



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Generación de un scFv neutralizante de la toxina C_{ss2} del
alacrán *Centruroides suffusus* a partir del scFv C1.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Everardo Remi Rodríguez Rodríguez

TUTOR:

Dr. Baltazar Becerril Luján (Instituto de Biotecnología, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. José Luis Montiel Hernández (Facultad de Farmacia, UAEM)

Dr. Humberto Flores Soto (Instituto de Biotecnología, UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

Agosto 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Baltazar Becerril Luján, dentro del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología, UNAM. Durante la realización de este trabajo se contó con la beca de Doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Numero de beca 207221) y el apoyo económico para el trabajo de los proyectos: Atención a Problemas Nacionales-CONACyT 246924 y DGAPIN-201913.

AGRADECIMIENTO

En especial a la Dra. Lidia Riaño Umbarila por su excelente trabajo de supervisión técnica para la realización de este trabajo, así como su gran amistad.

Al Dr. Baltazar Becerril por su importante asesoría y dirección durante la realización de este proyecto y darme la oportunidad de participar en su grupo de investigación.

Al Dr. Lourival D. Possani (IBT, UNAM) por la disponibilidad de colaboración en todo momento para con este proyecto.

Al técnico M. en C. Timoteo Olamendi Portugal por su gran ayuda en la purificación de las diferentes toxinas.

Dr. Hugo Serrano (Lab. Bioingeniería, Universidad de Colima), por su enorme asesoría y colaboración en construcción y análisis de los modelos tridimensionales.

Dr. Gerardo Anguiano (F. Ciencias Bioquímicas, Universidad Juárez del Estado de Durango), por facilitarnos el veneno y alacranes *C. suffusus*.

Por lo comentarios y sugerencias durante la realización del proyecto a los integrantes de mi comité tutorial:

- Dr. Humberto Flores Soto (IBT, UNAM)
- Dr. José Luis Montiel (F. Farmacia, UAEM)
- Dr. Joel Osuna (IBT, UNAM)

Al jurado evaluador de esta tesis

- Dra. Claudia Treviño Santa (IBT, UNAM)
- Dra. Isabel Gómez Gómez (IBT, UNAM)
- Dr. Karen Manutcharian (IIB, UNAM)
- Dr. Paul Gaytan Colin (IBT, UNAM)
- Dr. Enrique Rudiño Piñera (IBT, UNAM)

Por su excelente asesoría metodológica a los técnicos académicos

- Dr. Fernando Zamudio
- C. Leopoldo Güereca Gurrola
- Biol. Cipriano Balderas
- Dr. Ernesto Ortiz

Al personal de las unidades:

- Unidad de síntesis y secuenciación de ADN-IBT-UNAM
- Unidad de Bioterio IBT-UNAM

Al apoyo otorgado para asistir a cursos y congresos del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Al M. en C. Guillermo Fernández Taboada, por su amistad y excelente apoyo en el manejo de los roderos.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios BB y LDP por la ayuda y sugerencias que me brindaron durante toda mi estancia en laboratorio.

A TODOS mis amigos que indirectamente participaron este trabajo, que su compañía, apoyo y amistad hicieron que este trabajo fuera posible: Benjamín (chido carnal), Rosana, Juan, Selene, Héctor, Mayra, Alfonso (Puma), David, Rulo, Juan (Ingeniero), Octavio, Adán, Olga, Sebas, Marco, Mau, Ale, Edson, Efra, Mel, Pepe, A los Radicales, Fullerenos, Alacranes, Zombis, Colibrís de ultratumba, Rafitas Gorgoris, Barbas, Pumas, Mafia Rusa, 40's, Manatíes, Dragons...

A mi gran familia por su apoyo, confianza y alegrías, este triunfo es de ustedes también: a la mujer que más admiro, Mi Mamá (Hilda), a Jaime, a Jesús, Endia, Erika, Brenda, Edgar, Tabatha, Franco, Tomasita, Vero y Temiz.

Muy en especial a mi compañera y cómplice durante todos estos años, Dra. Blanca Jazmín Reyes Hernández, te amo

Esta tesis la dedico a las personas que me dieron su apoyo y cariño incondicional, sin las cuales no hubiera logrado culminar con esta meta académica y personal, especialmente a toda mi familia en particular a mi mamá Hilda, mi abuelita, a Jesús, a Jaime, a mis hermanos (Endia, Erika, Brenda y Edgar), mis sobrinos Tabatha y Franco. Y en especial a Jazmín que siempre ha estado a mi lado alentándome y provocando que sea mejor persona cada día, los amo.

INDICE

	Página
Resumen	11
Abstract	13
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	15
1.1 Estructura de los anticuerpos	12
1.2 Diversidad de secuencias en los anticuerpos	17
1.3 Fuerzas involucradas en la interacción antígeno-anticuerpo	18
1.4 Definición de especificidad y afinidad	19
1.5 Anticuerpos terapéuticos y recombinantes	20
1.6 Fragmento variable de cadena sencilla	22
1.7 Banco de fragmentos de anticuerpos humanos	23
1.8 Despliegue de bancos de variantes en las superficies de bacteriófagos (<i>phage display</i>) como sistema de aislamiento de fragmentos de anticuerpos	24
1.9 Biología de los bacteriófagos	24
1.10 Sistemas de despliegue en fagos	26
1.11 Tamizado de bancos de variantes por despliegue en fagos	28
1.12 Biosensores (SPR) y afinidad	31
1.13 Constantes cinéticas en la interacción anticuerpo-antígeno	34
1.14 Maduración <i>in vitro</i> de fragmentos de anticuerpos	37
CAPITULO 2: ANTECEDENTES	41
2.1 Terapia actual contra envenenamiento por picadura de alacrán	41
2.2 El veneno de los alacranes	43
2.3 Toxinas de alacranes del género <i>Centruroides</i>	44
2.4 Fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) humanos contra beta-neurotoxinas de alacrán	45
2.5 La toxina C _{ss2} del veneno del alacrán <i>Centruroides suffusus</i>	48
HIPOTESIS	50
OBJETIVO GENERAL	50
OBJETIVOS PARTICULARES	50
CAPITULO 3: METODOLOGÍA	51
3.1 Materiales	51

3.2 Veneno de alacranes	51
3.3 Purificación de las beta-toxinas	51
3.4 Secuenciación de ADN	52
3.5 Condiciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	52
3.6 Análisis estructural del modelo tridimensional; scFv RJI-2 con la toxina Css2 y generación del banco de variantes con mutaciones sitio dirigidas	42
3.7 Construcción del banco con mutaciones al azar	53
3.8 Despliegue en fagos de los bancos de scFvs	54
3.9 Rondas de tamizado con los bancos de fago-anticuerpos	54
3.10 Expresión de los scFvs en placa de 96 pozos	54
3.11 Pruebas de ELISA	55
3.12 Expresión y purificación de los scFvs	55
3.13 Ensayos de expresión	55
3.14 Pruebas de reconocimiento y determinación de los parámetros cinéticos de los scFvs hacia distintas toxinas mediante un biosensor de interacciones moleculares en tiempo real (Biacore)	55
3.15 Pruebas in vivo de la capacidad neutralizante de las variantes de scFvs contra distintas toxinas de alacranes	56
3.16 Ensayos in vivo de la capacidad neutralizante del scFv ER-5 y LR contra el veneno completo de <i>C. suffusus</i>	57
3.17 Ensayo de competencia por los epítopos en Biacore	57
3.18 Modelado de la estructura tridimensional del complejo scFv-toxina <i>in silico</i>	58
CAPITULO 4: RESULTADOS	59
4.1 Pureza y calidad del antígeno	59
4.2 Selección de templado dentro de la familia del parental C1 para maduración <i>in vitro</i>	59
4.3 Maduración <i>in vitro</i>: estrategia semi-racional	61
4.4 Evaluación de reconocimiento por la toxina Css2	63
4.5 Maduración <i>in vitro</i> por evolución dirigida	64
4.6 Análisis preliminar de los cambios de residuos aislados	65
4.7 La combinatoria de cambios como estrategia para mejorar las propiedades de interacción de los scFvs	68

4.8 Ensayos de expresión del scFv ER-5	73
4.9 Parámetros cinéticos y reactividad cruzada del scFv ER-5	74
4.10 Capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra la toxina Css2.	75
4.11 Capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra el veneno completo de <i>C. suffusus</i>	76
4.12 Pruebas <i>in vivo</i> de rescate	77
4.13 Competencia de reconocimiento por dos epítomos dentro de la toxina Css2	78
4.14 Evaluación de la capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra las toxinas Cn2 y CII1	79
4.15 Análisis estructural del scFv ER-5	80
CAPITULO 5: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	83
5.1 Discusión	83
5.2 CONCLUSIONES	90
CAPITULO 6: PERSPECTIVAS	91
ABREVIATURAS	92
REFERENCIAS	94
ANEXO	109

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Componentes en la estructura de un anticuerpo	16
Figura 2. Componentes de la estructura de un scFv	23
Figura 3. Bacteriófagos filamentosos utilizados para despliegue	28
Figura 4. Rondas de tamizado de un banco de fago-anticuerpos	29
Figura 5. Biosensor basado en el fenómeno de SPR	34
Figura 6. Cinéticas de interacción de tres fragmentos de anticuerpo	36
Figura 7. Similitud entre diferentes beta-toxinas de alacranes del género <i>Centruroides</i>	44
Figura 8. Curvas de interacción de cuatros scFvs provenientes del parental C1 contra la toxina C_{ss2}	60
Figura 9. Similitud entre dos beta-toxinas provenientes de especies del genero <i>Centruroides</i>.	61
Figura 10. Alineamiento de la línea región del FW3 de la línea germinal V_λ1 humana	66
Figura 11. Aportación del residuo G208 en la interacción con C_{ss2}	67
Figura 12. Modelos estructurales de los scFv RJI-2, ER-3 y ER-3a con la toxina C_{ss2}	68
Figura 13. Sensogramas que muestra la cinética de la interacción de distintos scFvs contra la toxina C_{ss2}.	69
Figura 14. Análisis de las diferentes variantes de scFv a nivel de interacción por la toxina C_{ss2}	70
Figura 15. Estabilidad funcional de las variantes de scFv	71
Figura 16. Genealogía de los scFv derivados del parental scFv C1	76
Figura 17. Ensayos de competencia por el reconocimiento hacia dos epítomos en la toxina C_{ss2}	79
Figura 18. Modelos generados <i>in silico</i> de los complejos binarios scFv-toxina	82

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Fragmentos variables de cadena sencilla neutralizantes, derivados de los parentales scFvs 3F y C1	47
Tabla 2. Dosis letales medias (DL ₅₀) de tres beta-toxinas	57
Tabla 3. Lista de mutaciones encontradas en los scFv derivados el parental C1 durante distintos procesos de maduración <i>in vitro</i>	60
Tabla 4. Rondas de tamizado contra la toxina C _{ss2} a partir del banco de variantes con mutaciones sitio dirigidas (estrategia semi-racional).	62
Tabla 5. Rondas de tamizado contra la toxina C _{ss2} a partir del banco con mutaciones al azar	64
Tabla 6. Mutaciones encontradas en los scFvs aislados y generados durante la maduración <i>in vitro</i> contra la toxina C _{ss2}	65
Tabla 7. Capacidad neutralizante de los scFvs ER-4a y ER-5 contra C _{ss2}	72
Tabla 8. Capacidad neutralizante de los scFvs ER-4a y ER-5 contra el veneno de <i>C. suffusus</i> .	72
Tabla 9. Constantes de afinidad de la variante ER-5 contra las toxinas C _{ss2} y C _{ss4} del veneno de <i>C. suffusus</i>	75
Tabla 10. Capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra la toxina C _{ss2}	76
Tabla 11. Pruebas de neutralización del veneno completo de <i>C. suffusus</i>	77
Tabla 12. Ensayo de rescate contra el veneno de <i>C. suffusus</i>	78
Tabla 13. Capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra las toxinas C _{n2} y C _{II1}	80

RESUMEN

En México, los alacranes pertenecientes al género *Centruroides* producen un tipo de veneno con la capacidad de causar severos síntomas de intoxicación e incluso la muerte en mamíferos. El veneno de estos artrópodos está conformado por un amplio número de péptidos, proteínas y compuestos orgánicos. Entre los péptidos más abundantes se encuentran las toxinas que afectan los canales iónicos y en particular, se destacan aquellas que afectan los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v). Estas toxinas, también denominadas beta-toxinas, ocasionan la despolarización anómala de células nerviosas alterando su funcionamiento normal, lo cual repercute en problemas fisiológicos graves, poniendo en riesgo la vida de las personas, principalmente niños y adultos mayores.

Cada veneno de alacrán del género *Centruroides* presenta entre 1 y 3 diferentes beta-toxinas de importancia médica dada su abundancia y toxicidad. Se ha demostrado que la neutralización de estos componentes por medio de anticuerpos o fragmentos de éstos, elimina completamente la toxicidad generada por el veneno completo en mamíferos. Es por ello que la generación de nuevos antivenenos está enfocada en obtener fragmentos de anticuerpos que neutralicen a cada beta-toxina presente en los venenos de los alacranes.

En el grupo de investigación del Dr. Baltazar Becerril, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, nos hemos dado a la tarea de identificar y optimizar a los denominados fragmentos variables de cadena sencilla de anticuerpos ó scFvs de origen humano, para que sean capaces de neutralizar a las distintas beta-neurotoxinas, con la finalidad de desarrollar un antiveneno de última generación. Mediante distintos procesos de tamizado de bibliotecas de scFvs desplegadas en fagos y la maduración *in vitro* de los fragmentos, hemos podido generar dos de ellos, denominados LR y RU1. El scFv LR es derivado del parental scFv 3F, mientras que RU1 proviene del scFv C1. Por separado, los scFvs LR y RU1, tienen la capacidad de neutralizar a la beta-toxina Cn2 y por lo tanto al veneno completo del alacrán *Centruroides noxius*. Recientemente se determinó que ambos scFvs se unen a uno de dos epítomos diferentes no sobrelapantes en las neurotoxinas. Al inyectar una mezcla de los scFvs RU1 y LR en pruebas *in vivo*, se logra una mejor neutralización del veneno del alacrán *C. noxius* que cuando se usan por separado. Estos resultados nos permiten proponer que al usar dos scFvs,

uno derivado de 3F y otro de C1, los cuales sean capaces de neutralizar a cada una de las beta-toxinas, se logrará mejorar la neutralización de los venenos completos.

Optimizar la nueva generación del antiveneno conformado por scFv humanos, requiere de la obtención de nuevas variantes de C1 y 3F neutralizantes de todas las beta-neurotoxinas. En este trabajo de investigación, se buscó generar un scFv derivado del parental C1 capaz de neutralizar a la toxina C_{ss2} del alacrán *Centruroides suffusus* cuyo epítipo es diferente al reconocido por los derivados del scFv parental 3F. En este momento se cuenta con el scFv LR, procedente de 3F, que es capaz de neutralizar a esta neurotoxina. Para cumplir esta meta, se implementaron dos estrategias de maduración *in vitro* sobre tres variantes de scFv derivadas de RU1, denominadas RJI-1, RJI-2 y RJI-3: evolución dirigida y un enfoque semi-racional en conjunto con tamizados de bancos de scFvs desplegados en fagos. Los métodos de maduración que se usaron permitieron identificar mutaciones que al ser combinadas dieron origen a un scFv (ER-5), capaz de neutralizar a las beta-toxinas C_{ss2}, C_{III1} y C_{n2}. Sobresale el hecho de que solo tres cambios de residuos incorporadas en los scFvs usados como templados, mejoraron la capacidad neutralizante hacia la toxina C_{ss2}. Los ensayos de neutralización del veneno completo de *C. suffusus*, demostraron que la combinación de los scFvs ER-5 y LR abaten completamente y de manera más eficiente, la toxicidad del mismo en comparación a cuando se usan por separado.

Otro producto adicional de este trabajo, fue la obtención de un scFv (ER-1), que amplió su reactividad cruzada hacia distintas neurotoxinas presentes en el veneno de otras especies de alacranes del género *Centruroides*. La caracterización de los scFv aquí reportados, reveló que pocas mutaciones fueron suficientes para obtener anticuerpos que denominamos “generalistas” es decir, con una amplia capacidad de neutralización hacia distintas neurotoxinas filogenéticamente relacionadas. De forma complementaria, el análisis de los residuos mutados, en el contexto de modelos tridimensionales de complejos scFvs-toxinas, permitió sugerir como se establece la ampliación del reconocimiento y el mejoramiento de la afinidad reflejado en la capacidad neutralizante hacia diferentes beta-toxinas.

En función de su amplia reactividad cruzada y su alta afinidad por diferentes beta-toxinas, los scFvs generados y caracterizados en este trabajo, son candidatos a formar parte de un antiveneno de última generación contra la picadura de alacranes mexicanos del género *Centruroides* y en algunos casos adicionalmente, darán lugar a nuevos scFvs.

Abstract

In Mexico, the scorpions of the genus *Centruroides* produce a type of venom with the ability to cause severe symptoms of envenoming and even death in mammals. The venom of these arthropods is composed of a large number of peptides, proteins and organic compounds. The most abundant peptides are toxins that affect ion channels and in particular those affecting voltage-dependent sodium channels (Na_v). These toxins, also called beta-toxins, cause abnormal depolarization of nerve cells disrupting normal functioning, which affects fundamental physiological processes, putting at risk the lives of people, mainly children and elderly.

Each venom from scorpions of *Centruroides* genus, contains 1-3 different beta-toxins of medical importance related to their abundance and toxicity. It has been shown that neutralization of these components by means of antibodies or derived fragments, completely eliminates the toxicity of the whole venom. This is the reason why, the development of new antivenoms is focused at obtaining antibody fragments that neutralize each beta-toxin present in the venoms of the scorpions.

In the research group of Dr. Baltazar Becerril at the Institute of Biotechnology of the UNAM, we have taken the task of identifying and optimizing the so-called variable fragments of single chain antibodies or scFvs of human origin, to be able to neutralize the various beta-neurotoxins, for the purpose of developing state of the art antivenoms against scorpion stings.

By means of different panning procedures, scFv libraries displayed on phages (phage display) and *in vitro* maturation of the antibody fragments, we could generate two of them, called LR and RU1. scFv LR was derived from parental scFv 3F, while scFv RU1 was from scFv C1. Separately, LR and RU1 scFvs, have the ability to neutralize beta-toxin Cn2 and therefore the whole venom from *Centruroides noxius*. Recently, we determined that both scFvs, bind to any of two different non-overlapping epitopes on the neurotoxins. By injecting a mixture of scFvs RU1 and LR in *in vivo* tests, results in a better neutralization of *C. noxius* scorpion venom as compared when injected separately. These results allow us to propose that by using two scFvs, one derived from 3F and one of C1, which are capable of neutralizing each of the beta-toxins, will assure the neutralization of whole venoms.

Optimization of the new generation of antivenoms constituted by human scFvs requires the generation of new variants of C1 and 3F capable of neutralizing all beta-neurotoxins. In this research, we sought to generate a scFv derived from parental C1 and cable of neutralizing toxin C_{ss2} from *Centruroides suffusus* scorpion through the binding of a different epitope to the one recognized by parental derivatives of scFv 3F. At this time, we have generated scFv LR derived from scFv 3F, which is able to neutralize this neurotoxin through a different epitope as the one recognized by different C1 derivatives. To meet this goal, two strategies of *in vitro* maturation on three variants of scFv derived from RU1, called RJI-1, RJI-2 and RJI-3 were implemented: directed evolution and a semi-rational approach in conjunction with several rounds of bio-panning on scFv libraries displayed on phage. The used maturation methods, allowed to identify mutations which when combined gave rise to scFv ER-5, capable of neutralizing the beta toxins C_{ss2}, C_{ll1} and C_{n2}. It is notable that only three residue changes incorporated into scFvs used as template, improved toxin neutralizing capacity towards C_{ss2}. Neutralization assays with whole venom of *C. suffusus*, demonstrated that the combination of scFvs ER-5 and LR completely neutralized and in a more efficient way, the toxicity of the whole venom as compared to when used separately.

Another product of this work was the generation of scFv ER-1, which extended its cross-reactivity to different neurotoxins in the venom of other scorpion species of the *Centruroides* genus. The characterization of the scFv here reported, revealed that few mutations were sufficient to obtain antibodies called "generalists" that is, with a broad neutralizing capacity towards different neurotoxins phylogenetically related. As a complement, the analysis of residues mutated in the context of three-dimensional models of scFv-toxin complexes, allowed to suggest an explanation for the recognition broadening and enhancement of the affinity reflected in the neutralizing capacity towards different beta-toxins.

Based on its extensive cross-reactivity and high affinity for different beta-toxins, scFvs generated and characterized in this work are candidates to constitute a next generation antivenom against the stings of Mexican scorpions of the *Centruroides* genus and in some cases additionally, will lead to new scFvs.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

Los **anticuerpos** o **inmunoglobulinas** son proteínas altamente especializadas, las cuales son producidas por el sistema inmune de los vertebrados. Estas moléculas tienen la función de reconocer, neutralizar y ayudar a eliminar una amplia variedad de moléculas ajenas al organismo, potencialmente peligrosas, denominadas genéricamente **antígenos**. Estas propiedades, han favorecido que los anticuerpos sean explotados para fines terapéuticos con gran éxito (revisado en Dübel and Reichert, 2014).

1.1 Estructura de los anticuerpos

Para lograr entender la eficiencia funcional de los anticuerpos es necesario describir su estructura. En la mayoría de los vertebrados existen 5 clases de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE). Todos estos isotipos comparten una estructura básica, la cual consiste en dos **cadena pesadas idénticas (H)** y dos **cadena ligeras (L)**, unidas por puentes disulfuro formando en esta región la denominada “bisagra” (**Fig. 1A**). Cada cadena H está formada por un **dominio variable (V_H)** en la región amino terminal (N-terminal) y dependiendo del isotipo, de tres a cuatro **dominios constantes (C_{H1-4})** en la porción carboxilo terminal (C-terminal). En tanto que, las cadenas L están constituidas por un **dominio variable (V_L)** y uno **constante (C_L)** (**Fig. 1**). Los dominios V_L pueden ser de dos clases; **kappa (κ)** o **lambda (λ)**. El par de dominios V_L y C_L, se encuentra unido por un puente disulfuro a su equivalente de dominios V_H y C_{H1} (**Fig. 1**).

Dentro de los **dominios variables (Fv)**, tanto de la cadena pesada (V_H) como ligera (V_L) se encuentran tres zonas hipervariables, seis en total, denominadas **regiones determinantes de complementariedad** o **CDRs** por sus siglas en inglés: *Complementarity Determining Regions* (**Fig. 1 y 2**). La mayoría de aminoácidos que interactúan con el antígeno se encuentran en estas seis regiones. Estructuralmente, los CDRs se caracterizan por formar asas (*loops*) (**Fig. 1B y 2B**), cuyo acomodo espacial global forma el sitio de unión al antígeno (**paratopo**). De esta forma, la variabilidad de los CDRs le confiere a cada anticuerpo, una determinada especificidad en el reconocimiento hacia cada región particular del antígeno (**epítopo**). Estas regiones determinantes de complementariedad se encuentran flanqueadas por residuos de aminoácidos que conforman, en su totalidad, el **andamiaje** o **FW** por sus siglas en inglés *framework*, del dominio variable. Éste, se subdivide en cuatro regiones (**FW 1-4**),

ordenadas con respecto a los CDR de la siguiente forma: **FW1-CDR1-FW2-CDR2-FW3-CDR3-FW4** tanto del dominio V_H como V_L (**Fig. 1A**). Estructuralmente, el andamiaje conforma dos láminas (hojas) beta (β) empaquetadas una frente a la otra generando la estructura denominada beta-sándwich, característica de los dominios de anticuerpo (**Fig. 1B y 2B**). De manera natural, la variabilidad de los residuos de aminoácidos presentes en el andamiaje es menor, por lo que su estructura es más conservada. Además de que el andamiaje sirve de sostén de los CDRs, juega un papel predominante en el correcto plegamiento y estructuración de los dominios variables (Fv).

La estructura completa de un anticuerpo asemeja la forma de una letra Y, cuyos brazos se denominan **Fab** por sus siglas en inglés *antigen binding fragment* (**Fig. 1**). Cada Fab contiene tanto a los dominios C_L y C_{H1} , como a los V_H y V_L , por lo que puede interactuar con el antígeno de manera independiente, confiriendo al anticuerpo el carácter divalente. El resto de la molécula está constituida por los dominios C de la cadena H conformando el llamado **fragmento cristalizante (Fc)** (**Fig. 1**). Esta región no participa en la interacción con el antígeno pero es reconocido por receptores celulares específicos, lo cual ocasiona respuestas efectoras mediante las cuales se elimina al antígeno unido al anticuerpo.

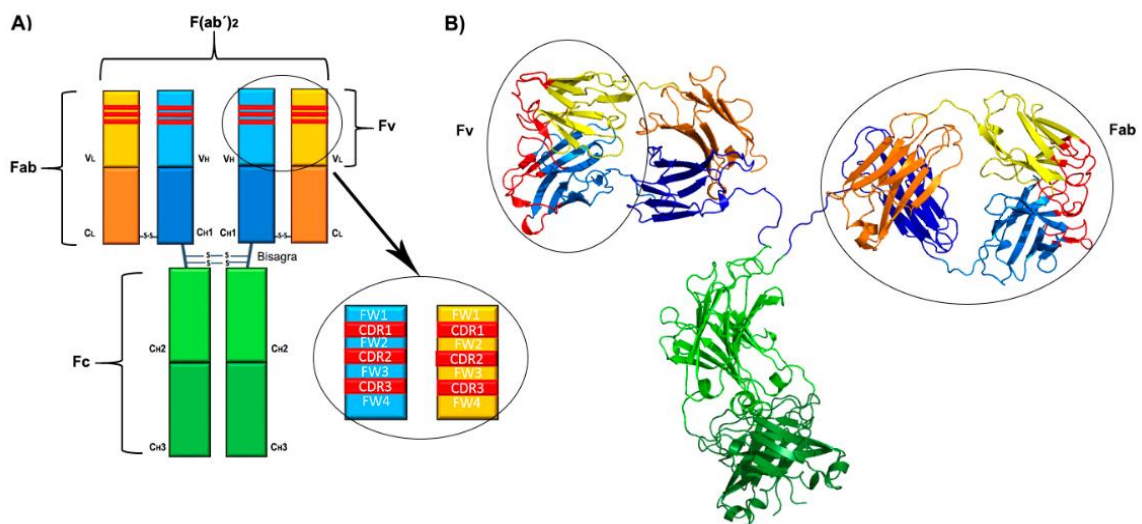


Figura 1. Componentes en la estructura de un anticuerpo. A) Esquema de la estructura de un anticuerpo en la que se muestra la ubicación de los dominios constantes (C) y los dominios variables (V) de las cadenas pesada (H) y ligera (L). Dentro de los dominios V_H y V_L se encuentran los CDRs (fronteras en color rojo). Asimismo, se indican algunos de los distintos fragmentos que se pueden generar de un anticuerpo como son: Fv, Fab, F(ab')₂ y Fc. **B)** Representación tridimensional de un anticuerpo. Esta imagen se generó a partir de la estructura determinada por cristalografía de rayos-X (PDB: 1IGT) (Harris et al., 1997).

1.2 Diversidad de secuencias en los anticuerpos.

El ser humano cuenta con un número determinado de genes (**líneas germinales**) que contribuyen a la formación de los dominios V en los anticuerpos. La generación de diversidad de los dominios ocurre principalmente por el mecanismo de **recombinación somática**. En este proceso, acontece un arreglo o ensamble de los genes de los dominios V de manera aleatoria y los cuales se combinan también con los dominios C de los anticuerpos.

La recombinación somática se da durante el desarrollo de los linfocitos B (células productoras de anticuerpos) en la médula ósea. El proceso de recombinación inicia con el arreglo de las secuencias de los dominios V_H , mediante la combinación de los genes V_H (*Variable*), D_H (*Diversity*) y J_H (*Joining*). Los genes V_H codifican para los CDR1 y 2, así como para una porción del CDR3 y para tres regiones del andamiaje (FW1-3) de este dominio variable. Los genes J_H codifican para otra porción del CDR3 y para la cuarta región del andamiaje (FW4). Así como, los genes D_H participan para generar mayor diversidad en el CDR3 (Abbas et al., 2014; Janeway et al., 2005). Para el caso de los dominios V_L , ya sea κ ó λ , se organizan de manera similar, excepto que carecen del gen D .

El repertorio de anticuerpos humanos, en términos del número de genes funcionales involucrados es de:

$$V_H=50, D_H=30, J_H=6, V_\kappa=40, J_\kappa=5, V_\lambda=30 \text{ y } J_\lambda=4.$$

La combinatoria matemática del número de estos genes (VDJ_H y VJ_L) da como resultado 3.5×10^6 diferentes ensambles de dominios variables. Sin embargo, la variabilidad puede ser menor debido a que hay preferencia de ciertos tipos de arreglos (Glanville et al., 2009; Hust et al., 2011). Se han reportado mecanismos adicionales que aumentan la diversidad de los dominios V. Uno de estos procesos ocurre principalmente en los genes J_H . Estas secuencias están sujetas a un procesamiento transcripcional diferencial (*splicing*), lo cual se ve reflejado en el número de residuos de aminoácidos que conforman la región correspondiente al CDR3- V_H (Hust et al., 2011; Janeway et al., 2005; Zhao and Lu, 2011). De hecho, se ha determinado que el CDR3- V_H puede presentar longitudes que van de entre 5 a 30 residuos de aminoácidos (Zemlin et al., 2003).

Adicionalmente, ocurre otro mecanismo de generación de diversidad. Este proceso, ocurre una vez que se presenta la activación de los linfocitos B, la cual sucede por el contacto

de las inmunoglobulinas (BCR) presentes en la membrana de estas células, con el antígeno. Los linfocitos B, reciben un estímulo que ocasiona su proliferación (**selección clonal**) y diferenciación hacia células plasmáticas. Durante estos procesos, el locus del anticuerpo sufre mutaciones a una tasa de entre 10^5 - 10^6 veces mayor a la que se presenta en el genoma normalmente (Odegard and Schatz, 2006; Oprea, 1999). Las mutaciones que se presentan son principalmente sustituciones de un solo nucleótido, las cuales ocurren principalmente en los genes recombinados codificantes de los dominios Fv (VDJ_H y VJ_L). A este mecanismo se le denomina **hipermutación somática** y permite la **maduración del anticuerpo**, ya que la generación de diversidad favorece la aparición de anticuerpos con mayor especificidad y afinidad por un blanco. Es importante mencionar que las mutaciones solo afectan a las células inmunitarias individuales y los cambios no se transmiten a la descendencia. Sin embargo, los genes de los anticuerpos mutados se almacenan en células de memoria del individuo, las cuales en un segundo encuentro con el antígeno pueden responder rápidamente (Abbas et al., 2014; Janeway et al., 2005). Debido a los procesos de recombinación e hipermutación somática, la diversidad de anticuerpos en el humano puede llegar a ser del orden de 10^{12} variantes, razón por la cual se considera que podrían virtualmente reconocer a cualquier molécula conocida.

La eficiencia de un anticuerpo en el reconocimiento, la neutralización y la eliminación de un antígeno dependen fundamentalmente de las propiedades fisicoquímicas de éstos, las cuales son reflejadas en la especificidad y la afinidad que presenten.

1.3 Fuerzas involucradas en la interacción antígeno-anticuerpo.

El reconocimiento y la correcta interacción entre los anticuerpos y sus respectivos antígenos, están regidas de manera general por dos parámetros esenciales. El primero de ellos involucra la formación de uniones reversibles no covalentes, como: enlaces electrostáticos, puentes salinos, puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals e hidrofóbicas, las cuales se presentan entre los residuos de aminoácidos presentes en el epítipo y el parátipo. La combinación que existe entre las fuerzas de atracción y repulsión dentro de ambas moléculas, son los parámetros que definen la persistencia de la unión (**afinidad**) (Goldblatt, 2001; Sundberg, 2009). Estas fuerzas de interacción son dependientes de la distancia entre los grupos funcionales que interactúan, mientras más cerca se encuentren los grupos, la unión se volverán más significativas. La cercanía de los residuos de aminoácidos presentes en el

epítopo y el parátopo está determinada por la **complementariedad** entre ambas regiones. Este es el segundo parámetro que determina la especificidad y la eficiente interacción del anticuerpo con el antígeno. La complementariedad, es la correspondencia que existe entre las superficies de interacción del epítopo y el parátopo (Goldblatt, 2001; Sundberg, 2009). Es decir, la geometría de la estructura tridimensional que pueden adoptar los CDRs y cuya superficie sea compatible con la estructura del epítopo. Cuanto mayor sea la complementariedad entre el anticuerpo y el antígeno, habrá un mejor acomodo del epítopo y el parátopo, lo cual facilitará la formación de múltiples interacciones y esto se verá reflejado en una mayor afinidad. Por lo descrito anteriormente se considera que la complementariedad es el parámetro que determina la especificidad del anticuerpo por un antígeno particular.

1.4 Definición de especificidad y afinidad.

Dos propiedades relacionadas con la interacción antígeno-anticuerpo, que deben tomarse en cuenta cuando se busca utilizar un anticuerpo para fines terapéuticos son **la especificidad y afinidad**. El término **especificidad** se refiere a la capacidad que tiene un anticuerpo de discernir en el reconocimiento y unirse a un determinado epítopo de entre varios a los que tiene acceso. Mientras que la **afinidad**, como mencionamos anteriormente, es producto de la suma de fuerzas de unión y repulsión entre un parátopo y el epítopo correspondiente. Tomando en cuenta estos parámetros, se pueden agrupar tres tipos de anticuerpos. La primera clase, está conformada por anticuerpos altamente específicos. Estas moléculas son capaces de discernir incluso entre pequeñas variaciones en el epítopo del antígeno, tanto a nivel de estructura primaria, como de conformación estructural estérica o configuración isomérica. Este tipo de anticuerpos denominados **monoespecíficos** o **monoreactivos** por definición reconocen estrictamente un solo epítopo en un antígeno particular. La superficie de interacción a nivel estructural que forman los CDRs del anticuerpo es altamente complementario con un epítopo. Esta característica facilita que haya un mejor acomodo del antígeno y se generen un mayor número de contactos entre los residuos del parátopo y el epítopo, lo cual se refleja en una mayor afinidad.

En el otro extremo, se han descrito también las propiedades de anticuerpos denominados **poliespecíficos** o **polireactivos**. Este grupo de moléculas presenta alta promiscuidad en el reconocimiento, uniéndose a una amplia diversidad de epítopos (Sethi et

al., 2006; Van Regenmortel, 2014; Wing, 1995). Estos anticuerpos no mantienen una complementariedad bien definida por un epítipo, por lo que la afinidad no es tan alta.

En el punto intermedio, se encuentran los anticuerpos denominados **oligoespecíficos** u **oligoreactivos**. Estas moléculas presentan moderada **reactividad cruzada**, es decir, reconocen un número restringido de epítipos con una conformación muy similar. Generalmente estos epítipos, se encuentran en antígenos relacionados filogenéticamente. Dada la similitud que existe entre los epítipos, la complementariedad del anticuerpo con éstos es significativa, con pequeñas diferencias a nivel de contactos entre residuos, por lo que las afinidades tienden a ser de valores intermedios a altos y muy parecidos (Notkins, 2004; Regenmortel, 1992).

Durante la respuesta inmune, se ha descrito la presencia de esta gama de anticuerpos. En una primera etapa, se observan anticuerpos polireactivos de baja afinidad cuya secuencia de residuos de aminoácidos presenta mínimos cambios con respecto a la línea germinal. Mientras que posterior a los procesos de maduración, se pueden encontrar moléculas oligoespecíficas y monoespecíficas con alta afinidad por el blanco (Chen et al., 1991; Eisen, 2014; Foote and Eisen, 1995; Oppezzo et al., 2004; Regenmortel, 1992; Wing, 1995). Aunque tradicionalmente se ha buscado aislar anticuerpos monoespecíficos para fines terapéuticos, en los últimos años ha habido un mayor interés en explotar la reactividad cruzada de los anticuerpos oligoreactivos para ese mismo fin (Beltramello et al., 2010; Deng et al., 2013, 2011; Lakhashe et al., 2007).

1.5 Anticuerpos terapéuticos y recombinantes.

La premisa de poder obtener anticuerpos específicos con alta afinidad por un blanco particular, ha llevado a explotar estas moléculas para distintos fines, principalmente para la terapia en pacientes. La estrategia más eficiente para la producción de anticuerpos terapéuticos ha sido emplear el sistema inmune natural. Mediante la inmunización de animales (caballos, ratones, conejos, entre otros) con uno o varios antígenos, se pueden obtener un grupo de anticuerpos, denominados **policlinales** (derivados de diferentes líneas de células B), que reconozcan un conjunto de diferentes epítipos antigénicos. Asimismo, al conjuntarse con técnicas de cultivo celular, se pueden obtener un tipo de anticuerpo que reconozca un epítipo particular, denominado **monoclonal** (Köhler and Milstein, 1975). Es

importante mencionar que en algunos casos, los anticuerpos deben de unirse al epítipo que se encuentre relacionado con la actividad biológica del antígeno, para que puedan ser neutralizantes. Sin embargo, el uso en humanos de anticuerpos de origen animal con fines terapéuticos, puede causar fuertes reacciones secundarias (revisado en Hansel et al., 2010). Para disminuir estos problemas, se han desarrollado distintas estrategias. Una de las tecnologías más recientes y eficiente ha sido la producción de anticuerpos humanos en ratones transgénicos (humanizados en cuanto a la producción de anticuerpos) (Lonberg, 2008). Sin embargo, es preferible generar anticuerpos contra antígenos que no comprometan la salud de los animales, es decir no tóxicos. En caso de que el antígeno sea tóxico, se deben buscar las dosis de éste que no maten o causen daños severos al organismo inmunizado, lo cual implica disponer de varios animales, lo que puede resultar costoso.

Por otro lado, el tamaño de los anticuerpos (peso molecular de 150 kDa), ocasiona que el tiempo de permanencia en el organismo sea de varias semanas (Holliger and Hudson, 2005) y la presencia de la región Fc en los anticuerpos completos ocasiona la activación de la respuesta efectora. Estas dos características, pueden resultar favorables en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (Scott et al., 2012), pero también puede provocar una respuesta inmunológica del individuo, contra los anticuerpos terapéuticos (Hwang and Foote, 2005; Swann et al., 2008). El uso de anticuerpos completos puede ser perjudicial en otros tipos de tratamiento en los que se necesite una rápida eliminación del agente nocivo. Para contrarrestar estos efectos, una segunda estrategia ha sido la generación de fragmentos de anticuerpos que contengan a los dominios variables (Fv) pero sin el fragmento Fc, por ejemplo, los formatos **Fab** o **(Fab)²** (**Fig. 1**). Estos fragmentos, se pueden obtener por medio de digestión enzimática de anticuerpos maduros (aislados post-inmunización de animales). El uso de fragmentos de anticuerpos de origen no humano como agentes terapéuticos en pacientes ha disminuido la aparición de efectos secundarios, pero estos aún siguen latentes. Adicionalmente, la eficiente producción de los anticuerpos es totalmente dependiente de la correcta respuesta inmune de un animal, lo cual puede llegar a ser muy variable.

En la actualidad, existen las herramientas que han permitido generar y producir fragmentos de anticuerpos que pueden sustituir el uso de animales. Esta tecnología, denominada **ingeniería genética** o de **ADN recombinante**, se basa en la manipulación *in vitro* del material genético codificante de los anticuerpos, mediante técnicas de biología

molecular (ver sección: 1.7). Los genes correspondientes a los fragmentos de anticuerpos se incorporan en vectores moleculares tipo plásmido. La información genética completa se introduce en distintos tipos celulares como son: células de mamíferos, levaduras o bacterias (revisado en Verma et al., 1998) como es el caso de *Escherichia coli*, con la finalidad de usar la maquinaria transcripcional de estas células para producir la proteína. Una de las mayores ventajas de los anticuerpos recombinantes, es que las secuencias de éstos, pueden ser de origen humano lo que permite disminuir casi totalmente la probabilidad de aparición de efectos secundarios al ser usados como agentes terapéuticos en los pacientes. El uso de estas tecnologías proporcionan varias ventajas: a) obtención de altos niveles de producto, si el sistema de expresión es el correcto; b) fácil manipulación genética, c) bajo costo de producción y d) homogeneidad en la producción. La eficiencia en la generación de anticuerpos recombinantes terapéuticos para uso en humano, se ve reflejada en el alto porcentaje de éstos (85%) aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) (Dübel and Reichert, 2014; Nelson and Reichert, 2009).

1.6 Fragmento variable de cadena sencilla

Utilizando la ingeniería de anticuerpos recombinantes, es posible construir una amplia variedad de formatos funcionales siempre y cuando se mantengan presentes los dominios V. De hecho, los dominios V_H y V_L pueden expresarse de forma individual, ya que pueden asociarse naturalmente para formar el fragmento variable (Fv) (**Fig. 1**). Sin embargo, la interacción entre estos dominios, al carecer del dominio C (ver sección 1.1) es poco estable y tienden a disociarse de manera rápida. Para solucionar este problema, entre las regiones variables mediante ingeniería genética, se acopló covalentemente un péptido conector, lo cual favorece la interacción entre los dominios V y su estructuración de forma funcional. A esta construcción se le denomina **fragmento variable de cadena sencilla** (scFv, por sus siglas en inglés *single chain variable fragment*) (**Fig. 2**) (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988). El péptido conector suele estar formado por una secuencia de 15 residuos de aminoácidos de carácter hidrofílico, siendo los más utilizados Ser y Gly en un arreglo $(Ser_4-Gly)_3$, debido a su flexibilidad (Holliger and Hudson, 2005; Huston et al., 1991).

Los scFvs tienen una masa molecular de alrededor de 30 kDa lo cual les confiere diversas ventajas terapéuticas: penetración más rápida y homogénea en los tejidos, un menor tiempo de permanencia en los tejidos y una rápida eliminación de la sangre. (Brekke and Sandlie, 2003;

Farajnia et al., 2014; Hagemeyer et al., 2009; Holliger and Hudson, 2005; Nelson and Reichert, 2009).

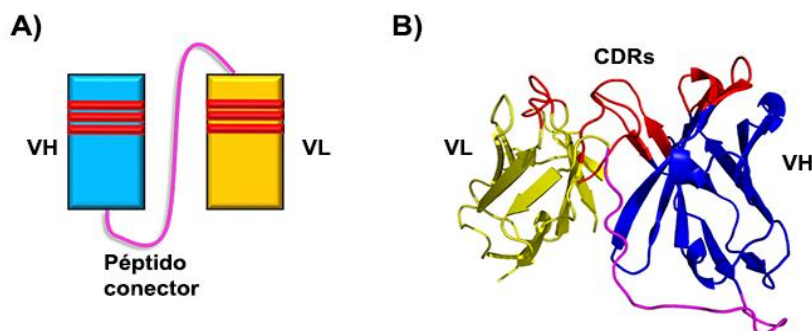


Figura 2. Componentes de la estructura de un scFv. A) Se esquematiza el fragmento variable de cadena sencilla constituido por los dominios V_H y V_L unidos por un péptido conector. B) Estructura tridimensional de un scFv. Se puede observar el plegamiento beta-sándwich característico de los dominios V de las inmunoglobulinas. Se muestra el andamiaje en amarillo y azul (FW) que sirve de sostén de los CDRs (mostrados en color rojo), con una estructura de asa característica (Modificado del PDB:2YBR) (Canul-Tec et al., 2011).

