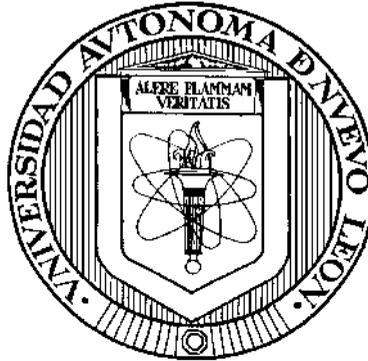


# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

## FACULTAD DE MEDICINA



**“GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO BI-ESPECÍFICO ANTI-CD19 Y CD16  
MEDIADOR DE CITOTÓXICIDAD TUMORAL CD16 DEPENDIENTE”**

**Por**

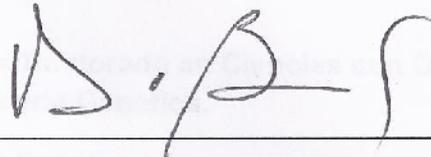
**Oscar Raúl Fajardo Ramírez**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

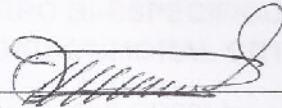
**JULIO, 2014**

**Generación de un anticuerpo bi-específico anti-CD19 y CD16 mediador de citotoxicidad tumoral CD16 dependiente**

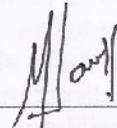
Aprobación de tesis.



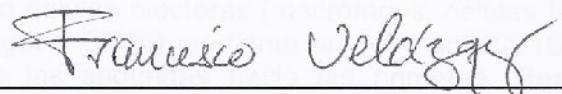
Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña  
Director de Tesis



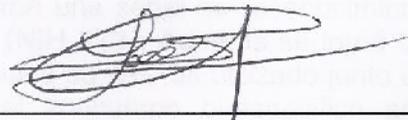
Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez  
Co- Director de Tesis



Dr. med. Mario Alberto Garza Elizondo  
Comisión de Tesis



Dr. C. Juan Francisco Velázquez Vadillo  
Comisión de Tesis



Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez  
Comisión de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## RESUMEN

Oscar Raúl Fajardo Ramírez

Fecha de Graduación: Julio, 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Área de Estudio: Ingeniería Genética

Título del Estudio:

### **GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO BI-ESPECÍFICO ANTI-CD19 Y CD16 MEDIADOR DE CITOTÓXICIDAD TUMORAL CD16 DEPENDIENTE.**

**Introducción.** Aun cuando el Rituximab (Anti-CD20) ha mejorado las perspectivas de vida de los pacientes con linfoma u otros padecimientos en los que hay afectación de las células B (CD20 positivas), un porcentaje de estos pacientes no responden a esta terapia, lo que justifica la investigación y el desarrollo de otros formatos y/o modificaciones de la estrategia actual, que logren superar las limitantes del mecanismo que impide la efectividad de esta terapia. **Objetivo.** Este estudio busca la transformación estructural de los anticuerpos convencionales para el tratamiento del cáncer. Se modificará el formato de manera que el anticuerpo pueda unirse por un extremo a una célula diana (célula expresando el antígeno de interés, en este caso el antígeno CD19) mediante un vNAR aislado de un tiburón inmunizado con dicha proteína, y a la vez por el otro extremo lo haga de manera efectiva a células efectoras (macrófagos, células NK, neutrófilos, etc., en este caso el antígeno CD16) mediante un scFv anti-CD16 para re-direccionar la lisis mediada de las segundas hacia las primeras. **Resultados.** Se logró el aislamiento de 10 clonas con la estructura canónica de los vNARs, de las cuales 4 mostraron cierto nivel de reconocimiento por células de una línea celular de linfoma difuso de células grandes B (SUDHL-4); desafortunadamente estas mismas clonas presentaron una señal de reconocimiento sobre una línea celular de fibroblastos de ratón (NIH 3T3). Además se logró la caracterización funcional del scFv anti-CD16, el cual a su vez fue utilizado junto con una de las secuencias aisladas para generar el anticuerpo bi-específico anti-CD19/anti-CD16. Dicha molécula de doble afinidad fue analizada para su capacidad de re-direccionar la

lisis celular mediada por linfocitos CD16 hacia células tumorales CD19, en donde no se logró encontrar la respuesta esperada, posiblemente por la falta de reconocimiento específico por los linfocitos CD19.

---

Director de tesis  
Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña

El presente trabajo titulado “Generación de un anticuerpo bi-específico anti-CD19 y CD16 mediador de citotoxicidad tumoral CD16 dependiente” fue realizado por en M.C. Oscar Raúl Fajardo Ramírez en tres diferentes centros de investigación. El laboratorio de Genómica y Bioinformática del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de la División de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, en Ensenada, Baja California. El laboratorio de Investigación Básica del Centro de Innovación y Transferencia en Salud de la Escuela de Medicina del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

## **Dedicatoria**

*A mis padres, por todo el apoyo incondicional que me han brindado desde que tengo uso de razón, por todos los consejos que me han ofrecido y por todas llamadas de atención cuando debía. Por permitirme vivir una vida feliz y esperarme con todo el cariño cada periodo vacacional, esto es por y para ustedes.*

*A mis hermanos por venir a darme un hogar estando lejos de mis padres.*

*A ti que con lo que te sobra me darías la luz para encender los días.*

## Agradecimientos

*A Dios porque aunque no me dio la oportunidad de escoger en que familia nacer, escogió la mejor opción, y por todas las pruebas que ha puesto en mi camino, porque todas me ha llevado a culminar esta etapa más en mi vida.*

*A mi profesor, el Dr. Hugo Barrera por todos y cada uno de los consejos que me brindó durante la realización de este proyecto; gracias por toda la motivación para salir adelante y por permitirme trabajar bajo su dirección, mi admiración y respeto.*

*A los Drs. Jorge Ascacio, Lourdes Garza, Francisco Velázquez y Mario Garza; gracias por aceptar ser parte mi comisión de tesis y por todos los consejos que recibí de su parte. Muchas gracias por su valiosa asesoría.*

*A la Dra. Rocío Ortiz y al Dr. Augusto Rojas, por permitirme acercarme a la ciencia, y por tratarme como uno más de sus alumnos sin pertenecer a su grupo.*

*A todos los profesores del departamento de bioquímica por todos los debates enriquecedores en cada uno de los seminarios de los jueves. Se aprende más en ellos que leyendo 100 artículos.*

*Al Dr. Alexei Licea, gracias por aceptarme en su laboratorio para realizar la etapa más importante del proyecto, gracias por las asesorías y gracias por permitirme conocer la hermosa ciudad de Ensenada.*

*Al Dr. Luis Villela, por darme todas las facilidades para realizar mi doctorado, en verdad muchas gracias por todos los permisos y los consejos que me brindó tanto académica y laboralmente.*

*A mi amigo, que digo mi amigo, mi herrrrrrmano del alma! Al Dr Iván Marino por toda la ayuda técnica que me brindó en la realización de mi tesis.*

*A la Dra. Mary Rocha, gracia por todo el apoyo que me brindó en la tesis, gracias por los reactivos que me regaló para poder completar los experimentos de cada una de las etapas.*

*Al Dr. Ali Perez Maya, gracias por las platicas en el laboratorio y por los consejos para poder realizar mi tesis y para lidiar con el Dr Barrera.*

*A todos mis compañeros y amigos de la ULIEG, por las platicas en los pasillos, los juegos de futbol, y todo el tiempo que convivimos en esta etapa de nuestras vidas.*

*Un agradecimiento mega-especial a Juanny, Ariadna, Lulu, Daniela, Irasema y Ruth, por todo el apoyo que está detrás de la experimentación, el apoyo administrativo; gracias por todo el café preparado sin más deseos que el despertarnos por las mañanas. Gracias por la organización de posadas, de pasteles de cumpleaños, de examencitos, etc. mucha muchas gracias.*

*A mi gente de Ensenada, Felix, Tanya, Pavel, Deivid, Jenny, Jairo, Robert; muchas gracias por todo el apoyo en las estancias en Ensenada, gracias por devolverme la vista, gracias por enseñarme el Valle de Guadalupe y por todas las platicas sobre cine y ciencia. Muchas gracias.*

*A la Q. Isabel García, gracias Isa por todo el apoyo en cuanto a reactivos, equipo y espacio que me brindaste para la realización de esta tesis, muchas gracias Isa.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1.	Incidencia a nivel mundial del linfoma No-Hodgkin para ambos sexos y todas las edades por cada 100,000 habitantes	5
2	Mecanismos de acción del rituximab	7
3	Diversidad actual en los formatos de anticuerpos	10
4	Estructura base de un anticuerpo bi-específico	11
5	Estructura de un anticuerpo convencional y un anticuerpo de cadena sencilla	15
6	Blancos terapéuticos para linfoma	16
7	Etapas del desarrollo de los linfocitos B	18
8	Etapas del despliegue de fagos	21
9	Resumen grafico de la estrategia a seguir	26
10	Respuesta del tiburón hacia el antígeno	44
11	Aislamiento de vNARs	45
12	Título de la biblioteca	47
13	Tamizaje de colonias previo al despliegue de fagos	48
14	Tamizaje de colonias posterior al despliegue de fagos	50

15	ADN plasmídico aislado de colonias vNAR positivas	50
16	Secuencias aminoacídicas de vNARs	51
17	Inducción de vNARs y scFv	53
18	Rastreo por ELISA de vNARs recombinantes	54
19	Purificación de los extractos periplasmicos	54
20	Caracterización inmunofenotípica de PBMCs	55
21	Caracterización funcional del scFv anti-CD16	57
22	Caracterización funcional de los vNARs aislados	58-59
23	Reconocimiento sobre la línea celular NIH 3T3	60
24	Reconocimiento de vNARs sobre PBMCs	62
25	Etapas de la generación del ac. bi-específico	63
26	Inducción de las clonas con insertos de scFv-vNAR13L	64
27	Ensayo de lisis celular	65

## LISTA DE CUADROS

<b>Número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Protocolo de inmunización	31
2	Títulos de entrada y de salida durante las cuatro rondas del “panning”	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
Min	Minutos
Kg	Kilogramo
mM	Milimolar
LH	Linfoma de Hodgkin
LDCGB	Linfoma difuso de células grandes B
EDTA	Acido diaminotetracético
PBS	Buffer salino de fosfatos
IFN-γ	Interferón gamma
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
EGFR	Receptor de factor de crecimiento endotelial
FDA	Administación de alimentos y fármacos
kDa	Kilodaltones
BSA	Suero bovino fetal
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
PE	Ficoeritrina
HRP	Peroxidasa de rábano picante

DEPC	Dietilpirocarbonato
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
mL	Mililitros
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
Nli-NTA	Niquel-acido nitrilotriacético
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Mg	Miligramos
G	Gravedad
TA	Temperatura ambiente
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
s	Segundos
h	Horas
SOC	Caldo súper óptimo con represión por catabolito
kV	Kilovoltios
μF	Microfaradios
Ω	Ohms
SB	Súper caldo
PEG-8000	Polietilenglicol 8000
NaCl	Cloruro de sodio
pb	Pares de bases
ufc	Unidades formadoras de colonias

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN. ....	3
1.1 Malignidades de células B. ....	3
1.2 Terapias actuales contra el LNH. ....	5
1.2.1 Esquema actual. ....	5
1.3 Limitaciones de los anticuerpos monoclonales usados actualmente contra Linfoma. 7	
1.4 Mejorando la afinidad por el FcγR y nuevas tecnologías: anticuerpos bi-específicos. ....	8
1.4.1 Anticuerpos bi-específicos. ....	9
1.4.2 Mejoramiento de la interacción antígeno blanco y el receptor FcγRIII. ....	12
1.5 Uso de Anticuerpos anti-CD3 para atraer células T. ....	13
1.6 Anticuerpos de cadena sencilla (vNARs). ....	14
1.7 Nuevos blancos contra linfomas y leucemias. ....	15
1.8 Metodologías para el desarrollo de anticuerpos. ....	18
1.8.1 Tecnología del despliegue de fagos (phage display). ....	19
2. JUSTIFICACIÓN. ....	22
3. HIPÓTESIS. ....	23
3.1 Hipótesis de investigación. ....	23
3.2 Hipótesis nula. ....	23
4. OBJETIVO GENERAL. ....	24
4.1 Objetivos particulares. ....	24
5. ESTRATEGIA GENERAL. ....	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS. ....	27
6.1 Materiales y reactivos. ....	27
6.2 Metodología. ....	29
6.2.1 Lugar de realización del estudio. ....	29
6.2.2 Inmunización de los tiburones. ....	29
6.2.3 Aislamiento de ARN. ....	31
6.2.3 Amplificación y generación de biblioteca de vNARs. ....	32
6.2.4 “Panning” de biblioteca sobre el antígeno inmovilizado. ....	35

6.2.5 Tamizaje de clonas vNAR positivas.....	37
6.2.6 Expresión de clonas con secuencias vNAR íntegras y scFv anti-CD16.....	38
6.2.7 Ensayos de funcionalidad de las vNARs expresados.....	40
6.2.8 Generación de anticuerpo bi-específico.....	41
6.2.9 Ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).....	43
7. RESULTADOS. ....	44
7.1 Inmunización de tiburones.....	44
7.2 Aislamiento de secuencias del tipo vNAR.....	44
7.3 Generación de la biblioteca de vNARs.....	45
7.4 Selección de vNARs con afinidad hacia nuestro antígeno blanco.....	48
7.5 Expresión de clonas con secuencias vNAR íntegras y scFv anti-CD16.....	52
7.6 Ensayos de reconocimiento celular. ....	55
7.7 Generación de formato bi-específico.....	62
7.8 Ensayos de lisis celular por re-direccionamiento de células CD16. ....	64
8. DISCUSIÓN. ....	66
9. CONCLUSIONES.....	71
10. BIBLIOGRAFÍA.....	72
11. ANEXOS.....	83
11.1 Alineamiento nucleotídico de secuencias obtenidas de rondas 3 y 4 del “panning”. .....	83
11. 2 Árbol filogenético de la relación de las clonas aisladas base a su secuencia aminoacídica. ....	84
11.3 Estructuras tridimensionales teóricas de las secuencias aisladas. ....	85
11.4 Alineamiento de las secuencia de iniciadores “Forward” y “Reverse” con secuencia de referencia 13L.....	86
11.5 Genomas del vector fagémido pComb3X y del fago helper M13K07. ....	87

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Malignidades de células B.