1.7 Bancos de fragmentos de anticuerpos humanos

La generación de scFv *in vitro* a partir de segmentos de ADN de origen humano, es un gran avance para la obtención de moléculas más seguras para usos terapéuticos. De manera similar a lo que ocurre en el sistema inmune, es necesario contar con una amplia diversidad de secuencias de dominios V para poder contender con la vasta variedad de antígenos. Al conjunto de secuencias de ADN que codifican para los diferentes fragmentos de anticuerpos, se les denomina **banco o biblioteca de variantes**. Estos bancos se construyen a partir de la manipulación *in vitro* de los genes de origen humano correspondientes a las regiones V_H y V_L . Las secuencias nucleotídicas codificantes de estos dominios se obtienen a partir de linfocitos B presentes en sangre periférica de un individuo o de una población determinada.

Metodológicamente, el ARNm que codifica para los anticuerpos, se recupera de las células B, las cuales son aisladas previamente (separadas en un gradiente de densidad) de una muestra de sangre. Posteriormente, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*) el ARNm se convierte a cADN, el cual servirá de templado o molde para amplificar las secuencias de las distintas familias de los dominios V_H y V_L ó V_K (Marks et al., 1991; Orlandi et al., 1989). La diversidad en los fragmentos de anticuerpos es producto de la combinación aleatoria de

los dominios V. Dependiendo del formato de anticuerpo que se desea generar, se acoplan las secuencias de los dominios V_H y V_L mediante un péptido conector para los scFvs ó a la secuencia de los dominios constantes para los Fabs. Los bancos de variantes, son construidos a partir de los genes obtenidos de organismos sanos no inmunizados (**banco nativo**) o de los linfocitos B de individuos que fueron sometidos a un régimen de inmunización o donantes con alguna enfermedad (**banco inmune**) (Hoogenboom, 1998; Hoogenboom and Winter, 1992; Marks et al., 1991; McCafferty et al., 1990). Existe un tercer tipo de banco denominado **sintético**, el cual involucra la modificación *in vitro* adicional de una o varias regiones de los dominios V, siendo las zonas más utilizadas los CDRs (Hanes et al., 2000; Knappik et al., 2000).

A partir de los bancos de variantes, es posible identificar y aislar fragmentos de anticuerpos con potencial terapéutico. Para lograrlo, se utilizan distintas herramientas descritas en la siguiente sección, las cuales permiten aislar fragmentos que reconozcan un blanco específico.

1.8 Despliegue de bancos de variantes en la superficie de bacteriófagos (*phage display*) como sistema de aislamiento de fragmentos de anticuerpos.

El sistema inmune tiene mecanismos muy eficientes de selección y amplificación de aquellos anticuerpos cuyas propiedades de unión hacia un antígeno sean las mejores (Janeway et al., 2005; Kindt et al., 2007). En el laboratorio, es posible imitar dichos procesos mediante el despliegue de fragmentos de anticuerpos en la superficie de fagos (*phage display*) o células (*cell display*) (revisado en King et al., 2014; Qin and Li, 2014; Sheehan and Marasco, 2015). De estas dos opciones, el despliegue en fagos (Smith, 1985), sigue siendo la técnica más utilizada para fragmentos de anticuerpos humanos ya que permite evaluar una amplia diversidad de secuencias proteínicas unidas en la superficie del bacteriófago y aislar aquellos fragmentos de anticuerpos con la capacidad de unirse a un antígeno, manteniendo la secuencia codificante de ADN (ver sección **1.7**).

Para poder entender el despliegue en fagos como sistema de aislamiento de fragmentos de anticuerpo, es necesario conocer un poco sobre las características morfológicas de los bacteriófagos así como su ciclo de vida.

1.9 Biología de los bacteriófagos

Los **bacteriófagos** o **fagos** son virus que infectan a bacterias gram-negativas y utilizan la maquinaria molecular de estas células, para poder propagarse. Para el despliegue de

proteínas en fagos, se ha recurrido a dos tipos de bacteriófagos: los lambda (T4 y T7) y los **filamentosos** (M13, f1 y fd) (Nixon et al., 2014; Russel et al., 2004; Smith and Petrenko, 1997; Wilson and Finlay, 1998). Estos últimos han sido los más utilizados, incluyendo este trabajo, dado que presentan ciertas ventajas con respecto a los lambda como son: su carácter no lítico, la forma de infección de bacterias es dependiente del pilus F (estructura bacteriana en forma de pelo que se utiliza para la conjugación), su fácil manejo y almacenamiento de los bancos dentro del hospedero (Kehoe and Kay, 2005; Russel et al., 2004; Willats, 2002). Por estas razones, nos enfocaremos en describir solo este tipo de fagos.

Los fagos filamentosos, presentan una conformación cilíndrica alargada de entre 90 nm de largo y 7 nm de ancho, su información genética está contenida en un genoma de ADN de cadena sencilla (ssADN) (**Fig. 3**). Esta información se encuentra dentro de 9 genes (que codifican para 10 proteínas) y dos regiones intergénicas (genes de replicación y ensamblaje). La información genética comprendida en 6400 nucleótidos (bases), se encuentra encapsulada por cinco proteínas de la cubierta denominadas **PIII, PVI, PVII, PVIII y PIX** (**Fig. 4**). La proteína PVIII es la que se encuentra en mayor proporción (2800 copias), la cual recubre al ADN de cadena sencilla (ssDNA por sus siglas en inglés *single stranded DNA*) conformando una estructura cilíndrica, conteniendo en un extremo a las proteínas PVII y PIX (4 a 5 copias cada una). En el otro extremo, se encuentran las proteínas PIII y PVI (4 a 5 copias cada una) de tal manera que finalmente se conforma la cápside viral completa (**Fig. 3**) (Marvin, 1998; Marvin et al., 2006; Rasched and Oberer, 1986; Russel, 1991).

El ciclo de vida de los fagos filamentosos se inicia con la unión de la proteína PIII al *pilus* de la bacteria. Una vez que ocurre el contacto, el *pilus* se retrae ocasionando que el fago se una a la membrana bacteriana. Esto facilita que el material genético sea transferido a la célula hospedera donde es convertido en ADN de doble cadena (dsDNA por sus siglas en inglés *double stranded DNA*) y subsecuentemente se da la síntesis de las proteínas del fago, utilizando la maquinaria de transcripción y traducción de la bacteria (Lubkowski et al., 1998; Riechmann and Holliger, 1997).

Las proteínas traducidas PVIII, PVII, PIX y PIII, se insertan en la membrana interna de la célula bacteriana para ser transportadas al periplasma, mientras también ocurre la replicación del ssDNA. Cuando la concentración de la proteína PV llega a un nivel crítico, ésta cubre a la cadena de ssDNA recién sintetizada para que no sea convertida en dsDNA, lo

cual funciona como señal de empaquetamiento. El complejo ssADN-PV se captura y se transporta por las proteínas PI, PIV y PXI a la región interna de la membrana, donde ocurre el ensamblaje y la extrusión de nuevas partículas virales mediante un mecanismo de formación de poro (Marciano et al., 1999). Un promedio de 5 copias de PVII y PIX se sitúan en uno de los extremos de la cápside, mientras que la proteína PV se remueve por la enzima tiorredoxina y sustituida por la proteína PVIII para conformar la estructura cilíndrica típica de los virus filamentosos (**Fig. 3**). Durante la secreción de la partícula viral se incorporan en el otro extremo cinco copias de cada proteína PVI y PIII, con ésta última ayudando a la liberación del fago al espacio extra celular (Clackson and Lowman, 2004; Feng et al., 1997; Guan et al., 2008; Konings et al., 1995; Marciano et al., 1999; Opalka et al., 2003).

Una vez que se ha descrito como están constituidos los fagos filamentosos, se puede definir al despliegue en fagos, como la expresión de proteínas de interés (en nuestro caso fragmentos de anticuerpos) fusionados con alguna de las proteínas de la cubierta del fago (**Fig. 3B**). Esto se logra mediante la fusión del segmento que codifica para los fragmentos de anticuerpos al gen correspondiente a alguna de las proteínas de la capsida: *pIII*, *pVI*, *pVIII* ó *pIX* (**Fig. 3B y C**). Este procedimiento permite lograr un acoplamiento entre el fenotipo (el fragmento de anticuerpo desplegado) y el genotipo (segmento del gen correspondiente del fragmento de anticuerpo contenido en ssDNA) de la partícula infectiva. De esta forma, los fagos se convierten en el vehículo que contiene la información genética mientras que expone la proteína de interés en la superficie y mantiene la capacidad de replicarse.

1.10 Sistemas de despliegue en fagos

Se han descrito tres sistemas para lograr el despliegue de proteínas en bacteriófagos, los cuales se denominan: fago, **fagémido** e híbrido.

En el sistema de fago, que es el más básico, se fusiona el gen de la proteína de interés (p. e. scFv) con algún gen de la proteína de la cubierta del fago, de tal forma que se despliega la proteína en cada una de las copias de las moléculas de la cubierta (**Fig. 3B**). Si se fusiona un scFv a la PVIII, se desplegará el fragmento de anticuerpo en cada una de las 2800 copias, denominándose a este tipo de despliegue como multivalente. Este sistema no es el óptimo, dado que el alto número de copias de scFvs desplegadas ocasiona el fenómeno de avidéz, el cual ocurre cuando una molécula multivalente (varios sitios de unión al antígeno) interactúa

con los antígenos presentes, en donde la fuerza de unión total tiende a ser mayor que la interacción de un solo sitio, por lo cual que no permitiría discriminar entre fragmentos de anticuerpo de baja ó alta afinidad. La avidéz ocasiona que los valores de afinidad sean alto y no corresponda a la suma de la afinidad cada sitio de unión por separado. Aun cuando se utilicen otras proteínas que se encuentren en menor número de copias y el fenómeno de avidéz disminuya, se pueden generar problemas de ensamble ocasionados por la cercanía de las moléculas desplegadas. Si se hace la fusión en la proteína PIII de la cubierta, que es una de las más utilizadas para despliegue, saturando con las proteínas desplegadas, se disminuye la eficiencia de infección del fago. Para evitar estos problemas, se ha desarrollado el sistema denominado **fago-fagémido** utilizado en este trabajo.

Un fagémido es un plásmido que contiene un marcador de resistencia a algún antibiótico (por ejemplo: Ampicilina; *Amp r* y/o Kanamicina; *Kan r*), un origen de replicación bacteriano (*ColE ori*) y uno de bacteriófago (*M13 ori*), un promotor (generalmente *plac*), un segmento que codifica para un péptido que permite direccionar el producto de fusión al periplasma (péptido señal) y un gen de proteína de cubierta en la cual se quiera hacer el despliegue (generalmente *pIII*), fusionado al gen del fragmento de anticuerpo (**Fig. 3C**). Una de las ventajas de este sistema, es que el fagémido es usado para transformar células, el cual es amplificado y purificado como cualquier plásmido. El despliegue de la proteína de interés en este sistema se logra cuando se da la co-infección de las bacterias con un segundo fago denominado ayudador (*helper*). Este virus contiene la información genética que codifica para todas las proteínas de la cápside viral. Sin embargo, la replicación del ADN del fago ayudador es menos eficiente que la del fagémido, dando una proporción aproximada de 100:1, por lo que el ADN del fagémido es empaquetado preferencialmente. Debido a que el fago ayudador permite sintetizar las proteínas de la cubierta incluidas algunas copias de la proteína de despliegue, la cápside del fagémido contendrá proteínas de cubierta fusionadas al fragmento de anticuerpo y proteínas silvestres, haciendo que el despliegue de la proteína de interés sea prácticamente **monovalente**, es decir que solo una de las 5 copias de las PIII está fusionada al scFv (**Fig. 4B**). El carácter monovalente, a diferencia del polivalente asociado al sistema de fago completo, hace más eficiente el poder identificar a los de fragmentos de anticuerpos con mejores propiedades de unión. Este sistema presenta otras ventajas con respecto al sistema de fago tales como fácil manipulación, estabilidad genética y obtención de fragmentos de

anticuerpos solubles (no fusionados) sin necesidad de cambiar de vector (Bradbury and Marks, 2004; Hoogenboom, 1998; Hoogenboom and Chames, 2000; Kramer et al., 2003).

Por último, el sistema híbrido es similar al de fago, pero se trata de favorecer un despliegue monovalente. Para lograr esto, dentro del material genético se tiene una segunda copia del gen de la proteína de cubierta que fue utilizada para el despliegue, pero bajo el control de un promotor diferente (Krieger et al., 2009; McConnell and Hoess, 1995; Zwick et al., 2000).

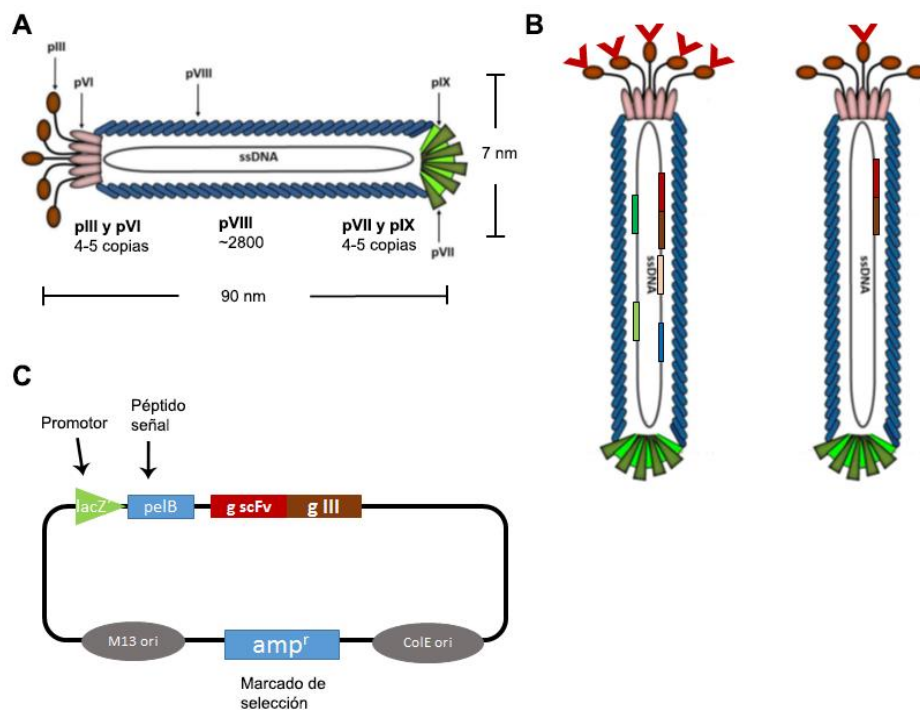


Figura 3. Bacteriófagos filamentosos utilizados para despliegue. (A) Representación de un fago filamentoso. Se muestra la composición y ubicación de las proteínas de la cápside viral. (B) Se esquematiza el tipo de despliegue multivalente (izq.) y monovalente (der.) sobre la proteína PIII (representada en color café), utilizando los sistemas de fago y fagémido respectivamente. Es importante observar la composición del material genético dentro del fago. En (C) se esquematiza la información genética que contiene un fagémido: el promotor (sistema *lacZ*), péptido señal (PelB), fragmento de anticuerpo (*gscFv*), proteína de despliegue (*gIII*), los orígenes de replicación (M13 y ColE) y el marcador de resistencia a antibiótico (modificada de Georgieva and Konthur, 2011).

1.11 Tamizado de bancos de variantes por despliegue en fagos

El despliegue en fagos ha sido una herramienta muy poderosa para aislar fragmentos de anticuerpos con fines terapéuticos (revisado en Bradbury and Marks, 2004; Chan et al.,

2014; Winter et al., 1994; Zhao et al., 2014). Esto se puede entender en términos de que la técnica permite explorar una amplia variedad de secuencias nucleotídicas (alrededor de 1×10^{10}) con el propósito de identificar fragmentos de anticuerpos con propiedades de unión específicas. En este trabajo, denominaremos al banco de variantes de scFv desplegadas en fagos como biblioteca de **fago-anticuerpos**. Para lograr identificar variantes que reconocen a un blanco en particular, se parte de la población de fago-anticuerpos provenientes de un banco de variantes (ver sección 1.7) para entonces someterlas a **rondas de tamizados**. La **Figura 4** describe los pasos básicos que se realizan durante un proceso de tamizado.

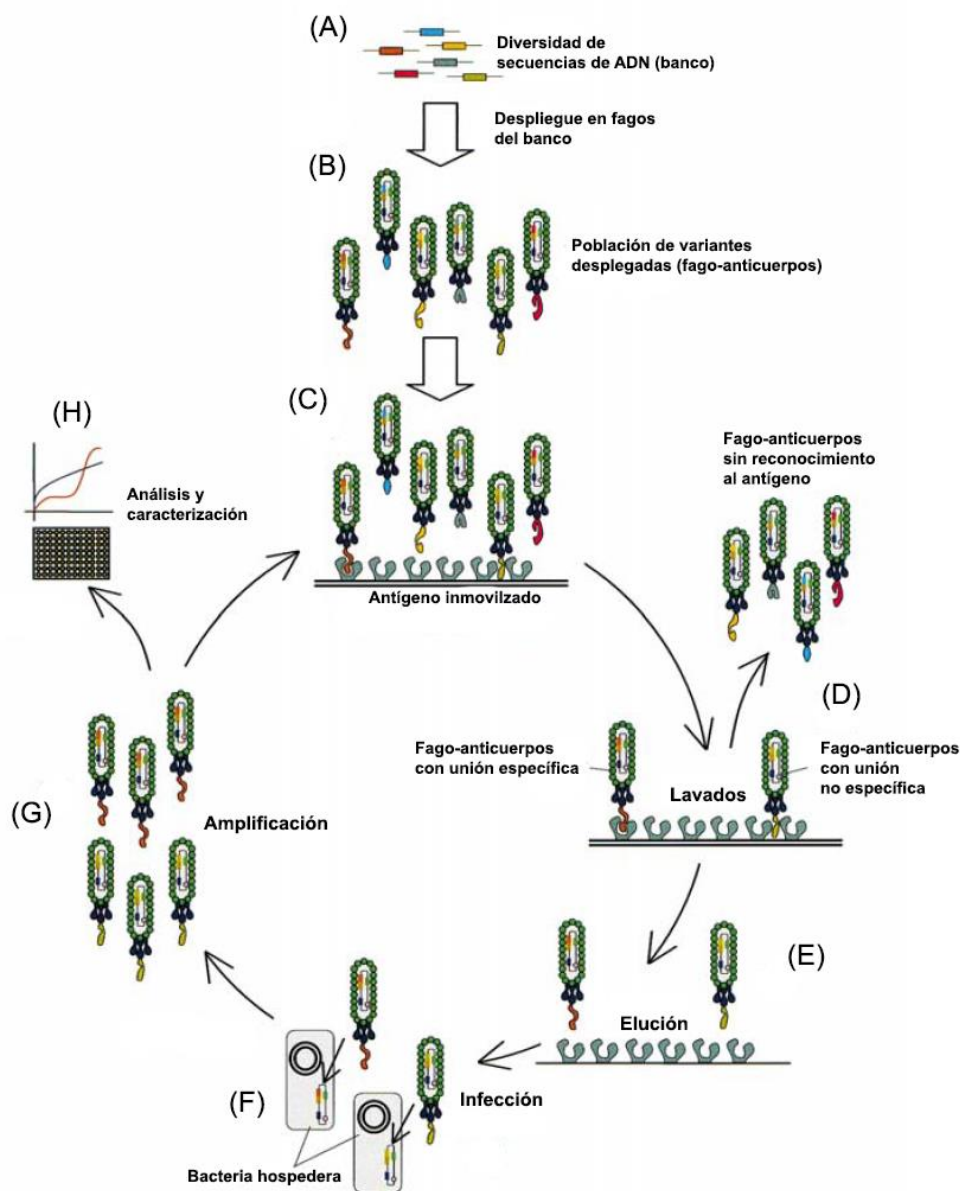


Figura 4. Rondas de tamizado de un banco de fago-anticuerpos. **A)** Grupo de distintas secuencias de ADN que codifican para diferentes fragmentos de anticuerpo (banco de variantes). **B)** El repertorio de fragmentos de ADN que codifican para las variantes de anticuerpo, es clonado en un sistema de despliegue en fagos (en nuestro caso en el sistema de fagémido), para producir un conjunto fago-anticuerpos. **C)** El banco de fago-anticuerpos es expuesto a un antígeno inmovilizado en una superficie sólida. **D)** Mediante lavados exhaustivos, son removidos aquellos fago-anticuerpos que no presentaron unión con el blanco. **E)** Se recuperan aquellos fragmentos de anticuerpos que presentaron algún tipo de unión con ayuda de alguna condición que debilite la interacción de los fago-anticuerpos con su blanco. **F)** La población de variantes recuperadas son amplificadas mediante la infección de un nuevo cultivo de bacterias. **G)** Los fago-anticuerpos amplificados forman una segunda población (sub conjunto del banco original) que denominaremos también como familia, que puede ser sometida a un nuevo proceso de tamizado. **H)** Las poblaciones pueden ser utilizadas para nuevas rondas de tamizado y/o para realizar la evaluación funcional de las variantes dentro de éstas (modificada de Willats, 2002).

Los **ciclos de tamizado** pueden repetirse con la finalidad de disminuir el número de fragmentos de anticuerpos que presenten una unión inespecífica, así como con el propósito de obtener un enriquecimiento de aquellos que tengan las mejores propiedades de unión. Adicionalmente, durante los ciclos de tamizado, es posible realizar modificaciones en las condiciones de cada ronda. Por ejemplo, implementar una competencia por el antígeno, disminuir la concentración del mismo, hacer una selección negativa, aumentar el número de lavados, incrementar la temperatura de incubación, entre otras. Todo esto se estaría haciendo con el fin favorecer la selección de variantes con mejores propiedades de unión como alta afinidad y/o estabilidad.

Para poder identificar variantes con propiedades de unión específica, posterior a un proceso de tamizado, las distintas variantes de fragmentos de anticuerpos presentes en la población recuperada, son evaluadas de forma individual. Las clonas aisladas se someten a ensayos de reconocimiento para poder discernir entre los fragmentos que tengan mejores propiedades de unión. Uno de los métodos más utilizados es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Este método permite identificar aquellos fragmentos de anticuerpo que presentan buenos niveles de unión con el antígeno mediante la medición de valores de coloración en el ensayo. Aunque, actualmente existen instrumentos que permiten lograr una mayor sensibilidad y al mismo tiempo un mejor entendimiento de las interacciones moleculares, como son los **biosensores**. Es importante mencionar que la eficiencia de la utilización del despliegue en fagos se ve

reflejada en el alto número de fármacos que se han aislado con el uso esta tecnología (revisado en Nixon et al. 2014) .

1.12 Biosensores (SPR) y Afinidad

Los **biosensores** son una herramienta que ha permitido caracterizar las interacciones de un gran número de macromoléculas (revisado en McDonnell, 2001; Nguyen et al., 2015; Torreri et al., 2005) debido a que es posible dar seguimiento en tiempo real y con alta sensibilidad y precisión a los parámetros de interacción entre dos moléculas. Con estos equipos es posible determinar eficientemente las constantes cinéticas (que permiten calcular la afinidad) (ver secciones **1.3, 1.4 y 1.11**) de un fragmento de anticuerpo por su antígeno.

La tecnología que utilizan estos biosensores se basa en el fenómeno óptico llamado **resonancia de plasmones superficiales** (SPR, por sus siglas en inglés *Surface plasmon resonance*) (Wood, 1902). El primer equipo de medición basado en esta tecnología fue uno de la marca **Biacore** (GE Healthcare®) en 1990. A partir de éste, se han generado una amplia variedad de otros dispositivos más modernos, incluso de la misma marca para aplicaciones altamente especializadas (GEHealthcare, 2015; McDonnell, 2001). Un biosensor que utiliza SPR, permite medir los cambios en el índice de refracción en una superficie ocasionados por los cambios de masa que ocurren como consecuencia de la interacción entre dos especies moleculares, una de las cuales está inmovilizada sobre dicha superficie.

Los plasmones son oscilaciones colectivas de electrones en un metal producidos por la excitación de los mismos con fotones. Para que el fenómeno de SPR se produzca, es necesario tener una condición de reflexión total interna (TIR, por sus siglas en inglés, *Total Internal Reflection*). Este estado se produce cuando un haz de luz atraviesa dos medios con índice de refracción diferentes y el ángulo de incidencia es mayor que un valor crítico para que éste sea reflejado. En el equipo Biacore, la luz polarizada proveniente de un prisma pasa de un medio de mayor índice de refracción (placa de vidrio) e incide sobre una capa conductora de metal (oro) sobre la cual se encuentra inmovilizada una de las moléculas interactuantes conformando un medio con menor índice de refracción. En la frontera entre estos dos medios, el haz de fotones que incide con un ángulo mayor a un valor crítico, produce el fenómeno TIR. Parte de los fotones incidentes, generan un campo eléctrico en la superficie del metal que por desaparecer cuando ha penetrado unos cientos de nanómetros, es denominado campo evanescente. El campo evanescente puede interactuar con la superficie metálica

ocasionando la oscilación de electrones superficiales o **resonancia superficial de plasmones** o **SPR** por sus siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance* (Biacore and GEHealthcare, 2002) (**Fig. 5A**). Por lo tanto, la resonancia es el resultado del movimiento de los plasmones ocasionados por la excitación de éstos, generada por la energía de los fotones. El fenómeno de SPR es dependiente del índice de refracción de la capa sobre la cual la luz es reflejada, por lo que el grosor de la superficie es muy importante. La respuesta a un cambio de masa en la superficie del material conductor, como por ejemplo la unión de una macromolécula en solución a un ligando inmovilizado, ocasiona un desplazamiento en el ángulo de refracción y por ende en la resonancia de los plasmones (**Fig. 5A y C**). Los cambios en el índice de refracción que se dan en la superficie metálica por efecto de las interacciones moleculares, permite determinar con exactitud la cantidad de masa que se une a las moléculas inmovilizadas en la fase sólida.

En el equipo Biacore, la medición del fenómeno de SPR que se traduce en la cuantificación de los parámetros cinéticos involucrados en la interacción que existe entre dos moléculas, se logra por medio de tres componentes principales un detector de SPR, un cartucho sensor (*Sensor Chip*) y un sistema de micro-fluidos (Biacore and GEHealthcare, 2001; GEHealthcare, 2015) (**Fig. 5B**).

El detector de SPR, registra los cambios del índice de refracción, ocasionados por la unión de dos especies moleculares, con lo cual se puede establecer la cantidad de masa unida en todo momento. La resolución del equipo es capaz de detectar el cambio de 1 pg/mm^2 equivalente a una **unidad de resonancia** (RUs, por sus siglas en inglés, *resonance units*) (Biacore and GEHealthcare, 2001; GEHealthcare, 2015). El sensor chip consiste en una lámina de vidrio cubierta con una fina capa de oro, la cual presenta una matriz carboximetilada (chip CM5) que forma un ambiente hidrofóbico. En esta matriz es posible inmovilizar macromoléculas de forma covalente, mediante la reacción de los grupos carboxilos de la superficie con los grupos amino de la proteína que se desea unir en el chip. Esta molécula inmovilizada en el chip se le denominada genéricamente como **ligando**. Posteriormente el cartucho sensor con la proteína unida se utiliza para determinar las constantes cinéticas de su par interactuante. Este último, denominado genéricamente **analito**. El sistema de micro-fluidos es un sistema muy fino de control de paso de forma continua hacia el cartucho sensor, de una solución o muestra que contiene al analito. La alta precisión

del sistema de micro-fluidos, permite inyectar volúmenes pequeños (hasta 5 μ l) con la seguridad de que la concentración del analito se mantendrá constante durante el contacto con el ligando, lo cual se ve reflejado en una alta sensibilidad de las mediciones de este equipo.

En resumen, un analito (p. e. fragmento de anticuerpo) a una concentración definida es puesto en contacto, en un flujo continuo, con el ligando (antígeno) inmovilizado, lo que ocasiona que ambas moléculas interaccionen. Cuando ocurre la unión entre ambas moléculas ocasiona un incremento en la masa de la superficie y por lo tanto el cambio en el índice de refracción y en la resonancia de plasmones de superficie, lo cual es detectado y expresado en **unidades de resonancia o respuesta** que cambian en función del tiempo (segundos: s) (**Fig. 5C y D**). Es importante mencionar que los cambios en los ángulos de refracción producidos por la diferencia en la masa de la superficie del chip, es independiente de la naturaleza química de las muestras que son analizadas, por lo que es prácticamente igual para todas las proteínas y péptidos, y muy similar para glicoproteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Torreri et al., 2005).

Los datos obtenidos, producto de la unión de dos especies moleculares, se muestran como gráficas denominadas **sensogramas**, los cuales nos ayudan a tener un primer indicio del comportamiento de la interacción entre ambas moléculas. Un sensograma típico se divide en tres diferentes fases: 1) la **línea base** donde se observan los RUs iniciales, dados solamente por el ligando unido a la matriz del chip a un flujo constante de solución amortiguadora. 2) Fase de **asociación**, esta ocurre cuando una muestra de analito se pone en contacto con el ligando y ocurre la interacción entre ambas moléculas, lo cual se ve reflejado en el aumento en la pendiente del trazo en el sensograma y 3) la fase de **disociación** que ocurre posterior al paso del analito. Éste tiende a perder la interacción con el ligando, provocando una disminución en la señal, lo cual se ve reflejado en la caída en la curva del sensograma (**Fig. 5D**). Para realizar una inyección nueva de analito a una concentración diferente a la realizada previamente, es necesario regresar a la línea base. Esto se logra mediante el uso de una solución de **regeneración**, que permita romper las interacciones entre ambas moléculas que aún se mantengan unidas, sin dañarlas permanentemente (**Fig. 5D**).

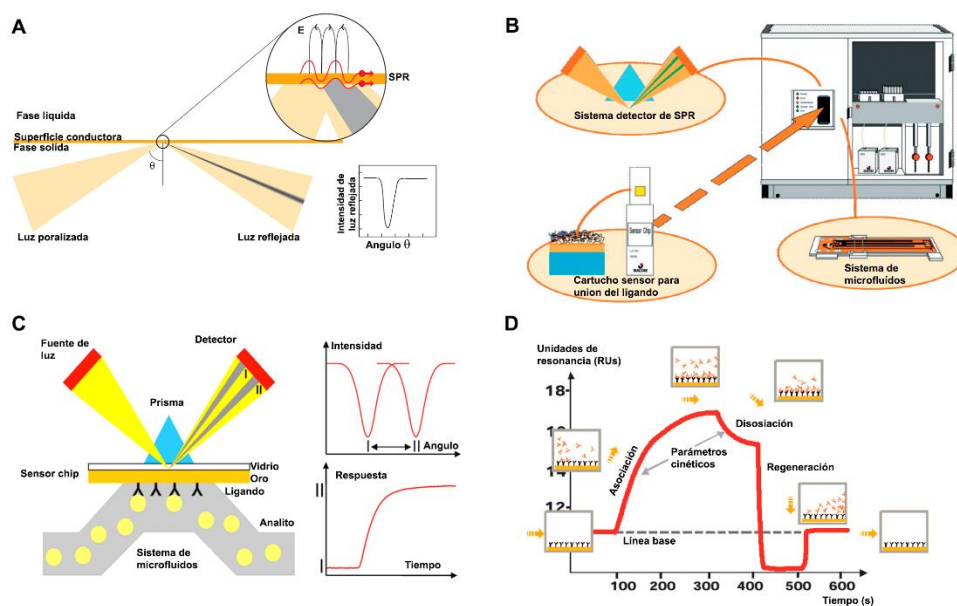
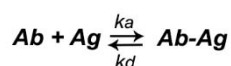


Figura 5. Biosensor basado en el fenómeno de SPR. **A)** Los plasmones se generan por una vibración colectiva de electrones (resonancia), en la superficie de un material conductor ocasionado por la excitación de electrones proveniente de un haz de luz polarizada. Estos plasmones se propagan (circulo) a través de la superficie del metal y el medio de bajo índice de refracción (fase líquida) convirtiéndose en el fenómeno de SPR. Cuando se modifica el grosor del material, tanto la resonancia de plasmones superficiales como el ángulo de reflexión de la luz cambian. **B)** Se muestran los tres componentes básicos de un equipo Biacore, que permiten la medición de la interacción de dos especies moleculares. **C)** Se esquematiza el funcionamiento de un biosensor en tiempo real. Un ligando específico se inmoviliza en un cartucho sensor (*chip*) y posteriormente se pone en contacto con un analito a una concentración definida. Al mismo tiempo, un haz de luz polarizada por un prisma, incide en la superficie del chip ocasionando el movimiento oscilatorio de los plasmones. La interacción de las moléculas modifica el ángulo de resonancia y reflexión (derecha superior) lo cual se traduce en unidades de respuesta a través del tiempo (derecha inferior). **D)** Los resultados obtenidos se muestran como sensogramas, los cuales nos indican el comportamiento de la interacción de las moléculas dado por dos etapas principales, la asociación y la disociación. A partir de estos datos, se pueden determinar las constantes cinéticas asociadas a la interacción entre dos especies moleculares.

1.13 Constantes cinéticas en la interacción anticuerpo-antígeno

El conjunto de datos obtenidos en los biosensores nos permite calcular los **parámetros cinéticos** de la interacción entre dos especies moleculares. Mediante esta información, es posible poder discernir de manera cuantitativa, entre los fragmentos de anticuerpo que tengan mejores propiedades de unión por un blanco.

La interacción de un anticuerpo y su antígeno correspondiente, está definida por la siguiente fórmula:



Donde Ab: anticuerpo libre, Ag: antígeno libre, k_a : velocidad de formación del complejo Ab-Ag, k_d : velocidad de disociación del complejo.

A partir de las dos constantes cinéticas; **velocidad de disociación (k_d ó k_{off})** y **velocidad de asociación (k_a ó k_{on})**, es posible determinar la **constante de disociación en equilibrio (K_D)**, definida como **constante de afinidad**. El valor de la afinidad (K_D), se calcula utilizando las velocidades de formación del complejo (k_a) y la tasa de disociación de este (k_d), como se muestra en la siguiente fórmula:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

Es necesario recordar que el valor de afinidad (K_D), es de gran importancia dado que la adecuada funcionalidad de los anticuerpos está dada por la calidad de interacción que estos tengan con el antígeno (ver sección 1.3). Biológicamente, el valor de K_D se define como la concentración de anticuerpo necesaria para mantener un 50% de antígeno unido. Es por eso que los valores de afinidad están dados en concentración molar (M). Tomando en cuenta esto, cuanto menor sea el valor de K_D mayor será la afinidad, puesto que se necesita una menor concentración de anticuerpo para tener un 50% de antígeno unido. Consecuentemente, la afinidad de un anticuerpo es una de las mayores propiedades que pueden afectar la potencia terapéutica de estas moléculas. Cuando un anticuerpo presenta una alta afinidad la cantidad necesaria de éste para una correcta función terapéutica será menor (Adams et al., 1998; Dübel and Reichert, 2014b; George, 2000; Jackson et al., 1998; Zhu et al., 2003).

De manera natural, la respuesta inmune primaria produce anticuerpos de baja afinidad (K_D) que puede oscilar entre 1×10^{-5} y 1×10^{-6} M (Foote and Eisen, 2000, 1995), mientras que como resultado de los procesos de maduración, se han caracterizado anticuerpos de origen humano con valores de entre 1×10^{-9} a 1×10^{-11} M (Poulsen et al., 2011; Rathanaswami et al., 2005; Riaño-Umbarila et al., 2011) (ver sección 1.4).

Si bien el valor de K_D es un parámetro importante para determinar la calidad de interacción de un anticuerpo, hay que ser muy cuidadosos, dada la relación que existe entre este valor y las velocidades de interacción (k_a y k_d). Por ejemplo: tres anticuerpos pueden

presentar la misma afinidad (K_D) de 10 nM (1×10^{-8} M) sin embargo, un primer anticuerpo X presenta velocidades de $k_a = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_d = 1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$; una segunda molécula Y: $k_a = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_d = 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y el último anticuerpo Z valores de $k_a = 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_d = 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (**Fig. 5**). Estos valores nos hablan de tres comportamientos biológicos diferentes, a pesar de tener la misma afinidad. En estos ejemplos la molécula X se une de manera más rápida al antígeno pero esta unión se mantiene por muy poco tiempo (bajo valor de k_d), lo que ocurre de forma contraria con el anticuerpo Z, mientras que Y es la que presenta los valores de velocidades cinéticas más equilibrados, considerando entonces a ésta molécula más importante desde un punto de vista terapéutico (**Fig. 6**). Por esta razón, aquellos anticuerpos que presenten la menor velocidad de disociación (k_d) serán más relevantes, ya que este valor se traduce funcionalmente en la mayor permanencia en la unión con el antígeno, favoreciendo la neutralización del blanco y la eficiente eliminación del cuerpo, del complejo anticuerpo-antígeno.

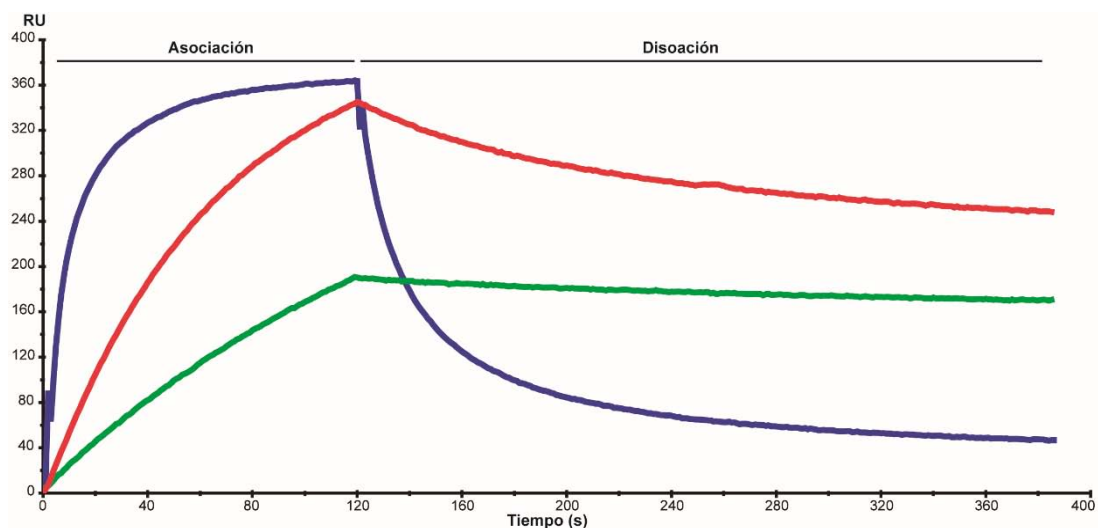


Figura 6. Cinéticas de interacción de tres fragmentos de anticuerpo. Se muestran los sensogramas de tres fragmentos de anticuerpo X (azul), Y (verde) y Z (rojo). Aunque éstos presentan los mismos valores de afinidad (K_D , ver texto), al observar las pendientes de las curvas podemos caracterizar diferentes comportamientos de la interacción. En el anticuerpo X (azul) se observa la rápida unión sin embargo la caída es igualmente rápida, mientras que con la molécula Z (verde) la pendiente de asociación es más lenta, pero la curva de disociación es aún más lenta (prácticamente horizontal), lo que indica que este anticuerpo permanece pegado por más tiempo al antígeno. Por último, el anticuerpo Y (rojo) muestra una curva de asociación más lenta comparada con X, pero la disociación presenta una velocidad intermedia en comparación con los trazos de X y Z.

Con los ejemplos anteriores, se muestra que los sensogramas generados por el biosensor (Biacore), son una herramienta que permite identificar aquellos fragmentos de anticuerpos con mejores propiedades de unión y permanencia con el blanco. Es por esto que posterior a un proceso de tamizado por despliegue en fagos es recomendable evaluar de forma individual a los fragmentos de anticuerpos aislados que den los valores más altos en las pruebas de ELISA y elegir aquellos que cumplan con los requisitos de nuestro interés.

1.14 Maduración *in vitro* de fragmentos de anticuerpos

En algunos casos los fragmentos de anticuerpos recombinantes que se aíslan no cumplen con las propiedades que se desean, como por ejemplo termoestabilidad o alta afinidad. En particular, la baja afinidad repercute en una deficiente neutralización del blanco. Por esta última razón, es necesario recurrir a métodos que permitan mejorar las propiedades de interacción de los fragmentos de anticuerpos. Para este fin, se implementan estrategias de **maduración *in vitro***, las cuales consisten en tratar de imitar los procesos naturales de hipermutación somática y selección clonal que ocurren en el sistema inmune (ver sección **1.2**). En consecuencia, el proceso de maduración *in vitro* consiste en la generación de diversidad (bancos de variantes mutadas) acoplado a un sistema que permita aislar fragmentos de anticuerpos con las mejores propiedades de unión, como es la tecnología de despliegue en fagos (ver sección **1.8 a 1.10**).

En el laboratorio, la generación de diversidad en las secuencias que codifican para los fragmentos de anticuerpos se puede realizar mediante tres estrategias: **evolución dirigida, semi-racional y racional**.

La **evolución dirigida**, inicialmente fue utilizada para modificar o mejorar la función de proteínas con actividad enzimática (revisado en Lane and Seelig, 2014; Packer and Liu, 2015; Zaugg et al., 2014). Esta técnica se basa en la generación de diversidad al azar a nivel de ADN, seguido de rondas de selección (identificación de actividades enzimáticas o fenotipos de interés) y amplificación (herencia de secuencias). En el proceso evolutivo existe un vínculo esencial entre genotipo y fenotipo, por lo que es necesario generar cambios a nivel del material genético que se reflejen en el producto proteico. Sin embargo, las tasas de mutaciones espontáneas pueden ser muy limitadas para lograr un nivel de evolución molecular significativo en condiciones de laboratorio, por lo que son necesarias estrategias que permitan robustecer este proceso. La generación de mutaciones al azar puede realizarse

por dos métodos principales, el primero denominado químico, se realiza con agentes que dañan aleatoriamente el ADN como pueden ser compuestos alquilantes (Lai et al., 2004), desaminantes (Myers et al., 1985) e incluso radiación ultravioleta (Bridges and Woodgate, 1985). Sin embargo, estas técnicas generan un sesgo importante en la frecuencia de mutaciones (Lai et al., 2004; Myers et al., 1985) y se volvieron obsoletas con la llegada de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*. Este segundo método, no químico, se basa en modificar las condiciones normales de la PCR durante la amplificación *in vitro* de los genes. En particular, la técnica denominada PCR propensa al error (ep-PCR) (D. W. Leung et al., 1989), favorece la aparición de mutaciones al azar, ya que ocasiona la disminución en la fidelidad de apareamiento de las bases, aumentando la tasa de mutaciones en un rango de 10^{-4} ~ 10^{-3} bases por cada replicación (Cadwell and Joyce, 1992; Eckert and Kunkel, 1990). Dado que las mutaciones durante cada ciclo de amplificación se van acumulando, es posible tener un aumento considerable en el promedio de mutaciones por gen, lo que ha hecho a la técnica de ep-PCR como la mejor alternativa para generar diversidad al azar.

Las variantes proteicas generadas se someten a rondas de tamizado o selección y de ser necesario a nuevos procesos de evolución. Después de varios procesos de maduración se espera que los beneficios aportados por cada una de las mutaciones acumuladas, reflejadas como cambios de residuos de aminoácidos, resulten en un mejoramiento sustancial en la funcionalidad del fenotipo (propiedades físico-químicas de las proteínas de interés).

El conjunto de evolución dirigida y despliegue en fagos han sido herramientas de gran éxito para la maduración de fragmentos de anticuerpos (Gillam et al., 2014; Hawkins et al., 1992; Low et al., 1996; Marks et al., 1992; Mössner and Plückthun, 2001; O'Neil and Hoess, 1995; Riaño-Umbarila et al., 2005), incluso se han logrado generar y aislar anticuerpos con altos valores de afinidad (Boder et al., 2000; Jermutus et al., 2001; Rodríguez-Rodríguez et al., 2012).

Sin embargo, uno de los puntos cruciales para la obtención de proteínas de interés utilizando esta técnica, está relacionada con los tamaños y diversidad de los bancos. Cuanto mayor sea la diversidad, la probabilidad de aislar moléculas de interés aumenta (Griffiths et al., 1994). Para este fin, se deberían generar mutaciones en todo el espacio de secuencia de una proteína típica, sin embargo, es muy difícil cubrirla. Por ejemplo, la población de un

decapéptido totalmente aleatorizado es igual a 1024×10^{13} variantes proteicas diferentes. Debido a esta desventaja, se ha buscado optimizar el espacio de secuencia mediante la delimitación de regiones que pueden ser modificadas. Este enfoque es seguido por la estrategia de maduración denominada **semi-racional** (Barderas et al., 2012; Chica et al., 2005), la cual radica en la generación de diversidad en regiones o posiciones puntuales dentro de la secuencia de la proteína. En los fragmentos de anticuerpos, las zonas que generalmente son mutadas corresponden a los CDRs (ver sección **1.1**), dada su importancia para el reconocimiento del antígeno (Rothe et al., 2008; Xu and Davis, 2000; Yang et al., 1995). Adicionalmente, aprovechando la información presente en las bases de datos, se pueden identificar posiciones específicas dentro de los CDRs, que de manera natural presentan mayor diversidad y que son tolerantes a las mutaciones sin que esto afecte la estructura canónica del CDR (Fellouse et al., 2005, 2004; Hackel et al., 2010; Koide et al., 2009; Retter et al., 2005). En los anticuerpos, incluso el espacio de secuencia puede reducirse aún más, ya que se ha demostrado que los CDR3 tienden a presentar mayor diversidad (ver sección **1.2**), además de jugar un papel predominante en la interacción con el antígeno (Short et al., 2001; Sundberg, 2009; Xu and Davis, 2000).

Posterior a la elección de las regiones o posiciones para generar diversidad, éstas son mutadas de forma azarosa o sesgadas en términos de solo cambiar un número determinado de residuos e incluso pueden incorporarse residuos con propiedades específicas, por ejemplo, solo aminoácidos hidrofílicos. Para generar diversidad en cualquiera de las zonas elegidas del gen, la técnica de PCR sigue siendo la más útil. Para limitar las regiones del gen a modificar y las mutaciones deseadas, se utilizan mezclas de oligonucleótidos degenerados que contengan los tripletes NNK ó NNS donde N puede ser cualquier nucleótido, K puede ser guanina (G) o timina (T), mientras que S puede ser guanina (G) o citosina (C). Dado que el producto de esta estrategia sigue generando un número significativo de secuencias potencialmente diferentes, es necesario realizar procesos de tamizado, con la finalidad de identificar los fragmentos de anticuerpo con mejores propiedades de unión.

El éxito del último método de maduración, se debe principalmente a los grandes avances en la determinación de la estructura de los anticuerpos, tanto de forma libre como formando un complejo con su antígeno. De manera complementaria o auxiliar, la construcción de modelos tridimensionales, confiables, de estas moléculas a través de

herramientas computacionales (análisis *in silico*), ha favorecido la implementación de estrategias más **racionales** de maduración *in vitro* (Barderas et al., 2012, 2008; Kiyoshi et al., 2014; Lippow et al., 2007). Esta metodología utiliza el análisis *in silico* mediante herramientas bioinformáticas, de la zona de interacción entre el anticuerpo y el antígeno, cuyas estructuras tridimensionales ya fueron determinadas o modeladas previamente, para proponer cambios a nivel de residuos de aminoácidos que resulten en el beneficio de la interacción entre ambas moléculas. Las variantes de anticuerpos se diseñan computacionalmente (bancos virtuales), se someten a un acoplamiento molecular (*Docking*) antígeno-anticuerpo *in silico*, simulaciones y finalmente a un escrutinio molecular mediante el cálculo de las distintas fuerzas involucradas en la interacción (ver sección **1.3**) (Barderas et al., 2008; Kiyoshi et al., 2014; Lippow et al., 2007). Los resultados de estos análisis ayudan a decidir que mutación(es) sería(n) más beneficiosa(s) para mejorar la unión antígeno-anticuerpo. Finalmente, el fragmento de anticuerpo que contenga las mutaciones predichas debe producirse y caracterizarse funcionalmente para evaluar la validez de dicha predicción. Aunque las tres estrategias de maduración *in vitro*, por si solas, pueden dar resultados muy exitosos, aun nos encontramos distantes de igualar la eficiencia del sistema inmune, por lo que la combinación de ellas puede ayudar a tener mayor éxito en la búsqueda de fragmentos de anticuerpos con mejores propiedades. Como por ejemplo el análisis *in silico* sobre modelos o estructuras tridimensionales antígeno-anticuerpo, acoplado a la estrategia semi-racional (Barderas et al., 2012).

El conjunto de las técnicas descritas como parte de la **ingeniería de anticuerpos**, sirven para generar una amplia variedad de fragmentos de anticuerpos con fines terapéuticos, pero lo más importante, es que ha ayudado a tener un acercamiento para entender el complejo e interesante fenómeno de la interacción de los anticuerpos con su blanco.

CAPITULO 2: ANTECEDENTES

La línea de investigación del Dr. Becerril (IBt, UNAM), se ha enfocado en la aplicación de la ingeniería de anticuerpos (generación y producción de fragmentos de anticuerpos recombinantes, despliegue en fagos y maduración *in vitro*), con la finalidad de obtener scFvs que permitan contender con el envenenamiento causado por picadura de alacranes ponzoñosos (**alacranismo**). El **alacranismo** es considerado un problema de salud pública en numerosas regiones tropicales y subtropicales. A nivel mundial, el número de intoxicados por picadura de alacrán supera los 1.5 millones anuales (Chippaux, 2012). Nuestro interés es el caso de México, el cual ocupa el segundo lugar en morbilidad con un promedio de 300,000 casos por año (SINAVE, 2016). Estos datos son alarmantes y el número podría aumentar, si se considera una supuesta subestimación de los datos, ya que no necesariamente se tiene un registro completo de este tipo de accidentes.

2.1 Terapia actual contra envenenamiento por picadura de alacrán

Hoy en día, la inmunización pasiva (seroterapia) con antivenenos de origen equino, es la forma más eficiente para contrarrestar y revertir los efectos tóxicos de los venenos de alacranes (Abroug et al., 1999; Bawaskar and Bawaskar, 2007; Boyer et al., 2009; Chippaux et al., 2010; Dehesa-Dávila and Possani, 1994; Ghalim et al., 2000). Actualmente, en México, el antiveneno comercial contra la picadura de alacrán, se produce por la hiperinmunización de caballos con el veneno de cuatro especies tóxicas para humanos. Los anticuerpos generados, presentes en el suero de estos equinos, se purifican y procesan para obtener de ellos fragmentos de tipo $F(ab')_2$ (Dehesa-Dávila and Possani, 1994). Los fragmentos $F(ab')_2$ se obtienen por digestión enzimática con pepsina, la cual hace un corte en la región de los anticuerpos denominada “bisagra”. Por esa razón, estos fragmentos de anticuerpo de caballo, están constituidos por los dominios variables (Fv) en pares de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L); así como, por el dominio constante de la cadena ligera (C_L) y el correspondiente a la cadena pesada (C_{H1}) (ver sección 1.1) (**Fig.1**).

Este antiveneno está constituido por la colección de fragmentos de anticuerpos equinos de origen policlonal y por ser dirigidos contra el veneno total de las cuatro especies de alacrán, también son polivalentes (ver sección 1.5). Los fragmentos de anticuerpos poseen

alta afinidad y capacidad de neutralización de los venenos, ya que han sido madurados por el sistema inmune del caballo. Asimismo, este grupo de $F(ab')_2$ poseen un carácter **oligoreactivo** (ver sección 1.4), ya que son capaces de inhibir la toxicidad del veneno de las 7 especies venenosas documentadas de México (*C. noxius*, *C. limpidus*, *C. suffusus*, *C. tecomanus*, *C. infamatus*, *C. sculpturatus* y *C. elegans*), aun cuando 3 de estos venenos no fueron usados durante la inmunización. El carácter oligoreactivo de los antivenenos implica que de manera natural se están generando anticuerpos con alta **reactividad cruzada** (ver sección 1.4). Hoy en día se conoce, que esta propiedad está relacionada con la alta similitud que se presenta entre sus blancos médicamente importantes que son las toxinas que afectan canales iónicos de sodio, las cuales se describen más adelante (sección 2.3).

El efecto terapéutico de los antivenenos es eficiente, sin embargo, se tiene la presencia de fragmentos de anticuerpos innecesarios en este producto. Esto se debe a que para el proceso de hiperinmunización se utiliza el veneno completo del alacrán. La presencia de moléculas tanto tóxicas como no tóxicas, provoca una respuesta inmunológica contra todos los componentes presentes. Pucca y colaboradores (2011) reportaron que en el suero de un caballo hiperinmunizado con el veneno de una especie de alacrán del género *Tityus*, se detecta solo entre el 1 al 2.5% de anticuerpos específicos contra los componentes nocivos, mientras que una gran proporción (97.5%) reconocen moléculas no tóxicas. Aunado a esto, la administración de altas concentraciones de anticuerpos de origen no-humano ocasiona importantes efectos secundarios en los individuos a los que se les aplica el antiveneno de origen equino. Algunos efectos secundarios documentados por el uso de este tipo de antivenenos, ocurren de forma inmediata como son la hipersensibilidad tipo I (activación de mastocitos y liberación de histamina) que ocasiona vasodilatación, inflamación, asma y anafilaxia lo cual puede ser fatal (Black, 1999; Chippaux and Goyffon, 1991). También pueden producirse, aunque con menor frecuencia, respuestas tardías como la hipersensibilidad tipo III (formación de inmunocomplejos y agregados que son depositados en tejidos y órganos) ocasionando la denominada enfermedad del suero (Black, 1999; Chippaux, 2012; Espino-Solis et al., 2009).

Para mejorar la seroterapia o nuevas terapias contra la picadura de alacrán es importante conocer en detalle los componentes tóxicos que se encuentran dentro de los venenos.

2.2 El veneno de los alacranes

El veneno de los alacranes tiene la función evolutiva de facilitar la captura de sus presas así como para defenderse de sus depredadores. El veneno, es una mezcla compleja de componentes orgánicos y proteínas de alto y bajo peso molecular. Algunas de estas proteínas que lo conforman, tienen actividad sobre los canales iónicos presentes en las células excitables y no excitables del sistema nervioso, ya sea por medio de bloqueo o disminución de la función de estos (Catterall, 1980). Es por esta actividad que se les denomina **toxinas** o **neurotoxinas**. Estas toxinas, se clasifican de acuerdo al número de residuos de aminoácidos que presentan en su estructura primaria. Los llamados péptidos de cadena corta (entre 22 y 47 residuos de aminoácidos), se unen a canales de potasio dependientes de voltaje (K_v), mientras que los péptidos de cadena larga (entre 59 y 76 residuos) se unen a canales de sodio dependiente voltaje (Na_v) (Carbone et al., 1982; Catterall, 1980; de la Vega et al., 2013; Rodríguez De La Vega and Possani, 2005). Adicionalmente, se han descrito otras dos familias de toxinas que interactúan con canales de cloro (DeBin et al., 1993) y calcio (Valdivia and Possani, 1998). La composición de las toxinas en los venenos varía entre las diferentes especies de alacranes, pero se ha determinado que aquellas que se unen específicamente a **canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v)** de mamíferos, son las causantes más importantes del efecto tóxico en humanos (Possani et al., 1999; Rodríguez De La Vega and Possani, 2005). Aunque la proporción de estas toxinas dentro de los venenos es baja, son lo suficientemente potentes para intoxicar y matar a un ser humano.

Dentro de las toxinas que actúan sobre canales Na_v se encuentran las denominadas **beta-toxinas** (Possani et al., 1999; Rodríguez De La Vega and Possani, 2005), las cuales se unen y modifican la activación de estos poros a potenciales de membrana más negativos que los que se observan de forma normal (Sandrine Cestèle et al., 1998; Possani et al., 1999). Estas neurotoxinas se consideran de importancia médica debido a su abundancia y letalidad dentro del veneno (Alagón et al., 1988; Martin et al., 1987; Ramírez et al., 1994; Zamudio et al., 1992) ocasionada por la interrupción de los impulsos nerviosos, lo cual se refleja en complicaciones de algunas funciones vitales y que finalmente puede ocasionar la muerte del individuo envenenado. En particular, las beta-toxinas, son de interés para el grupo de

investigación del Dr. Becerril (IBt, UNAM) dado que se encuentran altamente representadas dentro de los venenos de alacranes del Genero *Centruroides* y los cuales están ampliamente distribuidos en México.

2.3 Toxinas de alacranes del género *Centruroides*

En México se han descrito 281 especies de alacranes, siendo este uno de los países más diversos en este rubro (Santibáñez-López et al., 2015). Dentro de esas especies, solo 7 pertenecientes al género *Centruroides* han sido consideradas de importancia médica para el hombre y que se presume son las causantes de la mayoría de picaduras en personas (Dehesa-Dávila and Possani, 1994).

El grupo de investigación del Dr. Lourival Possani (IBt, UNAM), ha trabajado en el aislamiento y caracterización de algunas de las beta-toxinas presentes en los venenos de alacranes del género *Centruroides*. Parte de los resultados de esta investigación indican que estas toxinas están constituidas por 60-70 residuos de aminoácidos, con pesos moleculares entre 6000 y 7500 Da. Además, presentan una estructura altamente conservada entre ellas, la cual está conformada por segmentos alfa/beta estabilizados por cisteínas (Cs- α/β). A nivel de residuos de aminoácidos, tienen alta similitud que oscila entre 80-90% (**Fig. 7**) (Cestèle and Catterall, 2000; Cestèle et al., 2006; Sandrine Cestèle et al., 1998; Possani et al., 1999; Quintero-Hernández et al., 2013; Rodríguez De La Vega and Possani, 2005).

La nomenclatura de las toxinas se elabora tomando las iniciales de la especie de alacrán en la cual fue encontrada, seguida de un número, que solo es indicativo del orden en que son purificadas y reportadas (Alagón et al., 1988; Corzo et al., 2008; Espino-Solis et al., 2011; Martin et al., 1987; Ramírez et al., 1994; Zamudio et al., 1992). Por ejemplo, la beta-toxina Cn2 proviene del alacrán *Centruroides noxius*, mientras que la toxina Css2 y Css4, se encuentran dentro del veneno del alacrán *Centruroides suffusus*.

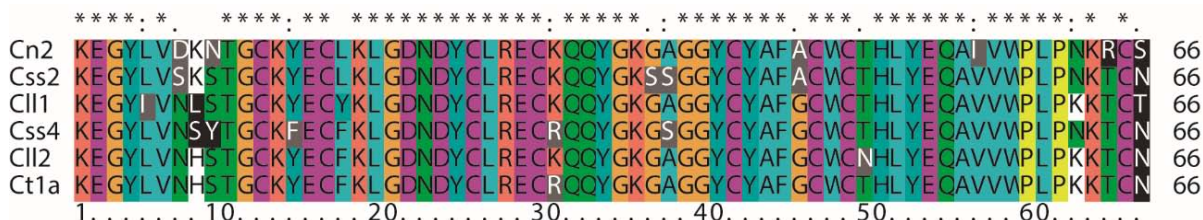


Figura 7. Similitud entre diferentes beta-toxinas de alacranes del género *Centruroides*. Alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de algunas de las principales neurotoxinas aisladas de los venenos de alacranes peligrosos en México. La similitud que

existe entre ellas es significativa (80-90%). Con un asterisco se indican los residuos conservados; dos puntos, residuos significativamente conservados; un punto, ligera conservación y espacios en blanco, residuos diferentes, de acuerdo con los parámetros de Clustal X (v 2.0).

El avance en el estudio de los componentes tóxicos presentes en los venenos de alacranes *Centruroides*, ayudó a determinar que cada una de las especies contiene entre 1 y 3 beta-toxinas que afectan los canales de Na_v de mamíferos. Utilizando esta información se buscó explorar alternativas a los antivenenos actuales por medio de la generación de anticuerpos dirigidos solo hacia estas toxinas. Los primeros esfuerzos se enfocaron en la obtención de anticuerpos y fragmentos de éstos de origen murino dirigidos contra la beta-toxina Cn2, que es la más tóxica y abundante dentro del alacrán *C. noxius*. Los resultados de estos trabajos sentaron un gran precedente para la optimización de los antivenenos, ya que se logró determinar que al tener un anticuerpo capaz de neutralizar a la toxina Cn2 era posible abatir la toxicidad del veneno completo del alacrán *C. noxius* en ratones (Licea et al., 1996; Selisko et al., 2004; Zamudio et al., 1992). Aunque los anticuerpos obtenidos seguían siendo de origen animal, lo que puede causar efectos secundarios, se demostró que era posible generar anticuerpos neutralizantes de las beta-toxinas y como consecuencia, según se puntualizó antes, la neutralización del veneno completo de las especies correspondientes.

2.4 Fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) humanos contra beta-neurotoxinas de alacrán

Con el antecedente anterior, el grupo de trabajo del Dr. Baltazar Becerril (IBt, UNAM) se ha enfocado en generar y aislar fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de origen humano con la capacidad de neutralizar a las distintas beta-toxinas presentes en los venenos de los alacranes del genero *Centruroides*. En esta tesis, la neutralización supone la capacidad del fragmento de anticuerpo de bloquear la actividad dañina que la toxina pueda causar al organismo (abatimiento de los síntomas de envenenamiento y con ello evitar la muerte de los mamíferos afectados). La neutralización efectiva incluye la rápida eliminación del antígeno por los mecanismos de excreción del organismo. Es importante recordar que la rápida biodistribución y eliminación es una propiedad intrínseca que presentan los scFvs (ver sección 1.6). Todo esto con la finalidad de generar un novedoso antiveneno, más seguro y eficiente contra la picadura de alacrán en México.

Para cumplir con el objetivo antes mencionado, inicialmente se construyó un banco de scFvs de origen humano no inmune (ver sección **1.7**) (Riaño-Umbarila et al., 2005) , el cual se sometió a rondas de tamizado por despliegue en fagos (ver sección **1.8 a 1.10**) contra la toxina Cn2 de *C. noxius*. Al finalizar 4 rondas de tamizado se aislaron dos variantes denominadas **scFvs C1 y 3F** (Riaño-Umbarila et al., 2005). Ambos scFvs mostraron la capacidad de reconocer y unirse a la beta-toxina Cn2, pero con bajos valores de afinidad (K_D) siendo incapaces de neutralizarla totalmente. Por esta razón, estos scFvs (3F y C1), se sometieron a procesos de maduración *in vitro* mediante evolución dirigida y despliegue en fagos (ver sección **1.13**). Por una parte, el camino para obtener variantes neutralizantes a partir del scFv parental 3F fue más parsimonioso. Es decir, que cada uno de los cambios a nivel de residuo que se aislaron dentro de los scFv posteriores a cada ronda de maduración tuvieron un efecto acumulativo en el mejoramiento de las propiedades de interacción de los fragmentos de anticuerpo (ver evolución dirigida en sección **1.13**). Estas mejoras se reflejaron en la obtención del scFv LR que presenta alta afinidad y capacidad neutralizante de Cn2 (Riaño-Umbarila et al., 2011) (**Tabla 1**). Por otra parte, la maduración del scFv C1 no fue secuencial como en el caso del scFv 3F. La obtención de un scFv neutralizante a partir de C1, se logró cuando se combinaron 4 residuos de aminoácido presentes en dos variantes (scFvs 3H y 202F) (Riaño-Umbarila et al., 2013) aisladas en dos procesos de maduración independientes. Al conjuntar estos residuos en un solo fragmento de anticuerpo dio origen al denominado **scFv RU1** (Riaño-Umbarila et al., 2016) (**Tabla 1**). Tanto RU1 como LR tienen la capacidad de neutralizar a la toxina Cn2 y por lo tanto abatir la toxicidad del veneno completo del alacrán *C. noxius* (**Tabla 1**).

Como resultado de la caracterización de las propiedades de unión de los scFvs LR y RU1, se determinó que tienen la capacidad de reconocer distintas beta-toxinas contenidas en el veneno de otras especies de alacranes del género *Centruroides*. Estos resultados indican que estos fragmentos de anticuerpo, presentan **reactividad cruzada**. Lo relevante de estos scFvs, es que son capaces de neutralizar a algunas de esas toxinas. El scFv LR, es capaz de neutralizar a la beta-toxina Cn2 de *C. suffusus* (Riaño-Umbarila et al., 2011), mientras que RU1 neutraliza a la toxina Cll1 (*C. limpidus*) (Riaño-Umbarila et al., 2016) (**Tabla I**).

Recientemente, se logró resolver la estructura tridimensional del complejo LR-Cn2-RU1 mediante cristalografía de rayos X (Riaño-Umbarila et al., 2016). Esta aportación ayudó

a tener un acercamiento a nivel atómico de los elementos involucrados en la interacción de los scFvs con la toxina Cn2 y cómo estos repercuten en la capacidad neutralizante. Uno de los resultados más importantes fue observar que los scFvs RU1 y LR, se unen a **dos epítomos no sobrelapantes** dentro de la toxina, lo cual es consecuencia de provenir de dos scFv parentales diferentes (C1 y 3F), capaces de reconocer y unirse a dichos epítomos. Favorablemente, la orientación espacial de ambos fragmentos de anticuerpo es opuesta entre ellos. Mientras que el scFv LR mantiene la unión con el epítomo de Cn2 previamente reportado (Canul-Tec et al., 2011), la variante RU1 reconoce otro epítomo neutralizable diferente. A diferencia del scFv LR (derivado de 3F), el scFv RU1 (derivado de C1) reconoce un epítomo en Cn2 que solo comparte algunos residuos que interactúan directamente con el canal Nav (Riaño-Umbarila et al., 2016; Zhang et al., 2012), pero que es suficiente para lograr la neutralización de la actividad tóxica de esta neurotoxina.

A continuación se enlistan en la **Tabla 1** algunos de los scFvs con mejores capacidades neutralizantes que se han generado utilizando procesos de maduración *in vitro* y despliegue en fagos dentro del laboratorio del Dr. Becerril (IBt, UNAM).

TABLA 1

Fragmentos variables de cadena sencilla neutralizantes, derivados de los parentales scFvs 3F y C1

Nombre	scFv Parental	Antígeno	Veneno (especie)	Afinidad (nM)	Referencia
C1 (parentales)		Cn2	<i>C. noxius</i>	540	(Riaño-Umbarila et al., 2005)
3F (parentales)		Cn2	<i>C. noxius</i>	12.50	(Riaño-Umbarila et al., 2005)
6009F	3F	Cn2 y Css2	<i>C. noxius</i> y <i>C. suffusus</i>	0.21 y 0.54	(Riaño-Umbarila et al., 2005)
9004G	3F	Cn2 y Css2	<i>C. noxius</i> y <i>C. suffusus</i>	0.21	(Riaño-Umbarila et al., 2011)
LR	3F	Cn2 y Css2	<i>C. noxius</i> y <i>C. suffusus</i>	0.05 y 0.09	(Riaño-Umbarila et al., 2011)
LER	3F	Cn2	<i>C. noxius</i>	0.03	Rodríguez-Rodríguez et al., 2012)
202F	C1	Cn2 y CII1	<i>C. noxius</i> y <i>C. limpidus</i>	8.10 y 25.10	(Riaño-Umbarila et al., 2013)

Como se mencionó, ambos scFvs (RU1 y LR) por separado tienen la capacidad de neutralizar a la toxina Cn2 y por lo tanto al veneno del alacrán *C. noxius*. Al evaluar la capacidad neutralizante de la combinación de ambos fragmentos, contra el veneno completo se observó una actividad complementaria de ambos scFvs. Es decir, que se logró abatir la toxicidad del veneno con una menor cantidad de proteína de los dos scFv mezclados, en comparación cuando se usan por separado (Riaño-Umbarila et al., 2016). Estos resultados sentaron un nuevo precedente ya que indicaron que al utilizar al menos dos scFv de origen humano, que neutralicen a cada una de las diversas beta-toxinas uniéndose a dos epítomos diferentes y veneno completo se puede generar un antiveneno más eficiente y seguro. Eficiente en términos de garantizar la inhibición total de los efectos nocivos de los venenos, dada la complementariedad en la capacidad neutralizante que se observa con el uso de dos scFvs provenientes cada uno de los parentales 3F y C1. Además de, garantizar la seguridad en su uso terapéutico debido a que estos fragmentos de anticuerpos son de origen humano, por lo que es poco probable que su aplicación en personas desencadene reacciones adversas, como se ha reportado con los antivenenos usados actualmente.

Nuestro enfoque actual para la optimización del antiveneno es explorar y dirigir a los scFv 3F y C1, así como a los derivados de éstos, hacia la neutralización de cada una de las distintas beta-neurotoxinas. De esta forma, podremos contar con un par de scFv, que se unan a dos epítomos distintos y sean capaces de neutralizar a las toxinas y por ende del veneno del alacrán de donde provienen.

2.5 La neurotoxina C_{ss2} del veneno del alacrán *Centruroides suffusus*

Con los antecedentes anteriores y con la finalidad de continuar con la optimización del antiveneno de origen humano, este proyecto se enfocó en dirigir la capacidad neutralizante de la familia de scFvs provenientes del parental C1 hacia a la beta-toxina C_{ss2} presente en el veneno del alacrán *C. suffusus*. Como ya se mencionó, ya se cuenta con un scFv derivado del scFv 3F que neutraliza un epítomo dentro de esta toxina (Riaño-Umbarila et al., 2011) (**Tabla I**). Por lo tanto, se busca que el nuevo scFv interactúe y neutralice el segundo epítomo presente en la toxina C_{ss2} y al cual se unen los fragmentos de anticuerpos derivados del parental C1 (Riaño-Umbarila et al., 2016)

La toxina C_{ss2} es la más abundante (2.8% del total de veneno) y tóxica dentro del veneno del alacrán *C. suffusus* (Martin et al., 1987). La manera de cuantificar la toxicidad de las beta-toxinas o los venenos es mediante la determinación del valor de la dosis letal media (DL₅₀: cantidad de toxina necesaria para matar al 50% de una población de ratones). La toxina C_{ss2} muestra una DL₅₀ de 0.75 µg por 20 gr de ratón de la cepa CD1 (Estrada et al., 2007; Hernández-Salgado et al., 2009). Mientras que el veneno completo de *C. suffusus* presenta una DL₅₀ de 8.75 µg por 20 gr de ratón de la cepa CD1, siendo el segundo alacrán más tóxico de México. Esta especie de alacrán, se distribuye en los estados de Sinaloa, Nayarit y Durango y es causante de 25,000 casos de envenenamientos por picadura al año en las tres entidades (Carboney C. Alfredo, 2012).

La alta toxicidad que presenta el veneno de *C. suffusus* hace primordial la generación de un scFv derivado del parental C1 que complemente la capacidad neutralizante del scFv LR (derivado de 3F). Al contar con un par de scFvs que se unan a dos epítomos neutralizables en la toxina C_{ss2}, se puede garantizar inhibición de la actividad tóxica en humanos, de este componente, así como del veneno completo del alacrán.

Dentro del grupo de scFvs que conforman a la familia de C1, se encuentran variantes que tienen la capacidad de reconocer a la toxina C_{ss2} con baja afinidad por lo cual no son capaces de neutralizarla. La reactividad cruzada que presentan los scFv derivados de C1 puede explicarse por la alta similitud que tiene C_{ss2} con el resto de neurotoxinas caracterizadas en los alacranes del genero *Centruroides*, y en particular con Cn2 (**Fig. 7**). Esta propiedad de reconocimiento, nos da un indicio de que la capacidad neutralizante de la familia de C1 puede mejorarse y ser dirigida hacia la toxina C_{ss2} mediante procesos de maduración *in vitro*. Para cumplir este objetivo durante este trabajo se realizaron dos estrategias de maduración: 1) **Evolución dirigida**. Esta es una de las técnicas más utilizadas para maduración *in vitro* de fragmentos de anticuerpo y 2) **Semi-racional**. Para la implementación de esta estrategia, se utilizó la estructura tridimensional de la variante RU1 en complejo con Cn2 (PDB 4V1D) reportada previamente (Riaño-Umbarila et al., 2016) y la estructura descrita previamente de la beta-toxina C_{ss2} (PDB 2LI7) (Saucedo et al., 2012).

HIPÓTESIS

La modulación por mutagénesis, de la reactividad cruzada que presentan los scFvs derivados de C1, permitirá obtener fragmentos de anticuerpos capaces de neutralizar eficientemente tanto a la toxina Css2 como al veneno correspondiente.

OBJETIVO GENERAL

Obtener un scFv derivado del parental C1, capaz de reconocer y neutralizar el segundo epítipo presente en la toxina Css2 del alacrán *Centruroides suffusus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Elegir el(los) scFv(s) derivado(s) de C1 que presente(n) el mejor reconocimiento por la toxina Css2.
- Generar diversidad de manera semi-racional en el scFv que tenga mejor reconocimiento por la toxina Css2.
- Generar diversidad por mutagénesis al azar a nivel de la secuencia del (de los) scFv(s) que tenga(n) mejor reconocimiento por la toxina Css2.
- Realizar rondas de tamizado de los bancos de variantes mediante despliegue en fagos contra la toxina Css2 para poder seleccionar una variante que la neutralice.

Caracterizar las variantes aisladas a nivel de la determinación de:

- Cambio de residuos de aminoácido detectados en las secuencias de ADN.
- Afinidad hacia la toxina Css2
- Capacidad neutralizante de la toxina Css2
- Capacidad neutralizante del veneno de *C. suffusus*.
- Reconocimiento por otras toxinas de alacrán (reactividad cruzada).

Finalmente, implementar una combinatoria de las mutaciones presentes en los scFv con mejores propiedades.

- Caracterizar las nuevas variantes.

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Materiales. Las cepas de la bacteria *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo fueron TG1 [F'*traD36 proAB lacI_qZAM15*] y XL1Blue [F'*proAB lacI_qZAM15Tn10*]. El vector para despliegue en fagos de los anticuerpos fue *Psyn2* (Amp^r). A menos que se mencione otra cosa, los cultivos bacterianos se hicieron en medio líquido YT2X (NaCl 171 mM, extracto de levadura 10 g/L, Bactotripton 16 g/L) suplementado con Ampicilina (Amp; 200 µg/ml) y glucosa (2%). A menos que se haga alguna aclaración, los cultivos líquidos con bacterias se incubaron en condiciones aeróbicas (con agitación a 200 rpm) a 37 °C. Para el protocolo de despliegue en fagos, así como para lavados en las rondas de tamizado, se utilizó una solución salina amortiguada por fosfatos (PBS); (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 7.4 mM). En algunos lavados el PBS se complementó con detergente *Tween* 20 (laurato de sorbitan POE20; 0.1%). Para la recuperación de los fago-anticuerpos por precipitación se utilizó una mezcla de polietilenglicol 8000 (PEG 40%) con NaCl (2 M). Para los procesos de tamizado y evaluación de reconocimiento, se realizó la inmovilización de la toxina C_{ss2} tanto en inmunotubos (Nalgen-Nunc) como en placas de ELISA de 96 pozos (Constar, Corning NY, USA) mediante la dilución previa de la toxina en solución de carbonatos (50 mM Na₂CO₃ pH 9). Se colocó la toxina C_{ss2} en los inmunotubos o en cada pozo de la placa de ELISA y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS-*Tween* y se añadió el agente denominado bloqueador (BSA, leche o gelatina al 1% solubilizado en PBS), y se incubó por 2 horas a 37 °C. Todos los químicos se obtuvieron de J.T Baker, Sigma-Aldrich o Merck.

3.2 Veneno de los alacranes. Las especies de alacranes utilizadas en este trabajo fueron; *Centruroides suffusus*, *C. noxius* y *C. limpidus*. El veneno se obtuvo de los individuos de cada especie mediante un pulso eléctrico aplicado sobre el telson. El veneno obtenido, se disolvió en agua tetra-destilada y centrifugado a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se cuantificó el contenido proteico mediante espectrofotometría ($\lambda=280\text{nm}$).

3.3 Purificación de beta-toxinas. El sobrenadante de los venenos se sometió a procesos cromatográficos para la purificación de las neurotoxinas C_{ss2}, C_{ss4}, C_{II1} y C_{n2}, usando los protocolos reportados por Espino-Solis et al. (2011), Ramírez, A. et al. (1994) y Zamudio et al. (1992), respectivamente. La pureza e identidad de cada proteína se confirmó por medio de

espectrometría de masas. La cantidad de cada toxina recuperada se determinó por espectrofotometría ($\lambda=280\text{nm}$).

3.4 Secuenciación de ADN. El material genético que codifica para las distintas variantes de scFvs, se aisló utilizando el *kit* comercial de purificación; *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). El proceso de secuenciación fue realizado por el M. en C. Timoteo Olamendi Portugal en el equipo Applied BioSystems Sequencer model 3100 (Foster City, CA) usando uno de los oligonucleótidos Dir (5-ATACCTATTGCCTACGGC-3') o Rev (TTTCAACAGTCTATGCGG-3') o cMyc (5'-TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT-3') (Riaño-Umbarila et al., 2005).

3.5 Condiciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A menos que se indique lo contrario, las condiciones utilizadas para las reacciones de amplificación (PCR) fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min; 30 ciclos de amplificación (94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min); un ciclo terminal de extensión, a 72°C por 10 min.

3.6 Análisis estructural del modelo tridimensional; scFv RJI-2 con la toxina Css2 y construcción del banco de variantes con mutaciones sitio dirigidas. Se generó un modelo estructural binario del scFv RJI-2 con la toxina Css2 partiendo de la estructura cristalográfica del complejo ternario scFv RU1-Cn2-LR scFv (PDB entry 4V1D) (Riaño-Umbarila et al., 2016). De este complejo se eliminó la estructura del scFv LR y se sustituyó a la toxina Cn2 por Css2 cuya estructura ya había sido determinada por NMR (PDB: 2LI7) (Saucedo et al., 2012). Para generar el scFv RJI-2, se incorporaron *in silico* los cambios de aminoácido en la estructura del scFv RU1 (**Tabla 6**), utilizando la biblioteca de rotámeros estándar del programa Coot (Emsley et al., 2010). El modelo se sometió a una minimización de energía usando el programa YASARA (Krieger et al., 2009). En este complejo, se analizaron los residuos involucrados en la interacción entre el scFv RJI-2 y la toxina Css2 y se compararon con el complejo reportado RU1-Cn2 (Riaño-Umbarila et al., 2016). Basados en el análisis, se decidió cambiar en el scFv RJI-2 los aminoácidos: S 57 (V_H) por R o K; K 65 (V_H) por R o Y e I 236 (V_L) por W, F o L. La combinatoria de los residuos de aminoácidos modificados en cada posición, se implementó sobre el gen correspondiente al scFv RJI-2 por PCR usando la estrategia de megaoligonucleótidos. Los oligonucleótidos degenerados que se usaron para generar los cambios fueron: S57, 5'-AGTATTMYTACYTCCACCATATG-3'; K65, 5'-

GCAGACTCCGTGARGGGCCG-3' y I 236, 5'-GGGATGACAGCCTGTKSGGTTATG-3'. La construcción de los genes mutados se completó con los oligonucleótidos DIR y REV (Riaño-Umbarila et al., 2005) los cuales se unen en las regiones externas del gen correspondiente a cada scFv. Los productos de la reacción final obtenidos por PCR, se purificaron a partir de un gel de agarosa preparativo (1%) y posteriormente digeridos con las enzimas de restricción *Sfi*I y *Not*I (New England Biolabs, Beverly MA, USA). Los genes correspondientes a los scFvs se ligaron por medio de la enzima ligasa de T4 en el fagémido pSyn2, digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. Los fagémidos recombinantes se purificaron después de la reacción de la ligasa y se introdujeron por electroporación en células de *E. coli* TG1 electrocompetentes. La diversidad de mutaciones que se logró generar en los genes de los scFvs, se evaluaron realizando la secuenciación de ADN obtenido de colonias tomadas al azar. La tasa mutagénica del banco de variantes, se calculó tomando en cuenta el número de cambios a nivel de nucleótidos presente en cada gen correspondiente a los scFvs, por cada 1000 pb. El tamaño del banco de variantes, se calculó a partir del conteo de colonias individuales crecidas en medio solido YT2X.

3.7 Construcción del banco con mutaciones al azar. La generación de mutaciones al azar se realizó utilizando la técnica de epPCR con base en los protocolos descritos por D. Leung et al., (1989) y Cadwell and Joyce, (1992). Mediante estos protocolos es posible manejar diferentes tasas de error (mayor al 1%) de la Taq polimerasa. El banco se generó tomando como templado los genes codificantes de los scFv RJI-1, RJI-2 y RJI-3 (**Tabla 6**). Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando los oligonucleótidos DIR y REV (Riaño-Umbarila et al., 2005).

Los productos de las reacciones de ep-PCR se purificaron a partir de geles de agarosa preparativos (1%) y posteriormente digeridos con las enzimas *Sfi*I y *Not*I (New England Biolabs, Beverly MA, USA). Los productos digeridos y sometidos a la actividad de la ligasa, se procesaron de la misma manera que la descrita en el apartado anterior. De igual forma el banco se introdujo en células de *E. coli* TG1 electrocompetentes. La diversidad de cambios en las secuencias (tasa mutagénica) se determinó a partir de secuencias de ADN aislado de colonias elegidas al azar. El tamaño del banco de variantes, se calculó a partir del conteo de colonias individuales crecidas en medio solido YT2X.

3.8 Despliegue en fagos de los bancos de scFvs. El proceso de despliegue en fagos de las variantes de scFvs generada en los bancos, se realizó en dos etapas. La primera fase implicó el crecimiento y despliegue de los anticuerpos en la superficie de los fagos. La segunda etapa radicó en la recuperación, por precipitación, de las partículas infectivas (que denominaremos fago-anticuerpos). El protocolo utilizado para el despliegue de los bancos en fagos se basó en el reportado por Marks et al., (1991). Solo en un caso se modificó el protocolo donde los cultivos de fago-anticuerpos fue crecida a 37 °C (**Tablas 4 y 5**), cuando normalmente se realiza a 30 °C. La determinación de los títulos de los fago-anticuerpos, se realizó mediante la infección de células *E. coli* y el conteo de colonias individuales crecidas en medio sólido YT2X.

3.9 Rondas de tamizado con los bancos de fago-anticuerpos. Los bancos de scFvs desplegados en fagos, se sometieron a rondas de tamizado basados en los protocolos reportados por Marks et al., (1991) y Riaño-Umbarila et al., (2005), con algunas modificaciones que se mencionan a continuación. Las concentraciones de toxina Css2 inmovilizada, para cada ronda de tamizado se muestran en las **Tablas 4 y 5**. Distintas concentraciones de fago-anticuerpos se colocaron en contacto con la toxina inmovilizada de manera independiente (**Tablas 4 y 5**). En un caso, como se indica en las tablas, los bancos de fago-anticuerpos se sometieron a un tratamiento previo antes de ser colocados en contacto con la toxina. Otra modificación que se realizó consistió en una ronda de competencia, en la cual se colocó el scFv RJI-2 soluble en una relación molar 1:15 toxina:scFv en conjunto con la mezcla de fago-anticuerpos en un inmunotubo que contenía la toxina Css2 inmovilizada (**Tabla 4**). En algunas rondas de tamizado como se indica en la **Tabla 5**, se realizaron lavados con 100 mM de trietilamina, seguido de lavados con PBS-Tween20 como se describe en Riaño *et al.* (2005). Al finalizar la última ronda de tamizado, se tomaron colonias bacterianas aisladas de forma aleatoria para realizar la expresión de los correspondientes scFvs en placas de cultivo de 96 pozos.

3.10 Expresión de los scFvs en placas de 96 pozos. La expresión de scFvs en forma soluble en placas de cultivo de 96 pozos, se realizó como se describe en el protocolo descrito por Riaño-Umbarila et al., (2005). Los scFvs obtenidos en forma soluble, fueron utilizados para ensayos de ELISA.

3.11 Pruebas de ELISA. Con la finalidad de identificar las variantes de los scFvs que tuvieran mejor reconocimiento por la toxina C_{ss2}, se realizaron ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indirecta. Se inmovilizó toxina C_{ss2} a una concentración de 3 µg/ml en placas de ELISA de 96 pozos (Corning NY, USA). Posteriormente, se continuó con el protocolo descrito por Riaño-Umbarila et al., (2005).

3.12 Expresión y purificación de los scFvs. Los segmentos de ADN correspondientes a los genes de los scFvs de interés, se subclonaron en el vector de expresión p*Syn1* (Riaño-Umbarila et al., 2005; Schier et al., 1995). La correcta clonación de los scFvs, se confirmó por medio de secuenciación de ADN. La expresión y purificación de los fragmentos de anticuerpo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Riaño-Umbarila et al., (2005). La pureza e identidad de cada proteína se confirmó por medio de espectrometría de masas. La concentración de las proteínas se determinó por espectrofotometría a $\lambda=280\text{nm}$.

3.13 Ensayos de expresión. Con la finalidad de obtener un mayor rendimiento (cantidad de proteína por litro de cultivo) en la expresión del scFv ER-5, se realizaron modificaciones al protocolo reportado por Riaño-Umbarila et al., (2005). Tres variables se probaron en los ensayos de expresión tomando en cuenta las recomendaciones descritas en los protocolos reportados por Rouet et al., (2012) y Popplewell et al., (2005). Las tres modificaciones fueron: el tipo de cepa de *E. coli*; TGI y XL1Blue, temperatura de expresión; 20°C y 25°C y tiempo de expresión; 16 y 20 horas. La purificación de los scFvs se realizó de la forma antes descrita. La concentración de las proteínas se determinó por espectrofotometría a $\lambda=280\text{nm}$, para comparar los rendimientos.

3.14 Pruebas de reconocimiento y determinación de los parámetros cinéticos de los scFvs hacia distintas toxinas mediante un biosensor de interacciones moleculares en tiempo real (Biacore). Los scFvs purificados, se evaluaron mediante un sensor de interacciones moleculares en tiempo real (Biacore X, Uppsala, Sweden) a 25°C. Previamente, cada toxina (C_{ss2}, C_{ss4}, C_{n2}, ó C_{II1}) se disolvió en 10 mM del amortiguador 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES; pH6), para ser inmovilizada en su respectivo cartucho sensor o chip. El pegado de las moléculas se realizó en el canal 2 de un chip CM5, usando el *kit amino-coupling* (Biacore), recomendado por el fabricante (GEHealthcare, 2015). El canal 1 del chip se utilizó como control, por lo que éste, no contenía toxina inmovilizada. Se obtuvieron chips

con baja densidad de toxina unida (aproximadamente entre 200 a 300 Unidades de Resonancia; RUs) que es lo recomendado para lograr determinaciones de la afinidad más precisas. Los diferentes scFvs se diluyeron en solución HBS-EP (GE Healthcare®) para llegar a concentraciones de entre 1 nM a 200 nM. Inyecciones de 100 µl de cada concentración de cada scFv se aplicaron en cada chip con toxina, por separado. Las velocidades de flujo utilizadas fueron de 40 ó 50 µl min⁻¹, con lapsos de tiempo para la fase de disociación de entre 500 ó 600 segundos. Las determinaciones de solo aquellas dos variantes de scFv que mostraron mejores parámetros cinéticos contra cada toxina, se hicieron por duplicado, a excepción de ER-5 contra Css2 que fue hecha por triplicado. Para las pruebas de estabilidad funcional, los scFvs se incubaron con 0.5 M de cloruro de guanidinio (GdnHCl) a 37°C durante 1 hora antes de ser inyectados al chip correspondiente. La superficie del chip fue regenerada después de cada ensayo con 10 mM de HCl. Los datos, se corrigieron restándoles los valores obtenidos en el canal 1 (referencia o control). Los sensogramas resultantes de la interacción de las variantes con las distintas toxinas se compararon utilizando el programa BIA-evaluation versión 3.1. Los valores de las constantes cinéticas, fueron determinados usando ese mismo programa, mediante el modelo de interacción *Langmuir* de tipo 1:1. El tiempo de unión (T_R: por sus siglas en inglés *Time of residence*), entre los scFvs y las toxinas, se determinaron calculando el inverso del valor de la velocidad de disociación (1/k_d), expresándolo en minutos para tener un uso práctico de los mismos.