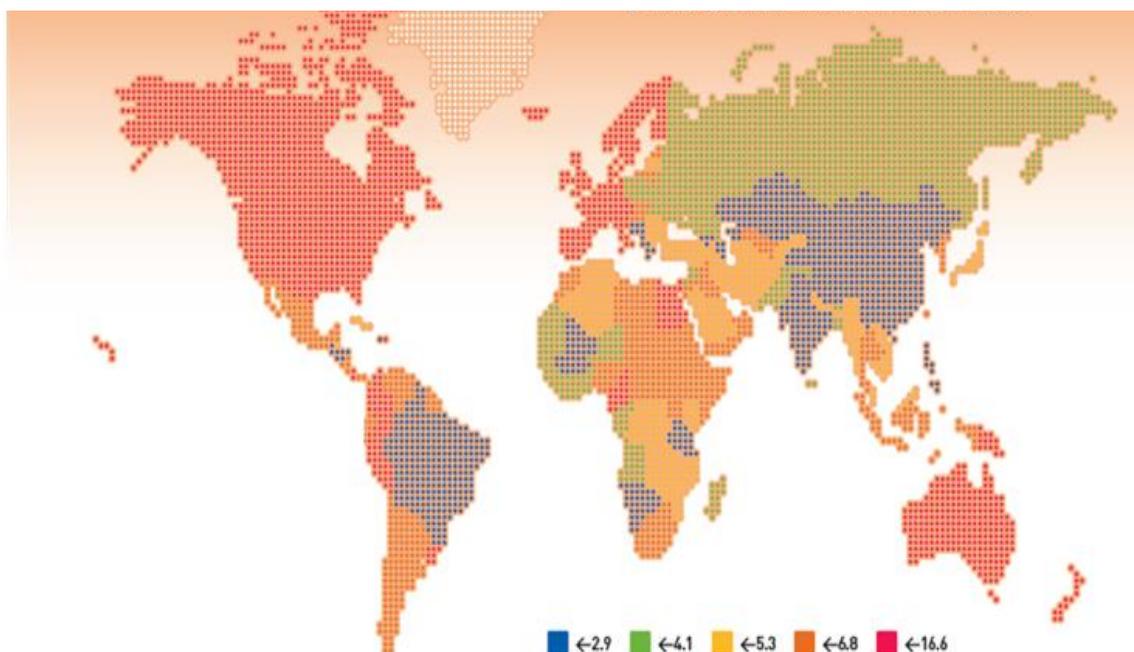
Las leucemias y los linfomas pertenecen a un grupo de enfermedades heterogéneas en las que eventos oncogénicos rompen o alteran vías moleculares que regulan la apoptosis, la proliferación y/o la diferenciación de las células B o T. Dentro de las malignidades en las que hay una alteración de las células B, se encuentran los siguientes padecimientos [1].

- Leucemia linfocítica crónica B/ Linfoma de linfocitos pequeños B (LLC).
- Leucemia prolinfocítica B(LPB).
- Inmunocitoma/Linfoma linfoplasmocítico (+/- Macroglobulinemia de Waldenström).
- Linfoma del manto (LM).
- Linfoma folicular cutáneo (LF).
- Linfoma de la zona marginal del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (+/- células B monocitoides).
- Linfoma esplénico de la zona marginal (+/- linfocitos vellosos).
- Linfoma difuso de célula grande B (LDCGB).
- Linfoma mediastínico (tímico) de célula grande B.
- Linfoma intravascular de célula grande B.
- Linfoma de Burkitt (LB).

Las leucemias son un tipo de cáncer de la sangre que comienza en la médula ósea, el tejido blando que se encuentra en el centro de los huesos, donde se forman las células sanguíneas, mientras que los linfomas son neoplasias que se desarrollan en el sistema linfático, siendo también conocidos como tumores sólidos hematológicos.

Los linfomas se subdividen en diferentes tipos dependiendo de su comportamiento clínico, molecular, morfología celular, estirpe inmunológica y citogenética. La clasificación general es: linfoma de Hodgkin (LH) y linfoma no Hodgkin (LNH).

Con base en el registro de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Globocan 2012 la tasa de incidencia mundial de LNH en hombres fue de 5.6/100,000 habitantes y la tasa de mortalidad 3.2/100,000 habitantes. En mujeres las tasas de incidencia y mortalidad mundiales fueron menores con respecto a las de los varones: 4.1/100,000 y 2.4/100,000, respectivamente. Para México, los datos de Globocan 2002 para hombres fueron: tasa de incidencia 4.5/100,000, tasa de mortalidad 2.1/100,000; y para el género femenino, incidencia de 3.3/100,000 y mortalidad de 1.6/100,000 [2].



**Figura 1. Incidencia a nivel mundial del linfoma No-Hodgkin para ambos sexos y todas las edades por cada 100,000 habitantes.** La distribución de los casos está estandarizada con la edad [2].

## 1.2 Terapias actuales contra el LNH.

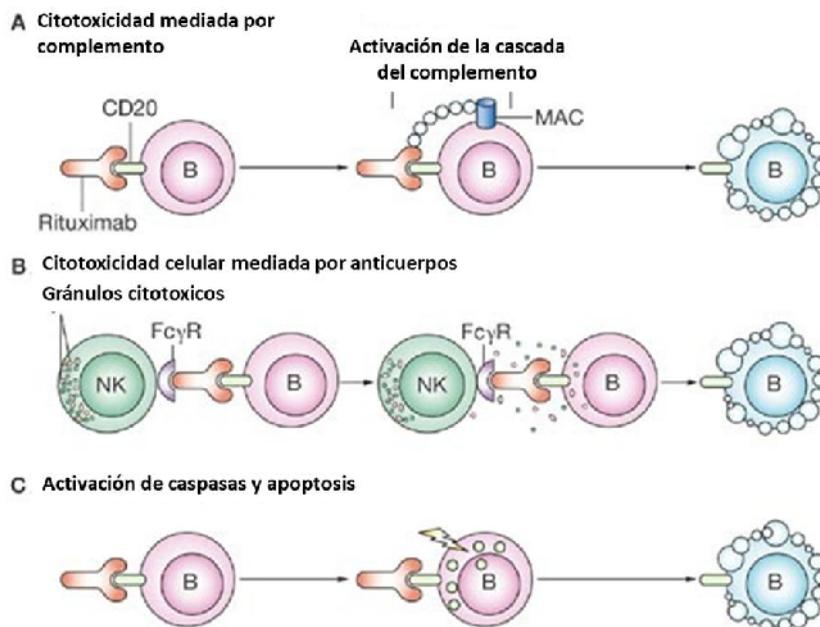
### 1.2.1 Esquema actual.

En 1993 se publicó un estudio que comparaba diferentes esquemas terapéuticos (mezclas de varios agentes citotóxicos) para el tratamiento del LNH. El esquema conocido como CHOP fue el que mostró los mejores resultados [3]. CHOP es un acrónimo de las sustancias químicas [Ciclofosfamida, la Hidroxi-daunorubicina, el Oncovin (nombre comercial de la Vincristina) y la Prednisona] de los componentes del actual tratamiento de primera línea en pacientes diagnosticados con LNH. A partir de 1997, la FDA aprobó la adición al CHOP de un anticuerpo monoclonal

(Rituximab) dirigido contra la proteína de membrana CD20 [4-5]. La mayoría de LNH tipo B expresan CD20 en la superficie de los linfocitos tumorales, por lo que la adición del Rituximab (R-CHOP) a la terapia generó un gran beneficio, al grado de que este esquema terapéutico ha sido aceptado como la terapia de primera línea para los pacientes con enfermedades linfoproliferativas (linfomas CD20 positivos), tales como el Linfoma Difuso de Células Grandes tipo B (LDCGB). Actualmente R-CHOP es el tratamiento estándar, con el que el LDCGB ha logrado ser una enfermedad potencialmente curable, puesto que su efectividad terapéutica ha permitido reducir la mortalidad en la población [6-8].

El Rituximab (nombre comercial Mabthera o Rituxan) es un anticuerpo monoclonal, el cual a su vez es una inmunoglobulina G1 anti-CD20 quimérica (IgG1), que contiene de las regiones constantes (Fc)  $\gamma$  y k de un anticuerpo de humano, ligadas a los dominios variables (Fv) de un anticuerpo murino [7]. Actualmente se sabe que este anticuerpo monoclonal elimina a los linfocitos B CD20 positivos mediante tres mecanismos (Fig. 2): i) la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, ii) la lisis mediada por complemento y iii) la inducción de apoptosis [9-10]. La citotoxicidad mediada por anticuerpo que lleva a cabo el Rituximab, se basa en la formación de una sinapsis inmunológica entre la célula blanco y la célula efectora. Para poder reclutar a las células efectoras, el anticuerpo se une mediante su porción Fc al receptor Fc $\gamma$ R que se expresa en macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células asesinas naturales NK. Este anclaje resulta en la activación de estas células y su movilización hacia la célula blanco,

que termina en la liberación de proteínas citotóxicas como granzimas y perforinas, así como con la fagocitosis de la célula blanco [11].



**Figura 2. Mecanismos de acción del Rituximab.** Descripción grafica de los efectos producidos por el rituximab al entrar en contacto con la célula tumoral. A) La unión del anticuerpo con la células tumoral promueve la activación del sistema complemento. B) La Fc del anticuerpo interacciona con su receptor FcR en las células efectoras, lo que promueve la liberación de granulos citotóxicos. C) La unión del anticuerpo con su moléculas blanco (CD20) genera un cambio bioquímico en la célula que termina con la apoptosis de la misma [9].

### 1.3 Limitaciones de los anticuerpos monoclonales usados actualmente contra Linfoma.

Si bien en los últimos años se han conseguido resultados impresionantes en las respuestas a tratamientos de enfermedades usando anticuerpos monoclonales, este tipo de moléculas enfrentan diversas desventajas, encabezando la lista su costo de producción y su baja penetrabilidad [12], así como la fiabilidad de su modo de acción; razones estas por las cuales no se han podido usar como

monoterapia, lo que en cierta medida limita sus aplicaciones. Ello sin contar con la necesidad de recurrir a sistemas eucariotas complejos, de alcanzar la pureza requerida para los fármacos clínicos y de requerirse de altas concentraciones para administrar a los pacientes, lo que eleva aun más los costos de producción [13-14]. Además de lo anterior, recientemente diversos grupos de investigación han reportado polimorfismos en el gen del FcγR, los cuales se han relacionado con el grado de respuesta clínica. Estas variaciones polimórficas se traducen en proteínas que presentan diferentes grados de afinidad hacia su ligando en el anticuerpo (Fc) [15-16]. Por otro lado y para complicar aún más la situación, los patrones de glicosilación que se llevan a cabo en la porción CH2 del anticuerpo, también se han relacionado con diversos grados de afinidad por el receptor FcγR [7, 17]. Junto con estas dos limitantes, se ha estudiado la competencia que hay entre el anticuerpo terapéutico y las IgGs del paciente por el receptor FcγR, lo que se suma a la necesidad ya expresada arriba de administrar altas dosis de la molécula terapéutica para poder mostrar el efecto deseado [18].

#### **1.4 Mejorando la afinidad por el FcγR y nuevas tecnologías: anticuerpos bi-específicos.**

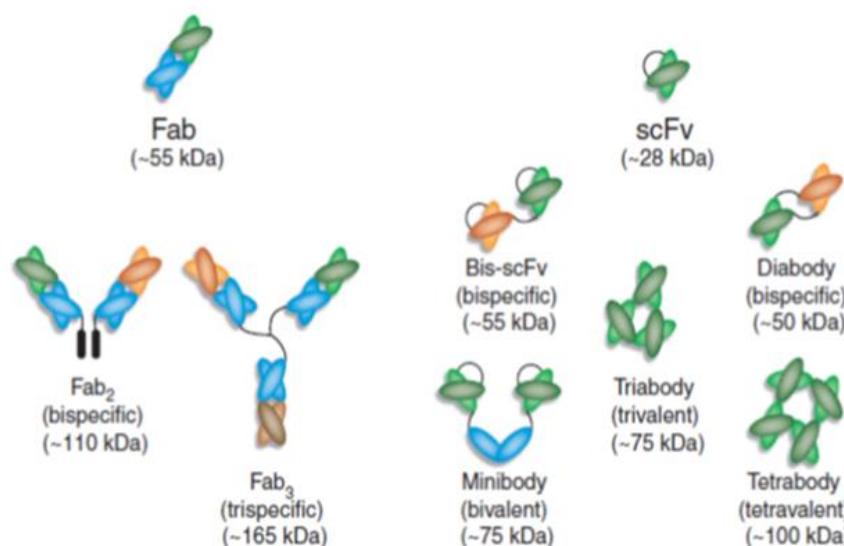
El receptor FcγR juega un papel muy importante entre las respuestas inmunes humoral y celular, al ser la molécula que permite la unión y activación de las células efectoras (linfocitos NK, monocitos, etc.) con la célula blanco (tumoral) por medio del anticuerpo (Fig 2B) [19]. Una vez que se une la Fc del anticuerpo con su receptor (FcR), se produce la activación del receptor, lo que a su vez desencadena mecanismos de defensa como la inflamación, citólisis,

hipersensibilidad, endocitosis y fagocitosis por parte de los leucocitos. Se conocen tres clases del receptor FcR: FcγRI (CD64), el FcγRII (CD32) y el FcγRIII (CD16), los cuales presentan diferentes grados de afinidad por la Fc [20]. El receptor CD16 es de particular interés por estar presente en macrófagos, mastocitos, polimorfonucleares y en células asesinas naturales del sistema inmune (células NK) [21], siendo estas últimas un componente muy importante de este sistema, pues desencadena la lisis celular; además de ser fuente temprana de citocinas. El principal problema de este receptor (CD16) es la baja afinidad por la Fc de las inmunoglobulinas, por lo que muchos grupos de investigación están desarrollando nuevas formas de mejorar esta afinidad y de promover una mayor participación de las células NK en la sinapsis inmunológica [22-25]. Algunos de las aproximaciones para mejorar esta afinidad son modificaciones en los patrones de glicosilación, o para de plano sacarle la vuelta a este problema, es el desarrollo de los anticuerpos bi-específicos y últimamente el uso de anticuerpos de cadena sencilla, como los encontrados en algunas especies de tiburones y camélidos [17, 26]; anticuerpos que a pesar de que las especies de las que se derivan se ubican distantes en el árbol evolutivo de la vida con respecto al humano, están bastante conservados con respecto a los anticuerpos de este último.