3.15 Pruebas *in vivo* de la capacidad neutralizante de las variantes de scFvs contra distintas toxinas de alacranes. Para los ensayos *in vivo*, se organizaron grupos de 8 o 10 ratones hembra de la cepa CD1 de alrededor de 20 g de peso. Los grupos control se inyectaron de forma intraperitoneal (ip) con el equivalente a 1 ó 2 dosis letales medias (DL₅₀) de cada toxina de acuerdo a la **Tabla 2**. El scFv ER-5 se mezcló con cada toxina de manera independiente y en diferentes relaciones molares toxina:scFv (1:10, 1:5, 1:2 ó 1:1). Estas mezclas se incubaron por 30 min a temperatura ambiente (≈ 25 °C) antes de ser inyectadas vía ip. en los ratones del grupo experimental. Las pruebas se realizaron por duplicado. Los animales se observaron por un periodo de 48 horas. Todos los animales se trataron conforme a las recomendaciones presentes en las normas oficiales mexicanas para uso de animales de laboratorio.

Tabla 2. Dosis letales medias (DL₅₀) de tres beta-toxinas

Alacrán	Toxina	1DL ₅₀ (µg/20 gr de ratón)	Referencia
<i>Centruroides suffusus</i>	Css2	0.75	(Estrada et al., 2007)
<i>Centruroides noxius</i>	Cn2	0.25	(Zamudio et al., 1992)
<i>Centruroides limpidus</i>	CII1	1.7	(Riaño-Umbarila et al., 2013)

3.16 Ensayos *in vivo* de la capacidad neutralizante del scFv ER-5 y LR contra el veneno completo de *C. suffusus*. El veneno se obtuvo y se procesó como se describió previamente (sección 3.2) y se utilizó el mismo día de la extracción. A este tipo de veneno, en lo sucesivo se le considerará como veneno fresco. Se utilizaron conjuntos de 10 ratones con las mismas características antes mencionadas. El grupo control se inyectó de forma ip. con la cantidad de veneno correspondiente a 2 ó 3 DL₅₀. Dos tipos de evaluaciones *in vivo* se realizaron: 1) Prueba de protección. En este ensayo, el veneno fresco se mezcló con el scFv ER-5 o en combinación con el scFv LR (Riaño-Umbarila et al., 2011) en diferentes relaciones molares toxina:scFv. Estas relaciones se calcularon en base de la cantidad de toxina Css2 presente en el veneno. Una DL₅₀ de veneno de *C. suffusus* se consideró como 8.75 µg por cada 20 g de ratón, en donde Css2 representa el 2.8% del veneno total (Estrada et al., 2007; Martin et al., 1987). Las diferentes mezclas de veneno con el (los) scFv(s) se incubaron por 30 min a temperatura ambiente (≈ 25 °C) antes de ser inyectadas en los animales. Estos tipos de ensayos de protección se realizaron por duplicado. 2) Prueba de rescate. En este ensayo, los animales se inyectaron con 2 ó 3 DL₅₀ del veneno. Después de un lapso de 10 ó 13 min, se les administraron diferentes relaciones molares del scFv ER-5 con respecto a la toxina, solo o en combinación con el scFv LR. La categorización de la sintomatología observada en los ratones fue de la siguiente manera: a, leves (parálisis ligera en patas y contracción abdominal); b, moderados (salivación excesiva, ligeros problemas respiratorios y movimiento involuntarios); c, severos (parálisis casi total en patas y problemas respiratorios severos).

3.17 Ensayo de competencia por los epítomos en Biacore. Se utilizó un sensor chip con toxina Css2 inmovilizada. Se realizaron 5 inyecciones consecutivas de 30 µl del scFv ER-5 (1 mM) hasta saturar el epítomo en la toxina que reconoce este fragmento. Posteriormente, se inyectaron 30 µl del scFv LR (0.5 mM) para observar la respuesta ocasionada por la unión de

éste a un segundo epítipo de la toxina. De igual forma, en un experimento independiente, se realizaron 3 inyecciones consecutivas de 30 µl del scFv LR (0.5 mM) hasta saturar el epítipo en la toxina que reconoce este fragmento de anticuerpo en la toxina. Posteriormente, se inyectaron 30 µl del scFv ER-5 (1 mM) para observar la unión de éste a un segundo epítipo diferente al que se une LR dentro de la toxina. Se realizaron dos pruebas de control, la primera consistió en inyectar por separado cada uno de los scFv (ER-5 y LR). Las unidades de respuesta (RU) en los sensogramas obtenidos se compararon con la inyección de ambos fragmentos en mezcla. El segundo control consistió en 7 inyecciones del scFv ER-5 (1 mM) hasta saturar el epítipo correspondiente. Subsecuentemente, se inyectó el scFv RU1 (1 mM). Los sensogramas resultantes se analizaron usando el programa BIA-evaluation versión 3.1

3.18 Modelado de la estructura tridimensional del complejo scFv-toxina *in silico*. Se generó el modelo estructural teórico del complejo scFv ER-5 con la toxina Css2. Se tomó como templado el modelo del scFv RJI-2-Css2 anteriormente descrito (sección 3.6). Para generar el nuevo modelo de ER-5 (**Tabla 6**), se incorporaron los cambios de aminoácido *in silico* utilizando la biblioteca de rotámeros estándar del programa Coot (Emsley et al., 2010). El complejo binario se sometió a minimización de la energía utilizando el programa YASARA (Krieger et al., 2009). La representación gráfica fue realizada con el programa ccp4mg (v 2.7.3) (McNicholas et al., 2011).

CAPITULO 4: RESULTADOS

4.1. Pureza y calidad del antígeno

Uno de los puntos cruciales para obtener resultados satisfactorios en el aislamiento de scFvs específicos contra un blanco es tener un antígeno puro, íntegro y funcional (Haque and Tonks, 2012; Rodi and Makowski, 1999; Sparks et al., 1996). En nuestra experiencia, al realizar rondas de tamizado contra un antígeno (toxina) cuya estructura y por lo tanto su función ha sido afectada, ocasiona el aislamiento de fragmentos de anticuerpos con unión inespecífica y por lo tanto carentes de capacidad neutralizante. Es por eso, que en este trabajo de tesis fue importante determinar la pureza y calidad del antígeno que se utilizaría para las rondas de tamizado posterior a su purificación. Nuestro blanco principal fue la toxina Css2, la cual se obtuvo por medio de dos pasos de purificación; cromatografía de fase reversa e intercambio iónico (ver sección 3.3). Al tener un menor número de pasos, comparado con los procesos tradicionales (Zamudio et al., 1992), la toxina se sometió a menos condiciones adversas, lo cual se refleja en la mejora del rendimiento (cantidad de toxina recuperada) y también favorece la permanencia de la toxina en estado nativo y funcional.

La identidad y pureza de la toxina Css2 se evaluó por espectrometría de masas. La masa experimental obtenida fue de 7538.3 Da, mientras que la masa molecular teórica es de 7538.6 Da. Es importante mencionar que no se observó la presencia de ningún otro componente contaminante durante la determinación de las masas moleculares. Estos resultados nos indican que la toxina se encuentra pura e íntegra. Adicionalmente, se evaluó la funcionalidad de Css2 mediante pruebas de toxicidad en ratones. Se inyectó el equivalente a 1 DL₅₀ de toxina en ratones vía ip. Se observaron fuertes síntomas de intoxicación en los animales y la muerte de los individuos a los 40 min. posteriores a la inyección. Estos resultados confirman que se logró obtener a la toxina Css2 en óptimas condiciones. Este esquema de evaluación se repitió después de cada proceso de purificación de la toxina Css2. A partir de este punto se denominará Css2 fresca a la toxina que fue purificada y cuya actividad tóxica se haya mantenido.

4.2. Selección de templado dentro de la familia del parental C1 para maduración *in vitro*

El scFv C1 en trabajos previos, se ha utilizado como templado para procesos de maduración *in vitro* contra diferentes toxinas como: CII1, CII2 y Cn2, lo que resultó en la

generación de un amplio número de variantes de scFv con diferentes propiedades de unión por las toxinas. Con la finalidad de elegir un scFv templado, distintos scFvs provenientes del parental C1 (**Tabla 3**) se evaluaron en términos de su patrón de interacción (curvas de asociación y disociación) hacia la toxina Css2.

Tabla 3. Lista de mutaciones encontradas en los scFv derivados del parental C1 durante distintos procesos de maduración *in vitro*.

scFv	VH								VL				Maduración <i>in vitro</i> -Toxina			
	FW1	CDR2			FW3		CDR3			FW1	CDR1	FW3		CDR3		
C1	50 V	54 D	56 S	57 N	69 T	84 N	105 M	107 A	110 Y	111 F	164 S	172 T	220 S	225 D	235 L	
3H		G								H						E.D. - CII1
202F		G	G				L									E.D. - CII1
RU1		G	G				L		H							C.- CII1-Cn2
3008C		G			I		L				I			P		E.D. - CII2
3008C-I		G			I		L		T		I			P		E.D. - CII2
3007A		G										A				E.D. - CII2
3004F	A	G		K	I	Y	L	S	H		I			P		E.D. - CII2
3010B		G			I		L		N	L			V	P		E.D. - CII2
RU2J		G	G	S	I		L		N	L	I		V	P		E.D. - CII2
RJI-1		G	G	S			L		T		I					C.
RJI-2		G	G	S			L		N		I					C.
RJI-3		G	G	S			L		H		I					C.

Procesos de maduración *in vitro* E.D. Evolución Dirigida; C. combinatoria, significa que los scFvs se construyeron por la combinación de mutaciones identificadas en otros scFvs.

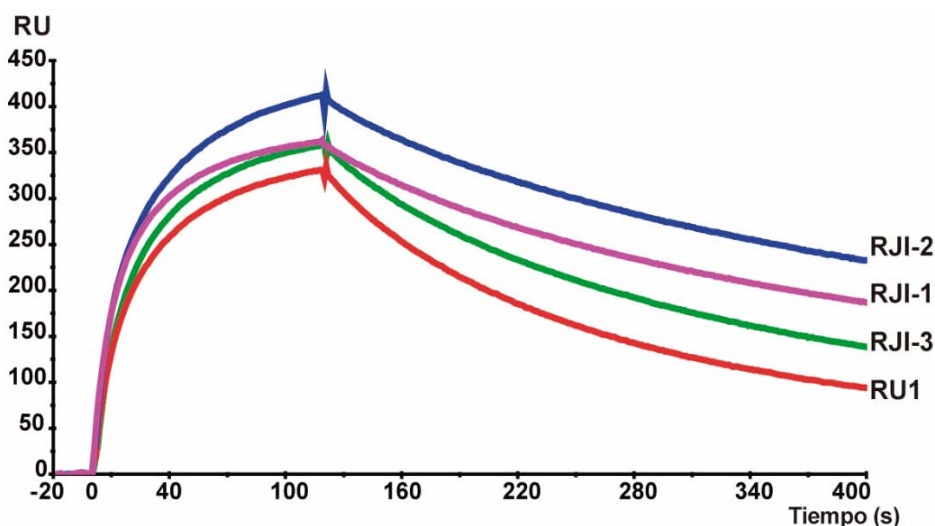


Figura 8. Curvas de interacción de cuatro scFvs provenientes del parental C1 contra la toxina Css2. Se muestran los patrones de reconocimiento de los scFv RJI-2 (azul), RJI-1 (magenta), RJI-3 (verde) y RU1 (rojo) hacia la beta-toxina Css2 obtenidos por SPR.

Los tres scFvs (RJI-1, RJI-2 y RJI-3) mostraron una mayor señal de reconocimiento contra la toxina C_{ss}2 (**Fig.8**), en comparación, con el parental RU1 el cual era hasta ese momento el scFv con mejores propiedades de interacción hacia distintas toxinas (Riaño-Umbarila et al., 2016). Estos tres fragmentos fueron producto de la combinación de tres cambios: **N57S** (CDR2-V_H), **Y110H-T-N** (CDR3-V_H) y **S164I** (FW1-V_L), identificados en un trabajo previo (Arredondo López, 2015), dentro del scFv RU1 (Riaño-Umbarila et al., 2016). Dentro de los tres scFvs el **RJI-2** presentó el mejor patrón de interacción contra la beta-toxina C_{ss}2 seguido por **RJI-1 y RJI-3** (**Fig. 8**). Dada la buena respuesta obtenida de la interacción de los scFvs RJI-1, RJI-2 y RJI-3, se decidió tomar como templado a los tres fragmentos para realizar los procesos de maduración *in vitro* con el fin de obtener scFvs neutralizantes de la toxina C_{ss}2.

4.3 Maduración *in vitro*: estrategia semi-racional

La estrategia semi-racional se implementó por primera vez en el laboratorio durante este trabajo, aprovechando la reciente determinación de la estructura tridimensional del complejo LR-Cn2-RU1 (Riaño-Umbarila et al., 2016). Utilizando la estructura reportada (PDB: 4V1D) se generó el modelo del scFv RJI-2 interactuando con la beta- toxina C_{ss}2, ya que este fragmento fue el que mostró el mejor reconocimiento contra esta toxina en las pruebas preliminares de reconocimiento en el Biacore (**Fig. 8**). El análisis del modelo se enfocó en los residuos de aminoácidos presentes en la interfaz de interacción entre ambas moléculas (RJI-2 y C_{ss}2), principalmente en los residuos dentro de esta zona de contacto, que son diferentes entre las toxinas Cn2 y C_{ss}2 (**Fig. 9**). En esta evaluación, encontramos que las cadenas laterales de los residuos K65 (FW3-V_H) e I236 (FW1-V_L) del scFv se encuentran alejadas de los residuos S9 y V56 de la toxina, respectivamente. Esto se debe a que las cadenas laterales de los residuos S9 y V56 en C_{ss}2, son de menor tamaño en comparación a los presentes en Cn2 (**Fig. 9**, rectángulos rojos).



Figura 9. Similitud entre dos beta-toxinas provenientes de especies del género *Centruroides*. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la toxina Cn2 y C_{ss}2. Los rombos indican los residuos que interactúan con el scFv LR (derivado de 3F), mientras que los triángulos indican los residuos que interactúan con el scFv RU1, basados en el reporte de Riaño *et al.* (2016).

La separación entre las cadenas laterales de los residuos mencionados, ocasiona la pérdida de un puente de hidrógeno y una interacción de carácter hidrofóbico con los residuos K65 (FW3-V_H) e I236 (FW3-V_L) del scFv, respectivamente. Esta pérdida de interacciones, trae como consecuencia un decremento en las fuerzas de interacción entre el scFv y la toxina. Para tratar de recuperar los contactos entre los residuos mencionados, los aminoácidos del scFv K65 e I236 se mutaron por residuos con cadenas laterales más largas. Para el caso de K65, se decidió cambiarlo por los aminoácidos R y Y, mientras que el aminoácido I236 se cambió por los residuos L, W y F. Además de estos dos residuos, se mutagenizó la posición S57, ya que en procesos previos de maduración contra las toxinas CII1 y CII2, se aislaron scFvs que presentaban el cambio K57. El residuo S57 (CDR2-V_H) presente en RJI-2 (**Tabla 3**) no presenta carga mientras que la K sí la tiene, además de que este último es de mayor tamaño. Para evaluar la importancia de esta posición en el reconocimiento por C_{ss}2, se evaluaron dos residuos adicionales (R ó G). En resumen, se incluyeron en esta posición (57) los aminoácidos K, R y G ante la posibilidad de que al combinarlos con las otras dos posiciones mencionadas (65 y 236), pudieran resultar en un mayor beneficio a la interacción scFv-toxina. Se generó un banco con la combinatoria de las mutaciones mencionadas sobre la variante RJI-2. El tamaño del banco fue de 3.8×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) y se sometió a tres rondas de tamizado por despliegue en fagos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Rondas de tamizado contra la beta-toxina C_{ss}2 a partir del banco de variantes con mutaciones sitio dirigidas (estrategia semi-racional).

Ronda	C _{ss} 2 (µg)	Fagos entrada (Ø/ml)	Fagos salida (Ø totales)	Saturante
1	2	1×10^{11}	900,000	BSA
2	1.5	1.5×10^{12}	60,000	Leche
3	1.5	1.6×10^{12}	1.2×10^6	Gelatina
4	1	5×10^{12} *	2.1×10^7	BSA

Ø entrada: fago-anticuerpos que se colocaron en contacto con la toxina. Ø salida: fago-anticuerpos recuperados del proceso de tamizado. * Ronda con competencia usando el scFv RJI-2.

Los datos obtenidos de los procesos de tamizado y resumidos en la **Tabla 4** nos permiten observar el comportamiento de las poblaciones en cada ronda. Durante un proceso de tamizado típico, se espera que los títulos de fago-anticuerpos recuperados (Ø salida) posterior a las primeras rondas de tamizado bajen significativamente (Bradbury and Marks, 2004). Esto se debe a la presencia de scFvs que muestran una pobre unión al blanco o uniones inespecíficas con el saturante, los cuales se removieron por medio de los lavados exhaustivos

y el cambio de saturante. Es por esta última razón, que el agente saturante debe ser diferente durante cada ronda del tamizado. Mientras que en las siguientes rondas se espera un aumento en los fago-anticuerpo recuperados, debido al enriquecimiento de scFvs que reconocen específicamente al antígeno. En nuestro caso, este principio se cumplió dado que se observó un aumento en el número de fago-anticuerpos obtenidos después de la tercera ronda de tamizado, lo cual es indicativo de la presencia de scFvs que se unen específicamente a la neurotoxina C_{ss2}. Para identificar y aislar aquellas variantes de scFv con mejor reconocimiento por C_{ss2} se realizó la evaluación de variantes independientes elegidas al azar.

4.4 Evaluación del reconocimiento por la toxina C_{ss2}.

Las evaluaciones se realizaron utilizando la población de variantes de scFvs provenientes de la última ronda de tamizado. Estas caracterizaciones permiten identificar los scFvs que muestran las mejores propiedades de unión por la toxina y consistió en 4 etapas principales:

- 1) Evaluación del reconocimiento por ELISA usando scFvs solubles, (expresados de forma independiente en placas de 96 pozos), es decir que no están unidos al fago. Este tipo de evaluación es un poco más exigente en comparación con un ensayo de tipo ELISA de fago-anticuerpo, ya que nos permite observar el reconocimiento de aquellos fragmentos de anticuerpo que lograron ser producidos por la bacteria de forma correcta. Esto es importante, porque se ha observado que los scFvs al estar unidos a la proteína de la cubierta del fago están sujetos a una mayor facilidad de plegamiento y estabilidad que cuando no están ligados en la partícula viral (Russel et al., 2004; Winter et al., 1994). Dentro de las evaluaciones de ELISA, se utilizó el scFv RU1 (Riaño-Umbarila et al., 2016) como control positivo. Las clonas que mostraron mayor señal de reconocimiento se aislaron y se sometieron a pruebas de reconocimiento inespecífico (hacia distintos saturantes como: BSA y leche, entre otros), así como de reactividad cruzada (unión a distintas toxinas). Aquellos scFvs que mostraron señal de reconocimiento por los saturantes se descartaron.
- 2) Posteriormente, las secuencias de los genes correspondientes a las variantes de scFvs con mejor señal de reconocimiento fueron determinadas. El producto

esperado de la reacción es de ≈ 800 pb, por lo que aquellas variantes que no presentaron un producto de PCR con el tamaño esperado fueron eliminadas.

- 3) El material genético de las clonas que contenían el inserto del gen que codifica para el scFv, fue secuenciado para identificar las mutaciones que presentan a nivel de nucleótidos y que se traducen en un cambio de residuo de aminoácido.
- 4) Por último, las distintas variantes de scFv identificadas se expresan y purifican para evaluar el reconociendo por la toxina C_{ss2} de forma más detallada mediante un biosensor de interacciones moleculares en tiempo real (Biacore) (ver sección 1.11).

Mediante la evaluación de los scFvs presentes en la población de la última ronda de tamizado, se lograron identificar dos variantes importantes. La primera, se denominó scFv **ER-3** la cual presenta la mutación **S57R** (CDR2-V_H) y la segunda se nombró scFv **ER-4** que contiene el cambio **K65R** (FW3-V_H) (**Tabla 6**, última columna con leyenda S-R). Aunque los scFvs ER-3 y ER-4 presentan algunas de las mutaciones propuestas mediante el análisis estructural, fue llamativo que no se lograra aislar algún scFv con mutaciones en la posición 236.

4.5 Maduración *in vitro* por evolución dirigida.

En forma paralela se realizó la maduración *in vitro* de los scFv RJI-1, RJI-2 y RJI-3 utilizando la estrategia de evolución dirigida. El banco de variantes obtenido al introducir mutaciones al azar fue de 3.3×10^8 UFC con una tasa mutagénica de 0.41%. Las variantes de scFv se desplegaron en fagos y se sometieron a tres rondas de tamizado (**Tabla 5**).

Tabla 5. Rondas de tamizado contra la toxina C_{ss2} a partir del banco con mutaciones al azar

Ronda	C _{ss2} (µg)	Fagos entrada (Ø/ml)	Fagos salida (Ø totales)	Saturante
1	2.3	8×10^{11}	500,000	BSA
2	2	2×10^{11}	11,000	Leche
3	2	2×10^{10}	50,000	Gelatina
4*	1	5×10^{11}	1.6×10^6	BSA

Ø entrada: fago-anticuerpos que se colocaron en contacto con la toxina. Ø salida: fago-anticuerpos recuperados del proceso de tamizado. * Los fago-anticuerpos se incubaron por 1 hora a 60°C, previo a ser colocados con la toxina.

En la última ronda de tamizado se realizó una modificación con la finalidad de favorecer el aislamiento de variantes con una mejor unión a la toxina C_{ss}2. Posteriormente, se realizó la evaluación de clonas al azar bajo tres de los parámetros antes mencionados: 1) pruebas de ELISA, 2) PCR de colonia y 3) secuenciación de ADN.

Por este método de maduración, se identificaron tres variantes, una denominada scFv **ER-1** que contiene la mutación **D208G** (FW3-V_L), el segundo scFv llamado **ER-3** que presenta el cambio **S57R** (CDR2-V_H) y por último el scFv denominado **ER-3a** que contiene el cambio **S57K** (CDR2-V_H) (**Tabla 6**, última columna con leyenda E.D.). En la evaluación del reconocimiento en ensayos de ELISA por la toxina C_{ss}2, la clona **ER-1** presentó la mayor señal de unión. Es importante mencionar que el scFv **ER-3** se aisló utilizando las dos estrategias de maduración *in vitro*, lo que nos indicaba que la mutación **S57R** presente en este fragmento es importante para el reconocimiento por la toxina C_{ss}2.

Tabla 6. Mutaciones encontradas en los scFvs aislados y generados durante la maduración *in vitro* contra la toxina C_{ss}2.

scFv	VH			VL		Proceso de maduración
	CDR2	FW3	CDR3	FW1	FW3	
C1	54 56 57 D S N	65 88 K A	105 107 110 M A Y	164 S	208 D	
RJI-1	G G S		L T	I	G	Comb.
RJI-2	G G S		L N	I	G	Comb.
RJI-3	G G S		L H	I	G	Comb.
ER-1	G G S		L T	I	G	E. D.
ER-2	G G S		L N	I	G	Comb.
ER-3	G G R		L N	I		E.D. y S-R.
ER-3a	G G K		L N	I		E.D.
ER-3b	G G K		L T	I		Comb.
ER-4	G G S	R	L N	I		S-R
ER-4a	G G R		L N	I	G	Comb.
ER-4b	G G R		L T	I		Comb.
ER-5	G G R	R	L N	I	G	Comb.
ER-6	G G S		L N		G	Comb.

Proceso de Maduración: E.D.: Evolución Dirigida, S-R: Estrategia semi-racional; Comb: Combinatoria, es decir que los scFvs se construyeron por combinación de cambios que se identificaron en otros scFvs.

4.6 Análisis preliminar de los cambios de residuos aislados

Inicialmente el scFv que llamó más la atención se denominó ER-1 ya que presenta un solo cambio (**D208G**), localizado en la región del FW3-V_L, la cual no parece estar involucrado en el reconocimiento de la toxina. Sin embargo, la señal de reconocimiento del

scFv ER-1 por la toxina Css2 fue la más alta de todas las variantes en las pruebas de ELISA, incluso superior a RU1 y sus tres derivados (RJI-1, RJI-2 y RJI-3). Estos resultados sugerían que este cambio jugaba un papel importante en el mejoramiento del reconocimiento por Css2. Como parte de la búsqueda del papel que pudiera estar jugando el residuo G en la posición 208, se realizó un análisis en las bases de datos de las líneas germinales de los anticuerpos IMGT (Lefranc, 2003, 2001; Lefranc et al., 2009, 2005, 1999; Ruiz, 2000). Como resultado de este estudio, pudimos observar que este residuo es altamente conservado principalmente en los dominios tipo V λ 1, reportadas en esta base de datos (**Fig. 10**).

		FW3																																	
		6								7								8																	
CDR1-2		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
VL1	13-7 (A)	G	V	S	D	R	F	S	G	S	K	S	G	--	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	14-7 (A)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	--	T	S	A	S	L	A	I	T	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	13-7 (A)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	--	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	13-7 (A)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	--	T	S	A	S	L	A	I	S	G	L	R	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	13-7 (A)	G	I	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	--	T	S	A	T	L	G	I	T	G	L	Q	T	G	D	E	A	D	Y	Y	C	
VL2	14-7 (A)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	--	N	T	A	S	L	T	V	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	14-7 (A)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	--	N	T	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	14-7 (A)	G	V	S	N	R	F	S	G	S	K	S	G	--	N	T	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	14-7 (A)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	--	N	T	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	14-7 (A)	G	V	S	N	R	F	S	G	S	K	S	G	--	N	T	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
VL3	11-7	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	--	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	M	D	E	A	D	Y	Y	C	
	11-7	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	--	N	T	A	T	L	T	I	S	R	A	Q	A	G	D	E	A	D	Y	Y	C	
	11-7	G	I	P	E	R	F	S	G	S	S	S	G	--	T	M	A	T	L	T	I	S	G	A	Q	V	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	11-7	G	I	P	E	R	F	S	G	S	S	S	G	--	T	I	V	T	L	T	I	S	G	V	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	11-7	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	--	N	T	A	S	L	T	I	T	G	A	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	11-7	G	I	P	E	R	F	S	G	S	N	S	G	--	N	T	A	T	L	T	I	S	R	V	E	A	G	D	E	A	D	Y	Y	C	
	11-7	G	I	P	E	R	F	S	G	S	T	S	G	--	N	T	I	T	L	T	I	S	R	V	L	T	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	11-7	G	I	P	E	R	F	S	G	S	S	S	G	--	T	I	V	T	L	T	I	S	G	V	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	11-7	G	I	P	E	R	F	S	G	S	S	S	G	--	T	I	V	T	L	T	I	S	G	A	Q	V	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
VL4	12-11	G	I	P	D	R	F	M	G	S	S	S	G	--	A	D	R	Y	L	T	F	S	N	L	Q	S	D	E	A	E	Y	H	C		
	12-11	G	V	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	--	A	D	R	Y	L	T	I	S	N	L	Q	L	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	12-11	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	--	A	E	R	Y	L	T	I	S	S	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
VL5	14-11	G	V	P	S	R	F	S	G	S	K	D	A	S	A	N	T	G	I	L	L	I	S	G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
	14-11	G	V	P	S	R	F	S	G	S	K	D	A	S	A	N	A	G	I	L	L	I	S	G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C
	14-11	G	V	P	S	R	F	S	G	S	N	D	A	S	A	N	A	G	I	L	R	I	S	G	L	Q	F	E	D	E	A	D	Y	Y	C
VL6	13-7 (B)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	I	D	S	S	S	N	S	A	S	L	T	I	S	G	L	R	T	E	D	E	A	D	Y	Y	C
VL7	14-7 (B)	W	T	P	A	R	F	S	G	S	L	L	G	--	G	K	A	A	L	T	L	S	G	V	Q	F	E	D	E	A	E	Y	Y	C	
	14-7 (B)	W	T	P	A	R	F	S	G	S	L	L	G	--	G	K	A	A	L	T	L	S	G	A	Q	F	E	D	E	A	E	Y	Y	C	
VL8	14-7 (B)	G	V	P	D	R	F	S	G	S	I	L	G	--	N	K	A	A	L	T	I	T	G	A	Q	A	D	E	S	D	Y	Y	C		
VL9	12-12	G	I	P	D	R	F	S	V	L	G	S	G	--	L	N	R	Y	L	T	I	K	N	I	Q	E	D	E	S	D	Y	H	C		
VL10	13-7 (C)	G	I	S	E	R	L	S	A	S	R	S	G	--	N	T	A	S	L	T	I	T	G	L	Q	F	E	D	E	A	D	Y	Y	C	

Figura 10. Alineamiento de la región del FW3 de la línea germinal V λ 1 humana. Se muestran las secuencias correspondientes al FW3-V λ 1. El residuo G en la posición 208 (en rojo) se encuentra conservado dentro de la familia de estos dominios de anticuerpo.

La reversión a la línea germinal del cambio D 208 G sugiere que se favorece la estructura consenso y por ende el plegamiento del dominio V_L, lo cual puede proveer de mayor estabilidad a los anticuerpos que la contienen. Adicionalmente, se determinó el patrón de reconocimiento de dos scFvs hacia la toxina Css2 mediante SPR: RJI-1 que presenta el residuo D208 y ER-1 con el residuo G208 (**Fig. 11**).

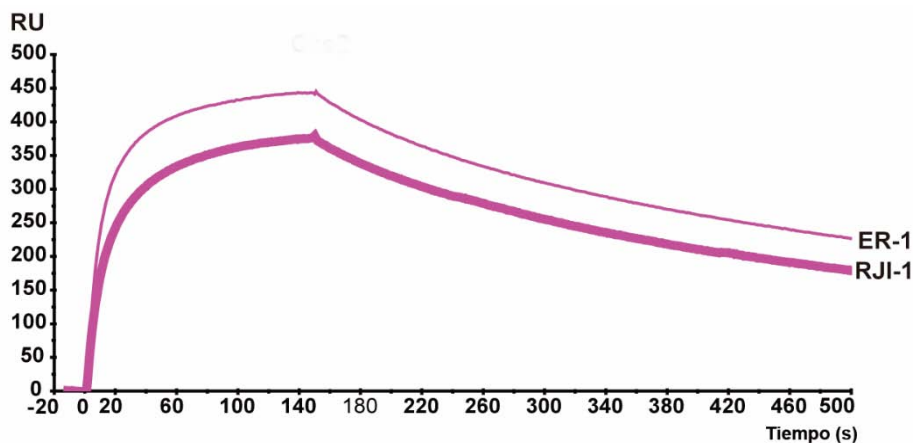


Figura 11. Aportación del residuo G208 en la interacción con C_{ss}2. Se muestran los patrones de reconocimiento hacia la toxina C_{ss}2, obtenidos por SPR de los scFvs RJI-1 (línea gruesa) que presenta el residuo D208, en comparación con el scFv ER-1 (línea delgada) que contiene el residuo G208.

La comparación de las curvas de interacción de las dos variantes (RJI-1 y ER-1) muestra que la presencia del cambio G208 está favoreciendo la interacción con la toxina C_{ss}2, dado que se observa un aumento en la sección de la curva que describe la velocidad de asociación. A pesar de este resultado, es necesario realizar una evaluación más profunda de la influencia de la presencia del cambio D208G.

Adicionalmente, dos cambios que se identificaron en los procesos de maduración fueron S57R y S57K (CDR2-V_H) (**Tabla 5**; scFv 3 y 3a). Con la finalidad de tener un primer acercamiento sobre la influencia de estos dos residuos en la interacción con C_{ss}2, se modelaron *in silico* estas mutaciones sobre el modelo previamente generado del scFv RJI-2-C_{ss}2 (sección 3.6).

En el análisis estructural, se observa que los cambios S57R ó S57K (CDR2-V_H), favorecen que las cadenas laterales de estos tengan una mayor cercanía con el residuo S7 de la toxina C_{ss}2, lo cual sugiere la formación de un puente de hidrógeno adicional entre ambas moléculas (**Fig. 12**). Aunque el cambio S57R en la variante ER-3 parece tener mayor cercanía con S7 de la toxina y por lo tanto sugerir que la interacción entre los residuos sea más fuerte (**Fig. 12B**), no se puede descartar que el cambio S57K pudiera también mejorar la interacción entre las moléculas en cuestión. Por lo tanto, con la finalidad de poder comprender el aporte de las mutaciones R y K en la posición 57 a nivel de interacción con C_{ss}2 y su aporte en el contexto de todos los residuos aislados, se implementó la construcción de diferentes variantes

con la combinación de los cambios identificados tanto del proceso de evolución dirigida como semi-racional (**Tabla 6**) para ser evaluadas.

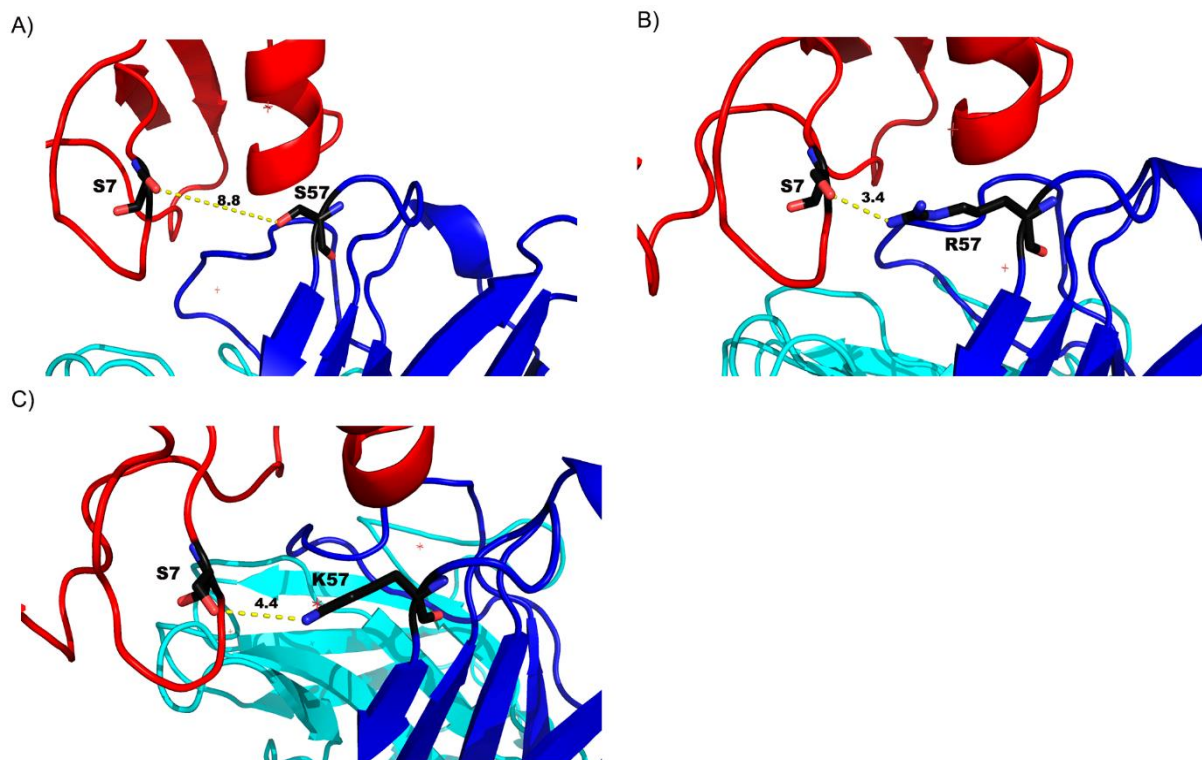


Figura 12. Modelos estructurales de los scFvs RJI-2, ER-3 y ER-3a con la toxina C_{ss}2. Modelos de las mutaciones en la posición 57 de los scFvs aislados en los procesos de maduración. **A)** Se muestra la ubicación del residuo S7 de la toxina C_{ss}2 (rojo) y la distancia (línea punteada amarilla) en Armstrongs entre la cadena lateral de este aminoácido con el residuo S57 ubicado en el dominio V_H (azul) presente en el scFv RJI-2. Asimismo, se muestran las distancias de S7 de la toxina con el residuo R57 (**B**) del scFv ER-3 y el residuo K57 (**C**) encontrados en el scFv ER-3a.

Adicionalmente, se observó que no se aisló ninguna variante con el residuo histidina (H), en la posición 110 (CDR3-V_H), presente en el scFv RJI-3, lo que puede indicar que este cambio no favorece el reconocimiento por C_{ss}2 en este contexto.

4.7 Combinatoria de cambios como estrategia para mejorar las propiedades de interacción de los scFvs.

En trabajos previos dentro del grupo de investigación, hemos determinado que al combinar algunas mutaciones presentes en distintos fragmentos de anticuerpos aislados en procesos de maduración *in vitro* independientes, se logran obtener scFvs con mejores propiedades de interacción contra las toxinas (Arredondo López, 2015; Riaño-Umbarila et al., 2016, 2011; Rodríguez-Rodríguez et al., 2012). Continuando con esta estrategia, decidimos

generar un grupo de nuevos scFvs que tuvieran la combinatoria de cambios encontrados en los scFvs aislados en los procesos de maduración antes descritos (sección 4.4 y 4.5). Las posiciones y residuos que se combinaron fueron: **R y K** en la posición **57** (CDR2-V_H); **R y K** en **65** (FW3-V_H); **T y N** en **110** (CDR3-V_H); **G y D** en **208** (FW3-V_L). Estas nuevas variantes de scFvs generadas (Tabla 6; última columna con la leyenda Comb.), así como las aisladas por medio de los procesos de maduración *in vitro* (Tabla 6; leyendas E.D y S-R), se expresaron y purificaron para determinar las curvas de interacción por medio del Biacore. Lo que se buscó con esta evaluación, fue identificar aquellos scFvs cuya pendiente en la región de la curva correspondiente a la disociación fuera menor, y de esta forma, poder discernir entre los mejores fragmentos de anticuerpo. El interés en este parámetro se basa en la observación de que una menor velocidad de disociación es indicativo de que el scFv se mantiene unido mayor tiempo a la toxina (T_R) (secciones 1.12, 3.14 y 4.1.9) lo cual se refleja en una mejor capacidad neutralizante (Riaño-Umbarila et al., 2016, 2013). A partir de los sensogramas obtenidos, se observó que los scFvs **ER-3** (**S57R, H110N y S164I**) y **ER-4a** (**S57R, H110N, S164I y D208G**) (Tabla 6) mostraron una menor pendiente en la curva correspondiente a la disociación y además de una mejor asociación (Fig. 13).

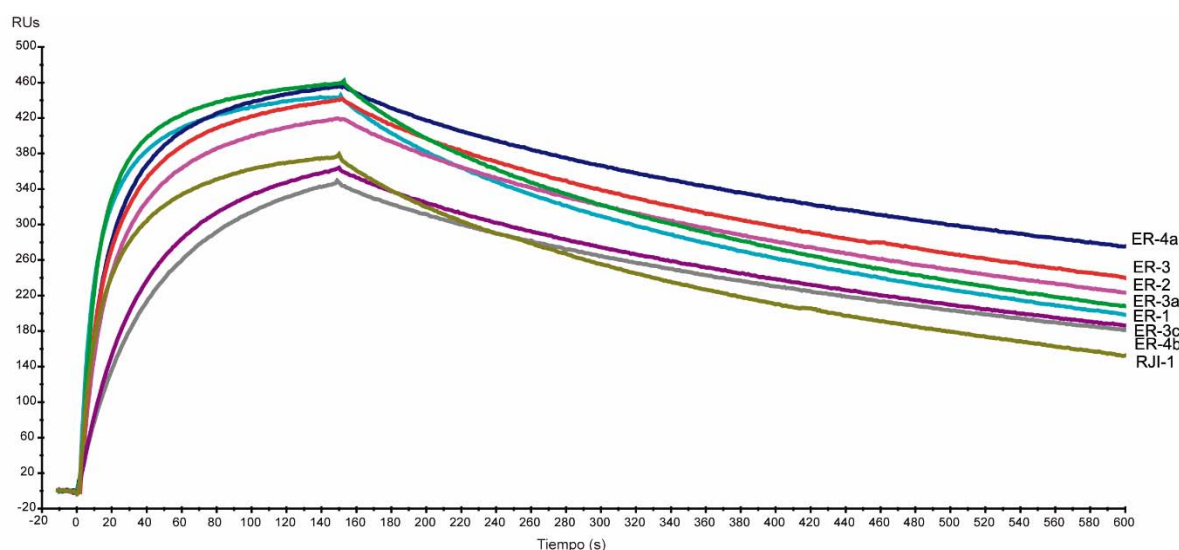
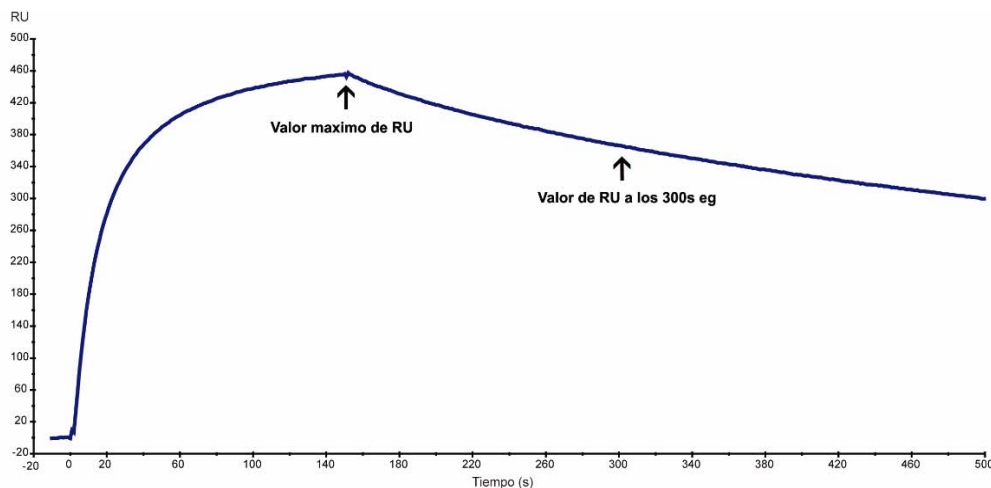


Figura 13. Sensogramas que muestran la cinética de la interacción de distintos scFvs contra la toxina Css2. Se muestran las curvas obtenidas de la interacción de los distintos scFvs contra la toxina Css2 en el Biacore. Los scFvs que mostraron tener el mejor patrón cinético de interacción (asociación y disociación) fueron los scFvs 3 (rojo) y 4a (azul).

Para poder corroborar que los scFvs ER-4a y ER-3 presentaban la mejor interacción con Css2, se realizó un segundo análisis cuantitativo basado en los sensogramas obtenidos. Para confirmarlo, se graficaron los valores máximos de unión (*resonance units*; RU max,)

(Ver sección 1.12) de cada scFv en un tiempo determinado durante el período de disociación (Fig. 14).

A)



B)

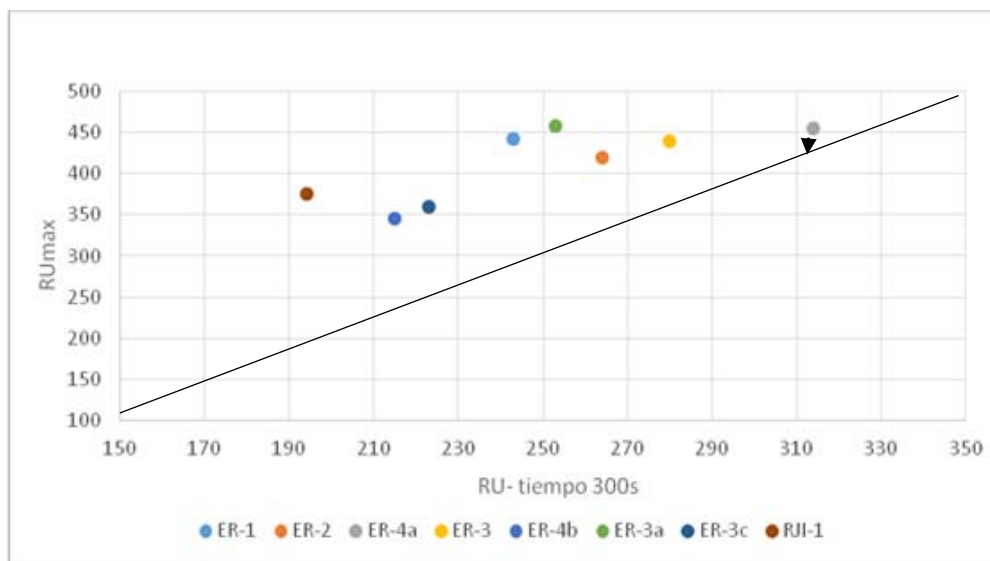


Figura 14. Análisis de las diferentes variantes de scFv a nivel de interacción por la toxina Css2. A) Se muestra el ejemplo de un sensograma generado por la interacción de un scFv con la toxina Css2 en el Biacore. Los valores utilizados para el análisis de las variantes fueron las unidades de resonancia máxima (RUmax) obtenidos al final de la curva correspondiente a la fase de asociación y el valor de unidades de resonancia (RU) a un tiempo dado en la curva de disociación; en este caso se muestra a los 300 segundos. B) Los valores resultantes se graficaron y aquellas variantes cuya posición se encontró más cercana a la recta son las que presentaron las mejores propiedades de disociación. En este caso el mejor scFv fue el ER-4a, seguida de ER-3.

Adicionalmente, se realizó una prueba preliminar de estabilidad funcional de los scFvs. Las distintas variantes, se incubaron en presencia de cloruro de guanidinio (ver sección 3.14) y posteriormente se determinó cuanto disminuyó la capacidad de unión a la toxina C_{ss}2. Los resultados se muestran en la **Figura 15**.

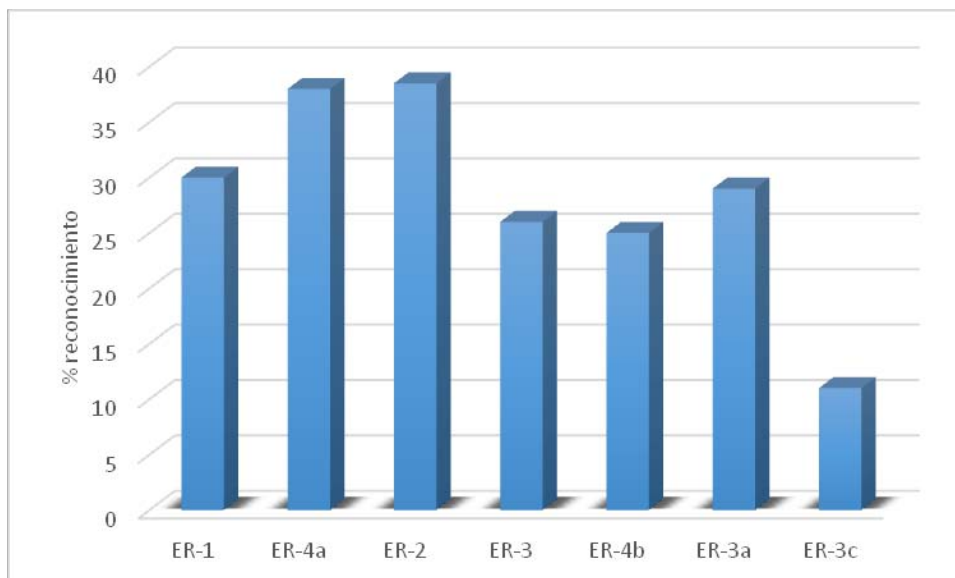


Figura 15. Estabilidad funcional de las variantes de scFv. Se muestra el porcentaje de reconocimiento de los diferentes scFvs aislados por maduración y construidos por combinación de cambios, después de ser incubadas en presencia de GdnHCl (0.5M), comparado con el reconocimiento de los mismos fragmentos de anticuerpo en ausencia del agente desnaturalizante.

Estos resultados preliminares, muestran un patrón donde las variantes que presentan la mutación D208G, experimentan una menor caída en la interacción, comparadas con los scFvs que no la presentan. Estos resultados indican que de la presencia del residuo G en la posición 208 tiene un mayor aporte a nivel de estabilidad que se ve también reflejado en la mejora de la interacción con la toxina.

Con el análisis de estos resultados (**Fig. 13, 14 y 15**), se logró determinar que el scFv ER-4a (RU1 con los cambios **N57R, H110N, S164I y D208G**) (**Tabla 6**), presentó el mejor nivel de unión con la toxina C_{ss}2 comparado con el resto de las variantes ensayadas.

Asimismo, uno de los cambios encontrados durante los procesos de maduración, fue K65R presente en la variante **ER-4** (**Tabla 6**) el cual aún no había sido evaluado y además de ser predicho por la estrategia semi-racional (ver sección 3.6). Para determinar su importancia, este cambio se introdujo en el scFv **ER-4a** que era la mejor variante generada hasta ese

momento contra la toxina Css2. La nueva construcción se denominó scFv **ER-5** (RU1 con los cambios **N57R, K65R, H110N, S164I y D208G**) (Tabla 6 y Fig. 16).

Para poder discernir cuál de las dos variantes (**ER-4a ó ER-5**), presentaba mejor actividad biológica, se evaluó su capacidad neutralizante mediante ensayos *in vivo* contra la toxina Css2 (Tabla 7) y el veneno completo de *C. suffusus* (Tabla 8).

Tabla 7. Capacidad neutralizante de los scFvs ER-4a y ER-5 contra Css2.

scFv	DL ₅₀	Relación molar (toxina:scFv)	Supervivencia (vivos/totales)
ER-4a	1	1:10	10/10
ER-5	1	1:10	10/10
ER-4a	1	1:5	10/10
ER-5	1	1:5	10/10
Solo toxina (Control)	1	1:0	1/10

Tabla 8. Capacidad neutralizante de los scFvs ER-4a y ER-5 contra el veneno de *C. suffusus*.

scFv	DL ₅₀	Relación molar (toxina:scFv)	Supervivencia (vivos/totales)
ER-4^a	2	1:10	10/10
ER-5	2	1:10	10/10
ER-4^a	3	1:10	6/10 ^{b-c}
ER-5	3	1:10	7/10 ^{a-b}
Solo veneno (Control)	2	1:0	0/10
Solo veneno (Control)	3	1:0	0/10

La presencia e intensidad de síntomas de intoxicación se categorizó de la siguiente manera: a, leves; b, moderados; c, severos (ver sección 3.1.6). Todos los ratones del grupo control muestran síntomas graves de intoxicación. Las relaciones molares en ambos ensayos se calcularon en relación a la proporción de toxina Css2 (2.8%) dentro del veneno.

Se observó que ambos fragmentos de anticuerpo tienen la capacidad de neutralizar el efecto nocivo de la toxina Css2 en las condiciones evaluadas. De igual forma, ambos scFvs

neutralizan completamente al veneno de *C. suffusus* cuando se utilizan 2 DL₅₀ de este último. Solo cuando se administró una concentración más alta de veneno (3 DL₅₀), se logró observar una pequeña diferencia en la capacidad neutralizante entre los dos fragmentos. El scFv ER-5 permitió proteger un ratón más en el grupo correspondiente y se observó una disminución de la gravedad de los síntomas de intoxicación en los animales, en comparación con el ER-4a. Los resultados obtenidos de estas pruebas, nos llevaron a concluir que el scFv **ER-5** era el mejor fragmento contra la toxina C_{ss2} y por lo tanto sería caracterizado profundamente.

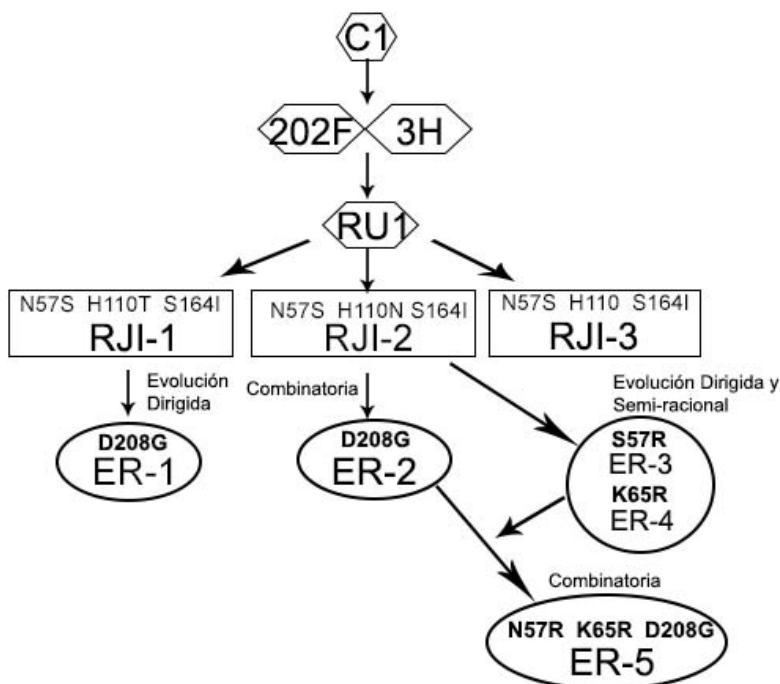


Figura 16. Genealogía de los scFv derivados del parental scFv C1. Resumen de los fragmentos de anticuerpos con mejores propiedades obtenidos en trabajos previos (hexágonos), aquellos que se obtuvieron al inicio de este proyecto (rectángulos) y los generados en este trabajo (óvalos). Se muestra el nombre de las variantes, así como, las mutaciones que se acumularon (parte superior del nombre) durante los procesos de mejoramiento de la capacidad neutralizante. Se indica con flechas el camino que llevó a generar las nuevas variantes así como el método por el cual se obtuvieron.

4.8 Ensayos de expresión del scFv ER-5

El rendimiento obtenido del scFv ER-5 utilizando las condiciones reportadas por Riaño *et al.* (2005) fue de 0.950 mg de proteína pura por cada litro de cultivo. Esta cantidad de proteína está por debajo de la cantidad obtenida con otras variantes derivadas del parental C1, como son los scFvs 202F (1.5 mg L⁻¹) (Riaño-Umbarila *et al.*, 2013) y RU1 (2.2 mg L⁻¹)

(Riaño-Umbarila et al., 2016). Con la finalidad de tratar de obtener mayor cantidad de proteína, se decidió realizar ensayos de expresión modificando tres parámetros (**ver sección 3.13**). Sin embargo, solo se logró un pequeño aumento en el rendimiento a la cantidad de 1.1 mg L⁻¹ del scFv ER-5 al disminuir la temperatura de expresión de 30° C a 25°C. Es probable que modificando el sistema de expresión como por ejemplo usando levaduras, se pueda mejorar el rendimiento considerablemente.

4.9 Parámetros cinéticos y reactividad cruzada del scFv ER-5

El scFv **ER-5** (mutaciones **R57 (CDR2-V_H)**, **R65 (FW3-V_H)**, **N110 (CDR3-V_H)**, **I164 (FW1-V_L)** y **G208 (FW3-V_H)**) (ver **Tabla 6** y **Fig. 16**), presentó el mejor valor de afinidad contra la toxina C_{ss2} (**Tabla 9**). Asimismo, se realizó la determinación de las constantes cinéticas contra la toxina C_{ss4}, la cual también se encuentra contenida en el veneno de *C. suffusus* (0.6% del total) y presenta alta similitud con la toxina C_{ss2} (**Fig. 8**). Esta toxina ya ha sido caracterizada por su efecto contra mamíferos, aunque su actividad es menos tóxica debido a que se encuentra en baja proporción con respecto a C_{ss2} (Cestèle and Catterall, 2000; S Cestèle et al., 1998; Martin et al., 1987). El valor de afinidad (K_D) determinado para el scFv ER-5 hacia la toxina C_{ss4} fue mayor que por la toxina C_{ss2}, aunque esta diferencia se debe al aumento en la velocidad de asociación (k_a), y no un cambio en la velocidad de disociación (k_d) que es similar para ambas toxinas. Resultados previos en nuestro grupo de investigación, nos han llevado a concluir que este último parámetro, tiene mayor relevancia a nivel funcional (Riaño-Umbarila et al., 2016, 2013). A partir del valor de k_d , se puede determinar el tiempo que el scFv se mantiene unido a la toxina (*Time of residence*; T_R). Cuanto mayor sea este último valor, se observará una mejor capacidad neutralizante. En este caso, los valores de T_R son similares. La relevancia de este parámetro en nuestro trabajo se discute más ampliamente en las secciones **4.1.9** y **5.1**.

Adicionalmente, se evaluó la reactividad cruzada del scFv ER-5 hacia las toxinas Cn2 y Cll1 por medio de la determinación de la afinidad (K_D) (**Tabla 9**).

Tabla 9. Constantes de afinidad de la variante ER-5 contra distintas neurotoxinas.

	scFv	Toxina	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)	Tiempo de unión (min)
n=3	ER-5	Css2	$1.2 \times 10^5 \pm 0.2$	$1.2 \times 10^{-3} \pm 0.05$	$1 \times 10^{-8} \pm 0.008$	14
	ER-5	Css4	4.8×10^5	1.1×10^{-3}	2.3×10^{-9}	15
	RU1	Cn2	6.8×10^4	4.0×10^{-4}	5.9×10^{-9}	42
n=2	ER-5	Cn2	$2.1 \times 10^5 \pm 0.7$	$2.7 \times 10^{-4} \pm 0.3$	$1.2 \times 10^{-9} \pm 0.5$	62
	RU1	CII1	13.2×10^4	9.2×10^{-4}	6.8×10^{-9}	18
n=2	ER-5	CII1	$2.2 \times 10^5 \pm 0.7$	$4.7 \times 10^{-4} \pm 1$	$2.1 \times 10^{-9} \pm 0.5$	35

Parámetros cinéticos: velocidad de asociación (k_a), de disociación (k_d) y constante de afinidad (K_D). El tiempo de unión se calculó con base al valor de k_d como ya se mencionó.

Los valores obtenidos de los parámetros cinéticos del scFv ER-5 hacia la toxina Cn2 y CII1, fueron superiores a los mostrados por su parental RU1. Estos datos indican que la combinatoria de los cambios, brindó una mejora en las propiedades de unión de este scFv. Particularmente, el valor de la afinidad (K_D), se vio favorecido como consecuencia de la disminución en la velocidad de disociación (k_d). Esta disminución en los valores de k_d se ve reflejado en tiempos mayores de unión (T_R). Estos datos, muestran que el grupo de variantes derivadas de C1, mantienen una alta flexibilidad en cuanto al reconocimiento, igualmente eficiente por las toxinas provenientes del veneno de distintos alacranes del género *Centruroides*. Esta propiedad puede explicarse por la alta identidad que comparten estas toxinas de alacrán (**Fig. 7**). Los datos obtenidos en la mejora de las constantes cinéticas, confirma que para los derivados de C1, la estrategia de combinar los distintos cambios de residuos asilados en los procesos de maduración, en un solo scFv, es la mejor opción. Lo anterior ocurrió a pesar de que los cambios que se presentan en estas variantes se aislaron durante los procesos de maduración *in vitro* contra la toxina Css2.

4.10 Capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra la toxina Css2.

Para evaluar la capacidad de neutralización del scFv ER-5 contra la toxina Css2, se realizaron pruebas *in vivo* en ratones. Los resultados resumidos en la **Tabla 10**, muestran que el scFv **ER-5** neutralizó hasta 2 DL_{50} de la toxina Css2 sin que se observaran síntomas de intoxicación en los ratones, lo cual se logró aun cuando se redujo a la mitad la relación molar considerada como estándar en los ensayos de neutralización; de 1:10 a 1:5 toxina:scFv. Este resultado es relevante, debido a que utilizando 1 DL_{50} en el grupo control, la sobrevivencia

fue del 20%, lo cual significa que la toxicidad de C_{ss}2 estaba subestimada. Por lo tanto, el potencial neutralizante de ER-5 contra la toxina puede ser significativamente mayor.

Tabla 10. Capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra la toxina C_{ss}2

scFv	DL ₅₀	Relación molar (toxina:scFv)	Supervivencia (vivos/total)
ER-5	1	1:10	10/10
ER-5	1	1:5	10/10
ER-5	2	1:10	10/10
ER-5	2	1:5	10/10
Toxina sola (control)	1	1:0	2/10
Toxina sola (control)	2	1:0	0/10

4.11. Capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra el veneno completo de *C. suffusus*.

Como se mencionó (secciones 2.3 y 2.4), se ha demostrado que al neutralizar a la(s) toxina(s) más abundante(s) y tóxica(s) para mamíferos presentes en los venenos de alacranes, es posible abatir la toxicidad del mismo (Hmila et al., 2010; Riaño-Umbarila et al., 2011, 2005; Zamudio et al., 1992). Por esta razón, se evaluó si el scFv **ER-5** al neutralizar a la toxina C_{ss}2, lograba inhibir la toxicidad del veneno completo fresco de *C. suffusus*. En este ensayo de protección, se observó que ER-5 fue capaz de neutralizar 2 DL₅₀ del veneno completo, sin la aparición de síntomas de intoxicación. Estos resultados, nos motivaron a someter a la variante ER-5 a una prueba más drástica utilizando 3 DL₅₀ de veneno. En este último caso, la sobrevivencia fue del 90% y no se lograron eliminar totalmente los síntomas de envenenamiento en los ratones sobrevivientes, aun cuando la relación molar del fragmento de anticuerpo con la toxina se incrementó hasta 1:30 (**Tabla 11**). Con la finalidad de lograr la neutralización completa del veneno y de verificar parte de la hipótesis de este trabajo, se ensayó la mezcla de los scFvs **ER-5** y **LR** (este último, neutralizante de un epítipo diferente presente en la toxina C_{ss}2) (Riaño-Umbarila et al., 2016). Se encontró que dicha combinación fue capaz de neutralizar completamente 3 DL₅₀ de veneno, incluso en una proporción molar de 1:5 (considerada baja) de cada uno de ellos (**Tabla 11**). Estos resultados demostraron que efectivamente existe un efecto complementario entre los dos fragmentos de anticuerpo, ya que la presencia de ambas variantes se tradujo en la neutralización completa del veneno de *C. suffusus* de manera más eficiente en comparación a cuando se usa solo el scFv ER-5.

Tabla 11. Pruebas de neutralización del veneno completo de *C. suffusus*.

scFv	DL ₅₀	Relación Molar (toxina Css2:scFv)	Supervivencia (vivos/total)
ER-5	2	1:10	10/10
ER-5	2	1:20	10/10
ER-5	3	1:30	9/10 ^{a-b}
ER-5 y LR	2	1:10* (1:20)	10/10
ER-5 y LR	3	1:10* (1:20)	10/10
ER-5 y LR	3	1:5*(1:10)	10/10
Veneno solo (Control)	2	1:0	0/10 ^c
Veneno solo (Control)	3	1:0	0/10 ^c

La presencia e intensidad de los síntomas de intoxicación se categorizaron de la siguiente manera: a, leves; b, moderados; c, severos. La relación molar se calculó en relación a la proporción de toxina Css2 (2.85). *La relación molar se refiere a cada uno de los scFvs.

4.12 Pruebas *in vivo* de rescate

Adicionalmente a las pruebas de neutralización reportadas (**Tabla 11**), se realizó una evaluación preliminar *in vivo* de los scFvs mediante ensayos denominados de rescate. En estos ensayos, se trató de evaluar si utilizando el scFv ER-5 solo o en combinación con LR, era posible revertir la intoxicación causada por el veneno del alacrán *C. suffusus* en los ratones. La importancia de las pruebas de rescate es que tratan de simular, de la forma más parecida, lo que sucede en condiciones naturales en un accidente por picadura de alacrán en pacientes picados. Experimentalmente, se inyectó a los ratones con el veneno fresco del alacrán *C. suffusus*. Posteriormente, se esperó un intervalo de tiempo en el cual los síntomas de intoxicación en los ratones estuvieran en el rango de moderados a severos para entonces administrarles el(los) scFv(s). En la primera etapa de estas pruebas, se ensayó solo el scFv ER-5 contra el veneno completo. Los resultados demostraron que después de 10 min post-inyección de 2 DL₅₀ de veneno, con la administración del scFv ER-5 se logró revertir el envenenamiento y rescatar a los individuos (**Tabla 12**). En la segunda etapa, se decidió aumentar la concentración de veneno a 3 DL₅₀ y asimismo, aumentando el tiempo de espera para después inyectar la mezcla del scFv ER-5 con LR. Utilizando ambos fragmentos se logró rescatar al 90% de los ratones del grupo experimental (**Tabla 12**). La mezcla anterior tuvo ese efecto usando tan solo una relación molar de 1:5 de cada una de la variantes (final 1:10 toxina:scFv), aun a un tiempo de 13 minutos posteriores a la inyección del veneno. Estos resultados se lograron a pesar de que en los ratones del grupo control, inyectados con 3 DL₅₀ de veneno se observaron severos síntomas de envenenamiento después de 5 min de la

administración del veneno y a los 10 min, su salud se encontraba severamente comprometida. La rápida intoxicación que se produjo con 3 DL₅₀ de veneno, sugiere que el individuo no rescatado con la mezcla de ambos scFvs, ER-5 y LR, se encontraba irreversiblemente afectado por lo que no se logró recuperarlo. Es posible que aumentando la cantidad de ambos scFvs y modificando la vía de administración por vía intravenosa, se logre el rescate total de los ratones. Es importante enfatizar que los síntomas de envenenamiento en los animales rescatados en este ensayo, disminuyeron significativamente, llegando a desaparecer completamente en un periodo de entre 20 a 30 min.

Tabla 12. Ensayo de rescate contra el veneno de *C. suffusus*.

scFv	DL ₅₀	Tiempo esperado después de la aplicación de veneno	Relación molar (toxina C _{ss2} : scFv)	Supervivencia (vivos/total)
ER-5	2	10 min	1:10	10/10
ER-5 y LR	3	13 min	1:5 c/u (1:10)	9/10
Veneno solo (Control)	2		1:0	0/10
Veneno solo (Control)	3		1:0	0/10

En este ensayo, todos los animales mostraron síntomas de envenenamiento. Las relaciones molares en ambos ensayos se calcularon en relación a la proporción de la toxina C_{ss2} (2.8%) dentro del veneno.

4.13 Competencia de reconocimiento por dos epítomos dentro de la toxina C_{ss2}.

Para confirmar que los scFv **ER-5** y **LR**, derivados de los parentales C1 y 3F, respectivamente, se unen a epítomos diferentes, se implementaron ensayos de competencia utilizando el Biacore. Esta prueba consistió en saturar un epítomo dentro la toxina con uno de los scFvs (ER-5 o LR) mediante inyecciones consecutivas del fragmento de anticuerpo en un chip con la toxina C_{ss2} inmovilizada. La saturación se observa cuando al inyectar la misma concentración del mismo scFv, no se detecta un aumento en la señal de resonancia (RUs) (ver sección **1.11**). Inmediatamente, se inyecta el segundo scFv (LR ó ER-5), el cual se espera que interactúe con un segundo epítomo que no se encuentra ocupado por el primer fragmento y esto se vea reflejado en el aumento en la señal de resonancia (RUs). El análisis del sensograma resultante de esta prueba muestra que ambos scFvs, derivados de C1 y 3F, mantienen la capacidad de unirse a dos epítomos diferentes (**Fig. 17A-B**). Como primer

ensayo control se inyectaron ambos scFvs: ER-5 y LR de forma separada y en mezcla de forma independiente. En esta prueba se observa que la suma de las unidades de respuesta dada por la unión de los scFvs por separado es equivalente a la respuesta obtenida por la inyección de la mezcla de ambos (**Fig. 17C**). Finalmente, se realizó la misma prueba de competencia, a diferencia de que posterior a la saturación del epítipo reconocido por scFv ER-5, se inyectó el scFv RU1, derivado también de C1. En esta prueba, no se observó aumento en la señal de resonancia al administrar el segundo scFv, lo cual indica que el sitio al que se une RU1 está siendo ocupado por ER-5 (**Fig. 17D**).

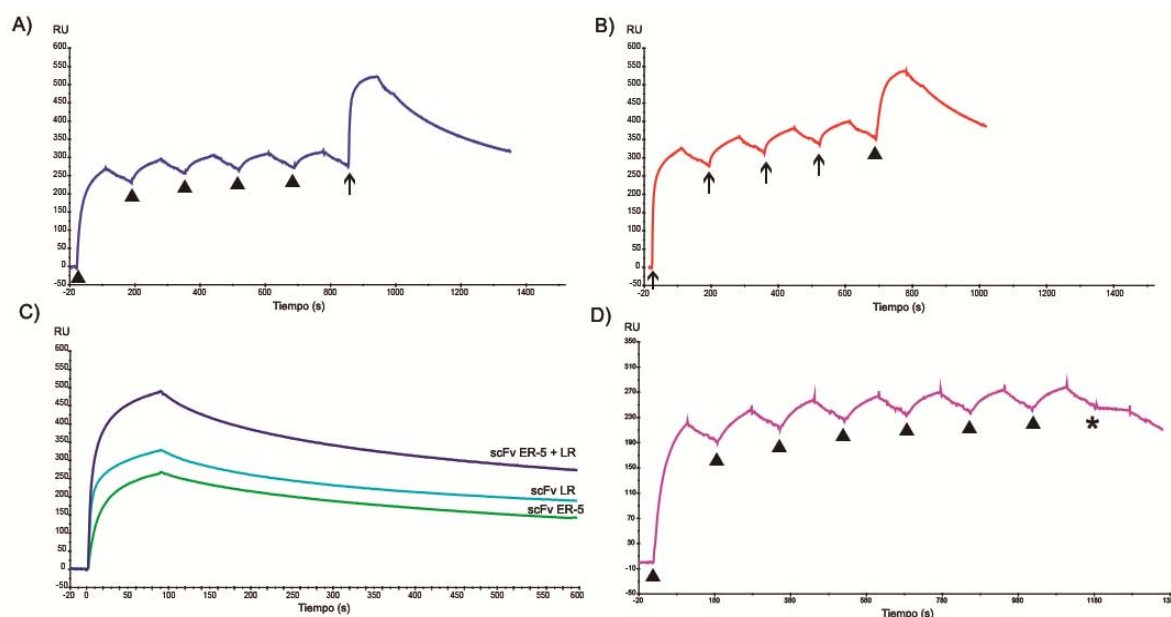


Figura 17. Ensayos de competencia por el reconocimiento hacia dos epítipos en la toxina C2s. A-B) Se muestran los sensogramas resultado de la saturación de un epítipo con el scFv ER-5 (triángulos), seguido de la inyección del scFv LR (flecha) y viceversa. En los sensogramas se observa un aumento en la señal de respuesta (RUs), al inyectar el segundo scFv, lo cual indica la unión de este fragmento a un segundo sitio. **C)** Sensogramas obtenidos de la inyección de los scFv ER-5 y LR de forma separada y en mezcla, ver texto **D)** Se muestra el sensograma de la prueba control, en la cual se realizó la saturación del epítipo que reconoce el scFv ER-5 (flechas) y posteriormente se inyectó el scFv RU1 (asterisco).

4.14 Evaluación de la capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra las toxinas Cn2 y C11.

Los altos valores de afinidad (K_D) que se obtuvieron del scFv, ER-5 así como los tiempos de unión (T_R) (**Tabla 9**), indicaban que este fragmento podría ser neutralizante de las

toxinas CII1 y Cn2. Por lo tanto, se determinó su capacidad neutralizante contra ambas beta-toxinas.

Tabla 13. Capacidad neutralizante del scFv ER-5 contra las toxinas Cn2 y CII1.

Neutralización de 1DL₅₀ de CII1	
scFv ER-5	Relación molar (toxina :scFv) 1:2 Supervivencia (vivos/totales) 8/8
Toxina sola (control)	5/10

Neutralización de 2DL₅₀ de Cn2	
scFv ER-5	Relación molar (toxina :scFv) 1:5 Supervivencia (vivos/totales) 10/10
Toxina sola (control)	1/10

Los datos muestran que el scFv ER-5 es capaz de neutralizar a las dos toxinas, incluso en relaciones molares bajas (1:5 y 1:2; toxina: scFv) comparadas con las que se usan de manera estándar (1:10). Sobresaliendo la capacidad de neutralizar 2 DL₅₀ de la toxina Cn2 equivaliendo a 7 veces más toxina que CII1.

Es importante puntualizar que la nueva variante ER-5 mostró, comparativamente, una capacidad neutralizante superior a RU1 manteniendo una alta reactividad cruzada (Riaño-Umbarila et al., 2016). Estos resultados de neutralización confirman la correlación que se había descrito antes en nuestro laboratorio por Riaño-Umbarila et al., (2016) entre los tiempos de unión (T_R) y la capacidad neutralizante. La mejora en los valores de T_R se ve reflejada en la optimización de la capacidad neutralizante de los scFvs, como ocurrió en este caso para las toxinas Cn2 y CII1 (**Tabla 9**).

4.15 Análisis estructural del scFv ER-5

Finalmente, para tratar de entender a nivel estructural el papel de los cambios encontrados en el scFv ER-5, sobre la interacción con la toxina Cn2, se construyó el modelo

in silico del complejo binario scFv-toxina. Inicialmente, se evaluó la posición 110 (CDR3-V_H), la cual previamente se reportó que el residuo H presentaba interacción con el residuo D108 por medio de un puente de hidrógeno, resultando en una estabilización del CDR3-V_H (Riaño-Umbarila et al., 2016). En el caso del ER-5 la presencia de N en la posición 110 incrementa la distancia a 3.06 Å entre el residuo D108 en comparación a lo reportado de 2.95 Å con el residuo H (Riaño-Umbarila et al., 2016). Este incremento en las distancias, sugiere la pérdida de interacción entre ambos residuos, lo cual parece favorecer levemente la flexibilidad del CDR3-V_H, viéndose reflejado en una mejora del reconocimiento por distintas toxinas sin perder afinidad (**Tabla 8**). Adicionalmente, en el modelo del scFv ER-5 con C_{ss2}, se observó que las cadenas laterales de los residuos R57 (CDR2-V_H) y R65 (FW3-V_H) son de mayor tamaño comparadas con S57 y K65, lo cual favorece la formación de puentes de hidrógeno con los residuos S7 y S9, respectivamente (**Fig. 18A**). Estas nuevas interacciones, explican la mejora en la capacidad neutralizante de ER-5 contra C_{ss2}.

Un cambio que también mejoró las interacciones de los scFvs, fue el D208G (FW3-V_L). A nivel molecular, el modelo no pudo ayudar a dar una interpretación lógica del aporte de G208 en la mejora en la interacción de los scFvs con las toxinas. Sin embargo, podemos sugerir que en particular el cambio D208G, al no presentar una cadena lateral voluminosa, puede dotar de mayor flexibilidad al asa estructural que lo contiene y repercutir en las dos hebras beta, así como al asa cercana que contiene el cambio S164I (FW1-V_L) (**Fig. 18B**). Sería importante evaluar otras mutaciones en esta zona, por residuos con cadenas laterales cortas como la glicina para determinar si aumentando la flexibilidad de esta zona, los scFvs pueden beneficiarse logrando que ciertas modificaciones estructurales del CDR3-V_L redunden en mejores propiedades de reconocimiento y neutralización de las toxinas.

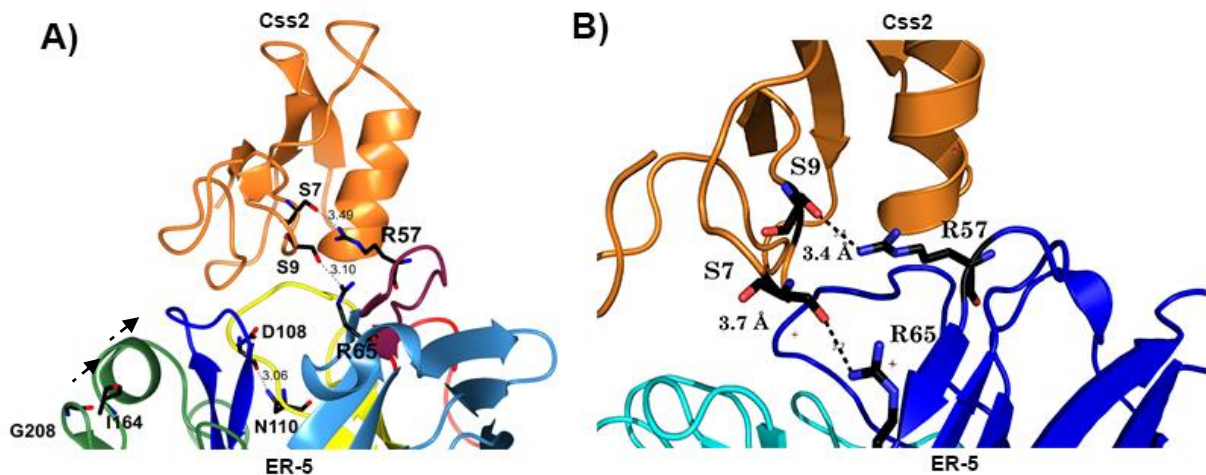


Figura 18. Modelo estructural generado *in silico* de los complejos binarios scFvER-5-Css2. **A)** Modelo del complejo scFv ER-5-Css2. Debido a los cambios en las posiciones S57R en el CDR2 (púrpura oscuro) y K65R del FW3 en el dominio V_H (azul claro) se forman nuevos puentes de hidrógeno con los residuos S7 y S9 de la toxina (naranja), respectivamente. Estas nuevas interacciones resultan en un incremento de la afinidad del scFv ER-5 por la toxina Css2. Además, la presencia del residuo N110 parece aumentar la energía del puente de hidrógeno que se establece con el oxígeno del grupo carbonilo del D108, disminuyendo la flexibilidad del CDR3 (en color amarillo) de la V_H (en azul claro), lo cual explica una mejor interacción a través de una mayor complementariedad superficial del scFv ER-5 con la toxina Css2. En este mismo panel (A), se puede visualizar la posible repercusión a distancia que tiene la presencia de los residuos G208 e I164 (flecha punteada) sobre la estructura del CDR3-V_L (azul fuerte). **B)** Se muestran un acercamiento de las regiones donde se encuentran los residuos R57 y R65 del scFv y los residuos S7 y S9 presentes en la toxina Css2. La posible ubicación y distancias en Angstroms (Å) de las cadenas laterales de los residuos S7 y S9 en la toxina (representada en color naranja) y los residuos R65 y R57 presentes en el dominio V_H del scFv (en color azul).

En resumen, el uso de dos estrategias de maduración *in vitro*, semi-racional y evolución dirigida, nos permitió identificar mutaciones puntuales en los scFvs que mejoraron el reconocimiento por distintas toxinas. Demostramos, que la estrategia de combinación de mutaciones dentro de los scFvs ha sido una pieza clave en el mejoramiento de las propiedades de interacción de los scFvs. La caracterización de los scFvs generados, en cuanto a afinidad y capacidad neutralizante mostró que pocas mutaciones en éstos, son suficientes para mejorar su capacidad neutralizante. Es necesario enfatizar que la variante generada presenta alta afinidad y alta neutralización cruzada por las toxinas ensayadas. Aún más importante es que este scFv (ER-5), al derivar de la familia de C1, reconocen y neutralizan un epítipo diferente al reconocido por los scFvs derivados del parental 3F y demostramos que al ser usados en conjunto tienen un efecto complementario en la capacidad neutralizante de los venenos.

CAPITULO 5: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

5.1 Discusión

Los avances en la caracterización de los compuestos de importancia médica para el hombre, dentro de los venenos de alacranes, ha motivado e impulsado la generación de un antiveneno de última generación. Esta nueva generación de antivenenos, busca la neutralización de las principales neurotoxinas que tienen actividad específica sobre los canales iónicos de sodio (Na_v) los cuales están presentes en el sistema nervioso de los mamíferos. La inhibición de la actividad nociva de las toxinas, se logra con el uso de fragmentos de anticuerpos (Amaro et al., 2011; Riaño-Umbarila et al., 2016, 2013, 2005; Zamudio et al., 1992). Al utilizar fragmentos de anticuerpos específicos con alta afinidad por las toxinas, se busca que el nuevo antiveneno sea más eficiente en la capacidad neutralizante y la eliminación de las toxinas.

Uno de los ejemplos de formatos de anticuerpo que ha funcionado como alternativa para lograr la neutralización de las neurotoxinas de alacrán, ha sido los denominados V_{HH} o *nanobodies*. Estas moléculas son derivadas de un isotipo de inmunoglobulina que se encuentra presente solo en los camélidos (camellos, llamas y dromedarios), cuya característica principal es que están constituidos solo por la cadena H, es decir carece de la cadena L (sección 1.1). Por lo tanto, los fragmentos V_{HH} , solo están formados por el dominio V_{H} .

La obtención de *nanobodies* neutralizantes de las toxinas, se ha logrado mediante la construcción de bancos (ver sección 1.7) utilizando las secuencias de ADN aisladas de camélidos inmunizados con la mismas neurotoxinas. Los bancos se someten a procesos de tamizado mediante despliegue en fagos (ver secciones 1.8 y 1.10). En particular, usando las estrategias mencionadas, se han aislado fragmentos V_{HH} madurados por el sistema inmune del animal, que tienen alta capacidad neutralizante de las toxinas y del veneno del alacrán africano *Androctonus australis* (Abderrazek et al., 2009; Darvish et al., 2016, 2015; Hmila et al., 2010, 2008). La ventaja de los *nanobodies* es que tienen una masa molecular de 15 kDa, lo que les confiere una rápida biodistribución y eliminación (Darvish et al., 2015), además de que no ocasionan efectos secundarios (Rahbarizadeh et al., 2011). Sin embargo, es necesario el uso de camélidos para obtener las secuencias codificantes de los anticuerpos para construir los formatos V_{HH} , lo cual para el caso de México, que es nuestro interés, es complicado de realizar, por lo cual decidimos ir directo al humano. Este ejemplo, cuyos detalles están

documentados en la revisión de Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2015), ha demostrado que es posible obtener un antiveneno compuesto por fragmentos de anticuerpos dirigidos a las toxinas de importancia médica dentro de los venenos de alacranes a nivel mundial.

Para México, el grupo de investigación del Dr. Becerril (IBT, UNAM), ha propuesto el uso de scFvs de origen humano como la mejor alternativa dadas sus propiedades (ver sección 1.6) para conformar un nuevo antiveneno contra la picadura de alacrán. En particular, nos hemos dado a la tarea de explotar a dos familias de scFvs derivadas de los parentales 3F y C1 aislados previamente en el laboratorio a partir de un banco humano no inmune de fragmentos scFv (Riaño-Umbarila *et al.*, 2005), con el propósito de dirigir su capacidad neutralizante hacia las distintas beta-toxinas aisladas de alacranes del género *Centruroides* (ver secciones 2.2 y 2.3). Ya que se determinó que al neutralizar a estos componentes tóxicos es posible abatir la toxicidad del veneno completo en mamíferos (Riaño-Umbarila *et al.*, 2011, 2005; Zamudio *et al.*, 1992).

Mediante evolución dirigida y despliegue en fagos como estrategias de maduración *in vitro*, se han logrado generar scFvs derivados de 3F y C1 con capacidad de neutralizar a varias beta-toxinas y algunos de los venenos correspondientes (**Tabla 1**) (Riaño-Umbarila *et al.*, 2016, 2013, 2011; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012). Adicional a estos antecedentes, se reportó recientemente la completa neutralización de las toxinas y el veneno completo del alacrán *C. noxius* mediante el uso de dos scFvs cada uno de ellos derivado de los parentales 3F y C1 (Riaño-Umbarila *et al.*, 2016). La inhibición de la toxicidad se logra por la unión de los scFvs a dos epítomos distintos dentro de las toxinas. Por lo tanto, actualmente nuestro objetivo es obtener al menos dos scFvs de origen humano, derivados uno de cada familia (C1 y 3F), que logren neutralizar a cada una de las toxinas principales de los venenos de alacranes venenosos de México.

En este trabajo, mediante dos estrategias de maduración *in vitro*, evolución dirigida y semi-razional, se buscó generar un scFv derivado del parental C1 capaz de neutralizar a la toxina Css2 por la unión al epítomo que esta familia de fragmentos de anticuerpo reconoce. Esta última estrategia se logró implementar de manera exitosa a partir del uso de la estructura determinada por cristalografía y rayos-X del complejo scFv LR-Cn2-RU1 (Riaño-Umbarila *et al.*, 2016).

La evolución dirigida implementada en los derivados de la familia C1, no ha sido un camino tan progresivo en el mejoramiento de las propiedades de unión, como lo ha sido para los derivados del scFv parental 3F (Riaño-Umbarila et al., 2011, 2005) y otros ejemplos reportado como: el Fab 3B3 (Barbas et al., 1994), scFv 4DB (Deng et al., 1994), scFv 4M5.3 (Boder et al., 2000). En este último caso, incluso se logró llegar a una afinidad del orden femtomolar (1×10^{-15} M). Estos resultados indican que el uso de una estrategia complementaria a la evolución dirigida, como lo es la semi-racional, parecía prometedora, además de que era la primera vez que se contaba con las herramientas estructurales para ser realizada en nuestro laboratorio. Las tres variantes derivadas del scFv RU1 (segundo descendiente de C1, ver **Fig. 16**), RJI-1, RJI-2 y RJI-3 se eligieron como templado para realizar los procesos de maduración *in vitro* porque mostraron mejor unión por la toxina C_{ss}2 (**Fig. 8**). En particular, el scFv RJI-2 destacó porque presentó mayor respuesta en la interacción con la toxina, seguida del scFv RJI-1 (**Fig. 8**). Después de implementar ambos procesos de maduración *in vitro* y despliegue en fagos, se identificaron las variantes denominadas ER-1, ER-3 y ER3a (**Tabla 6**). En particular el scFv ER-1 mostró las mejores propiedades en las primeras pruebas de reconocimiento por la toxina C_{ss}2, en comparación con las otras tres variantes. A nivel de residuos de aminoácidos, el scFv ER-1 presentó un solo cambio (D208G, FW3-V_L). Esta mutación fue importante ya que al ser introducida en distintas variantes ayudó a mejorar el reconocimiento por la toxina C_{ss}2 (**Fig. 11**). La mejora en las propiedades de interacción de los scFvs que portan esta mutación, resultó relevante debido a que la mutación D208G está ubicada en la región de andamiaje FW3-V_L, sitio que no está directamente involucrado en la interacción con la toxina. Este tipo de mutaciones, ubicadas en zonas alejadas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y que mejoran las propiedades de los fragmentos de anticuerpos que las presentan, han sido documentados anteriormente. Por ejemplo, Koti y colaboradores en el 2011, encontraron que la mutación D98G presente en FW3-V_H del anticuerpo que ellos estudiaron, mejoró su capacidad neutralizante contra el virus de herpes bovino (BoHV-1). Adicionalmente, nosotros encontramos y reportamos, que un solo cambio presente en FW2-V_H, mejoró la estabilidad y capacidad neutralizante de los scFvs D4 y LER dirigidos contra la toxina Cn2 (Rodríguez-Rodríguez et al., 2012). Esto sugiere, que a pesar de que los CDRs son ampliamente conocidos y considerados como las regiones más importantes en el reconocimiento de los antígenos, hay otras zonas importantes que aún no han sido evaluadas por completo y que estrategias como la evolución dirigida, nos permiten

acceder a explorar estas regiones que no hacen contacto directo con las toxinas pero que juegan un papel importante en la mejora de las propiedades de los fragmentos de anticuerpo.