#### **1.4.1 Anticuerpos bi-específicos.**

Las nuevas tecnologías de la ingeniería genética han permitido el desarrollo de los anticuerpos soñados hace más de 100 años, estructuras que no se encuentran en la naturaleza, pero que están basados en el modelo natural de las inmunoglobulinas humanas. Estas nuevas configuraciones proteicas tienen la

capacidad de re-direccionar células efectoras (células que expresan el receptor FcγIII) hacia la célula que expresa el antígeno blanco (células tumoral), lo que desencadenan la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), y que en cierta medida asemeja al proceso que ocurre por la acción de las IgGs naturales, resolviendo los problemas de afinidad por el receptor FcγRIII, descritos anteriormente. Esta capacidad de reconocer a proteínas de superficie de dos poblaciones celulares distintas ha sido explotada en el desarrollo de los anticuerpos bi-específicos (BsAbs, por sus siglas en inglés). Estos fragmentos de anticuerpos, tienen capacidad de unirse a dos blancos de manera simultánea. Por lo que re-dirigen células efectoras (linfocitos B/T, monocitos, macrófagos, células NK, etc.) hacia una célula blanco (tumoral). La ingeniería de proteínas (ingeniería de anticuerpos) ha generado formatos como los diabodies, diabodies en tándem, cuadromas, Fab2 y anticuerpos de cadena sencilla (scFv), entre otros (Fig. 3) [27].

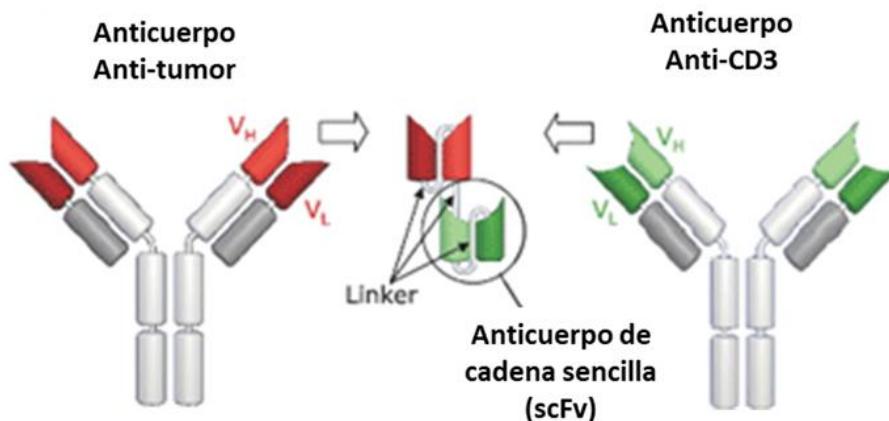


**Figura 3. Diversidad actual en los formatos de anticuerpos.** Variedades a base de fragmentos de anticuerpos, en los cuales se puede observar la pluralidad en tamaños y en configuración [27].

En 1984, en el departamento de inmunología del Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) en la ciudad de Bethesda en el estado de Maryland, USA, se desarrolló el primer anticuerpo bi-específico; la molécula estaba formada por la unión química del Fab anti-FcR y el Fab anti-DNP (2,4-dinitrofenil). El estudio describía el método de fusión, la capacidad de unirse a las células efectoras, además del efecto citotóxico desencadenado por las células efectoras, siendo el primer reporte de la generación de un anticuerpo bi-específico [28]. A partir de entonces, diversos estudios clínicos de fase 1 fueron realizados a principios de los noventas. Los primeros BsAbs que llegaron a fase clínica 1 estaban diseñados para redirigir las células efectoras CD64 positivas (monocitos y macrófagos) hacia las células tumorales expresando antígenos como HER2 o EGFR [29-33]. Desafortunadamente, el efecto antitumoral fue inconsistente debido, en parte, a la alta concentración requerida del anticuerpo y a que la relación de células efectoras con células blanco debía de ser 40:1, aún en pacientes pre-estimulados con IFN- $\gamma$  y G-CSF [17, 30-31].

La solución a este problema de inconsistencia y efectividad llegó con el desarrollo de la ingeniería de anticuerpos en la década de 1990. Con esta tecnología, se generó un fragmento variable de cadena sencilla (scFv, por sus siglas en inglés) mediante la fusión del dominio variable de la cadena pesada con el dominio variable de la cadena ligera a través de un péptido conector (GGGS)<sub>3</sub>. Esto permitió la fusión en tándem con otra scFv (dirigido contra otro antígeno blanco) a través de un conector adicional (GGGS)<sub>4</sub>, de tal manera que los cuatro dominios estuvieran alineados en una sola cadena de aproximadamente 55 kDa. Esto

contrasta con los anticuerpos bi-específicos iniciales en los cuales los fragmentos variables pertenecen a dos cadenas poli-peptídicas diferentes y en donde la fusión se llevaba a cabo mediante una reacción química [34-38].



**Figura 4. Estructura base de un anticuerpo bi-específico.** Imagen de cómo está conformado el Bi-especific retargeting T cells (BiTE®), el cual es el formato más avanzado en las etapas clínicas de desarrollo y que utiliza un anti-CD3 para atraer linfocitos T hacia la célula tumoral [39].

#### 1.4.2 Mejoramiento de la interacción antígeno blanco y el receptor FcγRIII.

La respuesta de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), basada en la actuación del receptor FcγRIII (CD16), ha sido mejorada con el desarrollo de anticuerpos bi-específicos. Tal es el caso de la molécula denominada Bike [40], la cual es una molécula formada por un scFv dirigido contra la proteína CD19 y que se une a un scFv que reconoce la proteína CD16 mediante una secuencia de 20 aminoácidos pertenecientes a la aldolasa A humana. Otro ejemplo del uso del CD16 para atraer células efectoras es el desarrollado por Kellner *et al.* [41], en el cual usan unos formatos llamados “bibody” y “tribody”, que

consisten en la unión de un Fab anti-CD19 con un scFv anti-CD16 en el caso del bibody y que en el caso del “tribody” se agrega un scFv anti-CD19.

### **1.5 Uso de Anticuerpos anti-CD3 para atraer células T.**

A los linfocitos T citotóxicos se les conoce por ser de las células efectoras más potentes del sistema inmune. El mecanismo principal por el cual actúan, es la liberación de gránulos líticos una vez que han reconocido un antígeno específico en la superficie de la célula blanco. Desafortunadamente, al carecer de receptor Fc estas células no participan en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, tal y como lo hacen otras células [42-43]. Esto último ha motivado el desarrollo de moléculas que permitan hacer partícipes a los linfocitos T citotóxicos en la destrucción de células tumorales. El marcador CD3 es uno de los blancos más usados en esta nueva generación de anticuerpos bi-específicos. Ya se ha demostrado la efectividad de estos anticuerpos para eliminar células de tumores sólidos que presentan altos niveles de antígeno carcinoembrionario (CEA) en una terapia bi-específica CEA/CD3[44]. Yoshida y cols. trabajaron con un anticuerpo bi-específico CD3/ Ag de *Plasmodium falciparum* contra la malaria y observaron que al usar el anticuerpo aumenta la producción del interferón gamma, el factor de necrosis tumoral alfa, además de aumentar la fagocitosis del parásito, al mismo tiempo que de la activación de macrófagos, neutrófilos y células NK para matar al parásito [45].

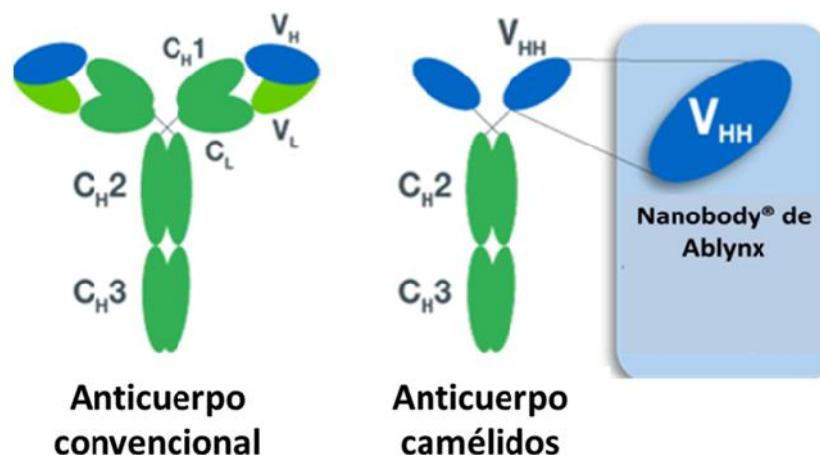
Actualmente, el formato más promisorio es el anticuerpo bi-específico llamado Blinatumomab de la compañía AMGEN (Fig. 4), el cual tiene reconocimiento

hacia CD3 y CD19, encontrándose ya en estudios clínicos fase 2 de experimentación en Linfoma No Hodgkin y Leucemia Linfoblástica Aguda, entre otros tipos de cáncer [46-48].

### **1.6 Anticuerpos de cadena sencilla (vNARs).**

Además de los anticuerpos convencionales, en la naturaleza existen unos anticuerpos inusuales formados en su estructura sólo de cadenas pesadas. Este tipo peculiar de anticuerpos de cadena pesada carecen de cadenas ligeras y se han encontrado en dos especies evolutivamente distintas como lo son los camélidos y ciertas especies de tiburones [26]. La fracción variable (Fv) de estos organismos es designada como vHH para los anticuerpos de camélidos, mientras que para el caso de los anticuerpos de tiburón se refieren como vNARs; aunque se les puede designar a ambos simplemente como anticuerpos de dominio sencillo (sdAb, por sus siglas en inglés). Debido a la falta de una cadena ligera en estos anticuerpos, presentan cambios ligeros pero sustanciales en los dominios de unión al antígeno. Para llenar la falta de cadena ligera, la CDR3 tanto de vHHs como de vNARs es más larga que la secuencia convencional vH de las IgGs: cerca de 24 y 18 residuos de aminoácidos, respectivamente comparados con los 7 de la vH [49]. Esta CDR3 más larga es estabilizada por la adición de un residuo de cisteína que crea un enlace disulfuro con alguna de las otras CDRs [50]. Además, se descubrió que una vez aislados y clonados, estos vHHs y vNARs no pierden su capacidad de unión al antígeno, por lo que han sido la base del desarrollo de los Nanocuerpos (Nanobodies) por la compañía biotecnológica Ablynx [51]. Estos Nanobodies suman las ventajas de los anticuerpos convencionales, como la

especificidad y afinidad por su blanco, con las características de los fármacos de moléculas pequeñas que le permiten, entre otras capacidades, acceder a receptores a los que un anticuerpo convencional no llegaría [52].



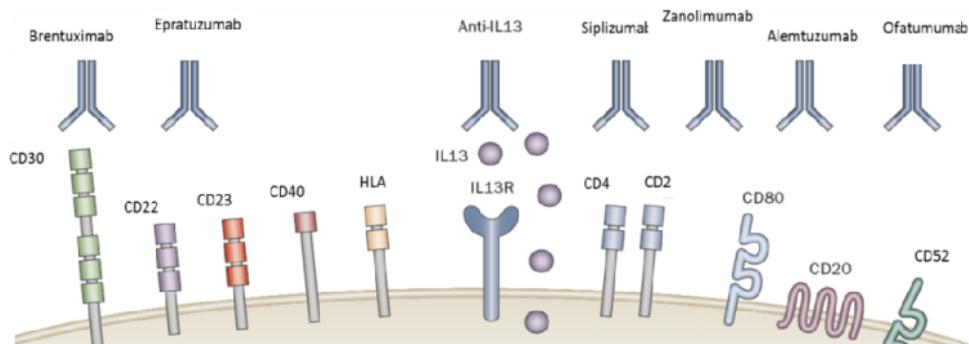
**Figura 5. Estructura de un anticuerpo convencional y un anticuerpo de cadena sencilla.** Descripción gráfica de la ausencia de la cadena ligera en los anticuerpos de camélidos [51].

### 1.7 Nuevos blancos contra linfomas y leucemias.

Como se expuso anteriormente, el uso de Rituximab (Anti-CD20) ha mejorado la respuesta al tratamiento de los pacientes que padecen enfermedades en las que hay afectación de células B [53]. Sin embargo, hay un subgrupo de pacientes que no responden favorablemente a la inmunoterapia, por lo que anticuerpos anti-CD20 de 2da y 3er generación están siendo evaluados actualmente, habiéndose reportado que han mostrado un aumento en la actividad antitumoral comparados con el rituximab [7-8, 15]. Una de las nuevas opciones usando anticuerpos monoclonales para el tratamiento del linfoma, es el Brentuximab vedotin (Adcetris) que pertenece a los anticuerpos conjugados [54-56]. Este tipo de anticuerpos

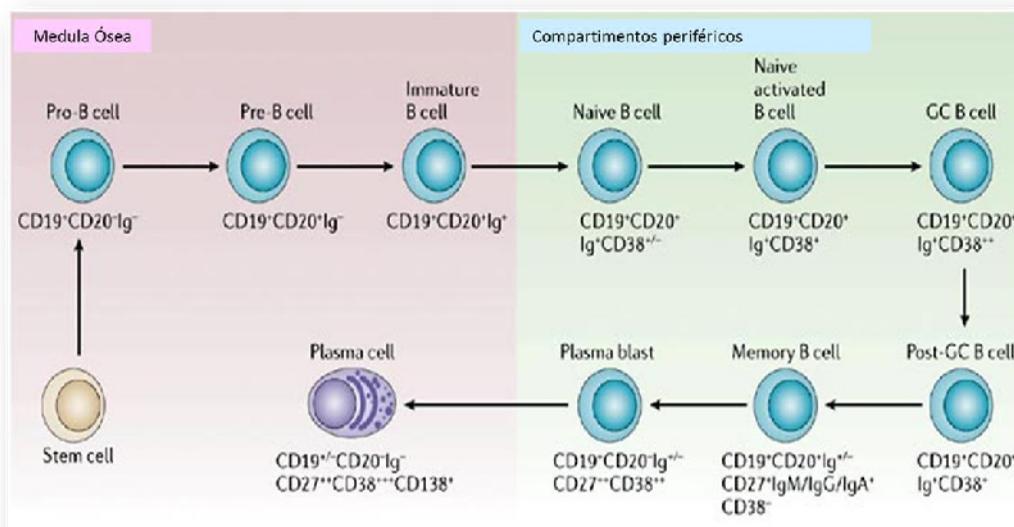
están unidos a una molécula altamente citotóxica (química o ion radioactivo); en el caso del Brentuximab, éste reconoce al marcador celular CD30 de la célula cancerosa y por un proceso de endocitosis el anticuerpo es introducido al interior, donde se libera el fármaco Monometil Auristatina E. Este fármaco tiene una acción potente contra la tubulina y cuando es liberado, después de detener el ciclo de división celular, conduce a la apoptosis [57]. Una de las grandes limitantes del uso de este conjugado es que puede aumentar el riesgo que se desarrolle en el paciente leucoencefalopatía multifocal progresiva, cuyo pronóstico son la discapacidad grave ó la muerte [58-59]. Existen en el mercado otros dos anticuerpos anti-CD20: Tositumomab (Bexxar) e Ibritumomab (Zevalin) [60]; ambos están marcados con un radioisótopo y si bien estos anticuerpos han mostrado eficacia en la eliminación de células cancerosas, su precio es muy elevado (cerca de los \$ 30,000 dólares por dosis) [61].

No obstante lo anterior, diversas investigaciones a nivel mundial han identificado nuevos blancos terapéuticos en células de linfoma (Fig. 6), por lo que se continúa con el desarrollo de nuevas terapias dirigidas con anticuerpos, algunas de los cuales ya se encuentran en fases clínicas tempranas [62].



**Figura 6. Blancos terapéuticos para linfoma.** Proteínas de superficie expresadas en linfocitos que actualmente son evaluadas para su utilización como blancos en el desarrollo de terapias dirigidas [62].

En este sentido, la glicoproteína transmembranal de 95 kDa de la superfamilia de las inmunoglobulinas (CD19), cuyo papel es desarrollar y activar las células B del sistema inmune, representa un blanco interesante en estas células con respecto a la proteína CD20 [63-64]. Ello porque este antígeno es expresado en diferentes estadios del desarrollo de células B, con la ventaja de estar ausente de células madre hematopoyéticas, células T u otras células no linfoides. Además de esto, la proteína CD19 es expresada en un estadio posterior del desarrollo de los linfocitos B (plasmablastos) en el cual la CD20 no está expresada [63]. Esta proteína se encuentra expresada en casi todos los casos de tumores de células B, desde linfomas No Hodgkin hasta leucemias linfoblásticas [63]. Pero además, en defensa de su utilidad terapéutica, las preocupaciones en cuanto a la afectación de otros tipos de células que expresan este antígeno (CD19), se subsanan por la participación de las células madre, las cuales no se ven afectadas por terapias anti-CD19, ya que esta estirpe celular carece, por su grado de inmadurez, de la multicitada proteína de superficie (Fig. 7) [65].



**Figura 7. Etapas del desarrollo de los linfocitos B.** Aparición de los antígenos de membrana que se están utilizando actualmente para el desarrollo de terapias dirigidas (CD19 y CD20) [66].

Sin embargo y muy a pesar de lo atractivo que parece ser el CD19 como blanco en la inmunoterapia de tumores de células B, los resultados con pacientes empleando anticuerpos monoclonales convencionales han sido muy variables. Por lo que hay una ventana de oportunidad aún para el mejoramiento en el uso de las nuevas generaciones de anticuerpos que tengan como blanco el antígeno CD19 [16-17, 67].

### 1.8 Metodologías para el desarrollo de anticuerpos.

El descubrimiento que logró hacer posible el desarrollo de los anticuerpos monoclonales se llevó a cabo hace ya casi 40 años. En 1975, en el “MRC Laboratory of Molecular Biology”, se realizó la fusión celular conocida como hibridoma, la cual consiste en la unión de un linfocito B productor de anticuerpos específicos hacia un blanco, con una célula B de un ratón con mieloma [68]. Esta

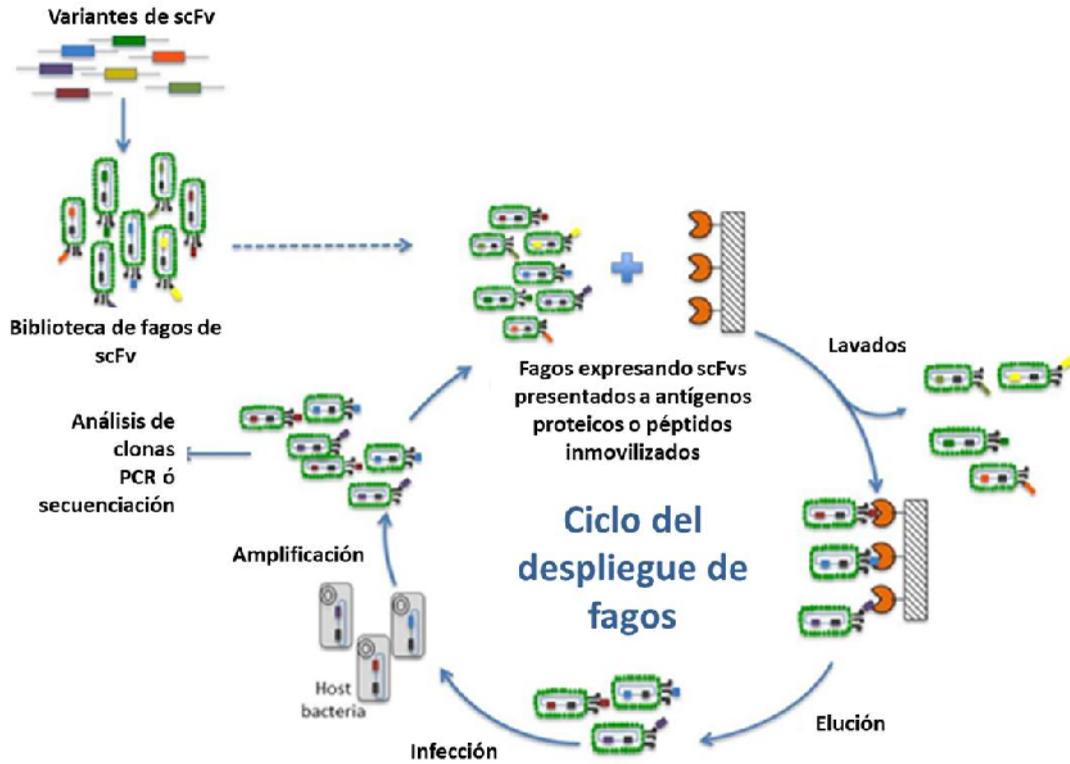
unión permitió obtener una célula con la capacidad de crecer infinitamente de la célula tumoral del mieloma y la habilidad de producir anticuerpos dirigidos contra un epítoto único del linfocito B. A partir de este descubrimiento merecedor del Premio Nobel de Medicina de 1984, se lograron generar anticuerpos monoclonales que a la postre serían utilizados en los esquemas terapéuticos de diversas enfermedades [69]. Desafortunadamente, debido al alto grado de inmunogenicidad de estos anticuerpos monoclonales de murinos, su aplicación clínica sufre una gran limitante y en especial en aplicaciones en las que se requieren repetidas administraciones del anticuerpo [13].

Lo anterior desencadenó el desarrollo de un área exclusiva en la generación de técnicas de modificación y mejoramiento de anticuerpos llamada Ingeniería de Anticuerpos. Esta área ha permitido el desarrollo de métodos de expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en bacterias, la humanización de los anticuerpos monoclonales de murinos, la generación de ratones transgénicos con genes de las inmunoglobulinas humanas, etc [70].

### **1.8.1 Tecnología del despliegue de fagos (phage display).**

Con las técnicas anteriormente mencionadas se ha logrado generar una gran variabilidad en los dominios de reconocimiento de los anticuerpos, como lo son las regiones variables (VH y VL) y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), las cuales se han podido clonar y así generar bibliotecas de estas regiones con todas sus variantes posibles [71-72]. El tamizaje (screening) de este tipo bibliotecas es una de las herramientas más importantes en la ingeniería de anticuerpos, ya que es por medio de este

proceso que se puede obtener un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una alta afinidad por su blanco, además de una gran estabilidad [73-74]. Una de las técnicas más utilizadas y de mayor eficacia para el tamizaje por afinidad de bibliotecas de gran tamaño es el despliegue de fagos (Fig. 8) [75]. Este consiste en la expresión o el despliegue de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en la superficie de bacteriófagos filamentosos. Esto se logra mediante la fusión con una de las proteínas superficiales de los fagos, comúnmente la proteína pIII, ya que permite la fusión con proteínas de mayor tamaño. Los fagos que expresan las secuencias de mayor afinidad por el blanco pueden ser enriquecidos mediante una absorción selectiva sobre el antígeno inmovilizado, a lo cual se le conoce como “panning”. Estos fagos unidos covalentemente luego son eluidos, recuperados y amplificados mediante la infección de células de *E. coli*, proceso que normalmente se repite entre 4 y 6 veces para asegurar que los fagos recuperados en cada ronda de “panning” sean los de mayor afinidad por el antígeno blanco. Este despliegue de fagos permite obtener secuencias a partir de bibliotecas con una complejidad superior a las  $10^{11}$  clonas.



**Figura 8. Etapas del despliegue de fagos.** Aparición de los antígenos de membrana que se están utilizando actualmente para el desarrollo de terapias dirigidas (CD19 y CD20).

## 2. JUSTIFICACIÓN.

Aun cuando el Rituximab (Anti-CD20) ha mejorado las perspectivas de vida de los pacientes con linfoma u otros padecimiento en los que hay afectación de las células B (CD20 positivas), un porcentaje de estos pacientes no responden a esta terapia, lo que justifica la necesidad de nuevos blancos terapéuticos, además del desarrollo de otros formatos y/o modificaciones de la estrategia actual, que logren superar las limitaciones del mecanismo que impide la efectividad de esta terapia.

A lo anteriormente descrito, se puede sumar la falta de efectividad como monoterapia de los anticuerpos monoclonales y en algunos casos la baja respuesta de estas moléculas en combinación con otros quimioterapéuticos, lo que hace apremiante la búsqueda de nuevas opciones para el mejoramiento de las que en algún momento se visualizaron como “balas mágicas”; búsqueda que incluya cambios en el formato de su estructura que potencie su mecanismo de acción (sin afectar su especificidad y afinidad), cambios que les permitan llegar a zonas a las que de manera convencional no harían y mejoras que puedan ser llevadas a cabo con técnicas refinadas de biología molecular e ingeniería genética.

### **3. HIPÓTESIS.**

#### **3.1 Hipótesis de investigación.**

El uso de un anticuerpo bi-específico anti-CD19, permitirá el re-direccionamiento de la lisis mediada por células efectoras CD16 positivas (como los linfocitos B y células NK) hacia células blanco CD19 positivas, como las células presentes en leucemias y linfomas de la estirpe celular B. Ello permitirá una inmunoterapia más efectiva que la lograda actualmente con los anticuerpos monoclonales convencionales.

#### **3.2 Hipótesis nula.**

El uso de un anticuerpo bi-específico anti-CD19, no permitirá el re-direccionamiento de la lisis mediada por células efectoras células (CD16 positivas: linfocitos B y células NK), hacia células blanco CD19 positivas, como las células presentes en leucemias y linfomas de estirpe celular B. No obstante lo novedoso de este tipo de anticuerpos, esto no permitirá alcanzar mayor efectividad que la ya lograda con los anticuerpos convencionales.

## 4. OBJETIVO GENERAL.

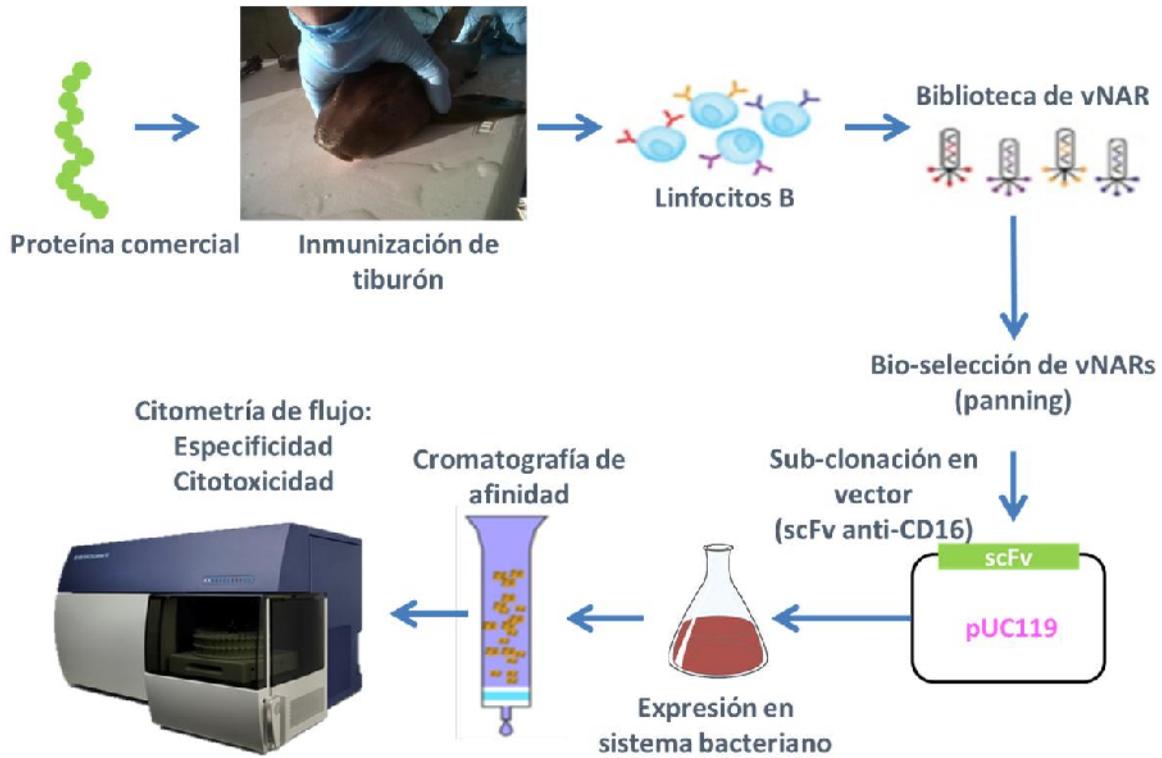
Desarrollar un anticuerpo bi-específico usando como base la fracción variable de un anticuerpo de tiburón (vNAR) dirigida contra la proteína CD19 presente en linfocitos B tumorales y acoplándolo a un scFv anti-CD16 de linfocitos B y NK.