Para tener un acercamiento adicional sobre la importancia de la mutación D208G a nivel de estabilidad funcional, se realizó una evaluación preliminar de esta propiedad en las variantes de los scFvs generados (**Fig. 15**). En este ensayo, se observó que el reconocimiento de las variantes que no presentan la mutación D208G decae entre un 80 a 90%. Mientras que en aquellos scFvs que contienen el residuo G208 se observa un decremento menor, alrededor del 60%, en comparación con las muestras sin tratamiento con el agente desnaturizante (ver sección **3.14**). Estos datos permiten concluir que la mutación G208 les confiere a las variantes de scFvs un ligero aumento en la estabilidad. Otro dato importante, se obtuvo del análisis de las secuencias de la línea germinal de los dominios V_{λ} en la base de datos IMGT (Lefranc, 2003, 2001; Lefranc et al., 2009, 2005, 1999; Ruiz, 2000). Los dominios V_L de los scFvs derivados del parental C1, incluyendo los aquí descritos, pertenecen a la familia $V_{\lambda}1$. De manera relevante, se observó que el residuo G208 se encuentra altamente conservado en las líneas germinales de las familias de cadenas ligeras de tipo λ , incluyendo $V_{\lambda}1$ (**Fig. 10**). Lo que nos indica que en el scFv ER-1 ocurrió una reversión a la línea germinal por el cambio D208G. En un estudio reciente, reportado por Chromikova y colaboradores (2015), se demostró que la introducción de un residuo presente en la línea germinal, mejora la conformación y estabilidad del anticuerpo sin modificar el reconocimiento por su blanco. La mejora de la estabilidad por la introducción de residuos consenso ya ha sido reportada en anticuerpos (Steipe et al., 1994; Wirtz and Steipe, 1999) y más ampliamente en algunas enzimas (Amin et al., 2004; Mosavi et al., 2002; Polizzi et al., 2006). Los resultados obtenidos, así como los reportes mencionados, sugieren que el cambio G208 provee de mayor estabilidad a los scFvs que las contienen, aunque es necesario realizar pruebas de estabilidad más formales.

Durante los procesos de maduración por la estrategia semi-racional y sus respectivos tamizados, las clonas obtenidas ER-4 y ER-3 (**Tabla 6**), mostraron un buen nivel de reconocimiento por la toxina C_{ss2}. Entre estas dos variantes, ER-3 que presenta la mutación R57 (CDR2- V_H), las cual también fue identificada en paralelo a través de la estrategia de evolución dirigida. Estos resultados, indicaban que este cambio pudiera ser importante para mejorar el reconocimiento por la toxina C_{ss2}. Barderas R. (2012, 2008) y Kiyoshi M. (2014)

han demostrado que siguiendo estrategias de tipo semi-racional y racional, respectivamente, los scFvs generados adquieren mejores propiedades de interacción con sus blancos, incluso llegando a mejorar hasta 500 veces la afinidad en comparación con el fragmento de anticuerpo parental (Kiyoshi et al., 2014). Sin embargo, en nuestro caso las variantes aisladas mediante esta estrategia no llegaron a adquirir una mejora tan alta a nivel de afinidad. Por esta razón se decidió evaluar si la combinatoria de los cambios aislados pudiera tener un efecto aditivo. Encontramos que la mejor combinatoria de residuos para el reconocimiento hacia la toxina C_{ss2} fue la presente en la variante ER-5 (**Tabla 6**). Esta variante, con una afinidad de 1×10^{-8} M y un tiempo de unión (T_R) de 14 min (**Tabla 9**) es capaz de neutralizar en relaciones molares 1:10 y 1:5 (toxina:scFv), a la toxina C_{ss2} y al veneno completo de *C. suffusus*, sin la presencia de síntomas de envenenamiento (**Tablas 10 y 11**). Además, se observó que también complementa la actividad neutralizante en presencia del scFv LR en ensayos de neutralización del veneno completo (**Tabla 11**) potenciada por la unión a epítomos diferentes (**Fig. 17**). Estos resultados demuestran que este scFv es un buen candidato para formar parte de un antiveneno recombinante de origen humano.

Así mismo, se observó que el scFv **ER-5** reconoce con altos valores de afinidad a las toxinas C_{II1} y C_{n2}, con valores de tiempos de unión (T_R) superiores al scFv progenitor RU1 (**Tabla 9**). Los altos valores de T_R , se ven reflejados en la capacidad de neutralizar a las toxinas C_{n2} y C_{II1} en relaciones molares bajas (**Tabla 13**). Estas propiedades, reflejan una ampliación del reconocimiento hacia toxinas similares. Esta reactividad cruzada puede explicarse tomando en cuenta la alta similitud que presentan las toxinas que contienen los venenos de los alacranes ponzoñosos de México, con identidades que oscilan entre 80-90% (Possani et al., 1999; Rodríguez De La Vega and Possani, 2005) (**Fig. 7**). Aunque esta alta identidad contrasta con la fina especificidad que presentan las toxinas contra los distintos subtipos de canales de sodio (Schiavon et al., 2006). El conjunto de estos dos argumentos nos pueden ayudar a sugerir porque algunos scFvs derivados de la familia de C1 presentan reactividad cruzada, pero no la suficiente capacidad neutralizante antes de ser sometidos a maduración *in vitro*.

De hecho, en los últimos años se han tratado de explotar la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos contra antígenos similares. Moulard y colaboradores (2002), Beltramello y su grupo (2010), así como, Deng y colaboradores (2011) demostraron la

capacidad de neutralización de algunas cepas de flavivirus, VIH y dengue, con un solo anticuerpo. Estos ejemplos, en conjunto con algunos más recientes, (Jiang et al., 2016; Sun and Brusic, 2015; Taus et al., 2015), demuestran la importancia que implica el tener moléculas con una alta reactividad cruzada y capacidad neutralizante de las principales toxinas de distintos venenos de organismos peligrosos para el hombre. Los anticuerpos obtenidos en esos ejemplos, son producto del sistema inmune, nosotros por otra parte hemos logrado ampliar la reactividad cruzada y capacidad neutralizante de los scFv mediante procesos de maduración e ingeniería de anticuerpos *in vitro*.

Posteriormente, para tratar de entender a nivel estructural el papel de las mutaciones encontradas en el scFv ER-5 en la interacción con la toxina Css2, se hizo un análisis del modelo *in silico* de este complejo binario. Se buscó evaluar principalmente el aporte de las mutaciones S57R (CDR2-V_H) y K65R (FW3-V_H) del scFv en el reconocimiento por esta toxina. Las cadenas laterales de los residuos R57 y R65 son de mayor longitud comparadas con S57 y K65 presentes en el scFv RJI-2. Estos cambios favorecieron la formación de puentes de hidrógeno con los residuos S7 y S9 presentes en Css2, respectivamente (**Fig. 18**). Estas nuevas interacciones, derivaron en la mejor interacción hacia la toxina Css2, explicando con esto, la optimización de la capacidad neutralizante del scFv ER-5 hacia Css2.

Fue muy interesante, que no todos los cambios incorporados en el scFv ER-5 que se vieron reflejados en la mejora de la capacidad neutralizante del fragmento, se encontraran ubicados en las regiones correspondientes a los CDRs, las cuales son por definición las zonas que se encuentran involucradas en la interacción con el antígeno. El poder utilizar las técnicas de despliegue en fagos y la evolución dirigida nos ha permitido explorar e identificar cambios que se encuentran fuera de los CDRs y que han logrado beneficiar las propiedades de interacción de los scFvs con las beta-toxinas. Basado en el uso racional de la tecnología de SPR, hemos sido capaces de poder identificar variantes de scFvs con capacidad neutralizante en función de sus tiempos de retención (T_R) determinados por medio de su velocidad de disociación (K_d) (ver sección 1.12). En el caso de los scFvs derivados del parental C1, hemos observado que tiempos de retención arriba de los 8 minutos son suficientes para lograr la neutralización de las toxinas uniéndose al epítipo que esta familia reconoce. A diferencia de los scFv derivados del parental 3F, los cuales deben presentar tiempos de retención superiores a los 20 minutos.

Asimismo, en el modelo scFv-toxinas, se evaluó el aporte de las mutaciones S164I (FW1-V_L) y D208G (FW3-V_L) en el mejoramiento de las interacciones, pero con los elementos de juicio emanados del propio análisis, no fue posible establecer una explicación bien sustentada. Sin embargo, algunos elementos analíticos indican que estos cambios juegan un papel indirecto pero importante en la estabilización del CDR3-V_L (**Fig. 18**). En relación a al cambio D208G, sugerimos que la ausencia de la cadena lateral del residuo D208, aumenta la flexibilidad de esta asa que conecta a dos hebras beta, confiriendo una mayor estabilidad a esta zona incluyendo al asa que contiene la mutación S164I. Sería importante evaluar otras mutaciones en esta zona, por residuos con cadenas laterales cortas como G para determinar si aumentando su flexibilidad, indirectamente pueda beneficiar estructuralmente al CDR3-V_L y redundar en mejores propiedades de reconocimiento y neutralización de las toxinas.

Actualmente, nos encontramos en una etapa intermedia en la generación de scFv neutralizantes de los principales y más tóxicos componentes en los venenos de alacranes del genero *Centruroides*, lo cual se debe a que aún no se cuenta con la caracterización completa de todos los venenos de las especies de alacranes venenosos para el hombre. Además de que es imperativo realizar pruebas pre-clínicas (farmacológicas y toxicológicas) que nos permitan tomar decisiones sobre si los scFv son los formatos ideales para la terapia en pacientes. Por ejemplo, los scFv presentan tiempo de vida media ($t_{1/2}$ beta) de 2 horas (Monnier et al., 2013) que pudieran o no ser, valores muy bajos comparativamente con el antiveneno actual (161.3 horas) (Vázquez et al., 2005). De ser necesario pueden derivarse a formatos con tiempos de vida media más largos y de mayor estabilidad como son fragmentos Fab (16-20 horas) (Ujhelyi and Robert, 1995), con la finalidad de mejorar sus propiedades terapéuticas.

Finalmente, es importante recalcar las ventajas que ofrece el uso de fragmentos de anticuerpos recombinantes como son los scFv, en la terapia contra el envenenamiento por picadura de alacrán en comparación con el antiveneno actual. Fragmentos de anticuerpos con alta especificidad, ya que estos estarán dirigidos solo contra las toxinas letales para mamíferos, a diferencia del antiveneno actual, cuyos anticuerpos reconocen a todos los componentes dentro de los venenos, incluso los no tóxicos. Además, la especificidad se traducirá en una mayor eficiencia, en términos de utilizar una menor cantidad de proteína para lograr la neutralización de los venenos. Brindarán una mayor seguridad al ser usados, dado que las secuencias de los fragmentos de anticuerpos son de origen humano y la

probabilidad de ocasionar efectos secundarios es casi nula. Por otra parte, la producción del antiveneno actual depende de la utilización de animales, que en ocasiones pueden quedar severamente dañados después de varios procesos de hiperinmunización. Asimismo, existe una respuesta diferencial del sistema inmune en los animales, en la cual puede darse una pobre producción de anticuerpos neutralizantes. En contraste, la obtención de los fragmentos de anticuerpos puede realizarse en bioreactores, lo que la hace independiente del uso de animales, además de obtener un producto homogéneo y estandarizado. El conjunto de estas propiedades mencionadas, hace a los fragmentos de anticuerpos, hasta hoy, la mejor alternativa para conformar el nuevo antiveneno contra picadura de alacrán.

5.2 CONCLUSIONES

El uso de dos estrategias de maduración *in vitro*, nos permitió identificar mutaciones puntuales en los scFv que mejoraron y ampliaron el reconocimiento por distintas toxinas. Demostramos que la estrategia de combinación de cambios en los scFvs ha sido una pieza clave en la generación de nuevas variantes con mejores propiedades de interacción. La caracterización de los scFvs generados, en cuanto a afinidad y capacidad neutralizante mostró que pocas mutaciones en éstos, fueron suficientes para lograr la neutralización de la beta-toxina C_{ss2}. Es necesario enfatizar que las variantes generadas en esta tesis, presentan alta afinidad y alta neutralización cruzada con todas las toxinas ensayadas. Además de neutralizar a la toxina C_{ss2}, el scFv ER-5 mejoró su capacidad de reconocer y neutralizar a dos toxinas adicionales: C_{II1} y C_{n2}. Aún más importante es que el scFv ER-5, al derivar del parental C1 reconoce y neutraliza un epítipo diferente a los scFvs derivados de 3F y que al usar variantes de ambas familias en conjunto, tienen un efecto complementario en la capacidad neutralizante del veneno completo del alacrán *C. suffusus*.

Finalmente, asumimos que podremos generar un antiveneno formado por unos pocos fragmentos de anticuerpos humanos, equivalente o superior al comercial, con mayores beneficios terapéuticos. En ese sentido, los scFvs aquí generados, representan buenos candidatos para la formulación de este nuevo antiveneno contra las picaduras de alacranes del género *Centruroides*.

CAPITULO 6: PERSPECTIVAS

Las propiedades que denominamos “generalistas” en términos de la capacidad de neutralización cruzada del scFv descrito en este trabajo, nos lleva a proponer que mediante nuevos procesos de maduración *in vitro*; racional ó evolución dirigida ó de forma combinada, probablemente generaremos una variante universal capaz de neutralizar a un mayor número de toxinas de alacrán al mismo tiempo. Esto puede lograrse gracias a que el reconocimiento de los scFvs por distintas toxinas se debe a que la zona a la que se unen es relativamente conservada entre las toxinas de los alacranes del genero *Centruroides*. Al lograr este objetivo, se simplificaría de manera significativa el antiveneno de origen humano y sería una innovación relevante en el área de las terapias en la intoxicación por picadura de alacrán.

ABREVIATURAS

Ø: Bacteriofago

Amp: Ampicilina

BSA: Albumina de suero bovina

C: Dominio constante

CDR: Regiones determinantes de complementariedad

CH: Dominio constante de la cadena pesada de un anticuerpo

CL: Dominio constante de la cadena ligera de un anticuerpo

CI1: Beta-neurotoxina 1 del alacrán *Centruroides limpidus*

CI2: Beta-neurotoxina 2 del alacrán *Centruroides limpidus*

Cn2: Beta-neurotoxina 2 del alacrán *Centruroides noxius*

Css2: beta-neurotoxina 2 del alacrán *Centruroides suffusus*

Ct1a: Beta-neurotoxina 1a del alacrán *Centruroides tecomanus*

Da: Dalton

DL₅₀: Dosis letal media

ELISA: Ensayo inmunosorbente ligado a enzima

Fab: Fragmento de unión al antígeno

Fc: Fragmento cristalizante de anticuerpo

Fv: Dominios variables de anticuerpo

Fw: Andamiaje del dominio variable de un anticuerpo

GdnHCl: Cloruro de guanidinio

H: Cadena pesada de anticuerpo

HCl: Ácido clorhídrico

Ig: Inmunoglobulina o anticuerpo

Ip: intraperitoneal

K_D: Constante de afinidad

kDa: Kilodalton

K_{on} o **k_a**: Velocidad de asociación

K_{off} o **k_d**: Velocidad de disociación

L: Cadena ligera de anticuerpo

N_{av}: Canal de sodio dependiente de voltaje

Pb: Pares de bases nucleotídicas

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Banco de datos de proteínas

RU: Unidades de resonancia

scFv: Fragmento variable de cadena sencilla de anticuerpo

SPR: Resonancia de plasmones superficiales

T_R: Tiempo de unión (*Time of residence*)

V_κ: Dominio variable de cadena ligera tipo kappa

V_λ: Dominio variable de la cadena ligera tipo lambda

V_H: Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo

V_L: Dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo

UFC: Unidades formadoras de colonia

REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, H.A., Pillai, S., 2014. Cellular and Molecular Immunology, 8th editio. ed. W. B. Saunders Co.
- Abderrazek, R. Ben, Hmila, I., Vincke, C., Benlasfar, Z., Pellis, M., Dabbek, H., Saerens, D., El Ayeb, M., Muyldermans, S., Bouhaouala-Zahar, B., 2009. Identification of potent nanobodies to neutralize the most poisonous polypeptide from scorpion venom. *Biochem. J.* 424, 263–272. doi:10.1042/BJ20090697
- Abroug, F., ElAtrous, S., Nouira, S., Haguiga, H., Touzi, N., Bouchoucha, S., 1999. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 354, 906–9.
- Adams, G.P., Schier, R., Marshall, K., Wolf, E.J., McCall, A.M., Marks, J.D., Weiner, L.M., 1998. Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain Fv antibodies. *Cancer Res.* 58, 485–90.
- Alagón, A.C., Guzmán, H.S., Martín, B.M., Ramírez, A.N., Carbone, E., Possani, L.D., 1988. Isolation and characterization of two toxins from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 89, 153–61.
- Alvarenga, L.M., Zahid, M., di Tommaso, A., Juste, M.O., Aubrey, N., Billiald, P., Muzard, J., 2014. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. *Toxins (Basel)*. 6, 2541–67. doi:10.3390/toxins6082541
- Amaro, I., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., Possani, L.D., 2011. Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. *Immunol. Lett.* 139, 73–9. doi:10.1016/j.imlet.2011.05.002
- Amin, N., Liu, A.D., Ramer, S., Aehle, W., Meijer, D., Metin, M., Wong, S., Gualfetti, P., Schellenberger, V., 2004. Construction of stabilized proteins by combinatorial consensus mutagenesis. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 787–93. doi:10.1093/protein/gzh091
- Arredondo Lopez, J.N., 2015. Maduración de la afinidad del scFv RU2 hacia la toxina CII2 del veneno del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* karsch. UNAM.
- Bahraoui, E., Pichon, J., Muller, J.M., Darbon, H., Elayeb, M., Granier, C., Marvaldi, J., Rochat, H., 1988. Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. *J. Immunol.* 141, 214–220.
- Barbas, C.F., Hu, D., Dunlop, N., Sawyer, L., Cababa, D., Hendry, R.M., Nara, P.L., Burton, D.R., 1994. In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3809–13.
- Barderas, R., Desmet, J., Alard, P., Casal, J.I., 2012. Antibody Engineering, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ. doi:10.1007/978-1-61779-974-7
- Barderas, R., Desmet, J., Timmerman, P., Meloen, R., Casal, J.I., 2008. Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9029–9034. doi:10.1073/pnas.0801221105
- Bawaskar, H.S., Bawaskar, P.H., 2007. Utility of scorpion antivenin vs prazosin in the management of severe *Mesobuthus tamulus* (Indian red scorpion) envenoming at rural setting. *J. Assoc. Physicians India* 55, 14–21.
- Beltramello, M., Williams, K.L., Simmons, C.P., Macagno, A., Simonelli, L., Quyen, N.T.H.,

- Sukupolvi-Petty, S., Navarro-Sanchez, E., Young, P.R., de Silva, A.M., Rey, F.A., Varani, L., Whitehead, S.S., Diamond, M.S., Harris, E., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2010. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* 8, 271–83. doi:10.1016/j.chom.2010.08.007
- Biacore, GEHealthcare, 2002. Surface plasmon resonance. Technol. note.
- Biacore, GEHealthcare, 2001. An Introduction to Biacore's SPR technology. Technol. note.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M., 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423–426. doi:10.1126/science.3140379
- Black, C.A., 1999. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatology online J.* [electronic Resour.
- Boder, E.T., Midelfort, K.S., Wittrup, K.D., 2000. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10701–10705. doi:10.1073/pnas.170297297
- Bosshard, H.R., 2001. Molecular recognition by induced fit: how fit is the concept? *News Physiol. Sci.* 16, 171–3.
- Boyer, L. V, Theodorou, A.A., Berg, R.A., Mallie, J., Chávez-Méndez, A., García-Ubbelohde, W., Hardiman, S., Alagón, A., 2009. Antivenom for critically ill children with neurotoxicity from scorpion stings. *N. Engl. J. Med.* 360, 2090–8. doi:10.1056/NEJMoa0808455
- Bradbury, A.R.M., Marks, J.D., 2004. Antibodies from phage antibody libraries. *J. Immunol. Methods* 290, 29–49. doi:10.1016/j.jim.2004.04.007
- Brekke, O.H., Sandlie, I., 2003. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 52–62. doi:10.1038/nrd984
- Bridges, B.A., Woodgate, R., 1985. Mutagenic repair in *Escherichia coli*: products of the *recA* gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at different steps in UV-induced mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4193–7.
- Cadwell, R.C., Joyce, G.F., 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 2, 28–33.
- Canul-Tec, J.C., Riaño-Umbarila, L., Rudiño-Piñera, E., Becerril, B., Possani, L.D., Torres-Larios, A., 2011. Structural basis of neutralization of the major toxic component from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann by a human-derived single-chain antibody fragment. *J. Biol. Chem.* 286, 20892–20900. doi:10.1074/jbc.M111.238410
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., Maelicke, A., 1982. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296, 90–1.
- Carboney C. Alfredo, J.V.C.E., 2012. SINAVE.Manual de Procedimientos estandarizados para la vigilancia Epidemiológica. Intoxicación por picadura de alacran.
- Catterall, W.A., 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 15–43. doi:10.1146/annurev.pa.20.040180.000311
- Cestèle, S., Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883–92.

- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J.C., Rochat, H., Scheuer, T., Catterall, W.A., 1998. Voltage sensor-trapping: Enhanced activation of sodium channels by β - scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* 21, 919–931. doi:10.1016/S0896-6273(00)80606-6
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J.C., Rochat, H., Scheuer, T., Catterall, W.A., 1998. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* 21, 919–31.
- Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Qu, Y., Sampieri, F., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2006. Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. *J. Biol. Chem.* 281, 21332–21344. doi:10.1074/jbc.M603814200
- Chan, C.E.Z., Lim, A.P.C., MacAry, P.A., Hanson, B.J., 2014. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int. Immunol.* 26, 649–57. doi:10.1093/intimm/dxu082
- Chen, C., Stenzel-Poore, M.P., Rittenberg, M.B., 1991. Natural auto- and polyreactive antibodies differing from antigen-induced antibodies in the H chain CDR3. *J. Immunol.* 147, 2359–67.
- Chica, R.A., Doucet, N., Pelletier, J.N., 2005. Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 378–384. doi:10.1016/j.copbio.2005.06.004
- Chippaux, J.-P., 2012. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Des. Devel. Ther.* 6, 165–73. doi:10.2147/DDDT.S24754
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 1991. Antivenom serotherapy: its applications, its limitations, its future. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 84, 286–297.
- Chippaux, J.-P., Stock, R.P., Massougbojji, A., 2010. Methodology of clinical studies dealing with the treatment of envenomation. *Toxicon* 55, 1195–212. doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.022
- Chromikova, V., Mader, A., Hofbauer, S., Göbl, C., Madl, T., Gach, J.S., Bauernfried, S., Furtmüller, P.G., Forthal, D.N., Mach, L., Obinger, C., Kunert, R., 2015. Introduction of germline residues improves the stability of anti-HIV mAb 2G12-IgM. *Biochim. Biophys. Acta.* doi:10.1016/j.bbapap.2015.02.018
- Clackson, T., Lowman, H.B., 2004. Phage display: a practical approach, Shock.
- Clot-Faybesse, O., Juin, M., Rochat, H., Devaux, C., 1999. Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis hector* scorpion neurotoxin I: Characterisation and use for venom neutralisation. *FEBS Lett.* 458, 313–318. doi:10.1016/S0014-5793(99)01179-5
- Corzo, G., Papp, F., Varga, Z., Barraza, O., Espino-Solis, P.G., Rodríguez de la Vega, R.C., Gaspar, R., Panyi, G., Possani, L.D., 2008. A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochem. Pharmacol.* 76, 1142–54. doi:10.1016/j.bcp.2008.08.018
- Darvish, M., Behdani, M., Shokrgozar, M.A., Pooshang-Bagheri, K., Shahbazzadeh, D., 2015. Development of protective agent against *Hottentotta saulcyi* venom using camelid single-domain antibody. *Mol. Immunol.* 68, 412–20. doi:10.1016/j.molimm.2015.10.002
- Darvish, M., Ebrahimi, S.A., Shahbazzadeh, D., Shokrgozar, M.A., 2016. Camelid antivenom development and potential in vivo neutralization of *Hottentotta saulcyi* scorpion venom. *Toxicon.* doi:10.1016/j.toxicon.2016.01.063
- de la Vega, R.C.R., Vidal, N., Possani, L.D., 2013. Handbook of Biologically Active Peptides, Handbook of Biologically Active Peptides. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-385095-9.00059-2

- DeBin, J.A., Maggio, J.E., Strichartz, G.R., 1993. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol.* 264, C361–9.
- Dehesa-Dávila, M., Possani, L.D., 1994. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon* 32, 1015–1018. doi:10.1016/0041-0101(94)90383-2
- Deng, S.J., MacKenzie, C.R., Sadowska, J., Michniewicz, J., Young, N.M., Bundle, D.R., Narang, S.A., 1994. Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. *J. Biol. Chem.* 269, 9533–8.
- Deng, Y., Guan, J., Wen, B., Zhu, N., Chen, H., Song, J., Yang, Y., Wang, Y., Tan, W., 2013. Induction of broadly neutralising HCV antibodies in mice by integration-deficient lentiviral vector-based pseudotyped particles. *PLoS One* 8, e62684. doi:10.1371/journal.pone.0062684
- Deng, Y.-Q., Dai, J.-X., Ji, G.-H., Jiang, T., Wang, H.-J., Yang, H., Tan, W.-L., Liu, R., Yu, M., Ge, B.-X., Zhu, Q.-Y., Qin, E.-D., Guo, Y.-J., Qin, C.-F., 2011. A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein. *PLoS One* 6, e16059. doi:10.1371/journal.pone.0016059
- Dübel, S., Reichert, J.M., 2014a. Therapeutic antibodies—from Paste to Future, in: Dübel, S., Reichert, J.M. (Eds.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 1–13.
- Dübel, S., Reichert, J.M., 2014b. Therapeutic Antibodies— from past to future, in: Dübel, S., Reichert, J.M. (Eds.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*. Wiley Blackwell, Weinheim, Germany, pp. 1–13.
- Eckert, K.A., Kunkel, T.A., 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 18, 3739–44.
- Eisen, H.N., 2014. Affinity Enhancement of Antibodies: How Low-Affinity Antibodies Produced Early in Immune Responses Are Followed by High-Affinity Antibodies Later and in Memory B-Cell Responses. *Cancer Immunol. Res.* 2, 381–392. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0029
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 486–501. doi:10.1107/S0907444910007493
- Espino-Solis, G.P., Estrada, G., Olamendi-Portugal, T., Villegas, E., Zamudio, F., Cestele, S., Possani, L.D., Corzo, G., 2011. Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Toxicon* 57, 739–46. doi:10.1016/j.toxicon.2011.02.006
- Espino-Solis, G.P., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., Possani, L.D., 2009. Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. *J. Proteomics*. doi:10.1016/j.jprot.2009.01.020
- Estrada, G., Garcia, B.I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., Possani, L.D., Corzo, G., 2007. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin C_{ss}II: heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 1161–8. doi:10.1016/j.bbagen.2007.04.006
- Farajnia, S., Ahmadzadeh, V., Tanomand, A., Veisi, K., Khosroshahi, S.A., Rahbarnia, L., 2014. Development trends for generation of single-chain antibody fragments. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 36, 297–308. doi:10.3109/08923973.2014.945126
- Fellouse, F.A., Li, B., Compaan, D.M., Peden, A.A., Hymowitz, S.G., Sidhu, S.S., 2005. Molecular Recognition by a Binary Code. *J. Mol. Biol.* 348, 1153–1162. doi:10.1016/j.jmb.2005.03.041
- Fellouse, F.A., Wiesmann, C., Sidhu, S.S., 2004. Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: a

- dominant role for tyrosine in antigen recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12467–72. doi:10.1073/pnas.0401786101
- Feng, J.N., Russel, M., Model, P., 1997. A permeabilized cell system that assembles filamentous bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4068–73.
- Foote, J., Eisen, H.N., 2000. Breaking the affinity ceiling for antibodies and T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10679–81.
- Foote, J., Eisen, H.N., 1995. Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1254–6.
- GEHealthcare, 2015. Biacore Life sciences [WWW Document].
- George, A.J.T., 2000. Diagnostic and Therapeutic Antibodies, in: George, A.J.T., Urch, C.E. (Eds.), . Springer Science & Business Media, p. 477.
- Georgieva, Y., Konthur, Z., 2011. Design and Screening of M13 Phage Display cDNA Libraries. *Molecules* 16, 1667–1681. doi:10.3390/molecules16021667
- Ghalim, N., El-Hafny, B., Sebti, F., Heikel, J., Lazar, N., Moustanir, R., Benslimane, A., 2000. Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 277–83.
- Gillam, E.M.J., Copp, J.N., Ackerley, D. (Eds.), 2014. Directed Evolution Library Creation, *Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-1053-3
- Glanville, J., Zhai, W., Berka, J., Telman, D., Huerta, G., Mehta, G.R., Ni, I., Mei, L., Sundar, P.D., Day, G.M.R., Cox, D., Rajpal, A., Pons, J., 2009. Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20216–21. doi:10.1073/pnas.0909775106
- Goldblatt, D., 2001. Affinity of Antigen-Antibody Interactions. *Enycl. life Sci.* 1–5.
- Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., 1994. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13, 3245–60.
- Guan, Y., Zhang, H., Wang, A.H.-J., 2008. Electrostatic potential distribution of the gene V protein from Ff phage facilitates cooperative DNA binding: A model of the GVP-ssDNA complex. *Protein Sci.* 4, 187–197. doi:10.1002/pro.5560040206
- Hackel, B.J., Ackerman, M.E., Howland, S.W., Wittrup, K.D., 2010. Stability and CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes. *J. Mol. Biol.* 401, 84–96. doi:10.1016/j.jmb.2010.06.004
- Hagemeyer, C.E., von Zur Muhlen, C., von Elverfeldt, D., Peter, K., 2009. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents. *Thromb. Haemost.* 101, 1012–9.
- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., Plückthun, A., 2000. Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat. Biotechnol.* 18, 1287–92. doi:10.1038/82407
- Hansel, T.T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J.A., George, A.J.T., 2010. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 325–38. doi:10.1038/nrd3003
- Haque, A., Tonks, N.K., 2012. The use of phage display to generate conformation-sensor recombinant antibodies. *Nat. Protoc.* 7, 2127–43. doi:10.1038/nprot.2012.132
- Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W., McPherson, A., 1997. Refined structure of an intact IgG2a

- monoclonal antibody. *Biochemistry* 36, 1581–97. doi:10.1021/bi962514+
- Hawkins, R.E., Russell, S.J., Winter, G., 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* 226, 889–96.
- Hernández-Salgado, K., Estrada, G., Olvera, A., Coronas, F.I., Possani, L.D., Corzo, G., 2009. Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CssII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Immunol. Lett.* 125, 93–99. doi:10.1016/j.imlet.2009.06.001
- Hmila, I., Abdallah R, B.A. Ben, Saerens, D., Benlasfar, Z., Conrath, K., Ayeb, M. El, Muyltermans, S., Bouhaouala-Zahar, B., 2008. VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI???. *Mol. Immunol.* 45, 3847–3856. doi:10.1016/j.molimm.2008.04.011
- Hmila, I., Saerens, D., Ben Abderrazek, R., Vincke, C., Abidi, N., Benlasfar, Z., Govaert, J., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B., Muyltermans, S., 2010. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J.* 24, 3479–3489. doi:10.1096/fj.09-148213
- Holliger, P., Hudson, P.J., 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1126–1136. doi:10.1038/nbt1142
- Hoogenboom, H., 1998. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1–20. doi:10.1016/S1380-2933(98)00007-4
- Hoogenboom, H.R., Chames, P., 2000. Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. Today* 21, 371–8.
- Hoogenboom, H.R., Winter, G., 1992. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J. Mol. Biol.* 227, 381–388. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(92)90894-P
- Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Dübel, S., 2011. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J. Biotechnol.* 152, 159–70. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.945
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotný, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5879–5883. doi:10.1073/pnas.85.16.5879
- Huston, J.S., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., McCartney, J., Warren, F., Haber, E., Oppermann, H., 1991. Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol.* 203, 46–88.
- Hwang, W.Y.K., Foote, J., 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 36, 3–10. doi:10.1016/j.ymeth.2005.01.001
- Jackson, H., Bacon, L., Pedley, R., Derbyshire, E., Field, A., Osbourn, J., Allen, D., 1998. Antigen specificity and tumour targeting efficiency of a human carcinoembryonic antigen-specific scFv and affinity-matured derivatives. *Br. J. Cancer* 78, 181–188. doi:10.1038/bjc.1998.462
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2005. *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 6th editio. ed. Garland Science, New York.
- Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J., Pluckthun, A., 2001. Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 75–80.

doi:10.1073/pnas.98.1.75

- Jiang, Z., Gera, L., Mant, C.T., Hirsch, B., Yan, Z., Qian, Z., Holmes, K. V, Shortt, J.A., Pollock, D.D., Hodges, R.S., 2016. Platform technology to generate broadly cross-reactive antibodies to α -helical epitopes in hemagglutinin proteins from influenza A viruses. *Biopolymers*. doi:10.1002/bip.22808
- Kehoe, J.W., Kay, B.K., 2005. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem. Rev.* 105, 4056–72. doi:10.1021/cr000261r
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., 2007. *Kuby Immunology*, Kuby Immunology. doi:10.1016/S0076-6879(09)04815-0
- King, D.J., Bowers, P.M., Kehry, M.R., Horlick, R.A., 2014. Mammalian cell display and somatic hypermutation in vitro for human antibody discovery. *Curr. Drug Discov. Technol.* 11, 56–64.
- Kiyoshi, M., Caaveiro, J.M.M., Miura, E., Nagatoishi, S., Nakakido, M., Soga, S., Shirai, H., Kawabata, S., Tsumoto, K., 2014. Affinity improvement of a therapeutic antibody by structure-based computational design: generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody-antigen complex. *PLoS One* 9, e87099. doi:10.1371/journal.pone.0087099
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A., Virnekäs, B., 2000. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* 296, 57–86. doi:10.1006/jmbi.1999.3444
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–7.
- Koide, A., Wojcik, J., Gilbreth, R.N., Reichel, A., Piehler, J., Koide, S., 2009. Accelerating phage-display library selection by reversible and site-specific biotinylation. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 685–90. doi:10.1093/protein/gzp053
- Konings, R.N.H., Folmer, R.H.A., Folkers, P.J.M., Nilges, M., Hilbers, C.W., 1995. Three-dimensional structure of the single-stranded DNA-binding protein encoded by gene V of the filamentous bacteriophage M13 and a model of its complex with single-stranded DNA. *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 57–72. doi:10.1111/j.1574-6976.1995.tb00188.x
- Koti, M., Nagy, E., Kaushik, A.K., 2011. A single point mutation in framework region 3 of heavy chain affects viral neutralization dynamics of single-chain Fv against bovine herpes virus type 1. *Vaccine* 29, 7905–12. doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.077
- Kramer, R.A., Cox, F., van der Horst, M., van der Oudenrijn, S., Res, P.C.M., Bia, J., Logtenberg, T., de Kruif, J., 2003. A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein. *Nucleic Acids Res.* 31, e59.
- Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., Karplus, K., 2009. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* doi:10.1002/prot.22570
- Lai, Y.-P., Huang, J., Wang, L.-F., Li, J., Wu, Z.-R., 2004. A new approach to random mutagenesis in vitro. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 622–7. doi:10.1002/bit.20066
- Lakhashe, S.K., Kulkarni, S.S., Thakar, M.R., Ghate, M. V, Paranjape, R.S., 2007. Extensive cross-reactive neutralizing antibody response in Indian patients with limited genetic diversity of HIV-1. *Virology* 359, 295–301. doi:10.1016/j.virol.2006.09.019

- Lane, M.D., Seelig, B., 2014. Advances in the directed evolution of proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 22, 129–36. doi:10.1016/j.cbpa.2014.09.013
- Laustsen, A.H., Lohse, B., Lomonte, B., Engmark, M., Gutiérrez, J.M., 2015. Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2015.07.334
- Lefranc, M.-P., 2003. IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R). *Nucleic Acids Res.* 31, 307–310. doi:10.1093/nar/gkg085
- Lefranc, M.-P., 2001. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 29, 207–209. doi:10.1093/nar/29.1.207
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Bodmer, J., Muller, W., Bontrop, R., Lemaitre, M., Malik, A., Barbie, V., Chaume, D., 1999. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 27, 209–212. doi:10.1093/nar/27.1.209
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., Regnier, L., Ehrenmann, F., Lefranc, G., Duroux, P., 2009. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* 37, D1006–12. doi:10.1093/nar/gkn838
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Kaas, Q., Duprat, E., Jabado-Michaloud, J., Scaviner, D., Ginestoux, C., Clément, O., Chaume, D., Lefranc, G., 2005. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* 33, D593–7. doi:10.1093/nar/gki065
- Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S.F., Wyss, M., 2000. The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1543, 408–415. doi:10.1016/S0167-4838(00)00238-7
- Leung, D., Chen, E., Goeddel, D., 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction 1.
- Leung, D.W., Chen, E., Goeddel, D. V., 1989. A Method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1, 11–15.
- Licea, A.F., Becerril, B., Possani, L.D., 1996. FAB fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*. doi:10.1016/0041-0101(96)00043-8
- Lippow, S.M., Wittrup, K.D., Tidor, B., 2007. Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation. *Nat. Biotechnol.* 25, 1171–6. doi:10.1038/nbt1336
- Lonberg, N., 2008. Human monoclonal antibodies from transgenic mice. *Handb. Exp. Pharmacol.* 69–97. doi:10.1007/978-3-540-73259-4_4
- Low, N.M., Holliger, P., Winter, G., 1996. Mimicking Somatic Hypermutation: Affinity Maturation of Antibodies Displayed on Bacteriophage Using a Bacterial Mutator Strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359–368. doi:10.1006/jmbi.1996.0406
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A., Wlodawer, A., 1998. The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nat. Struct. Biol.* 5, 140–7.
- Marciano, D.K., Russel, M., Simon, S.M., 1999. An aqueous channel for filamentous phage export. *Science* 284, 1516–9.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., 1991. By-

- passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581–597. doi:0.1016/0022-2836(91)90498-U
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Winter, G., 1992. Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J. Biol. Chem.* 267, 16007–10.
- Martin, M.F., Garcia y Perez, L.G., El Ayeb, M., Kopeyan, C., Bechis, G., Jover, E., Rochat, H., 1987. Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *J. Biol. Chem.* 262, 4452–4459. doi:10.1016/0041-0101(85)90289-2
- Marvin, D.A., 1998. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 150–8.
- Marvin, D.A., Welsh, L.C., Symmons, M.F., Scott, W.R.P., Straus, S.K., 2006. Molecular structure of fd (f1, M13) filamentous bacteriophage refined with respect to X-ray fibre diffraction and solid-state NMR data supports specific models of phage assembly at the bacterial membrane. *J. Mol. Biol.* 355, 294–309. doi:10.1016/j.jmb.2005.10.048
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J., 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552–554. doi:10.1038/348552a0
- McConnell, S.J., Hoess, R.H., 1995. Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries. *J. Mol. Biol.* 250, 460–70. doi:10.1006/jmbi.1995.0390
- McDonnell, J.M., 2001. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 572–7.
- McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K.S., Noble, M.E.M., 2011. Presenting your structures: The CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 67, 386–394. doi:10.1107/S0907444911007281
- Monnier, P., Vigouroux, R., Tassew, N., 2013. In Vivo Applications of Single Chain Fv (Variable Domain) (scFv) Fragments. *Antibodies* 2, 193–208. doi:10.3390/antib2020193
- Mosavi, L.K., Minor, D.L., Peng, Z.-Y., 2002. Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16029–34. doi:10.1073/pnas.252537899
- Mössner, E., Plückthun, A., 2001. Directed evolution with fast and efficient selection technologies. *Chimia (Aarau).* 55, 325–329.
- Moulard, M., Phogat, S.K., Shu, Y., Labrijn, A.F., Xiao, X., Binley, J.M., Zhang, M.-Y., Sidorov, I.A., Broder, C.C., Robinson, J., Parren, P.W.H.I., Burton, D.R., Dimitrov, D.S., 2002. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6913–6918. doi:10.1073/pnas.102562599
- Myers, R.M., Lerman, L.S., Maniatis, T., 1985. A general method for saturation mutagenesis of cloned DNA fragments. *Science* 229, 242–7.
- Nelson, A.L., Reichert, J.M., 2009. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* 27, 331–7. doi:10.1038/nbt0409-331
- Nguyen, H.H., Park, J., Kang, S., Kim, M., 2015. Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Basel).* 15, 10481–510. doi:10.3390/s150510481
- Nixon, A.E., Sexton, D.J., Ladner, R.C., 2014. Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice. *MAbs* 6, 73–85. doi:10.4161/mabs.27240

- Notkins, A.L., 2004. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol.* 25, 174–9. doi:10.1016/j.it.2004.02.004
- O’Neil, K.T., Hoess, R.H., 1995. Phage display: protein engineering by directed evolution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 443–9.
- Odegard, V.H., Schatz, D.G., 2006. Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 573–83. doi:10.1038/nri1896
- Olamendi-Portugal, T., Somodi, S., Fernández, J.A., Zamudio, F.Z., Becerril, B., Varga, Z., Panyi, G., Gáspár, R., Possani, L.D., 2005. Novel α -KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells. *Toxicon* 46, 418–429. doi:10.1016/j.toxicon.2005.06.001
- Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M.N., Russel, M., Darst, S.A., 2003. Structure of the Filamentous Phage pIV Multimer by Cryo-electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* 325, 461–470. doi:10.1016/S0022-2836(02)01246-9
- Oppezzo, P., Dumas, G., Bouvet, J.-P., Robello, C., Cayota, A., Pizarro, J.C., Dighiero, G., Pritsch, O., 2004. Somatic mutations can lead to a loss of superantigenic and polyreactive binding. *Eur. J. Immunol.* 34, 1423–32. doi:10.1002/eji.200424936
- Oprea, M.L., 1999. *Antibody Repertoires and Pathogen Recognition: The Role of Germline Diversity and Somatic Hypermutation.* University of New Mexico.
- Orlandi, R., Güssow, D.H., Jones, P.T., Winter, G., 1989. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3833–7.
- Packer, M.S., Liu, D.R., 2015. Methods for the directed evolution of proteins. *Nat. Rev. Genet.* 16, 379–94. doi:10.1038/nrg3927
- Polizzi, K.M., Chaparro-Riggers, J.F., Vazquez-Figueroa, E., Bommarius, A.S., 2006. Structure-guided consensus approach to create a more thermostable penicillin G acylase. *Biotechnol. J.* 1, 531–6. doi:10.1002/biot.200600029
- Popplewell, A.G., Sehdev, M., Spitali, M., Weir, A.N.C., 2005. Expression of antibody fragments by periplasmic secretion in *Escherichia coli*. *Methods Mol. Biol.* 308, 17–30. doi:10.1385/1-59259-922-2:017
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem.*
- Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J., Svendsen, I., 1981. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Carlsberg Res. Commun.* 46, 195–205. doi:10.1007/BF02906497
- Poulsen, T.R., Jensen, A., Haurum, J.S., Andersen, P.S., 2011. Limits for antibody affinity maturation and repertoire diversification in hypervaccinated humans. *J. Immunol.* 187, 4229–35. doi:10.4049/jimmunol.1000928
- Pucca, B.M., Carlos, J., Roncolato, C.E., Bertolini, T.B., Fossa, M.C., Varanda, A.W., Arantes, C.A., Barbosa, J.E., 2011. Monoclonal antibody (scFv) against the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*, produced by phage display technic, is capable to recognize and inhibit the action of the Ts1 toxin. *EPeQ/Fafibe* 1, 18–23.
- Qin, C.-F., Li, G.-C., 2014. Mammalian cell display technology coupling with AID induced SHM in vitro: an ideal approach to the production of therapeutic antibodies. *Int. Immunopharmacol.* 23, 380–6. doi:10.1016/j.intimp.2014.09.017

- Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J.M., Gurrola, G.B., Valdivia, H.H., Possani, L.D., 2013. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* 76, 328–42. doi:10.1016/j.toxicon.2013.07.012
- Rahbarizadeh, F., Ahmadvand, D., Sharifzadeh, Z., 2011. Nanobody; an old concept and new vehicle for immunotargeting. *Immunol. Invest.* 40, 299–338. doi:10.3109/08820139.2010.542228
- Ramírez, A.N., Martín, B.M., Gurrola, G.B., Possani, L.D., 1994. Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon* 32, 479–90.
- Rasched, I., Oberer, E., 1986. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol. Rev.* 50, 401–27.
- Rathanaswami, P., Roalstad, S., Roskos, L., Su, Q.J., Lackie, S., Babcook, J., 2005. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1004–1013. doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.002
- Regenmortel, M.H.V. Van, 1992. *Structure of Antigens, Volume 2*. CRC Press.
- Retter, I., Althaus, H.H., Münch, R., Müller, W., 2005. VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res.* 33, D671–4. doi:10.1093/nar/gki088
- Riaño-Umbarila, L., Contreras-Ferrat, G., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Corzo, G., Possani, L.D., Becerril, B., 2011. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *J. Biol. Chem.* 286, 6143–6151. doi:10.1074/jbc.M110.189175
- 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 directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.* 272, 2591–601. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04687.x
- Riaño-Umbarila, L., Ledezma-Candanoza, L.M., Serrano-Posada, H., Fernández-Taboada, G., Olamendi-Portugal, T., Rojas-Trejo, S., Gómez-Ramírez, I. V., Rudiño-Piñera, E., Possani, L.D., Becerril, B., 2016. Optimal Neutralization of *Centruroides noxius* Venom Is Understood through a Structural Complex between Two Antibody Fragments and the Cn2 Toxin. *J. Biol. Chem.* 291, 1619–30. doi:10.1074/jbc.M115.685297
- Riaño-Umbarila, L., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Gurrola, G.B., Possani, L.D., Becerril, B., 2013. A novel human recombinant antibody fragment capable of neutralizing Mexican scorpion toxins. *Toxicon* 76, 370–376. doi:10.1016/j.toxicon.2013.09.016
- Riechmann, L., Holliger, P., 1997. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* 90, 351–60.
- Rini, J., Schulze-Gahmen, U., Wilson, I., 1992. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* (80-.). 255, 959–965. doi:10.1126/science.1546293
- Rodi, D.J., Makowski, L., 1999. Phage-display technology – finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87–93. doi:10.1016/S0958-1669(99)80016-0
- Rodríguez De La Vega, R.C., Possani, L.D., 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: Biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*.
- Rodríguez-Rodríguez, E.R., Ledezma-Candanoza, L.M., Contreras-Ferrat, L.G., Olamendi-Portugal,

- T., Possani, L.D., Becerril, B., Riaño-Umbarila, L., 2012. A single mutation in framework 2 of the heavy variable domain improves the properties of a diabody and a related single-chain antibody. *J. Mol. Biol.* 423, 337–50. doi:10.1016/j.jmb.2012.07.007
- Rodríguez-Rodríguez, E.-R., Riaño-Umbarila, L., Possani-Lourival, D., Becerril, B., 2015. Recombinant Neutralizing Antibodies, A New Generation of Antivenoms, in: Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., F. Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R.. (Ed.), *Toxiology. Scorpion Venoms*. Springer Reference, p. 575.
- Rothe, C., Urlinger, S., Löhning, C., Prassler, J., Stark, Y., Jäger, U., Hubner, B., Bardroff, M., Pradel, I., Boss, M., Bittlingmaier, R., Bataa, T., Frisch, C., Brocks, B., Honegger, A., Urban, M., 2008. The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies. *J. Mol. Biol.* 376, 1182–200. doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018
- Rouet, R., Lowe, D., Dudgeon, K., Roome, B., Schofield, P., Langley, D., Andrews, J., Whitfeld, P., Jermutus, L., Christ, D., 2012. Expression of high-affinity human antibody fragments in bacteria. *Nat. Protoc.* 7, 364–73. doi:10.1038/nprot.2011.448
- Ruiz, M., 2000. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 28, 219–221. doi:10.1093/nar/28.1.219
- Russel, M., 1991. Filamentous phage assembly. *Mol. Microbiol.* 5, 1607–13.
- Russel, M., Lowman, H.B., Clackson, T., 2004. Introduction to phage biology and phage display, in: *Phage Display: A Practical Approach*. p. 332.
- Santibáñez-López, C.E., Francke, O.F., Ureta, C., Possani, L.D., 2015. Scorpions from Mexico: From species diversity to venom complexity. *Toxins (Basel)*. doi:10.3390/toxins8010002
- Saucedo, A.L., Del Rio-Portilla, F., Picco, C., Estrada, G., Prestipino, G., Possani, L.D., Delepiere, M., Corzo, G., 2012. Solution structure of native and recombinant expressed toxin CssII from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 Sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 478–487. doi:10.1016/j.bbapap.2012.01.003
- Schiavon, E., Sacco, T., Cassulini, R.R., Gurrola, G., Tempia, F., Possani, L.D., Wanke, E., 2006. Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons. *J. Biol. Chem.* 281, 20326–37. doi:10.1074/jbc.M600565200
- Schier, R., Marks, J.D., Wolf, E.J., Apellid, G., Won, C., McCartney, J.E., Bookman, M.A., Huston, J.S., Houston, L.L., Weiner, L.M., Adams, G.P., 1995. In vitro and in vivo characterization of a human anti-c-erbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. *Immunotechnology* 1, 73–81. doi:10.1016/1380-2933(95)00007-0
- Scott, A.M., Wolchok, J.D., Old, L.J., 2012. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 278–87. doi:10.1038/nrc3236
- Selisko, B., Cosío, G., García, C., Becerril, B., Possani, L.D., Horjales, E., 2004. Bacterial expression, purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius hoffmann*. *Toxicon* 43, 43–51. doi:10.1016/j.toxicon.2003.10.015
- Sethi, D.K., Agarwal, A., Manivel, V., Rao, K.V.S., Salunke, D.M., 2006. Differential epitope positioning within the germline antibody paratope enhances promiscuity in the primary immune response. *Immunity* 24, 429–38. doi:10.1016/j.immuni.2006.02.010

- Sheehan, J., Marasco, W.A., 2015. Phage and Yeast Display. *Microbiol. Spectr.* 3, AID-0028-2014. doi:10.1128/microbiolspec.AID-0028-2014
- Short, M.K., Jeffrey, P.D., Demirjian, A., Margolies, M.N., 2001. A single H:CDR3 residue in the anti-digoxin antibody 26-10 modulates specificity for C16-substituted digoxin analogs. *Protein Eng.* 14, 287-96.
- SINAVE, 2016. *Boletín Epidemiológico. Secr. salud* 1.
- Smith, G.P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-7.
- Smith, G.P., Petrenko, V.A., 1997. Phage Display. *Chem. Rev.* 97, 391-410.
- Sparks, A.B., Adey, N.B., Cwirla, S., 1996. Phage Display of Peptides and Proteins, Phage Display of Peptides and Proteins. Elsevier. doi:10.1016/B978-012402380-2/50015-0
- Stanfield, R.L., Dooley, H., Verdino, P., Flajnik, M.F., Wilson, I.A., 2007. Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *J. Mol. Biol.* 367, 358-72. doi:10.1016/j.jmb.2006.12.045
- Steipe, B., Schiller, B., Plückthun, A., Steinbacher, S., 1994. Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *J. Mol. Biol.* 240, 188-92. doi:10.1006/jmbi.1994.1434
- Sun, J., Brusica, V., 2015. A systematic analysis of a broadly neutralizing antibody AR3C epitopes on Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein and their cross-reactivity. *BMC Med. Genomics* 8 Suppl 4, S6. doi:10.1186/1755-8794-8-S4-S6
- Sundberg, E.J., 2009. Structural basis of antibody-antigen interactions. *Methods Mol. Biol.* 524, 23-36. doi:10.1007/978-1-59745-450-6_2
- Swann, P.G., Tolnay, M., Muthukkumar, S., Shapiro, M.A., Rellahan, B.L., Clouse, K.A., 2008. Considerations for the development of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 493-9. doi:10.1016/j.coi.2008.05.013
- Taus, N.S., Cunha, C.W., Marquard, J., O'Toole, D., Li, H., 2015. Cross-Reactivity of Neutralizing Antibodies among Malignant Catarrhal Fever Viruses. *PLoS One* 10, e0145073. doi:10.1371/journal.pone.0145073
- Torreri, P., Ceccarini, M., Macioce, P., Petrucci, T.C., 2005. Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Ann. Ist. Super. Sanita* 41, 437-41. doi:10.1021/ja061521a
- Ujhelyi, M.R., Robert, S., 1995. Pharmacokinetic Aspects of Digoxin-Specific Fab Therapy in the Management of Digitalis Toxicity. *Clin. Pharmacokinet.* doi:10.2165/00003088-199528060-00006
- Valdivia, H.H., Possani, L.D., 1998. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. *Trends Cardiovasc. Med.* doi:10.1016/S1050-1738(97)00138-2
- Van Regenmortel, M.H. V, 2014. Specificity, polyspecificity, and heterospecificity of antibody-antigen recognition. *J. Mol. Recognit.* 27, 627-39. doi:10.1002/jmr.2394
- Vázquez, H., Chávez-Haro, A., García-Ubbelohde, W., Mancilla-Nava, R., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., Sevcik, C., 2005. Pharmacokinetics of a F(ab')₂ scorpion antivenom in healthy human volunteers. *Toxicon* 46, 797-805. doi:10.1016/j.toxicon.2005.08.010
- Verma, R., Boleti, E., George, A.J., 1998. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methods* 216, 165-81.

- Willats, W.G.T., 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol. Biol.* 50, 837–54.
- Wilson, D.R., Finlay, B.B., 1998. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can. J. Microbiol.* 44, 313–29.
- Wing, M.G., 1995. The molecular basis for a polyspecific antibody. *Clin. Exp. Immunol.* 99, 313–5.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., Hoogenboom, H.R., 1994. Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433–455.
doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.002245
- Wirtz, P., Steipe, B., 1999. Intrabody construction and expression III: engineering hyperstable V(H) domains. *Protein Sci.* 8, 2245–50. doi:10.1110/ps.8.11.2245
- Wood, R.W., 1902. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proc. Phys. Soc. London* 18, 269–275. doi:10.1088/1478-7814/18/1/325
- Xu, J.L., Davis, M.M., 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13, 37–45. doi:10.1016/S1074-7613(00)00006-6
- Yang, W.-P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R., Barbas III, C.F., 1995. CDR Walking Mutagenesis for the Affinity Maturation of a Potent Human Anti-HIV-1 Antibody into the Picomolar Range. *J. Mol. Biol.* 254, 392–403. doi:10.1006/jmbi.1995.0626
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B.M., Gurrola-Briones, G., Hérion, P., Possani, L.D., 1992. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* 204, 281–92.
- Zaugg, J., Gumulya, Y., Gillam, E.M.J., Bodén, M., 2014. Directed Evolution Library Creation, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), *Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-1053-3
- Zemlin, M., Klinger, M., Link, J., Zemlin, C., Bauer, K., Engler, J.A., Schroeder, H.W., Kirkham, P.M., 2003. Expressed murine and human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures. *J. Mol. Biol.* 334, 733–49.
- Zhang, J.Z., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D., Gurevitz, M., Catterall, W.A., 2012. Mapping the interaction site for a beta-scorpion toxin in the pore module of domain III of voltage-gated Na(+) channels. *J. Biol. Chem.* 287, 30719–30728.
doi:10.1074/jbc.M112.370742
- Zhao, A., Tohidkia, M.R., Siegel, D.L., Coukos, G., Omid, Y., 2014. Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1–14.
doi:10.3109/07388551.2014.958978
- Zhao, S., Lu, J., 2011. A bioinformatics pipeline to build a knowledge database for in silico antibody engineering. *Mol. Immunol.* 48, 1019–26. doi:10.1016/j.molimm.2011.01.009
- Zhu, Z., Hattori, K., Zhang, H., Jimenez, X., Ludwig, D.L., Dias, S., Kussie, P., Koo, H., Kim, H.J., Lu, D., Liu, M., Tejada, R., Friedrich, M., Bohlen, P., Witte, L., Rafii, S., 2003. Inhibition of human leukemia in an animal model with human antibodies directed against vascular endothelial growth factor receptor 2. Correlation between antibody affinity and biological activity. *Leukemia* 17, 604–11. doi:10.1038/sj.leu.2402831
- Zwick, M.B., Shen, J., Scott, J.K., 2000. Homodimeric peptides displayed by the major coat protein of filamentous phage. *J. Mol. Biol.* 300, 307–20. doi:10.1006/jmbi.2000.3850



Broadening the neutralizing capacity of a family of antibody fragments against different toxins from Mexican scorpions



Everardo Remi Rodríguez-Rodríguez^a, Timoteo Olamendi-Portugal^a, Hugo Serrano-Posada^b, Jonathan Noé Arredondo-López^a, Ilse Gómez-Ramírez^a, Guillermo Fernández-Taboada^a, Lourival D. Possani^a, Gerardo Alfonso Anguiano-Vega^c, Lidia Riaño-Umbarila^{d,**}, Baltazar Becerril^{a,*}

^a Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62250, Mexico

^b CONACYT-Research Fellow, Laboratorio de Bioingeniería, Universidad de Colima, Km. 9 Carretera Coquimatlán-Colima, C.P. 28400, Coquimatlán, Colima, Mexico

^c Laboratorio de Biomedicina Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Durango, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av Veterinaria S/N, Circuito Universitario, CP 34120, Durango, Dgo, Mexico

^d CONACYT-Research Fellow, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2016

Received in revised form

12 May 2016

Accepted 18 May 2016

Available online 20 May 2016

Keywords:

Cross reactivity

Human scFvs

Phage display

Scorpion toxin neutralization

ABSTRACT

New approaches aimed at neutralizing the primary toxic components present in scorpion venoms, represent a promising alternative to the use of antivenoms of equine origin in humans. New potential therapeutics developed by these approaches correspond to neutralizing antibody fragments obtained by selection and maturation processes from libraries of human origin. The high sequence identity shared among scorpion toxins is associated with an important level of cross reactivity exhibited by these antibody fragments. We have exploited the cross reactivity showed by single chain variable antibody fragments (scFvs) of human origin to re-direct the neutralizing capacity toward various other scorpion toxins. As expected, during these evolving processes several variants derived from a parental scFv exhibited the capacity to simultaneously recognize and neutralize different toxins from *Centruroides* scorpion venoms. A sequence analyses of the cross reacting scFvs revealed that specific mutations are responsible for broadening their neutralizing capacity. In this work, we generated a set of new scFvs that resulted from the combinatorial insertion of these point mutations. These scFvs are potential candidates to be part of a novel recombinant antivenom of human origin that could confer protection against scorpion stings. A remarkable property of one of these new scFvs (ER-5) is its capacity to neutralize at least three different toxins and its complementary capacity to neutralize the whole venom from *Centruroides suffusus* in combination with a second scFv (LR), which binds to a different epitope shared by *Centruroides* scorpion toxins.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: scFv, single chain antibody fragment; CDR, complementarity determining region; FW, framework region; V_L, light chain variable domain; V_H, heavy chain variable domain; *C. noxius*, *Centruroides noxius* Hoffmann; Cn, toxin from *C. noxius*; *C. suffusus*, *Centruroides suffusus*; C_{ss}, toxin from *C. suffusus*; *C. limpidus*, *Centruroides limpidus*; C_{ll}, toxin from *Centruroides limpidus*; *C. tecomanus*, *Centruroides tecomanus*; Ct1a, toxin from *C. tecomanus*; LD₅₀, Median lethal dose.

* Corresponding author. Av. Universidad No. 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, 62210, Mexico.

** Corresponding author. Av. Universidad No. 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, 62210, Mexico.

E-mail addresses: umbarila@ibt.unam.mx (L. Riaño-Umbarila), baltazar@ibt.unam.mx (B. Becerril).

1. Introduction

The severity of envenomations caused by scorpion stings reported in Mexico and around the world (Chippaux, 2012) is associated with the presence of abundant and potent neurotoxins in the venom. Therefore, medical importance of these beta-neurotoxins relies on two key elements, abundance and toxicity reflected as their affectionation of voltage-dependent sodium (Na_v) channels (Cestèle et al., 1998; Possani et al., 1999) that are present in the central and peripheral nervous systems and are responsible for the transmission of nerve impulses. The fatal effect of the toxins relates

to the impairment of this transmission affecting some vital functions, which can lead to death.

The current antivenom applied in Mexico is produced by hyperimmunizing horses with the venoms from four venomous scorpion species. Serum antibodies are enzymatically processed to obtain F(ab')₂ type fragments (Dehesa-Dávila and Possani, 1994). The high homology shared by scorpion toxins (de la Vega et al., 2013; Rodríguez De La Vega and Possani, 2005), would favor the generation of cross reacting antibodies. This antivenom consisting of the whole content of cross reacting antibodies, is expected to be polyclonal and polyvalent. Its polyvalent character is revealed by the capacity to neutralize the whole venoms of at least 7 venomous scorpion species from Mexico: *Centruroides noxius*, *Centruroides limpidus*, *Centruroides suffusus*, *Centruroides tecomanus*, *Centruroides infamatus*, *Centruroides elegans*, and *Centruroides sculpturus*.

Intensive research on scorpion venom components, has revealed that usually there are one to three major neurotoxins in each venom (Bahraoui et al., 1988; Clot-Faybesse et al., 1999; Martin et al., 1987; Possani et al., 1981; Ramírez et al., 1994; Zamudio et al., 1992). As already mention, medical importance of these beta-neurotoxins is based on their abundance and toxicity (lethality) (Possani et al., 1999; Rodríguez De La Vega and Possani, 2005). It has been shown that polyclonal antibodies are not essential for neutralizing the toxic effect of the lethal components of scorpion venoms. For example, in *C. noxius* venom the main toxin (Cn2) represents 6.8% of the whole venom and shows an LD₅₀ of 0.25 µg/20 g mouse. A monoclonal antibody (BCF2) was able of neutralizing Cn2 toxin and the whole venom (Zamudio et al., 1992). Another example, corresponds to *Androctonus australis* scorpion venom which contains two main neurotoxins (AaHI and AaHII). This venom is neutralized by two fragments of antibodies directed against each of these toxins (Hmila et al., 2010). These examples and others documented in the literature (reviewed by Alvarenga et al., 2014; Rodríguez-Rodríguez et al., 2015) indicated that neutralization of the main toxins would be sufficient to neutralize the whole venom, meaning that it is possible to generate novel specific antivenoms with a few antibody fragments. Using a single antibody would be sufficient to neutralize each main beta-neurotoxin. However, the presence of two or more different neutralizing antibodies against each toxin would increase the therapeutic efficiency of the new antivenoms. In support of these observations, we have demonstrated that the neutralization of the venom of *Centruroides noxius* with two antibody fragments (LR and RU1), that recognize different epitopes on the Cn2 toxin is more efficient (Riaño-Umbarila et al., 2016). Smaller amounts of these scFVs mixed compared when injected separately, were sufficient to protect envenomed mice. Innovative antivenoms would have several advantages: a homogenous composition, limited batch-to-batch variation, better safety and efficacy. Furthermore, these products do not depend on the immune response of animals and the probability of occurrence of secondary effects associated with the heterologous origin of antivenoms might be minimized (Chippaux, 2012). Results reported by our group, indicate that single-chain variable fragments (scFv) of human origin capable of neutralizing the major beta-neurotoxins present in the venoms, represent a promising alternative to be used as a new antivenom against *Centruroides* scorpions stings (Riaño-Umbarila et al., 2016, 2013, 2011, 2005).

Initially, we isolated two non-neutralizing scFVs, 3F and C1 against toxin Cn2 from a human scFv library (Riaño-Umbarila et al., 2005). These parental antibody fragments were affinity matured by directed evolution and phage display. As a result of these processes, variants capable of neutralizing Cn2 toxin were generated. scFVs LR and RU1 were the best variants obtained from parental scFVs 3F (Riaño-Umbarila et al., 2011) and C1 (Riaño-Umbarila et al., 2016),

respectively. It was shown that these fragments were capable of neutralizing a second toxin. scFv LR was able to neutralize Css2 toxin from the venom of *Centruroides suffusus*, while scFv RU1 neutralized CII1 toxin from *Centruroides limpidus*. It is worth mentioning that these two scFVs recognize different epitopes. Both non-overlapping epitopes are supposed to be involved in the envenoming effects of the toxins (Riaño-Umbarila et al., 2016). The main aim of our group is to optimize the different antibody fragments derived from both families of scFVs (3F and C1) to develop variants being able of neutralizing the main toxins present in Mexican scorpion venoms. We suggest that a set of scFVs that bind to both epitopes will guarantee protection from envenoming. At the same time the polyclonal and polyspecific nature of the current antivenom would be imitated.

As mentioned above, scFv LR neutralizes the Css2 toxin. To further optimize the neutralization of this toxin, we sought to generate a second scFv derived from scFv C1 which would be able to neutralize Css2 toxin through a second epitope. At the same time, based on the high homology among *Centruroides* scorpion toxins, we would be broadening the neutralization capacity of the derived scFVs against other toxins. To achieve these goals, two mutagenesis processes were implemented in parallel; random and site-directed mutagenesis, using some of the variants derived from scFv RU1 taken as substrate. It is worth noting that scFv RU1 recognizes but does not neutralize Css2 toxin (data not shown). Two variants derived from scFv RU1 (scFVs RJI-1 and RJI-2) were subjected to *in vitro* maturation by means of directed evolution and semi-rational approaches. Generated libraries were subjected to several rounds of selection against Css2 toxin using phage display. Selected variants showed several changes that were combined, resulting in a new set of scFVs that were evaluated for their ability to bind to several toxins. The results of these experiments revealed that the incorporation of a few key mutations allowed to expand the binding capacity of the new scFVs toward various toxins; including Css2 (*C. suffusus*), Cn2 (*C. noxius*), CII1, CII2 (*C. limpidus*) and Ct1a (*C. tecomanus*). scFv ER-5 which was evolved toward Css2 toxin, was capable of neutralizing three different toxins. Structural analyses of the complexes of toxins with scFVs helped us to understand how this set of selected mutations significantly increased binding capacity, cross reactivity and affinities of the new variants against several toxins.

2. Experimental procedures

2.1. Venom preparation

The scorpion venoms used in this work were obtained from *Centruroides suffusus*, *Centruroides noxius*, *Centruroides limpidus* and *Centruroides tecomanus*. Fresh venom was obtained from individuals of each species by electrical stimulation. The samples were diluted in bidistilled water and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 4 °C. The insoluble material was discarded, and the toxin-containing supernatant was recovered and spectrophotometrically quantified ($\lambda = 280$ nm).

2.2. Purification of the toxins

The beta-neurotoxins were purified from the scorpion venoms using previously described methodologies. Css2 and Css4 were obtained from *C. suffusus* (Espino-Solis et al., 2011), CII1 and CII2 were obtained from *C. limpidus* (Alagón et al., 1988; Ramírez et al., 1994), Cn2 was obtained from *C. noxius* (Zamudio et al., 1992) and Ct1a was obtained from *C. tecomanus* (Olamendi-Portugal et al., 2005).

2.3. Construction of the scFv variants and the combinatorial mutations

To construct the initial variants, the DNA sequence of scFv RU1 was modified at positions N57S (V_H), Y110T (V_H), Y110N (V_H) and S164I (V_L) using specific oligonucleotides (DIR and REV, which flank the sequence of scFvs) (Riaño-Umbarila et al., 2005) (Table 1). For each mutation, a mega-primer was generated in a PCR reaction using a specific primer and the DNA from scFv RU1 as the template. The mega-primer containing the H110T and H110N mutations was combined with the mega-primer containing the S164I mutation. The product of this PCR reaction was included in a new PCR using the mega-primer containing the N57S mutation. All of the PCR products were purified from a preparative agarose gel. The final complete variant products were digested with the *SfiI* and *NotI* enzymes and ligated into the pSyn1 plasmid, which had previously been digested with the same enzymes, to further characterize the soluble protein products or into phagemid pSyn2 to display the scFvs on a phage (M13). The ligation products were introduced into electro-competent *E. coli* TG1 cells. The DNA sequence of each variant was confirmed by DNA sequencing (Sequencer equipment model 3100 Applied BioSystems; Foster City, CA). This same procedure was used to construct the different variants described in this study.

2.4. In vitro maturation of the RU1 variants by directed evolution

The maturation process included the construction of a mutant library by random mutagenesis and its screening using three rounds of bio-panning. Error-prone PCR reactions were performed to construct the mutant library. This method allows us to achieve different mutation rates under appropriate conditions (Cadwell and Joyce, 1992; Leung et al., 1989). The DNA sequences used as templates correspond to the scFv RU1 variants RJI-1 and RJI-2. The primers were DIR and REV (Riaño-Umbarila et al., 2005). The PCR products were gel-purified, digested with the restriction enzymes *SfiI* and *NotI*, and ligated into the pSyn2 phagemid that had previously been digested with the same enzymes to display the scFvs on a phage (M13). The ligation product was incorporated into *E. coli* TG1 electro-competent cells. The library was characterized and evaluated by bio-panning against the Css2 toxin as previously described (Riaño-Umbarila et al., 2005) with some modifications. The toxin concentrations were $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ for the first bio-panning round and $1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ for the second and third rounds. For the second round, the phages were pre-incubated at 60°C for 1 h before incubation with immobilized Css2 toxin. The unspecific and weak binding phages were eliminated by washing with 100 mM trimethylamine, followed by several washes with PBS-Tween 20. The scFv population from the third round was evaluated with a soluble protein ELISA as described previously (Riaño-Umbarila et al., 2005). The DNA from the selected scFvs was sequenced using the primers DIR and REV in an Applied BioSystems Sequencer

model 3100 (Foster City, CA).

2.5. Maturation by semi-rational strategy

A theoretical binary complex of scFv RJI-2-Css2 was generated through *in silico* mutagenesis and molecular replacement in the crystallographic structure of the ternary complex scFv RU1-Cn2-LR scFv (PDB entry 4V1D) using the standard rotamer library of Coot (Emsley et al., 2010). In this structure, scFv LR was removed and the Css2 toxin obtained by NMR (PDB entry 2LI7) (Saucedo et al., 2012) was structurally superposed to the Cn2 toxin and coupled to an *in silico* mutagenized scFv RU1 resulting in the scFv RJI-2. The model was subjected to energy minimization using YASARA software (Krieger et al., 2009). The structural scrutiny was focused on the area of interaction between scFv RJI-2 and the Css2 toxin in which there are differences in some amino acid residues with respect to the Cn2 toxin. The residues that were modified in scFv RJI-2 were changed from S 57 (V_H) to R and K; K 65 (V_H) to R and Y; and I 236 (V_L) to W, F and L. The library was constructed with the mega-primer strategy using scFv RJI-2 as the template, the degenerate primers S57R/K, K65R/Y, and I 236W/F/L (Table 1) and the primers DIR or REV (Riaño-Umbarila et al., 2005). The library was characterized and evaluated using three bio-panning rounds against the Css2 toxin as previously described (Riaño-Umbarila et al., 2005). The concentration of the toxin immobilized into an immuno-tube was $2.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ for the first round of bio-panning, and $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ for the second and third rounds.

2.6. Antibody fragment expression and purification

The DNA segments that encoded the selected scFvs were sub-cloned into the pSyn1 vector to express the proteins. The recombinant vectors were used to electroporate the *E. coli* TG1 cells. The proteins were expressed and purified as previously described (Riaño-Umbarila et al., 2005). The protein concentrations were determined spectrophotometrically at $\lambda = 280 \text{ nm}$. An extinction coefficient of 49765 and molecular weights: RJI-1; 28621.5, RJI-2; 28634, RJI-3; 28657.5, ER-1; 28563.5, ER-5; 28673 and ER-6; 28550.4 were used.

2.7. Comparison of the binding properties by surface plasmon resonance

The level of recognition of the scFv variants was determined using a biosensor that detects molecular interactions in real time (Biacore X, Uppsala, Sweden) at 25°C . The Css2, Cn2, CII1, CII2 and Ct1a toxins were dissolved in 10 mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (pH 6) and immobilized on cell 2 of a CM5 sensor chip using the amino coupling kit, reaching binding levels of 200–300 RUs. Cell 1 in the sensor chip without antigen was used as a control. The same concentrations of the scFv variants were used to evaluate the binding to each toxin. The samples were diluted in HBS-EP

Table 1
Primer sequences used to construct the variants. M = A/C, Y = C/T, R = A/G S = C/G and K = G/T.

Strategy	Template	Primers	Oligonucleotides
Construction of the RJI-1, RJI-2 and RJI-3 variants.	RU1	N57S	5'AGTATTTACTACCTCCACCATATGA3'
	RU1	S164I	5'CTGTCTGGATCCAGCTCC3'
	RU1	H110T	5'GCGCCGACTGGACCTTCG3'
	RU1	H110N	5'GCGCCGACTGGAACCTTCG3'
Maturation of RJI-2	RJI-2	S57 R/K	5'AGTATTTMYTACYTCCACCATATG3'
	RJI-2	K65 R/Y	5'GCAGACTCCGTGARCGGCCG3'
	RJI-2	I236 W/F/L	5'GGGATGACAGCCTGTGKSGGTTATG3'
	ER-4	N57R	5'AGTATTTCTACCTCCACCATATGA3'

buffer (Biacore) and 100 μL of the scFvs were injected over the chip at a flow rate 40 or 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ with a delay of 500 s. The chip surfaces were regenerated with 10 mM HCl. The sensorgrams were corrected by subtracting the values from the reference flow cell and comparing the results using BIA-evaluation software version 3.1.

2.8. Surface plasmon resonance measurements

The kinetic constants of the scFvs were determined using previously described conditions (Riaño-Umbarila et al., 2011) with some modifications. Only the two scFvs that exhibited the best interactions with the toxins were evaluated twice. The scFvs that had been serially diluted in HBS-EP buffer (Biacore) were injected into chips containing the immobilized C_{ss2}, C_{n2}, C_{II1}, C_{II2} or C_{t1a} toxins. Samples of 100 μL were injected over each chip at a flow rate 50 $\mu\text{L min}^{-1}$. The protein concentrations ranged from 1 nM to 200 nM for each assay. The delay phase lasted 600 s or 900 s. The kinetic constants were determined using the corresponding sensorgrams, which were corrected by subtracting the values from both the reference flow cell and the blank buffer injection. The Langmuir (1:1) model from BIA-evaluation software version 3.1 was used to determine the kinetic constants. Time of residence (T_R) of the scFvs on the different toxins was determined as the $1/k_{off}$ value expressed in minutes.

2.9. Competition assay

The competition for the binding of the scFvs ER-5, RU1 and LR to the C_{ss2} toxin was performed as previously described (Riaño-Umbarila et al., 2016).

2.10. Neutralization assays with the toxins

All *in vivo* neutralization assays were performed in accordance with the guidelines of the Bioethics Committee of the Institute of Biotechnology from the National Autonomous University of Mexico. The *in vivo* neutralization tests were performed with the different scFvs and 3 toxins (C_{ss2}, C_{n2} and C_{II1}). Control groups of 10 female CD1 mice weighing ~ 20 g were intraperitoneally injected with toxin amounts that were equivalent to 1 or 2 LD₅₀ (Table 2). In the experimental group, the toxin was mixed with each scFv variant to prepare samples with various toxin:scFv molar ratios (1:10, 1:5, 1:2 or 1:1). The mixtures were pre-incubated for 30 min at room temperature (~ 25 °C) prior to injection. The animals were observed over a period of 48 h.

2.11. Neutralization assays with whole fresh venom from *C. suffusus*

The *in vivo* neutralization tests were performed using freshly prepared venom. Control groups of 10 female CD1 mice weighing ~ 20 g were intraperitoneally injected with venom amounts corresponding to 2 or 3 median lethal doses (LD₅₀). For the first neutralization assay, the venom was mixed with scFv ER-5 to prepare samples containing different toxin:scFv molar ratios. These ratios were calculated relative to the concentration of the C_{ss2} toxin in the venom. The LD₅₀ of the venom of *C. suffusus* is ~ 8.75 μg /

20 g body weight of each mouse, where the C_{ss2} toxin represents $\sim 2.8\%$ of the total toxic components (Martin et al., 1987). Similar to the first test, a combination of ER-5 and LR was used for the second neutralization assay. The mixtures of venom and scFv(s) were pre-incubated at room temperature for 30 min prior to their injection into the mice.

2.12. In silico mutagenesis and modeling

Theoretical binary complexes were generated through mutations *in silico* based on the crystallographic structure of the ternary complex scFv RU1-C_{n2}-LR scFv (PDB entry 4V1D) in which the structure of scFv LR was removed. The generated models were scFv ER-1 with the toxins C_{n2}, C_{ss2}, C_{II1}, C_{II2} and C_{t1a}; and scFv ER-5 with C_{ss2}. The *in silico* mutagenesis was performed using the structure of RU1 as the template. The C_{n2} toxin was mutated to generate the C_{II1}, C_{II2} and C_{t1a} toxins. The differences between the scFv variants and toxins can be observed in Table 3A and B and Fig. 1 and 2. The models were generated using the standard rotamer library of Coot (Emsley et al., 2010) and subjected to energy minimization using YASARA software (Krieger et al., 2009). The electrostatic potential surfaces were calculated by solving the Poisson-Boltzmann equation included in the ccp4mg program version 2.7.3 (McNicholas et al., 2011). The graphical representations were also constructed with CCP4mg version 2.7.3 (McNicholas et al., 2011).

3. Results

Using different approaches of *in vitro* maturation such as directed evolution, site-directed mutagenesis and phage display, we sought to direct the recognition of the parental scFvs 3F and C1 (Riaño-Umbarila et al., 2005) towards several different scorpion beta-toxins. The high sequence similarity among Mexican scorpion toxins (Rodríguez De La Vega and Possani, 2005) (Fig. 1) and cross reactivity of some scFvs (Riaño-Umbarila et al., 2016, 2011) are the main elements that have contributed to achieve the aims of this study.

Maturation of scFv C1 by directed evolution against C_{II1} and C_{II2} toxins from scorpion *Centruroides limpidus* resulted in the generation of a set of important scFv variants (Table 3A). The main result was achieved from a combination of mutations that were integrated to generate scFv RU1, which exhibited the ability to neutralize C_{II1} and C_{n2} toxins and the whole venom of *C. noxius* (Riaño-Umbarila et al., 2016). Efforts aimed at generating variants from the parental scFv C1 that could neutralize C_{II2} toxin had been unsuccessful. However, key mutations that would help to broaden toxin recognition were identified during these maturation processes. These mutations were mainly located at CDR2 and CDR3 of the heavy chain variable domain (V_H) and fewer changes were located in the light chain variable domain (V_L). Based on the observation that the scFv RU1 carries mutations that improved the recognition of different toxins, mutations N57S, Y110H/T/N and S164I were incorporated into the sequence of scFv RU1 to generate a new set of scFvs (Table 3A). Obtained variants, share the same mutations with the exception of the mutation at 110 position; RJI-1

Table 2
Values of the toxins median lethal doses.

Scorpion venom	Toxin	1 LD ₅₀ ($\mu\text{g}/20$ g of mouse)	Reference
<i>C. suffusus</i>	C _{ss2}	0.75	(Estrada et al., 2007)
<i>C. noxius</i>	C _{n2}	0.25	(Zamudio et al., 1992)
<i>C. limpidus</i>	C _{II1}	1.7	(Riaño-Umbarila et al., 2013)

Table 3
A) Mutations identified in scFvs derived from parental scFv C1 during the process of *in vitro* maturation. B) Mutations identified in the scFvs isolated during maturation process against Css2 toxin.

A)																
scFv	VH										VL				Approach-toxin	
	FW1	CDR2			FW3		CDR3			FW1	CDR1	FW3		CDR3		
C1	50	54	56	57	69	84	105	107	110	111	164	172	220	225	235	
	V	S	D	N	T	N	M	A	Y	F	S	T	S	D	L	
3H		G							H							D.E.–CII1
202F		G	G				L									D.E.–CII1
RU1		G	G				L		H							C.–CII1–Cn2
3008C		G			I		L				I				P	D.E.–CII2
3008C-1		G			I		L		T		I				P	D.E.–CII2
3007A		G										A				D.E.–CII2
3004F	A	G		K	I	Y	L	S	H		I				P	D.E.–CII2
3010B		G			I		L		N	L			V		P	D.E.–CII2
RU2J		G	G	S	I		L		N	L	I		V		P	D.E.–CII2
RJI-1		G	G	S			L		T		I					C.
RJI-2		G	G	S			L		N		I					C.
RJI-3		G	G	S			L		H		I					C.

B)											
scFv	VH						VL			Approach	
	CDR2	FW3			CDR3		FW1	FW3			
C1	54	56	57	65	105	107	110	164	208		
	D	S	N	K	M	A	Y	S	D		
ER-1	G	G	S				L	T	I	G	D. E.
ER-2	G	G	S				L	N	I	G	C.
ER-3	G	G	R				L	N	I		D.E. and S-R.
ER-4	G	G	S		R		L	N	I		S-R
ER-5	G	G	R		R		L	N	I		C.
ER-6	G	G	S				L	N		G	C.

Approaches: D.E. Directed Evolution; C: Combinatorial, which means that scFvs were generated by combining mutations that were identified in the other scFvs. The residues that were incorporated into RJI-1, RJI-2 and RJI-3 are shown in bold; S-R.: Maturation using the semi-rational strategy.

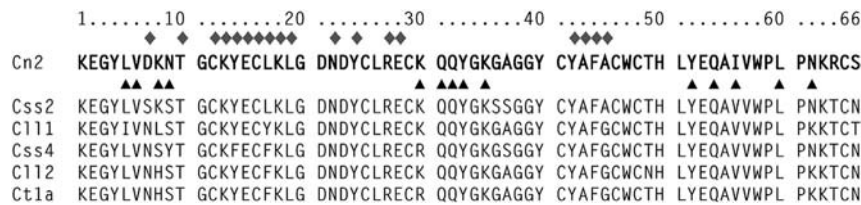


Fig. 1. Similarity of the different scorpion toxins from species of the *Centruroides* genus. The sequence alignment of the amino acid residues of the beta-neurotoxins exhibit a significant homology among the toxins (80–90%). The diamonds above the residues indicate the contacts between the Cn2 toxin and the scFv RU1 and the triangles below the residues indicate the contacts with the scFv LR, based on previous results (Riaño-Umbarila et al., 2016).

(T 110), RJI-2 (N 110) and RJI-3 (H 110) (Fig. 2 and Table 3A), which was identified during early maturation processes.

Binding capacity of the three RU1 variants (RJI-1, RJI-2 and RJI-3) to the various toxins was evaluated in a preliminary way by means of SPR. The respective sensorgrams revealed an improved binding towards Css2 and CII2 toxins compared to scFv RU1 at the same concentration (Fig. 3A and B). scFv RJI-2 shown a better binding response to Css2 toxin followed by RJI-1 and RJI-3 (Fig. 3A).

To generate a second set of improved scFvs capable of neutralizing the Css2 toxin, two simultaneous procedures of maturation were implemented: directed evolution and semi-rational approaches. The latter approach was performed with the help of a structural model which allowed to identify candidate mutations that would improve the recognition of Css2 toxin by the mutant scFvs.

3.1. Directed evolution

scFvs RJI-1 and RJI-2 were *in vitro* affinity matured in order to generate neutralizing variants against Css2 toxin. For this purpose, the genes that encode these scFvs were used as templates to construct a mutant library. A library of 3.3×10^7 transformants was subjected to three rounds of bio-panning using phage display. Two variants were isolated from the last round: ER-1 and ER-3 which contained D208G and N57R mutations, respectively (Fig. 2 and Table 3B). In ELISA assays, scFv ER-1 showed the highest binding to Css2 compared to scFvs ER-3 and RU1 (data not shown).

3.2. Site-directed mutagenesis

The theoretical model of the interaction between scFv RJI-2 and the Cn2 toxin showed that the side chain of residue K65 (V_H) at the interface establishes a hydrogen bond with residue N9 from Cn2 toxin and I236 (V_L) forms a hydrophobic interaction with toxin

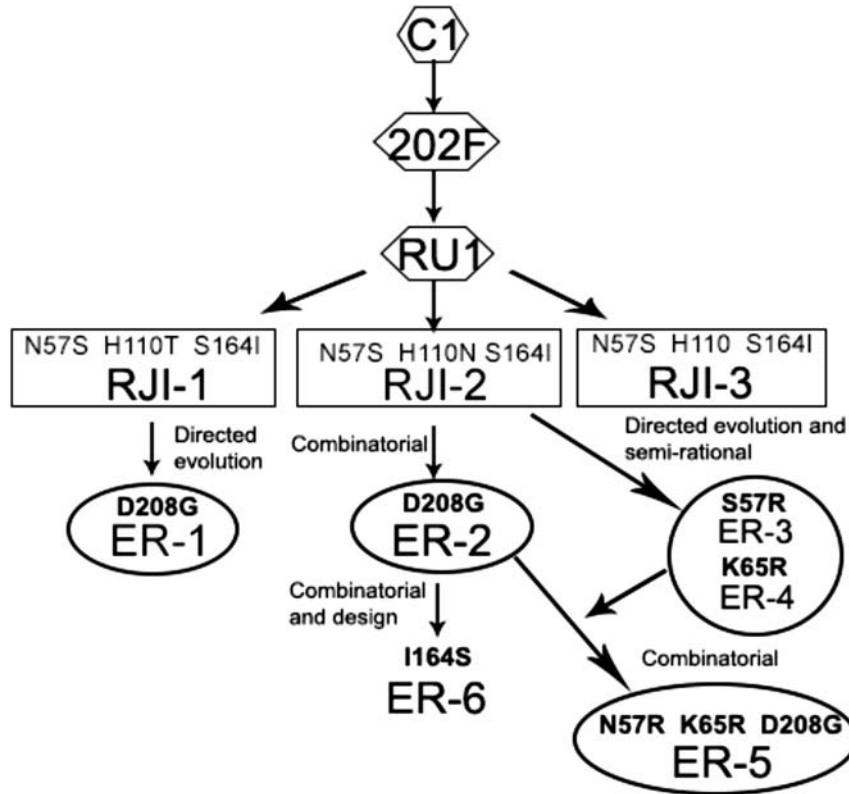


Fig. 2. Genealogy of scFvs derived from the parental scFv C1. Improved antibody fragments that were obtained in previous studies (hexagons) and the present work (rectangles and ovals) are shown. The name of the variants and mutations accumulated during the process of improving their neutralization capacity (top) are indicated. Rectangles include scFvs that were used for *in vitro* maturation under approaches indicated in the middle of the corresponding arrows. Ovals include mutant scFvs that resulted from these processes and were directed against Css2 toxin. scFv ER-6 was obtained by design and combinatorial approaches. This scFv was the best fragment that binds Cn2 toxin. The experimental approach that was used to obtain scFv ER-5 is also indicated.