### 4.1 Objetivos particulares.

- 1) Inmunizar tiburones cornudos para generar los anticuerpos anti-CD19 (IgNAR).
- 2) Generar una biblioteca de amplicones de las regiones variables de las IgNAR, a partir del ARNm aislado de los linfocitos B de cada tiburón inmunizado.
- 3) Realizar una selección y aislamiento del ADNc codificante de los vNARs con capacidad de reconocimiento para el antígeno de interés.
- 4) Unir mediante un enlace oligopeptídico el vNAR aislado con el scFv anti CD16, para generar una secuencia sencilla e introducir ésta en un vector de expresión.
- 5) Expresar en bacterias el anticuerpo bi-específico codificado por el casete resultante de la sub-clonación, para prepararlo en grandes cantidades y posteriormente purificarlo por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, principalmente.
- 6) Valorar las propiedades biológicas del nuevo nano-anticuerpo bi-específico, analizando por FACS su capacidad de unión a las células blanco (células de leucemia y linfomas CD19 positivas y linfocitos CD3 positivos).

- 7) Inferir las propiedades terapéuticas del nuevo anticuerpo bi-específico, mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

## 5. ESTRATEGIA GENERAL.



**Figura 9. Resumen grafico de la estrategia a seguir.** Etapas que se realizaron en esta investigación, las cuales están descritas a detalle en la sección de metodología.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 6.1 Materiales y reactivos.

Proteína comercial CD19 (Bioclone, USA), Adyuvante de Freund (Sigma-Aldrich), PBS, PBS con 3 % BSA, PBS con 1 % BSA, Cloroformo (Sigma-Aldrich), Etanol 100 % (Sigma-Aldrich), Etanol 70%, Isopropanol (Sigma-Aldrich), Metanol 100 % (Sigma-Aldrich), Acetato de amonio (CTR), Acetato de sodio (CTR), Cloruro de sodio (CTR), Glucosa (CTR), Cloruro de magnesio (CTR), Agar (CTR), Cloruro de potasio (CTR), Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich), Ácido clorhídrico (Sigma-Aldrich), Ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich), Dióxido de carbono (CTR), Sulfato de magnesio (Sigma-Aldrich), Cloruro de calcio (CTR), Fosfato diácido de sodio (Sigma-Aldrich), Bicarbonato de sodio (CTR), Imidazol (Sigma-Aldrich), Glicina (Bio-rad), Dodecilsulfato sódico (Bio-rad), Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich), Glicógeno (Sigma-Aldrich), Carbenicilina (Invitrogen), Kanamicina (Invitrogen), Tris base (Bio-rad), Tween 20 (Sigma-Aldrich), Leche descremada (Sigma-aldrich), Glicerol (CTR), IPTG (Sigma-Aldrich), Acrilamida (Bio-rad), TEMED (Bio-rad), Persulfato de amonio (Sigma-Adrich), Polietilen glicol 8000 (Probiotek), Triptona (Invitrogen), Extracto de levadura (Invitrogen), Agarosa (CTR), Tripsina (Invitrogen), Master mix para Gotaq (Uniparts), Trizol reagent (Sigma-Aldrich), Kit de retrotranscripción (SuperScript III)(Uniparts), Kit de ligación T4 DNA ligasa (Uniparts), RNasa, Gotaq polimerasa (Uniparts), Enzimas de restricción (Nde I, Xho I, Eag I, Nco I, Not I, Sfi I)(CTR), Anti-His marcado con PE (Uniparts), Anti-His marcado con HRP (CTR), Buffer de digestión (1, 2, 3 y 4)(CTR), Agua miliQ y DEPC (CTR), Medio RPM-1640 (Invitrogen), Suero bovino fetal (Invitrogen),

Antibiótico-Antimicótico (Probiotek), FACSFlow (CTR), Reactivo Color-Developer Reagent (CTR), Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), Reactivo TMB (CTR), Rituximab (Roche), Cepas de E. coli ER2537, BL21, TG1, Fago helper M13K07 (CTR), Líneas celulares (SUDHI-4, OCI-Ly7, NIH 3T3)(ITESM), Tubos eppendorf (0.2 mL, 0.5 mL, 1.5 mL y 2 mL)(CTR), Tubos falcon de 15 mL y 50 mL (CTR), Tubos para citometría (CTR), Tubos para toma de sangre con EDTA (CTR), Placas de ELISA (Uniparts), Puntas para micropipeta blancas, amarillas y azules (Uniparts), Puntas con filtro (10 µL, 200 µL y 1 mL) (CTR), Pipetas 10mL, 25 mL y 50 mL (CTR), Placas de petri (Uniparts), Placas de ELISA de 96 pozos (Uniparts), Jeringas de plástico (2mL, 5 mL y 10 mL)(CTR), Bisturíes de acero (CTR), Cubetas de electroporación (Bio-rad), Papel aluminio (CTR), Resina de agarosa Nique-NTA (CTR).

## 6.2 Metodología.

### 6.2.1 Lugar de realización del estudio.

La etapa de la inmunización de los tiburones, así como la obtención de la biblioteca de fagos con capacidad de reconocimiento del antígeno usado para la inmunización se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas (LIMB) del Departamento de Biología Experimental y Aplicada, del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en Ensenada, Baja California, el cual es dirigido por Dr Alexei Fedorovich Licea Navarro. Los procesos de producción y purificación de proteínas recombinantes, así como los ensayos de funcionalidad, se realizaron en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 6.2.2 Inmunización de los tiburones.

Se utilizaron dos tiburones de la especie *Heterodontus francisci*, los cuales fueron donados por el Dr. Licea Navarro del Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas (LIMB) del CICESE. Estos especímenes fueron inmunizados con la proteína CD19, lo que se realizó siguiendo los lineamientos del comité de cuidado y manejo de animales del CICESE. En el cuadro 1 se describe el protocolo de inmunización de los tiburones. Los sangrados pre e intra inmunización fueron realizados para evaluar la respuesta del tiburón al antígeno administrado, por medio de ensayos de ELISA. En resumen, 5 µg de proteína (CD19) fueron disueltos en el adyuvante completo de Freud y administrados en la aleta dorsal del

tiburón intramuscularmente, los refuerzos se realizaron cada 15 días con la proteína re-suspendida en PBS y a los siete días de cada inyección se realizó un sangrado del animal para monitorear la respuesta del tiburón (ver cuadro 1).

#### ***6.2.2.1 Monitoreo de respuesta.***

Para el monitoreo de la respuesta inmune se utilizó un anticuerpo de gallina anti-IgNAR (GenWay Biotech. Inc, San Diego, CA), el cual se utilizó para medir el aumento en la concentración sérica de las IgNAR una vez que se administró la primera dosis del antígeno, esto mediante un ensayo tipo ELISA. En resumen, las muestras de sangre fueron centrifugadas para obtener el suero, posteriormente 100  $\mu$ L de suero de cada sangrado del animal fueron colocados en pozos de una placa de 96 pozos por triplicado, posteriormente la placa se llevó a incubación por 1 hora a 37°C. Pasada la hora se decantó el sobrenadante, se agregaron 300  $\mu$ L de una solución de BSA al 1% en PBS y se dejó incubando la placa 1 hora más a 37°C. Posteriormente, se agregaron 50  $\mu$ L de una solución del anticuerpo anti-IgNAR (dilución 1:10,000 en PBS) para dejar incubando a 37°C por 1 hora. Pasada la hora, se decantó el exceso de la solución y se procedió a lavar 3 veces con una solución de PBS Tween al 0.05 %, terminados los lavados se agregó una solución de un anticuerpo anti-IgG de gallina marcado con HRP y se dejó incubando la placa por 1 hora a 37°C. Finalmente se volvió a lavar por 3 veces con la solución de PBS Tween 0.05% y se agregaron 50  $\mu$ L del reactivo de revelado (una solución de ABTS), la placa se volvió a dejar en incubación a 37°C pero esta vez por 20 min, al terminar el tiempo de incubación se leyó la placa en un lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm.

**Cuadro 1. Protocolo de inmunización.**

Semana	Sangrado	Inmunizado	Cantidad / Vehículo / Vía
1	X	X	5 µg / Adyuvante completo de Freud / Intramuscular
2	X		
3		X	5 µg / PBS / Intramuscular
4	X		
5		X	5 µg / PBS / Intramuscular
6	X		
7		X	5 µg / PBS / Intramuscular
8	X		
9		X	5 µg / PBS / Intramuscular
10	X		
11		X	5 µg / PBS / Intramuscular
12			Sacrificio del animal

### 6.2.3 Aislamiento de ARN.

Se extrajo el bazo del tiburón inmunizado y se procedió a la extracción del ARN total. Brevemente, se agregó 1 mL del reactivo Trizol® por cada 100 mg del tejido aislado. Posteriormente se utilizó un homogenizador eléctrico para generar una suspensión celular, a la cual se le agregaron 0.2 mL de cloroformo. Esta mezcla fue agitada manualmente por 2-3 min a temperatura ambiente para posteriormente

centrifugar a 12000 g por 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase superior (fase acuosa) y se colocó en un tubo limpio. El ARN se precipitó usando 0.5 mL de isopropanol al 100%, se dejó incubando a TA por 10 min y posteriormente se recuperó mediante centrifugación 12000 g por 10 min a 4 °C. La pastilla fue lavada con etanol al 75% y se dejó secando a temperatura ambiente (TA). Una vez seca, el ARN se re-suspendió en agua libre de ARNsas. La cantidad y calidad fueron evaluadas mediante un gel de agarosa desnaturalizante y mediante la relación de las absorbancias medidas a 260 y 280 nm.

### **6.2.3 Amplificación y generación de biblioteca de vNARs.**

#### **6.2.3.1 Aislamiento de ARN total.**

El RNA total aislado se utilizó como templado para generar el ADNc y así amplificar las secuencias de las regiones variables de las IgNARs (vNARs). Se utilizó un “pool” de primers (diseñados en el laboratorio del Dr. Licea) mediante los cuales se pueden amplificar dichas regiones variables. Brevemente, en un tubo de 0.2 mL se agregaron 1 µL del ARN aislado (10 µg), 1 µL del oligo dT (50µM), 1 µL de buffer de alineamiento (10X) y 5 µL de agua DEPC. Esta mezcla fue incubada por 5 min a 65°C y posteriormente colocada en hielo por 1 min. Pasado este minuto, se agregaron 10 µL de mix de reacción “First-strand” 2X y 2 µL de la enzima SuperScript III, se agitó la mezcla en vortex y se dejó incubando a 50°C por 50 min. Finalmente, se incubó por 5 min a 85°C y la reacción se almacenó a -20°C.

### **6.2.3.2 Amplificación de vNARs.**

El ADNc fue utilizado como templado para la amplificación de los vNARs. Brevemente, en tubo de PCR se colocaron 25 µL del Gotaq mastermix junto con 2 µL del mix de primer “forward” (10 µM) y 1 µL de primer “reverse” (10 µM). Se agregaron 2 µL del ADNc, que en el caso del control negativo se remplazo por agua. La reacción fue incubada 2 min a 95°C seguido de 30 ciclos de 95°C por 45 s, 58°C por 45 s y 72°C por 45 s. Finalmente, se añadió un tiempo de extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de la PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio y visualizado en un fotodocumentador.

### **6.2.3.3 Digestión de vNARs y pComb3X.**

Los productos amplificados (vNARs) fueron digeridos con la enzima *Sfi* I (sitio que fue insertado en los primers de la PCR), junto con el vector fagémido pComb3X. La reacción de digestión fue realizada con las siguientes condiciones: 2 µL de Buffer B, 0.1 µL de BSA (100X), 3 µL de enzima (5 U), 10 µL de agua y 5 µL de ADN. Esta reacción se dejó incubando a 50°C durante 4 h para después inactivar la enzima a 65°C por 15 min. Los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, tal y como se describió en el apartado 6.2.3.2.

### **6.2.3.4 Ligación de la biblioteca de vNARs y transformación.**

La inserción por ligación de los vNARs digeridos con *Sfi* I dentro del pComb3X, se realizó con una relación vector:inserto de 2:1. En tubo de 0.5 mL se colocaron 20 µL de buffer de ligasa (10X), 20 µL del vector, 12 µL del inserto, 6 µL de ligasa y 142 µL de agua. La reacción se dejó incubando a TA toda la noche. La ligación se

precipitó agregando 1  $\mu\text{L}$  de glicógeno, 20  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 440  $\mu\text{L}$  de etanol. Esta mezcla se agitó y se dejó incubando a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a velocidad máxima (14,000 rpm) en una microcentrifuga eppendorf por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70%; la pastilla se dejó secando brevemente al vacío. Finalmente la pastilla se re-suspendió en 10  $\mu\text{L}$  de agua. La ligación y sus controles (negativo, sin ligación; positivo, plásmido sin digerir) se colocaron en hielo mientras se descongelaban 200  $\mu\text{L}$  de células de *E. coli* electrocompetentes. Una vez descongeladas éstas, se tomaron los 10  $\mu\text{L}$  de ligación y se depositaron en el tubo con las células electrocompetentes, se agitaron con la pipeta y se transfirieron a la cubeta de electroporación. La mezcla se dejó incubando en hielo por 1 minuto y se electroporó a 2.5 kV, 25  $\mu\text{F}$  y 200  $\Omega$ , se agregó 1 mL de medio SOC y la suspensión celular se pasó a un tubo cónico de 50 mL, se lavó la cubeta dos veces con 2 mL de medio SOC para recuperar las bacterias remanentes y los 5 mL de medio se dejaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación (250 rpm) por 1 h. Pasada la hora se agregaron 10 mL de medio SB y 3  $\mu\text{L}$  de carbenicilina (100 mg/mL) y se tomaron 2  $\mu\text{L}$  de este cultivo para titular la transformación bacteriana, dejando en incubación por una hora más. Para la titulación, los 2  $\mu\text{L}$  se diluyeron en 200  $\mu\text{L}$  de SB y de aquí se sembraron 10  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$  en placa de petri con medio agar LB. Después de la hora se agregaron 4.5  $\mu\text{L}$  de carbenicilina y se dejó incubando por 1 h más en agitación. Terminado este tiempo, se agregaron 5 ml de una suspensión del fago helper M13K07 y el cultivo se pasó a un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se agregaron 185 mL de SB junto con 92.5  $\mu\text{L}$  de carbenicilina y se dejó incubando el

cultivo 2 hrs a 37°C y en agitación (300 rpm). Pasadas las 2 h, se agregaron 280 µL de kanamicina (50 mg/mL) y el cultivo se dejó en agitación toda la noche a 37°C. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó a 3,000 g por 15 min a 4°C y el sobrenadante se colocó en un matraz de 500 mL; a éste se agregaron 8 g de PEG-8000, 6 g de NaCl y se dejó en agitación a 37°C durante 5 min, después de este tiempo se dejó 30 min más en hielo. Pasados los 30 min, el medio se distribuyó en cuatro tubos falcon de 50 mL que se centrifugaron a 12,000 g por 20 min a 4°C. En seguida se descartó el sobrenadante y se dejaron secando las pastillas con los tubos invertidos sobre una toalla absorbente por 10 min. Las pastillas se re-suspendieron en un total de 2 mL de BSA al 1 % en PBS y se pasaron a un tubo de 2 mL. Este se centrifugó a 15,000 g por 5 min a 4°C, se colectó con una jeringa el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0.2 µM. La solución de fagos se dejó almacenada a 4°C.

#### **6.2.4 “Panning” de biblioteca sobre el antígeno inmovilizado.**

Con la biblioteca generada en el paso anterior se realizó la selección (panning) de las clonas con mayor afinidad hacia el antígeno blanco. En breve: 25 µl de PBS conteniendo 0.1 µg de nuestra proteína de interés (CD19) fueron colocados en 2 pozos de una placa de ELISA de 96 pozos y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente se decantó la solución del antígeno y se agregaron 150 µL de BSA al 3 % en PBS 1X, se dejó incubando la placa durante 1 h a 37°C. Trascurrido el tiempo, se decantó la solución de BSA, se agregaron 50 µL de la biblioteca de fagos recién preparada y se dejó incubando por 2 h a 37°C. Mientras tanto, se dejó creciendo una alícuota de 2 µL de las células electrocompetentes de

*E. coli* ER2537 en 2 mL de SB. Pasado el tiempo, se decantó la solución de fagos de la placa y se agregaron 150  $\mu$ L de una solución de Tween 20 al 0.5% en PBS. Esta solución fue pipeteada vigorosamente hacia arriba y hacia abajo cinco veces para eliminar los fagos no unidos fuertemente al antígeno embebido en la placa, se dejó reposando 5 min y se eliminó la solución. Esta operación fue repetida cinco veces más en la primera ronda del “panning” y en cada ronda se fueron agregando cinco lavados más. Al terminar los lavados, se agregaron 50  $\mu$ L de una solución recién preparada de tripsina de una concentración de 10 mg/mL a cada pozo. La placa se dejó incubando por 30 min a 37°C y al terminar la incubación se colectó la tripsina no sin antes agitar 10 veces para despegar la mayor cantidad de fagos unidos a la placa. El eluido fue utilizado para infectar los 2 mL de cultivo de *E. coli*, se dejó incubado a TA por 5 minutos y posteriormente se agregaron 6 mL de SB junto con 1.6  $\mu$ g de carbenicilina (100 mg/mL). El cultivo se transfirió a un tubo falcon de 50 mL y se dejó incubando por 1 hora a 37°C en agitación a 250 rpm. Antes de dejar incubando se tomaron 2  $\mu$ L del cultivo infectado y se diluyeron en 2 mL de SB. De esta dilución se sembraron 10  $\mu$ L y 100  $\mu$ L en placas de LB con carbenicilina para obtener el título de salida (Output) de la ronda en curso. Estas placas se dejaron creciendo toda la noche a 37°C. Transcurrida la hora, se agregaron 2.4  $\mu$ L de carbenicilina y se siguió incubando por 1 h más a 37°C. Durante ese tiempo se tituló el tamaño de la biblioteca en la entrada al “panning” (Input). Para esto, la biblioteca se diluyó a  $1 \times 10^8$  en SB, esta dilución se utilizó para infectar una alícuota de 50  $\mu$ L del cultivo de *E. coli* el paso anterior y se dejó 15 min a TA. Trascurrido el tiempo, el cultivo infectado fue sembrado en

una placa de LB con carbenicilina. Transcurridos la hora del cultivo de 8 mL, se agregó 1 mL del fago helper M13K07 y se transfirió a un matraz de 250 mL, se agregaron 91 mL de SB junto con 46  $\mu$ L de carbenicilina y se dejó en agitación por 2 horas a 37°C. Pasadas las 2 h se agregaron 140  $\mu$ L de kanamicina (50 mg/mL) y se dejó creciendo toda la noche a 37°C. Mientras tanto, también se dejó incubando placa con la solución de antígeno (0.1  $\mu$ g por pozo en 25  $\mu$ L de PBS) a 4°C toda la noche (para la siguiente ronda). Al día siguiente se centrifugó el cultivo a 3,000 g por 15 min a 4°C. Los fagos del sobrenadante se precipitaron agregando a un matraz limpio de 250 mL, 4 g de PEG-8000 y 3 g de NaCl. Se disolvieron las sales en el sobrenadante con agitación (300 rpm) a 37°C durante 5 min y posteriormente se colocó la suspensión en hielo por 30 min. Transcurridos los 30 min se centrifugó el sobrenadante en tubos falcon de 50 mL a 12,000 g por 20 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se dejó secando la pastilla con el tubo invertido sobre papel absorbente. Después de 10 min se resuspendieron las pastillas en 2 mL de BSA al 1 % en PBS, se centrifugaron en tubos de 2 mL a 12,000 g por 5 min y el sobrenadante se recuperó con una jeringa de 5 mL, para después ser pasado por un filtro de 0.2  $\mu$ m y almacenada la solución de fagos a 4°C. Esta preparación se utilizó para la siguiente ronda de selección hasta completar cuatro rondas.

### **6.2.5 Tamizaje de clonas vNAR positivas.**

Después de cumplidas 4 rondas de selección, se realizaron PCRs de colonia en las placas recuperadas de la elución del “panning” (output) para analizar si las colonias eran positivas para secuencias del tipo vNAR. Las PCRs se realizaron

utilizando primers que se unen a regiones flanqueantes al sitio de inserción del vector (pComb3X) [75]. En breve, en un tubo de 0.2 mL se colocaron 25  $\mu$ L de Gotaq mastermix, 1  $\mu$ L de “forward primers” (1  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de “reverse primer” (1 $\mu$ M), 3  $\mu$ L de agua. Se levantaron colonias con una pipeta y se re-suspendieron en este mix, agitando sobre las paredes del tubo para asegurarse de que no quedaran células en la punta de la pipeta. Esa misma colonia se re-sembró en un placa nueva para poder identificarla en caso que fuera positiva para la PCR. El mix se incubó en las mismas condiciones utilizadas en la etapa 6.2.3.2. Una vez que se determinaron las colonias positivas para un fragmento de aproximadamente 600 pb, se tomaron de la placa donde se habían re-sembrado y se dejaron creciendo en LB toda la noche a 37°C. Al día siguiente se realizó la extracción el ADN plasmídico siguiendo el protocolo de Miniprep del manual Sambrook [76]. Obtenidos los ADN plasmídicos, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se cuantificaron. Las muestras se ajustaron a una concentración a 1  $\mu$ g en 12  $\mu$ L de agua y se mandaron a secuenciar.

#### **6.2.6 Expresión de clonas con secuencias vNAR íntegras y scFv anti-CD16.**

Los plásmidos con una secuencia vNAR integrada en el pComb3x, fueron transformados en la cepa de *E. coli* BL21 para llevar a cabo la expresión, además del plásmido pUC119, el cual contiene la secuencia codificante para la proteína scFv anti-CD16. Brevemente, una vez transformadas por choque térmico y sembradas en LB agar con carbenicilina, se levantaron colonias para dejarlas creciendo toda la noche. Al día siguiente, esta semilla fue utilizada para sembrar en 50 mL de SB y se dejó crecer el cultivo a 37°C en agitación de 250 rpm hasta

llegar a una D.O.<sub>600</sub> de 0.4-0.6. Alcanzada esta densidad se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y el cultivo se dejó creciendo a TA por 24 h en agitación a 300 rpm. Transcurridas las 24 h, se procedió a extraer la proteínas del espacio periplásmico, siguiendo el protocolo descrito por Minsky et al, [77]. Para comprobar la inducción se realizaron ensayos de ELISA utilizando como anticuerpo primario un anti-His marcado con HPR. Para el revelado se utilizó TMB. Otra forma de visualizar la inducción de las clonas fue mediante Western-Blot. Para ello, las muestras extraídas fueron precipitadas con Metanol:Clorformo (600 µl: 450 µl) y re-suspendidas en buffer de carga, las cuales fueron corridas en un gel acrilamida al 12 % durante 2 h a 110 V. Posteriormente, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a un membrana de nitrocelulosa mediante una transferencia semi-seca utilizando el Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-rad), la cual se realizó por 2 h a 18 V utilizando el buffer Towbin. Posterior a la trasferencia, la inmunodetección se realizó usando el mismo anticuerpo para el ELISA pero esta vez el relevado se realizó con el reactivo Color-Developer Reagent de Bio-rad agregándole 40 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Una vez que se comprobó la expresión de los vNARs, se procedió a su purificación por medio de una cromatografía de afinidad sobre una resina de Ni-NTA. En breve, los extractos fueron mezclados con la resina e incubados por 1 h a 4°C en agitación. Posteriormente, la mezcla fue cargada en una columna de plástico (Biorad) y se dejó asentar para separar la resina del extracto. Luego se destapó la columna para dejar eluir la fracción con la proteína no unida y posteriormente se lavó con 10 volúmenes de buffer de equilibrio, seguido de un lavado con el buffer de

lavado. Al terminar los lavados, la proteína unida a la resina se eluyó con 4 lavados de medio volumen de buffer de elución. Las fracciones recuperadas fueron dializadas contra PBS 1X y se guardaron a -20°C para usarse en los ensayos de funcionalidad.

## **6.2.7 Ensayos de funcionalidad de las vNARs expresados.**

### ***6.2.7.1 Crecimiento de células tumorales.***

Para los ensayos de reconocimiento se trabajó con líneas celulares SUDHL-4 y OCI-Ly7, que son líneas de un tipo de linfoma difuso de células grandes B (LDCGB), las cuales fueron donadas amablemente por el Dr. Luis Villela de la cátedra de Hematología y Cáncer del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Se crecieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SBF y en incubadora con atmosfera al 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C. Los pasajes se realizaron cada 48 h y consistían en centrifugar el cultivo a 300 g por 5 min a TA, desechar el sobrenadante y re-suspender las líneas en medio fresco.

### ***6.2.7.1 Aislamiento y caracterización de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).***

El aislamiento de PBMC se realizó mediante centrifugación en gradiente utilizando el reactivo Histopaque-1077. De manera breve, 3 mL del Histopaque-1077 fueron colocados en un tubo de falcon de 15 mL. Después de esto, fueron colocados lentamente 3 mL de sangre periférica (tomada en un tubo con EDTA, tapa morada) en la parte superior del histopaque, lentamente para no mezclar la sangre con el reactivo. Posteriormente se centrifugó el tubo por 30 min a una velocidad de

400 g a TA. Terminada la centrifugación, se eliminó la fase superior y se transfirió la interface (Buffy coat) a un tubo falcon de 15 mL nuevo. Se lavó 3 veces con 10 mL de PBS 1X (en cada lavada se centrifugó a 250 g por 10 min). Finalmente, las células fueron re-suspendidas en 2 mL de PBS.

### **6.2.7.3 Ensayos de reconocimiento celular.**

Para ver la capacidad de reconocimiento de los vNARs y del scFv anti-CD16, se realizaron ensayos de citometría de flujo. Para estos análisis, se colocaron  $1 \times 10^6$  células (Ly7, SUDHL-4, NIH 3T3 y PBMC) en tubos para citometría (BD) y se lavaron dos veces con PBS. Después, a los lavados se agregaron 50  $\mu$ L de las fracciones de vNARs producidos y dializados y se dejaron incubando a 4°C por 1 h en oscuridad, después de lo cual se lavaron dos veces más las células y se agregaron 10  $\mu$ L de un anti-His marcado con PE (BD). Se dejó incubando en oscuridad a TA por 30 min y una vez transcurrido el tiempo se lavó una vez con PBS y se resuspendió en FACSCFlow. Las muestras fueron leídas en el FACSCano II de la compañía Beckton-Dickinson. Como control positivo de tinción se utilizó un anti-CD19 marcado con PE y como control negativo se utilizó PBS.

## **6.2.8 Generación de anticuerpo bi-específico.**

### **6.2.8.1 Amplificación de secuencias vNAR.**

Las secuencias vNAR que tuvieron cierta capacidad de reconocimiento fueron insertadas en el vector pUC119. Esto para generar la unión del scFv con el vNAR mediante un link polipeptídico con la secuencia (GGGS)<sub>4</sub>. En breve, mediante primers dirigidos contra las regiones 5' y 3', se insertaron los sitios de restricción

*Nde* I y *Xho* I, los cuales se encuentran en el pUC119 en la región 3' para así permitir la generación de la secuencia scFv-(GGGGS)<sub>4</sub>-vNAR. Para esto, en un tubo de 0.2 mL se agregaron 25 µL del mastermix Gotaq, 1 µL de “forward” y “reverse primers” (1 µM), 21 µL de agua miliQ y 2 µL del ADN plasmídico (500 ng). La reacción fue incubada a 94°C por 5 min seguido de 30 ciclos de 94°C por 45 s, 65°C por 30 s y 72°C por 45 s, para terminar con una extensión final de 72°C por 5 min.

#### **6.2.8.1 Digestión y ligación de vNAR con pUC119.**

Los productos de la PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 2 %; para posteriormente digerirlos junto con el pU119 con las enzimas *Nde* I y *Xho* I. La reacción de digestión se realizó con 2 µL de buffer 3, 2 µL de BSA 10X, 0.25 µL de *Xho* I, 0.25 µL de *Nde* I, 5 µL de PA, 5 µL de pUC119 y 14.5 µL de agua miliQ. La reacción se dejó incubando a 37°C toda la noche. Al día siguiente, la digestión fue visualizada en gel de acrilamida al 1.5 %. Una vez que se comprobó la digestión de vNARs y el pUC119, se realizó una ligación para insertar los vNARs dentro del pUC119. En un tubo de 0.2 mL se agregaron 2 µL de buffer de ligasa 10X, 1 µL de ligasa (10 U), 10 µL de la reacción de digestión y 8 µL de agua miliQ. Esta reacción se dejó incubando a TA toda la noche y al día siguiente se analizó en un gel de agarosa al 1.5 %.