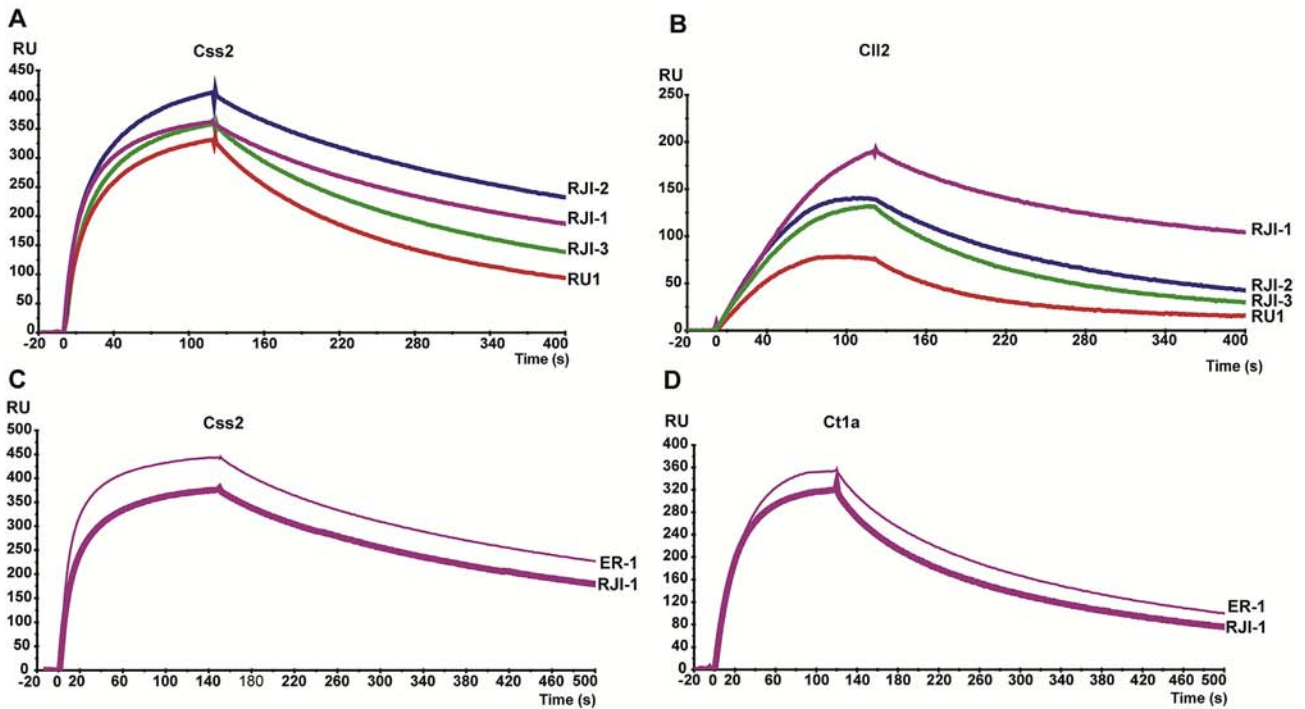


Fig. 3. Recognition of beta-toxins by different scFv variants. SPR sensorgrams correspond to the recognition of Ccss2 (A) and CII2 toxins (B) by RJ1-1, RJ1-2 and RJ1-3 compared to scFv RU1. Differences in the recognition of Ccss2 (C) or Ct1a (D) toxins can be observed in the variant with the D208G mutation (ER-1) compared to one which did not contain this mutation (RJ1-1). Each of the scFvs were used at the same concentration in each panel: A: 200 nM, B: 100 nM, C: 200 nM, and D: 250 nM.

residue I56. Equivalent interactions occur in the RU1-Cn2 complex (Riaño-Umbarila et al., 2016). In C_{ss}2 toxin, the residues at these positions are S9 and V56 which carry comparatively smaller side chains (Fig. 1). When Cn2 is replaced with C_{ss}2 in the model, the increased distance between the interacting residues of C_{ss}2 toxin and scFv RJI-2 might cause a decrease in the strength of their interaction. To recover these contacts, the corresponding residues in the scFv were mutated to residues with longer side chains: K65 to R or Y and I236 to L, W or F. In addition to these two residues we decided to modify position S57 by K, based on the results of the maturation processes (see Table 3A). Serine (S) present in scFv RJI-2, is a non-charged residue while K is larger and charged. To evaluate the importance of the residue present in this position, in terms of the recognition to C_{ss}2 toxin, two additional mutations (R or G) were included. This set of mutations was combined with the mutations in the other two positions (65 and 236). To evaluate the effects of the combination of these changes a corresponding library was constructed using scFv RJI-2 as the template. A library of 3.8×10^8 variants was subjected to three rounds of bio-panning. Two main variants were isolated from the third round: scFvs ER-3 and ER-4, which contained S57R and K65R mutations respectively (Table 3B). No variants with G57 at this position were identified. Although both scFvs incorporated mutations that were predicted by the structural analysis, no variants with mutations at position 236 were obtained.

3.3. Combinatorial mutations and evaluation of the recognition of the new scFvs by SPR

A new set of scFv variants, which contained a combination of mutations that were present in the scFvs isolated from directed evolution and semi rational approaches were constructed. These variants and the ones that were already selected by maturation processes (Table 3B) were expressed, purified and evaluated to compare their binding capacity to C_{ss}2 toxin by means of SPR. One of these variants named scFv ER-5 with the combination of R57,

R65, N110 and G208 (Table 3B and Fig. 2) showed a suitable binding capacity to C_{ss}2 toxin, with an affinity constant (K_D) of 10 nM (Table 4). Furthermore, C_{ss}4 toxin which is another component in *C. suffusus* venom (S Cestèle et al., 1998; Espino-Solis et al., 2011) was bound by scFv ER-5 with an affinity of 2.3 nM. It is worth mentioning that the (K_D) of scFv ER-5 for the C_{ss}4 toxin was higher than the corresponding value for the C_{ss}2 toxin. The difference in these affinities is explained by the fact that the association rate constant (k_{on}) for C_{ss}4 is slightly higher than that for C_{ss}2, while the dissociation rate constant (k_{off}) is similar for both toxins (Table 4).

Characteristically, variants derived from scFv C1 exhibited high cross reactivity against various toxins. scFv ER-5 besides recognizing C_{ss}2 and C_{ss}4 toxins, exhibited an improved binding to Cn2 and CII1 toxins (Table 4). scFv ER-1 which showed the best affinity against CII2 and Ct1a toxins also maintained an equally good binding to Cn2 and CII1 toxins (Table 4). Complementarily, scFv ER-6 that contains only three changes with respect to scFv RU1, increased its affinity (K_D) to the Cn2 toxin 5-fold (Table 4).

The combination of aforementioned mutations, improved the binding of this scFv with those toxins as a consequence of a slower dissociation rate (k_{off}) during the molecular interactions. This slower dissociation rate is reflected as an increase in the interaction time (T_R ; time of residence, see Material and Methods section) (Table 4).

3.4. Neutralization tests against the C_{ss}2 toxin

The ability of scFv ER-5 to neutralize C_{ss}2 toxin was evaluated in CD1 mice by intraperitoneal injections. scFv ER-5 was mixed with 1 or 2 LD₅₀ of toxin in different molar ratios. The results of these tests are shown in Table 5. As it can be seen, with a molar ratio of 1:10, scFv ER-5 was able to neutralize both LD₅₀ of the C_{ss}2 toxin without observable envenoming symptoms. Similar effects were observed when lower molar ratios, such as 1:5 (toxin:scFv) were injected, indicating an acceptable neutralizing capacity of scFv ER-5. Neutralization potency was contrasted when 1 LD₅₀ was injected into control group where only 2 out of 10 mice survived. These results indicated that the toxicity of the C_{ss}2 toxin had been underestimated. Furthermore, the neutralizing capacity of ER-5 could be also valued when 2 LD₅₀ were injected. No survivors left in the control group while all the mice in the experimental one were protected from envenoming even using a molar ratio of 1:5. It is noteworthy that the amount of C_{ss}2 toxin present in 2LD₅₀ used in this assay (1.5 µg), is equivalent to that contained in 6LD₅₀ of whole venom (Estrada et al., 2007 and Table 2), given an abundance of 2.8% (Martin et al., 1987).

3.5. Neutralization tests against Cn2 and CII1 toxins

The ability of the scFvs ER-1, ER-5 and ER-6 to neutralize Cn2 and CII1 toxins was determined in *in vivo* experiments (Table 6). All of the tested scFvs exhibited a good neutralizing capacity against

Table 4
Determination by SPR of the affinity of several variants from the C1 family for the different toxins.

scFv	Determination of the kinetic constants			T_R (min)
	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	
C_{ss}2 toxin				
ER-5 ^a	$1.2 \times 10^5 \pm 0.2$	$1.2 \times 10^{-3} \pm 0.05$	$1 \times 10^{-8} \pm 0.008$	14
C_{ss}4 toxin				
ER-5	4.8×10^5	1.1×10^{-3}	2.3×10^{-9}	15
Cn2 toxin				
RU1	6.8×10^4	4.0×10^{-4}	5.9×10^{-9}	42
ER-1	2.1×10^5	2.1×10^{-4}	1.0×10^{-9}	79
ER-5 ^b	$2.1 \times 10^5 \pm 0.7$	$2.7 \times 10^{-4} \pm 0.3$	$1.2 \times 10^{-9} \pm 0.5$	62
ER-6 ^b	$1.5 \times 10^5 \pm 0.3$	$1.7 \times 10^{-4} \pm 0.4$	$1.1 \times 10^{-9} \pm 0.4$	98
CII1 toxin				
RU1	13.2×10^4	9.2×10^{-4}	6.8×10^{-9}	18
ER-1 ^b	$3.8 \times 10^5 \pm 1$	$5.0 \times 10^{-4} \pm 0.7$	$1.3 \times 10^{-9} \pm 0.3$	33
ER-5 ^b	$2.2 \times 10^5 \pm 0.7$	$4.7 \times 10^{-4} \pm 1$	$2.1 \times 10^{-9} \pm 0.5$	35
ER-6	1.5×10^5	8.8×10^{-4}	2.5×10^{-9}	19
CII2 toxin				
RJI-1	3.7×10^5	2.7×10^{-3}	7.2×10^{-9}	6.2
ER-1 ^b	$4.7 \times 10^5 \pm 0.8$	$2.7 \times 10^{-3} \pm 0.3$	$5.8 \times 10^{-9} \pm 0.3$	6.2
Ct1a toxin				
RJI-1	1.9×10^5	3.2×10^{-3}	1.7×10^{-8}	5.2
ER-1 ^b	$2.7 \times 10^5 \pm 0.02$	$2.9 \times 10^{-3} \pm 0.6$	$2.9 \times 10^{-8} \pm 0.1$	5.7

Kinetic constants were determined in individual assays, with the exception of scFv ER-5.

^a n = 3.

^b n = 2. Time of residence (T_R) of the scFvs with each toxin were calculated based on the k_{off} values and are expressed in minutes.

Table 5
Ability of scFv ER-5 to neutralize C_{ss}2 toxin.

scFv	LD ₅₀	Molar ratio (toxin:scFv)	Survivors (alive/total)
ER-5	1	1:10	10/10
ER-5	1	1:5	10/10
ER-5	2	1:10	10/10
ER-5	2	1:5	10/10
Toxin alone (control)	1	1:0	2/10 ^a
Toxin alone (control)	2	1:0	0/10 ^a

^a Symptoms of envenoming were severe.

Table 6

A. Neutralizing capacity against 2 LD₅₀ of the Cn2 toxin. B. Neutralizing capacity against one LD₅₀ of the CII1 toxin.

A.			
scFv	Molar ratio (toxin:scFv) survivors (alive/total)		
	1:5	1:2	1:1
ER-5	10/10	ND	ND
ER-6	10/10	10/10	8/8 ^a
ER-1	ND	10/10	4/10 ^{b-c}
Toxin alone (Control)	1/10 ^c		
B.			
scFv	Molar ratio (toxin:scFv) Survivors (alive/total)		
	1:10	1:2	1:1
ER-5	10/10	8/8	8/8 ^a
ER-6	ND	10/10 ^a	ND
ER-1	ND	10/10	10/10 ^a
Toxin alone (Control)	5/10 ^c		

The presence and intensity of the symptoms of intoxication are categorized as follows: a; mild, b; moderate, c; severe. ND: Not determined.

these toxins. It is important to comment that although Cn2 toxin is approximately 7 times more toxic than CII1 toxin, all the generated variants were able to neutralize 2 LD₅₀ of that toxin. However, some differences in the neutralizing capacity were observed when lower molar ratios (toxin:scFv) were injected. scFv ER-6 was able to neutralize 2 LD₅₀ of Cn2 toxin even at a molar ratio 1:1. Similarly, scFvs ER-1 and ER-5 neutralized CII1 toxin at this lowest molar ratio. In both cases only mild intoxication symptoms were observed. There are few reported the scFvs or nanobodies with this neutralization potency against several scorpion toxins (Abderrazek et al., 2009; Rodríguez-Rodríguez et al., 2012).

3.6. Neutralization capacity of scFv ER-5 when challenged with whole venom of *C. suffusus*

Because ER-5 variant neutralizes C_{ss}2 toxin, its ability to neutralize the whole venom of *C. suffusus* was evaluated. The venom used in this study was obtained from animals that were recently collected and milked the same day of the experiments to guarantee the highest toxicity. Two or three LD₅₀ of venom were mixed with scFv ER-5 alone or in combination with scFv LR and pre-incubated before being administered to mice (Table 7). The scFv ER-5 alone was able to neutralize 2 LD₅₀ of *C. suffusus* venom without the appearance of envenoming symptoms. These stimulating results prompted us to challenge ER-5 variant using 3 LD₅₀ of whole venom. In this case, 9 out of 10 mice survived showing some

envenoming symptoms even when higher molar ratios of toxin:antibody (1:30) were used (Table 7). To achieve complete neutralization of the venom, a second assay was performed using a combination of variants ER-5 and LR (which binds to a second non-overlapping epitope that is present in the C_{ss}2 toxin). This mixing was capable of neutralizing 3 LD₅₀ of whole venom even with a lower molar ratio such as 1:5 of each scFv, revealing a complementary effect. Additionally, competition assays by means of SPR, confirmed that scFv ER-5 recognizes a different epitope than the one recognized by scFv LR (Fig. 4) and competes for the site recognized by scFv RU1. These results confirmed that both scFvs simultaneously bind to C_{ss}2 toxin on the already identified epitopes (Riano-Umbarila et al., 2016).

4. Discussion

In previous studies, the parental scFvs 3F and C1 were evolved using *in vitro* affinity maturation strategies to obtain a group of scFvs that were capable of neutralizing some scorpion toxins (Riaño-Umbarila et al., 2016, 2013, 2011, 2005). During these processes, we found that the scFvs, in addition to recognizing their original target (the Cn2 toxin) were able to recognize other toxins. In particular, the scFvs derived from the parental scFv C1 showed a greater cross reactivity than the scFvs derived from scFv 3F when evaluated by ELISA assays (data not shown). When applied to the improvement of C1 family of variants, directed evolution was not as straight as in the case of parental scFv 3F (Riaño-Umbarila et al., 2011, 2005) and other reported studies (Barbas et al., 1994; Boder et al., 2000; Deng et al., 1994). The C1 variants that were obtained using this process did not lead to significant improvements in their recognition to the toxins after several cycles of directed evolution. The combination of the detected changes into a single variant (scFv RU1) (Table 3A) resulted in broader recognition properties. This feature is reflected as an increase in its capacity to recognize various scorpion beta-neurotoxins. The variants derived from scFv RU1 (second offspring from C1, see Fig. 2), RJI-1, RJI-2 and RJI-3, exhibited improved binding to different toxins (Fig. 3A-B). Interestingly, the SPR analysis showed that specific residues at position 110 may influence the improved recognition towards certain toxins. The scFv RJI-1 containing T110 (Table 3A) showed better binding to the CII1, CII2 and Ct1a toxins (Fig. 3B), whereas RJI-2 containing N110 (Table 3A) exhibited improved binding to C_{ss}2 (Fig. 3A) and Cn2. This behavior is explained because the amino acid 110 is located in the V_H-CDR3, which is one of the main elements involved in antigen recognition (Sundberg, 2009; Xu and Davis, 2000).

As already mentioned after the different key mutations were combined, significant improvements in the binding properties were observed in this scFv family. We decided to perform a

Table 7

Neutralization tests using whole venom.

A. Pre-incubation			
scFv	LD ₅₀	Molar ratio (toxin C _{ss} 2:scFv)	Survivors (alive/total)
ER-5	2	1:10	10/10
ER-5	2	1:20	10/10
ER-5	3	1:30	9/10 ^{a-b}
ER-5 and LR	2	1:10* (1:20)	10/10
ER-5 and LR	3	1:10* (1:20)	10/10
ER-5 and LR	3	1:5*(1:10)	10/10
Venom alone (Control)	2	1:0	0/10 ^c
Venom alone (Control)	3	1:0	0/10 ^c

The presence and intensity of the symptoms of intoxication are categorized as follows: a; mild, b; moderate, c; severe. The molar ratios were calculated in relation to the proportion of C_{ss}2 toxin within the venom (2.8%). *These molar ratios refer to each scFv.

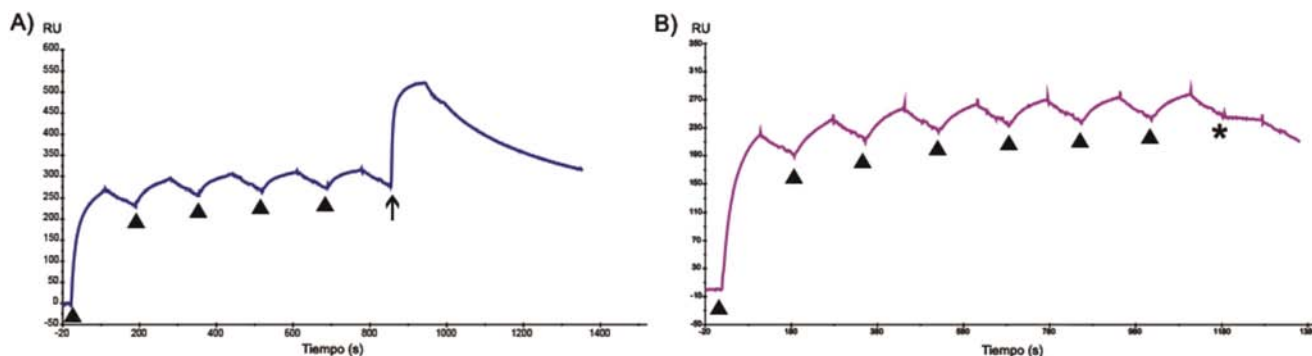


Fig. 4. Competitive binding of scFvs ER-5 and LR to Css2 toxin. Sensograms of epitope competition. A) Triangles indicate injections of scFv ER-5 (1 mM) to achieve saturation (5 injections) and the arrow indicates injection of scFv LR (0.5 mM). B) Triangles indicate injections of scFv ER-5 (1 mM) to achieve saturation (5 injections) and the asterisk indicates injection of scFv RU1 (1 mM).

structural analysis to identify the residues that could establish better interactions with their targets, particularly the interactions between RJ1-2 and the C_{ss2} toxin (Fig. 3A). As described in the results section, positions 57, 65 and 236 were mutagenized and combined to generate multiple mutants.

Two scFvs (ER-3 and ER-4) were obtained through *in vitro* maturation using the semi-rational approach (Fig. 2 and Table 3B). Both variants exhibited a good binding to the C_{ss2} toxin, but we had expected that the obtained scFvs should have shown even better affinity in accordance to successful reports where this approach was used (Barderas et al., 2008; Kiyoshi et al., 2014). Although no significant improvements were obtained, scFv ER-3 it is worth noting that this variant it was also selected during the process of directed evolution. Therefore, the mutation present in this variant (R57) might be relevant depending on the sequence context.

Furthermore, the scFv ER-1 obtained from directed evolution maturation processes contained a single change (D208G) located in (FW3-V_L) (Table 3B and Fig. 2). During exploratory assays, it exhibited improved binding capacity toward C_{ss2}, Ct1a (Fig. 3C and D) and other toxins (Cn2 and Cl1) (Table 4). To understand the contribution of this mutation to the improvement of binding, the amino acid sequence of scFv ER-1 was compared with its corresponding germline sequences available in the V-BASE2 database (Retter et al., 2005). We found that the G208 residue is highly conserved in the FW-3 of the V_L families. It is currently known that reverting mutations to the germline consensus sequences can positively influence the stability of antibodies, proteins and enzymes (Amin et al., 2004; Chromikova et al., 2015; Lehmann et al., 2000; Wirtz and Steipe, 1999).

Moreover, when scFv ER-1 was characterized, we demonstrated that this scFv exhibited a broadened binding capacity towards Cl1, Cl2 and Ct1a toxins (Table 4). This is the first time that the binding of Ct1a by an antibody fragment has been evaluated and it constitutes a promising result because Ct1a is the major toxic component of *C. tecomanus* scorpion venom. We could improve the binding properties of scFv ER-1 to neutralize the whole venom of the scorpions *C. limpidus* and *C. tecomanus*.

4.1. Combining mutations

Several scFvs were generated by combining mutations that occurred during these processes of *in vitro* affinity maturation. As has been suggested, the effect of specific mutations on the functional properties of a protein can be different depending on the sequence context (interaction of a certain residue with different partners). We found that the combination of the mutations present in scFv ER-5 (Table 3B and Fig. 2) resulted in a good affinity to C_{ss2}

toxin. This scFv, with a K_D of 1×10^{-8} M (Table 4), showed the ability to neutralize 2 LD₅₀ of both C_{ss2} toxin and the whole venom of *C. suffusus* using molar ratios of 1:5 and 1:10 (toxin: scFv), respectively. No envenoming symptoms were observed up to 48 h (Tables 5 and 7). Furthermore, it was demonstrated that mixing scFvs ER-5 and LR resulted in significant levels of protection reaching complete neutralization of 3 LD₅₀ of whole venom even with a molar ratio of 1:5 (Table 7). Similar results using LR and RU1 had been reported with the venom of *C. noxius* (Riaño-Umbarila et al., 2016). In summary, the neutralization of the main toxins with two antibodies that bind to two different epitopes (Fig. 4) would guarantee the complete neutralization of the venoms. Based on these results, we believe that scFv ER-5 is a candidate that could be part of a recombinant antivenom of human origin against stings from venomous Mexican scorpions. Furthermore, scFv ER-5 exhibited a good neutralizing capacity against Cl1 and Cn2 toxins (Table 6). Nevertheless, we will continue generating optimized scFvs with a broader binding and neutralizing properties.

Another variant generated in this work was scFv ER-6 (Table 3B and Fig. 2), which proved to be a variant with a good neutralizing capacity against Cn2 and Cl1 toxins. Its affinity parameters allowed us to observe that differences in K_D constants were minimal (Table 4). In terms of the variability among dissociation constants (k_{off}), we have noticed that for a determined toxin, scFvs with higher retention times ($T_R = 1/k_{off}$) showed a better neutralizing capacity (Riaño-Umbarila et al., 2016). Variants ER-1 and ER-5 with T_R s of approximately 30 min, neutralized Cl1 toxin at molar ratios as low as 1:1 (Table 6) reaching 100% survival rates among challenged mice. Furthermore, scFv ER-6 which showed T_R s of approximately 90 min protected mice against the most potent toxin (Cn2) at a molar ratio 1:1. These results indicate that longer times of residence are necessary to neutralize more potent toxins. Similar inferences can be raised for variants obtained from scFv 3F which bind to the other epitope (Riaño-Umbarila et al., 2016, 2011; Rodríguez-Rodríguez et al., 2012). However, lower binding strengths (higher K_D values) are necessary to neutralize the epitope recognized by scFv RU1 variants when compared to LR variants.

The analyses indicate that the selected mutations and their combination resulted in an improvement of the inhibitor antibodies because they are now able to recognize not only Cn2, Cl1 and C_{ss2} toxins but also Ct1a and Cl2 toxins. This is worth noting since these mutant scFvs are the product of maturation processes (directed evolution and semi-rational approaches) that were only conducted against C_{ss2} toxin. The variants exhibits a broader specificity, which allows them to recognize several toxins from the venom of scorpions of the genus *Centruroides* with similar efficiency (Table 4). Although this property could be explained by the

high sequence identity shared among scorpion toxins, contrasts with the fine specificity of the toxins on different sodium channel subtypes (Schiavon et al., 2006).

Binary models were constructed with different toxins to understand how a few mutations increased the cross reactivity of this family of scFvs (see materials and methods). The analyses were focused on the toxin area that was recognized by scFv RU1, which involved 14 amino acid residues of Cn2 toxin (indicated by triangles in Fig. 1). Among the various toxins present in the venoms of *Centruroides* scorpions, many of these residues are conserved or in some cases are similar. The analyses of the electrostatic potential of the toxins confirmed their similarity in the distribution of negative and positive potentials compared to Cn2 toxin (see Fig. 5A and B). Consequently, due to the high identity among toxin sequences, the high cross reactivity of scFv ER-1 is explained by the complementarity of the positive and negative potentials of the respective areas on the CDRs V_H 2 and 3 (Fig. 5A and B). It was observed that the mutations that were incorporated into scFvs that exhibited improved binding to different scorpion toxins corresponded to positions 57 (S or R) and 110 (N or T) (Table 3A). These mutations are located at the CDR2-V_H and CDR3-V_H respectively, and did not modify the positive and negative electrostatic potentials (see Fig. 5A and B). We evaluated the binding of scFv ER-1 (S57, T110, I164 and G208) to the Cn2, C_{ss}2, C_{II}1, C_{II}2 and C_t1a toxins using *in silico* structural models of the binary complexes. In particular, the N57S mutation resulted in a decrease of the size of the

corresponding side chain which favored an adequate fitting of the CDR2-V_H region with each of the different toxins, giving rise to a more suitable surface complementarity. Similar effects were observed within the crystal structure of scFv RU1-Cn2 at positions 54 and 56, where the presence of the smallest side chains corresponding to Gly residues, might confer some flexibility to this protein area in scFvs which would propitiate a better binding to different toxins (Riaño-Umbarila et al., 2016). In that structural model, residue H110 forms a hydrogen bond with the oxygen of the carbonyl carbon of residue D108, likely favoring the stabilization of the CDR3-V_H which harbors these residues. Furthermore, we observed that the presence of T at position 110 increases the distance between these two residues. In scFv RU1, distance is 2.95 Å, whereas in scFv ER-1 it is 3.65 Å (Fig. 5B and C) indicating a loss of interaction between residues 110 and 108. The lack of this contact, might favor the flexibility associated to CDR3-V_H resulting in a broadening of the capacity of binding to various toxins. This flexibility would maintain the cross reactivity without losing affinity strength for the different toxins (Table 4). This property of the variants here reported, might represent a nice example of the induced fit phenomenon, which has been shown to be closely related to the flexibility of CDR3-V_H (Bosshard, 2001; Rini et al., 1992; Stanfield et al., 2007). However, it is necessary to determine the three dimensional structure of the scFv alone and in complex with toxins to confirm this hypothesis. We must also explore different changes at positions 57 and 110 to diminish the

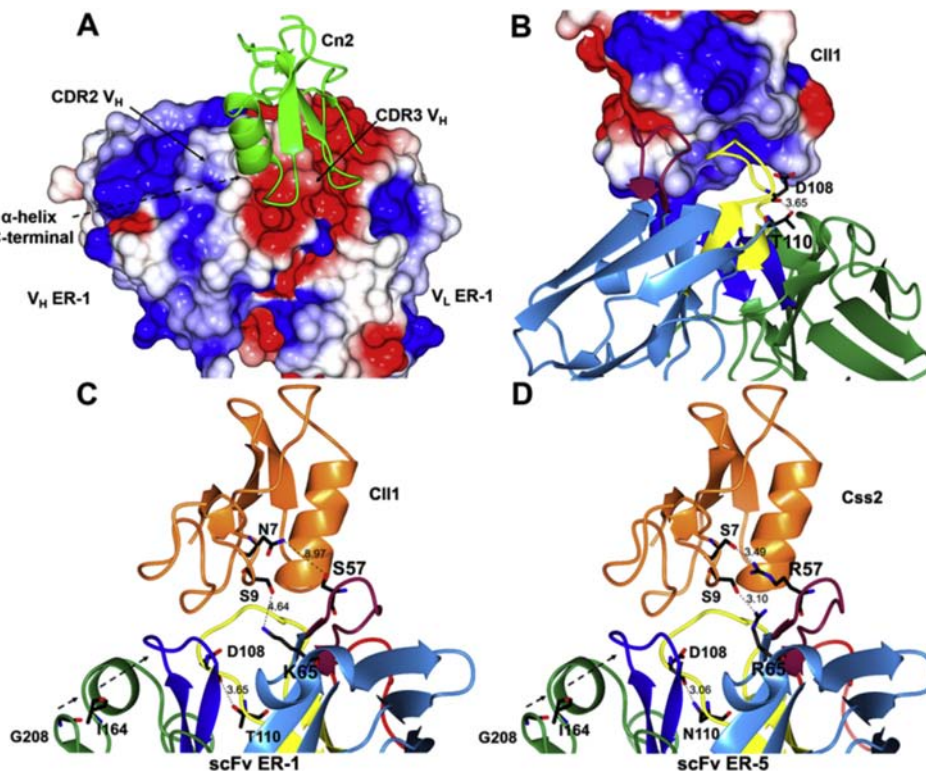


Fig. 5. Models of the binary scFv-toxin complexes. A) Model of scFv ER-1-Cn2 complex. ER-1 is colored according to the electrostatic potential. Negatively and positively charged surfaces are colored red and blue, respectively, while neutral surface is colored white. Note that positively charged CDR2-V_H and negatively charged CDR3-V_H interact with the α-helix in the C-terminal region of Cn2 toxin (green). B) Model of scFv ER-1-CII1 complex. CII1 toxin is colored according to the electrostatic potential, while scFv ER-1 V_H is colored light blue and the ER-1 V_L is shown in green. Notice that the long CDR3-V_H (yellow) and CDR2-V_H (dark purple) interact with regions of complementary charge in CII1 toxin. The distance between T110 and the carbonyl oxygen group of residue D108 is indicated (3.65). C) Representation of the interactions between scFv ER-1 (same color codes as in panel B) and CII1 toxin (orange). Distances among residues S 57 and K65 of scFv ER-1 with the respective amino acids at positions N7 and S9 of CII1 toxin are indicated, to be compared with the same positions of scFv ER-5 and C_{ss}2 toxin shown in panel D. D) Model of scFv ER-5-C_{ss}2 complex. Notice that compared to panel C, the distance between residue N110 and carbonyl oxygen group of residue D108 is lower (3.06). Additionally, in contrast with (C), due to proper distances between residues R65 of FW3 and R57 of CDR2 of V_H with residues S7 and S9 of the C_{ss}2 toxin, corresponding hydrogen bonds are formed. Location of mutations G208 and I164 are also shown. Details regarding this figure are described in the text. Distances are indicated in Angstroms (Å).

supposed “stiffness” at CDR2-V_H and CDR3-V_H, thus generating more flexible loops hopefully increasing scFv cross reactivity.

Conversely, when scFvs contain residue N110, the distance between this amino acid and the oxygen in the carbonyl group of residue D108 is reduced to 3.06 Å (Fig. 5D) approaching the value observed in scFv RU1 (2.95 Å). These observations suggest that CDR3-V_H might be stabilized through N 110, which in turn would be determining a decrease in the flexibility and consequently narrowing the cross reactivity potential of the variants that contain this change. This would explain why scFvs ER-5 and ER-6 preferentially neutralize Cn2 and Css2 toxins, which share a greater similarity ($\approx 90\%$) and therefore a greater complementarity with the corresponding surfaces on these scFVs.

In the model in which scFv ER-5 binds to Css2, we observed that the side chains of residues R57 and R65 are longer than N57 and K65, favoring the formation of hydrogen bonds with toxin residues S7 and S9, respectively (Fig. 5C and D). These new interactions might have been influential to reach an adequate retention time which was sufficient to neutralize Css2 toxin (Tables 4 and 5).

Other potentially important changes identified were S164I and D208G. The models did not help to address a logical interpretation of these results because these residues do not interact with the toxins (Fig. 5C and D). However, the experimental results in terms of affinity and neutralizing capacity, showed that these changes play an important role in improving the binding of scFv ER-1 with the toxins compared with scFv RJI-1 which does not contain D208G mutation and exhibited a lower association rate (Table 4). These observations show that mutation D208G despite being located outside the contact areas with the toxin, it might be beneficial indirectly reflected as an increase in the association rate during the kinetics of scFv-toxin interaction.

We speculate that D208G mutation, which reverted to a germline residue and considering its side chain minimal size from the structural point of view, it would increase the flexibility of the loop that connects two β strands including the loop that contains the S164I mutation (Fig. 5C and D, dashed arrow). In summary, this mutation would be associated to a stabilizing effect on the binding conformation of scFvs, reflected as an increase of association rate. Considering these speculations, it would be necessary to evaluate the effects on the optimization of a binding conformation by incorporating some Gly residues to determine if the supposed increase of flexibility in this area, results in a broader cross reactivity.

5. Conclusion

The results reported here represent an advance in the generation of antivenoms with less complexity and higher cross reactivity against the toxins of primary medical importance and their corresponding venoms from Mexican venomous scorpions. We focused on the most abundant and toxic (lethal) components of the venoms in accordance with the criteria recently suggested to consider a toxin as medically relevant (Laustsen et al., 2015) These new scFvs have the ability to neutralize several toxins by incorporating only a few changes at the key positions identified in this work. Although we know that a single antibody fragment can neutralize the effects of some venoms (*C. noxius* and *C. suffusus*), we have demonstrated that two neutralizing antibodies that recognize different epitopes on the toxins can neutralize toxic effects more efficiently and safely when they are combined (this work and Riaño-Umbarila et al., 2016). We believe that the generation of new scFvs derived from members of the family of toxin inhibitors here reported will allow to neutralize a greater number of toxins and scorpion venoms. When added to the already developed scFvs, the mix will constitute a polyvalent antivenom that might replace the current equine product.

Ethical statement

The authors of this manuscript declare that they all have followed the ethical requirements for this communication. The experiments in which animals alive were used and reported in this manuscript were approved by Ethical Committee of our Institute of Biotechnology from the National Autonomous University of Mexico.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Acknowledgments

This work was supported by grants CB 2010-155099-Q from CONACYT and DGAPA IN-201913 to BB and Atención a Problemas Nacionales CONACYT 246924 to BB. The CONACYT scholarship (207221) to ERRR is acknowledged. We thank Dr. Humberto Flores for critically reading the manuscript and BSc. Selene Uribe for preliminary characterizations of scFv RJI-1 against Ct1a toxin. We also thank the animal facility services of Biotherium from the Instituto de Biología-UNAM, Dr. Paul Gaytán, Dr. Fernando Zamudio and Cipriano Balderas for providing technical assistance in various aspects of this study.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.011>.

References

- Abderrazek, R. Ben, Hmila, I., Vincke, C., Benlasfar, Z., Pellis, M., Dabbek, H., Saerens, D., El Ayeub, M., Muyltermans, S., Bouhaouala-Zahar, B., 2009. Identification of potent nanobodies to neutralize the most poisonous polypeptide from scorpion venom. *Biochem. J.* 424, 263–272. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20090697>.
- Alagón, A.C., Guzmán, H.S., Martín, B.M., Ramírez, A.N., Carbone, E., Possani, L.D., 1988. Isolation and characterization of two toxins from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus* Karsch. *Comp. Biochem. Physiol. B* 89, 153–161.
- Alvarenga, L.M., Zahid, M., di Tommaso, A., Juste, M.O., Aubrey, N., Billiald, P., Muzard, J., 2014. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. *Toxins (Basel)* 6, 2541–2567. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6082541>.
- Amin, N., Liu, A.D., Ramer, S., Aehle, W., Meijer, D., Metin, M., Wong, S., Gualfetti, P., Schellenberger, V., 2004. Construction of stabilized proteins by combinatorial consensus mutagenesis. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 787–793. <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzh091>.
- Bahraoui, E., Pichon, J., Muller, J.M., Darbon, H., Elayeb, M., Granier, C., Marvaldi, J., Rochat, H., 1988. Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. *J. Immunol.* 141, 214–220.
- Barbas, C.F., Hu, D., Dunlop, N., Sawyer, L., Cababa, D., Hendry, R.M., Nara, P.L., Burton, D.R., 1994. In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3809–3813.
- Barderas, R., Desmet, J., Timmerman, P., Meloen, R., Casal, J.I., 2008. Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9029–9034. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0801221105>.
- Boder, E.T., Midelfort, K.S., Wittrup, K.D., 2000. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10701–10705. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.170297297>.
- Bosshard, H.R., 2001. Molecular recognition by induced fit: how fit is the concept? *News Physiol. Sci.* 16, 171–173.
- Cadwell, R.C., Joyce, G.F., 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 2, 28–33.
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J.C., Rochat, H., Scheuer, T., Catterall, W.A., 1998. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by β -scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* 21, 919–931. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80606-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80606-6).
- Chippaux, J.-P., 2012. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Des. Devel. Ther.* 6, 165–173. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S24754>.
- Chromikova, V., Mader, A., Hofbauer, S., Göbl, C., Madl, T., Gach, J.S., Bauernfried, S., Furtmüller, P.G., Forthall, D.N., Mach, L., Obinger, C., Kunert, R., 2015. Introduction of germline residues improves the stability of anti-HIV mAb 2G12-IgM.

- Biochim. Biophys. Acta. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.02.018>.
- Clot-Faybessé, O., Juin, M., Rochat, H., Devaux, C., 1999. Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis* hector scorpion neurotoxin I: characterisation and use for venom neutralisation. *FEBS Lett.* 458, 313–318. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01179-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01179-5).
- de la Vega, R.C.R., Vidal, N., Possani, L.D., 2013. Handbook of Biologically Active Peptides, Handbook of Biologically Active Peptides. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00059-2>.
- Dehesa-Dávila, M., Possani, L.D., 1994. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon* 32, 1015–1018. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90383-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(94)90383-2).
- Deng, S.J., MacKenzie, C.R., Sadowska, J., Michniewicz, J., Young, N.M., Bundle, D.R., Narang, S.A., 1994. Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. *J. Biol. Chem.* 269, 9533–9538.
- Emley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 486–501. <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
- Espino-Solis, G.P., Estrada, G., Olamendi-Portugal, T., Villegas, E., Zamudio, F., Cestele, S., Possani, L.D., Corzo, G., 2011. Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Toxicon* 57, 739–746. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.006>.
- Estrada, G., Garcia, B.I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., Possani, L.D., Corzo, G., 2007. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CsslI: heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 1161–1168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.04.006>.
- Hmila, I., Saerens, D., Ben Abderrazek, R., Vincke, C., Abidi, N., Benlasfar, Z., Govaert, J., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B., Muyllethmans, S., 2010. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J.* 24, 3479–3489. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-148213>.
- Kiyoshi, M., Caaveiro, J.M.M., Miura, E., Nagatoishi, S., Nakakido, M., Soga, S., Shirai, H., Kawabata, S., Tsumoto, K., 2014. Affinity improvement of a therapeutic antibody by structure-based computational design: generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody-antigen complex. *PLoS One* 9, e87099. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087099>.
- Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., Karplus, K., 2009. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* <http://dx.doi.org/10.1002/prot.22570>.
- Laustsen, A.H., Lohse, B., Lomonte, B., Engmark, M., Gutiérrez, J.M., 2015. Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a toxicity score. *Toxicon.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.07.334>.
- Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S.F., Wyss, M., 2000. The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1543, 408–415. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00238-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00238-7).
- Leung, D.W., Chen, E., Goeddel, D.V., 1989. A Method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1, 11–15.
- Martin, M.F., Garcia y Perez, L.G., El Ayeb, M., Kopeyan, C., Bechis, G., Jover, E., Rochat, H., 1987. Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *J. Biol. Chem.* 262, 4452–4459. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90289-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(85)90289-2).
- McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K.S., Noble, M.E.M., 2011. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 67, 386–394. <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444911007281>.
- Olamendi-Portugal, T., Somodi, S., Fernández, J.A., Zamudio, F.Z., Becerril, B., Varga, Z., Panyi, G., Gáspár, R., Possani, L.D., 2005. Novel α -KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells. *Toxicon* 46, 418–429. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.001>.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem.* 264 (2), 287–300.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J., Svendsen, I., 1981. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Carlsb. Res. Commun.* 46, 195–205. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02906497>.
- Ramírez, A.N., Martin, B.M., Gurrola, G.B., Possani, L.D., 1994. Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon* 32, 479–490.
- Retter, I., Althaus, H.H., Münch, R., Müller, W., 2005. VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res.* 33, D671–D674. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki088>.
- Riño-Umbarila, L., Contreras-Ferrat, G., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Corzo, G., Possani, L.D., Becerril, B., 2011. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *J. Biol. Chem.* 286, 6143–6151. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.189175>.
- Riño-Umbarila, L., Juárez-González, V.R., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-León, M., Possani, L.D., Becerril, B., 2005. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.* 272, 2591–2601. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04687.x>.
- Riño-Umbarila, L., Ledezma-Candanoza, L.M., Serrano-Posada, H., Fernández-Taboada, G., Olamendi-Portugal, T., Rojas-Trejo, S., Gómez-Ramírez, I.V., Rudiño-Pinera, E., Possani, L.D., Becerril, B., 2016. Optimal neutralization of *centruroides noxius* venom is understood through a structural complex between two antibody fragments and the Cn2 Toxin. *J. Biol. Chem.* 291, 1619–1630. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.685297>.
- Riño-Umbarila, L., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Gurrola, G.B., Possani, L.D., Becerril, B., 2013. A novel human recombinant antibody fragment capable of neutralizing Mexican scorpion toxins. *Toxicon* 76, 370–376. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.016>.
- Rini, J., Schulze-Gahmen, U., Wilson, I., 1992. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* 255, 959–965. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1546293>, 80.
- Rodríguez De La Vega, R.C., Possani, L.D., 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon.*
- Rodríguez-Rodríguez, E.R., Ledezma-Candanoza, L.M., Contreras-Ferrat, L.G., Olamendi-Portugal, T., Possani, L.D., Becerril, B., Riño-Umbarila, L., 2012. A single mutation in framework 2 of the heavy variable domain improves the properties of a diabody and a related single-chain antibody. *J. Mol. Biol.* 423, 337–350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.007>.
- Rodríguez-Rodríguez, E.-R., Riño-Umbarila, L., Possani-Lourival, D., Becerril, B., 2015. Recombinant neutralizing antibodies, a new generation of antivenoms. In: Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., Schwartz, F., Rodríguez de la Vega, E.R. (Eds.), *Toxicology. Scorpion Venoms*. Springer Reference, p. 575.
- Saucedo, A.L., Del Rio-Portilla, F., Picco, C., Estrada, G., Prestipino, G., Possani, L.D., Delepierre, M., Corzo, G., 2012. Solution structure of native and recombinant expressed toxin CsslI from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 Sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta Proteomics Proteomics* 1824, 478–487. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.01.003>.
- Schiavon, E., Sacco, T., Cassulini, R.R., Gurrola, G., Tempia, F., Possani, L.D., Wanke, E., 2006. Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons. *J. Biol. Chem.* 281, 20326–20337. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M600565200>.
- Stanfield, R.L., Dooley, H., Verdino, P., Flajnik, M.F., Wilson, I.A., 2007. Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *J. Mol. Biol.* 367, 358–372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.045>.
- Sundberg, E.J., 2009. Structural basis of antibody-antigen interactions. *Methods Mol. Biol.* 524, 23–36. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-450-6_2.
- Wirtz, P., Steipe, B., 1999. Intrabody construction and expression III: engineering hyperstable V(H) domains. *Protein Sci.* 8, 2245–2250. <http://dx.doi.org/10.1110/ps.8.11.2245>.
- Xu, J.L., Davis, M.M., 2000. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13, 37–45. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00066-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00066-6).
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B.M., Gurrola-Briones, G., Hérlion, P., Possani, L.D., 1992. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* 204, 281–292.