#### **6.2.8.1 Tamizaje de clonas con anticuerpo bi-específico**

Las reacciones de ligación anteriores fueron transformadas en la cepa de *E. coli* BL21 y sembradas en agar LB con carbenicilina. Al día siguiente se realizaron PCRs de colonia para evaluar si las clonas tenían el inserto del tamaño

correspondiente, utilizando los mismos primers y condiciones de reacción usadas para amplificar el vNAR. Las clonas que amplificaron se mandaron secuenciar para comprobar la inserción del vNAR dentro de pUC119 y la formación de anticuerpo bi-específico.

#### **6.2.8.2 Expresión de las clonas con anticuerpo bi-específico.**

La producción y extracción de las proteínas bi-especificas se realizaron siguiendo los mismos pasos que en la sección 5.2.6

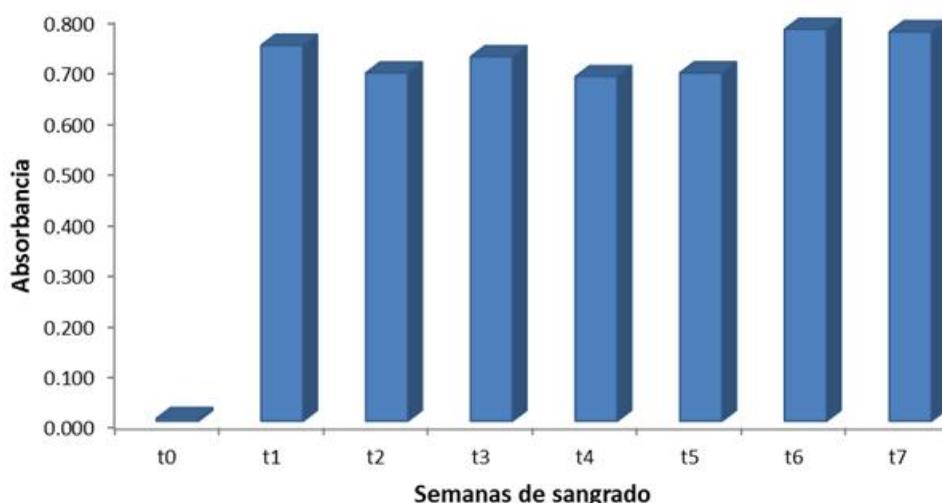
#### **6.2.9 Ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).**

Para analizar si el anticuerpo era capaz de re-direccionar la citotoxicidad de las células efectoras hacia las células blanco, se utilizó la línea celular de linfoma SUDHL-4 (CD19 positivas), la cual se dejó incubando con células mononucleares aisladas de sangre periférica (PBMCs) a diferentes relaciones de células efectoras: células blanco (E:B) y diferentes concentraciones de nuestro anticuerpo bi-específico. En breve, se colocaron 10,000 células en pozos de placas de ELISA por triplicado con diferentes concentraciones de células efectoras (PBMC) desde 10,000 hasta 500,000. Se agregaron 50 µL del extracto del anticuerpo bi-específico; en el caso del Rituximab, se agregó una concentración final de 10 µg/mL, las células se dejaron incubando por 4 h y posteriormente se agregaron 20 µL del reactivo revelador para detectar la concentración de la lactato deshidrogenasa y se midió por espectrofotometría. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y utilizando como control positivo el Rituximab comercial.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1 Inmunización de tiburones.

En las muestras de sangrado tomadas 7 días después de cada refuerzo con el antígeno, se pudo observar la respuesta del tiburón hacia la proteína desde la semana posterior a su primera inmunización. Con este resultado se pudo proceder a la siguiente etapa, la cual consistió en el aislamiento de los vNARs (Fig. 10).

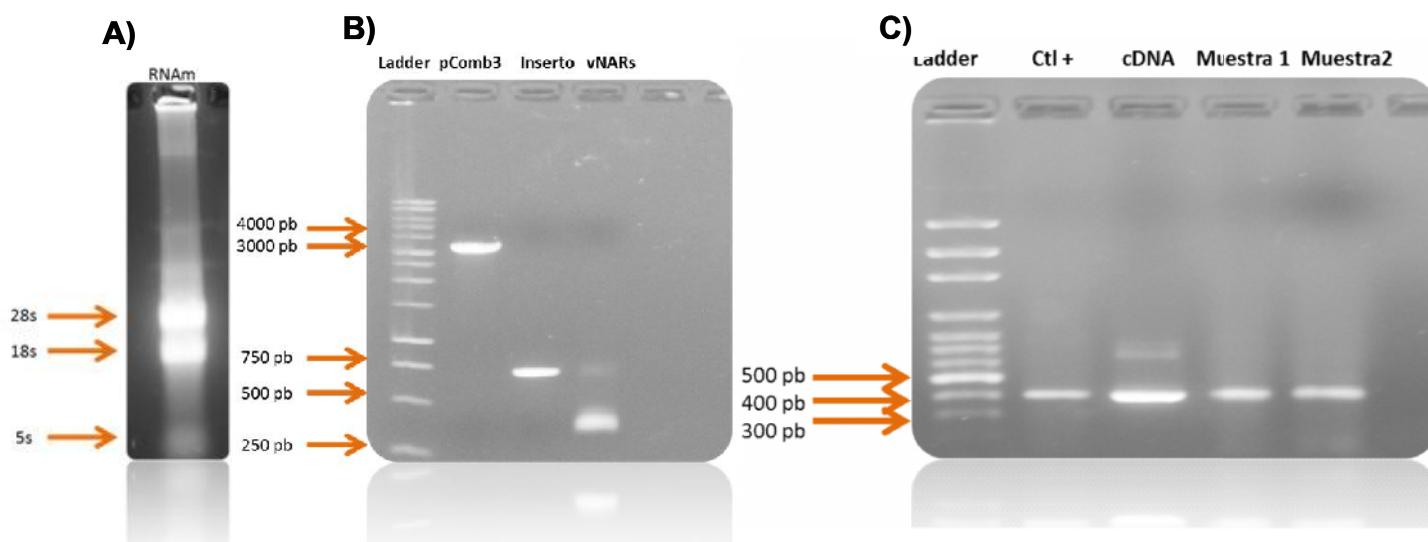


**Figura 10. Respuesta del tiburón hacia el antígeno.** Análisis por ELISA para monitorear el incremento de las IgNARs mediante un anticuerpo de gallina dirigido contra estas inmunoglobulinas del tiburón.

### 7.2 Aislamiento de secuencias del tipo vNAR.

Se aisló el bazo del tiburón inmunizado, el cual fue utilizado para extraer los linfocitos B y aislar el ARN total, el cual se obtuvo con un buen rendimiento y de alta calidad, lo cual quedó demostrado en su análisis de electroforesis en gel de agarosa (Fig. 11). A partir de del ARN se logró sintetizar el ADNc, el que a la vez

fue usado como templado para amplificar los dominios variables de las IgNARs del tiburón. A los productos de amplificación se les constató un tamaño aproximado de 350 pb, pudiendo variar de acuerdo a las secuencias de los distintos tipos de vNARs. La ligación de estos productos amplificados con el vector no se analizó por electroforesis en gel de agarosa por lo limitado de su cantidad, siendo recomendable destinarla en su totalidad para la generación de biblioteca, por lo que no se muestra imagen alguna de esta reacción.

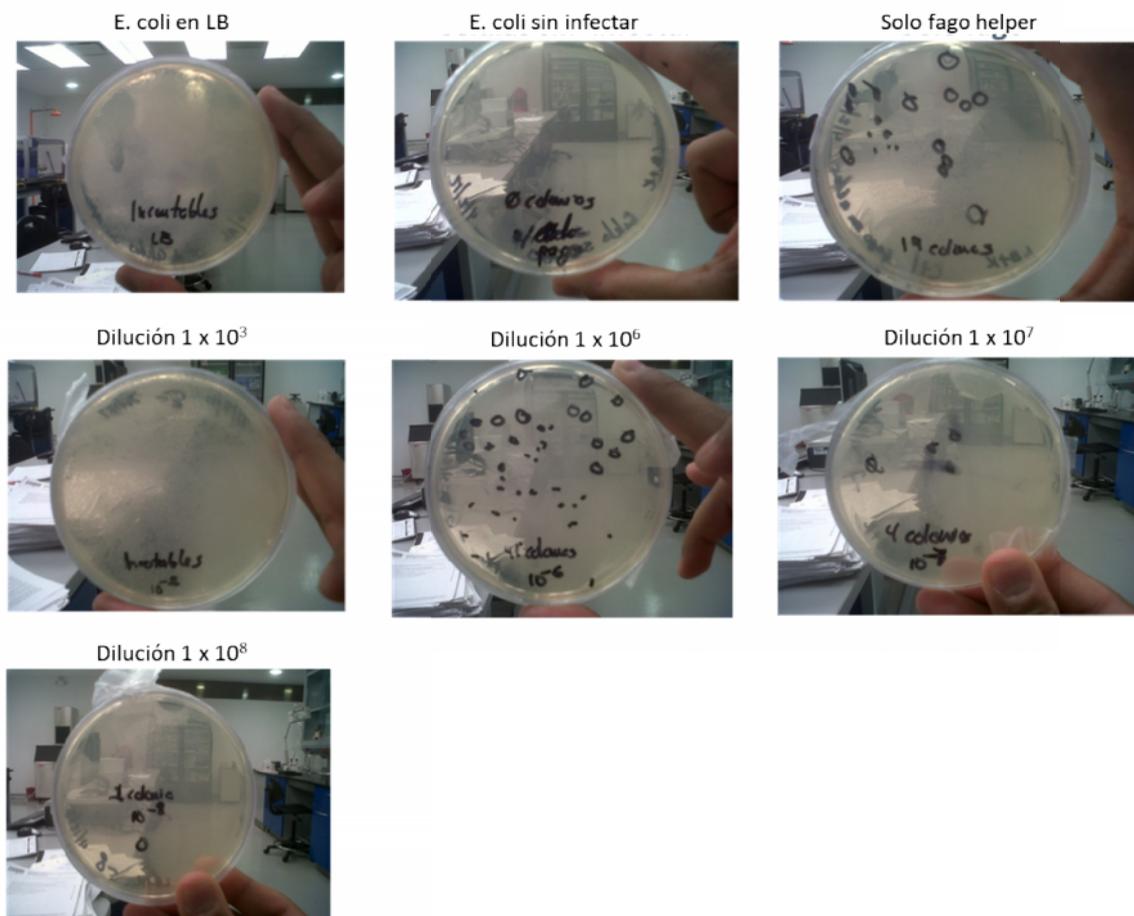


**Figura 11. Aislamiento de vNARs.** Imágenes de geles de agarosa con las diferentes etapas de la generación de la biblioteca. A) gel del ARN total extraído del bazo del tiburón. B) comprobación de la amplificación de los vNARs a partir del ARNm mediante PCR. C) Digestión del vector fagémido pComb3X y de los vNARs con la enzima *Sfi* I, previo a su ligación. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

### 7.3 Generación de la biblioteca de vNARs.

La ligación de los vNARs dentro del vector pComb3X y su posterior transformación en la cepa de *E. coli* ER2537, arrojó una biblioteca de una complejidad de  $1.5 \times 10^8$  ufc/ $\mu$ g de ADN transformado. El control negativo (células de *E. coli* sin infectar con el fago) no mostró colonia alguna, indicando que la cepa estaba libre de

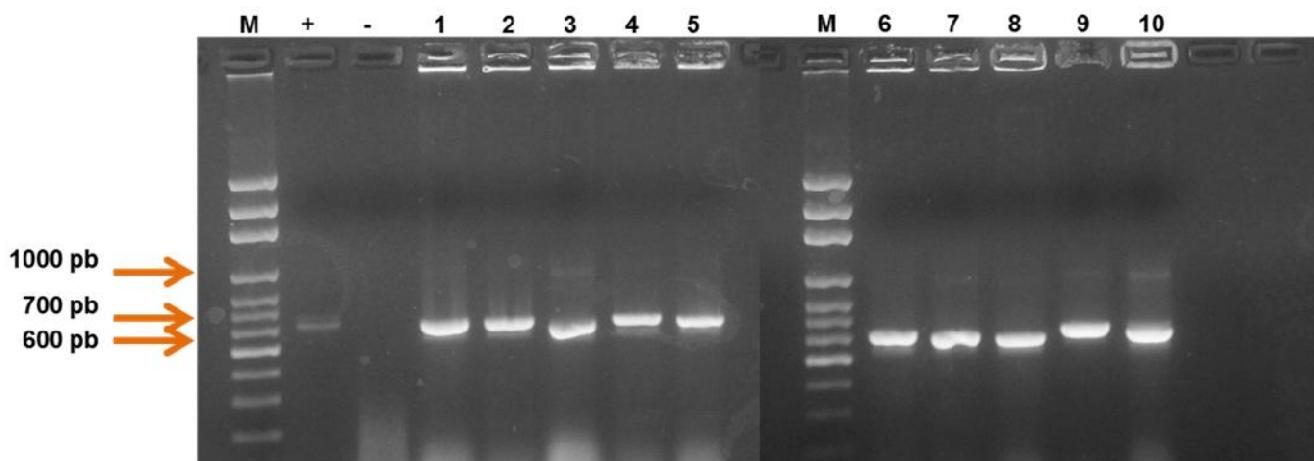
contaminación con alguna bacteria infectada con el fago en cuestión o alguno otro fago residual de otros “panning” realizados anteriormente en el laboratorio. Por otro lado, en el control en donde sólo se sembró la solución de fago helper se observaron 19 colonias, lo que indicó que la preparación de fagos tenía una mínima cantidad de bacterias arrastradas desde su preparación. Aún cuando se encontraron colonias, el número resultó muy bajo (19 colonias), lo que se puede descartar como problema serio ya que el volumen tomado para esta placa fue directo de la solución de fagos; es decir, no se diluyó, lo que indica que el nivel de contaminación es en efecto muy bajo y por tanto despreciable. En el caso de las bacterias infectadas con diferentes concentraciones de la biblioteca, se puede constatar también que a partir de la dilución mayor realizada ( $1 \times 10^8$ ) se observó el crecimiento de una o muy pocas colonias y en las diluciones menores el número de éstas fue aumentando (Fig 12).



**Figura 12. Título de la biblioteca.** Imágenes de cada una de las placas sembradas a la hora de evaluar el tamaño de la biblioteca, resultante de transformar la cepa bacteriana con la ligación de los productos de la PCR para VNARs y el vector fagémido.

Antes de empezar el proceso de selección (panning), se levantaron algunas de las colonias para confirmar la proporción de éstas que portaban un inserto del tamaño correspondiente a la secuencia de los vNARs, mediante PCR utilizando “primers” dirigidos contras zonas que flanquean el sitio de inserción del pComb3X, cuyo tamaño cuando hay un inserto es aproximadamente de 650 pb. Esto con la finalidad de corroborar la identidad de la biblioteca y no sólo su complejidad. Como se puede observar en la figura 13, de las 10 colonias que se levantaron, las 10

fueron positivas en el tamizaje por PCR, pudiéndose además observar una ligera diferencia en los tamaños de los fragmentos, lo que indica que las clonas son distintas entre sí a causa de los diversos vNARs que guardan en su genoma.



**Figura 13. Tamizaje de colonias previo al despliegue de fagos.** Imágenes donde se puede observar un fragmento de aproximadamente 650 pb, correspondiente a la secuencia de un vNAR típico, más parte del vector fagémido amplificado con los primers OmpA y gback. Las bandas amplificadas presentan ligeras diferencias en sus tamaños. M = marcador de 100pb, + = control positivo, - = control negativo, 1-10 = colonias analizadas. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

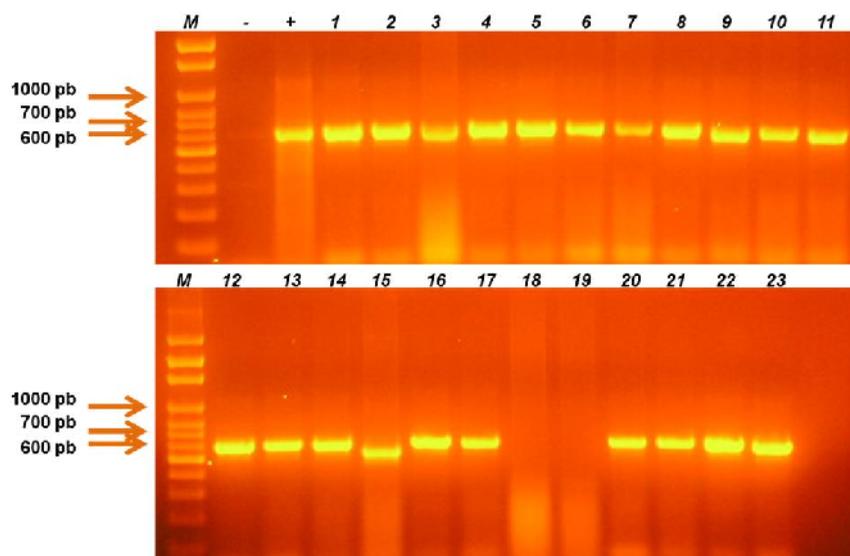
#### 7.4 Selección de vNARs con afinidad hacia nuestro antígeno blanco.

La biblioteca generada con un tamaño de  $1.5 \times 10^8$  ufc/ $\mu$ g fue sometida a un proceso de selección usando como “anzuelo” a la proteína recombinante CD19. Durante cada ronda de selección se obtenían los títulos de los fagos que entraban (Input) y los fagos que salían al recuperar la elución (Output). Como se puede observar en el cuadro 2, los títulos de “entrada” estaban en el orden de  $10^{12}$ - $10^{13}$ , mientras que los de “salida” (posterior a los lavados) se encontraron en el orden de  $10^5$ .

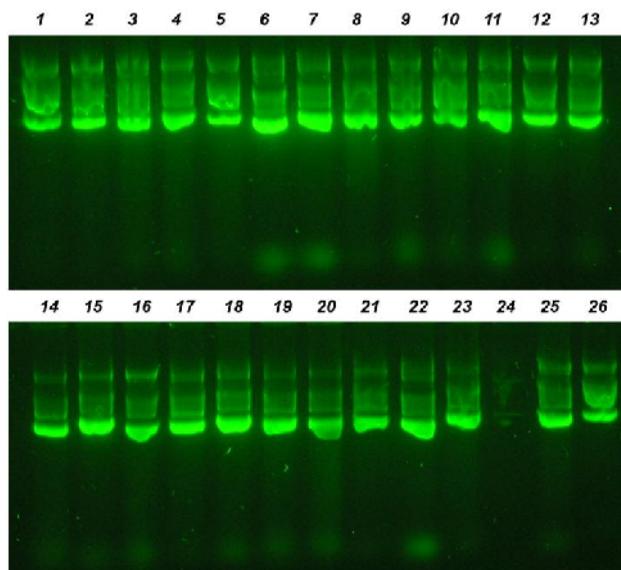
**Tabla 2. Títulos de entra y de salida durante las cuatro rondas del “panning”.**

Ronda	Etapa	Título
<b>Ronda 1</b>	Entrada	$1.8 \times 10^{12}$ ufc/ml
	Salida	$1.92 \times 10^5$ ufc totales
<b>Ronda 2</b>	Entrada	$3.47 \times 10^{13}$ ufc/ml
	Salida	$4.82 \times 10^5$ ufc
<b>Ronda 3</b>	Entrada	$4.5 \times 10^{12}$ ufc/ml
	Salida	$4.05 \times 10^5$ ufc
<b>Ronda 4</b>	Entrada	$3.06 \times 10^{12}$ ufc/ml
	Salida	$5.52 \times 10^5$ ufc

Realizadas las cuatro rondas de selección, se efectuaron PCRs para analizar las colonias que contenían las secuencias tipo vNARs en sus genomas. Como se puede observar en la figura 14, de las 23 colonias analizadas, 21 fueron positivas para un fragmento de alrededor de 650 pb, con ligeras diferencias en sus tamaños, similar a lo observado en la etapa de análisis de la calidad de la biblioteca. Estas colonias se dejaron creciendo en medio líquido (LB) durante la noche y al día siguiente se extrajo el ADN plasmídico, para mandar a secuenciar el fragmento de 650 pb (Fig 15).

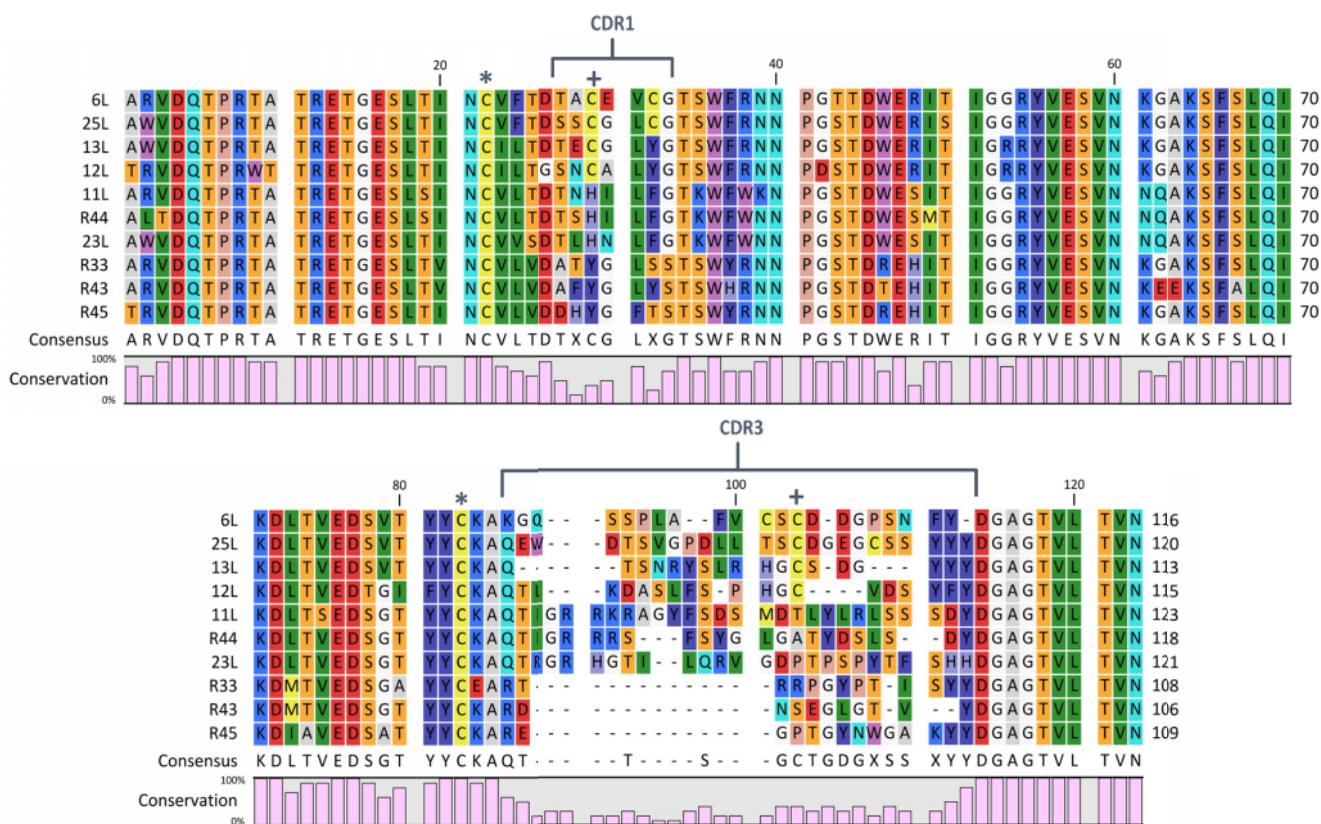


**Figura 14. Tamizaje de colonias posterior al despliegue de fagos.** Visualización de los fragmentos de aproximadamente 650 pb, correspondientes secuencias del tipo vNAR con una parte del vector fagémido amplificado con los primers *OmpA* y *gback*. Las bandas presentan una ligera diversidad en tamaño, lo cual representa la variabilidad de las colonias aisladas. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.



**Figura 15. ADN plasmídico aislado de colonias vNAR positivas.** Las clonas positivas para el fragmento de vNAR fueron crecidas y se aisló el plásmido de estas, con la finalidad de mandar a secuenciar y conocer la identidad (secuencia nucleotídica) de las clonas aisladas mediante el panning. Gel de agarosa al 1.0 % teñido con syber green.

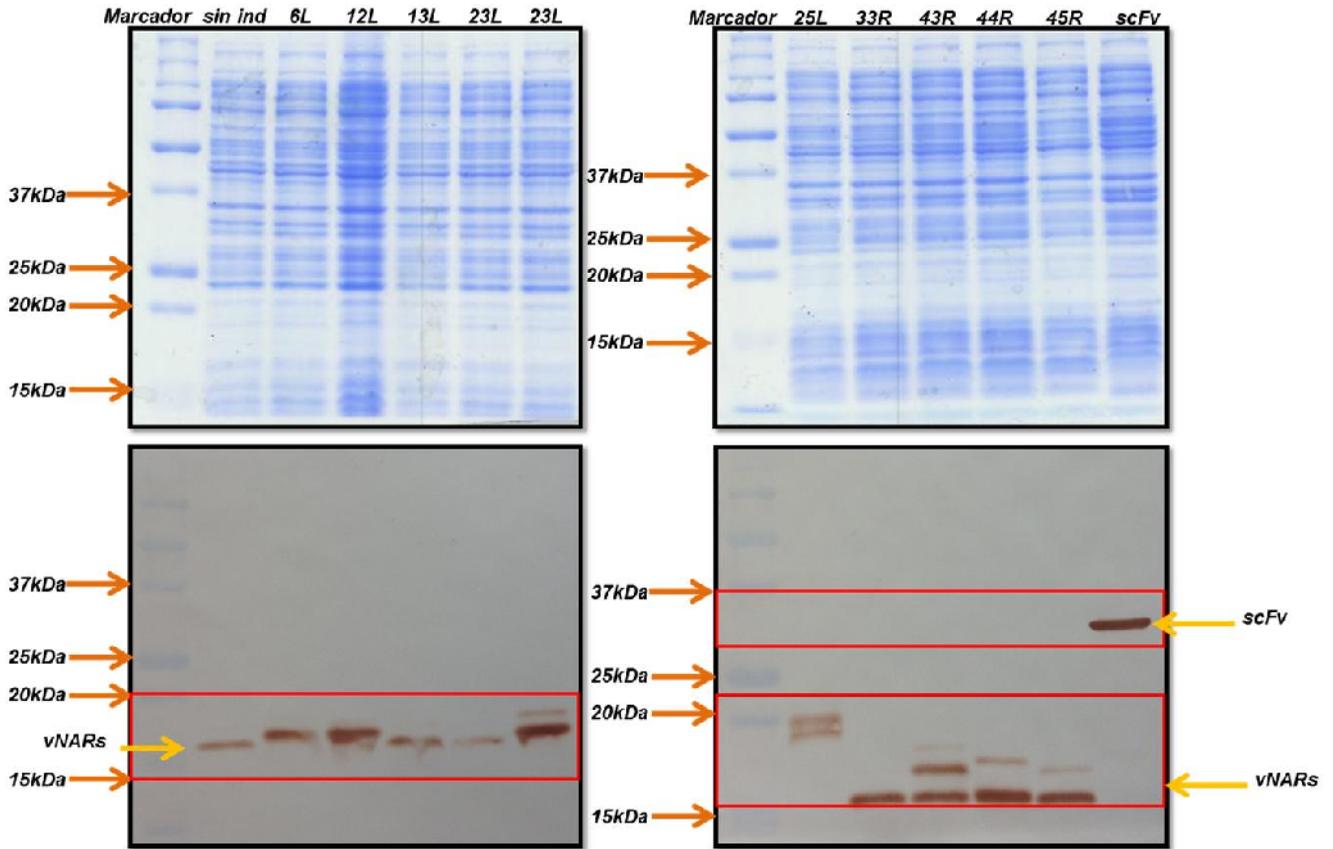
Las secuencias de los insertos de diferentes clonas mostraron similitudes y diferencias (ver anexo). Una vez que sus codones se tradujeron a aminoácidos se pudieron observar las características canónicas de una secuencias tipo vNAR (Fig. 16). Por un lado, poseen las regiones de variabilidad correspondientes a las CDR1 y CDR3, esta última de mayor tamaño y con una mayor variabilidad, lo que las hacen muy buenas candidatas a tener algún grado de reconocimiento y afinidad por la proteína blanco de interés. Además, poseen cisteínas en las posiciones 22 y 83, las cuales son también características de las secuencias vNARs antes reportadas.



**Figura 16. Secuencias aminoacídicas de vNARs.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las clonas secuenciadas, donde se marcan las regiones de hipervariabilidad CDR1 y CDR3. Esta última con una longitud considerable y variable.

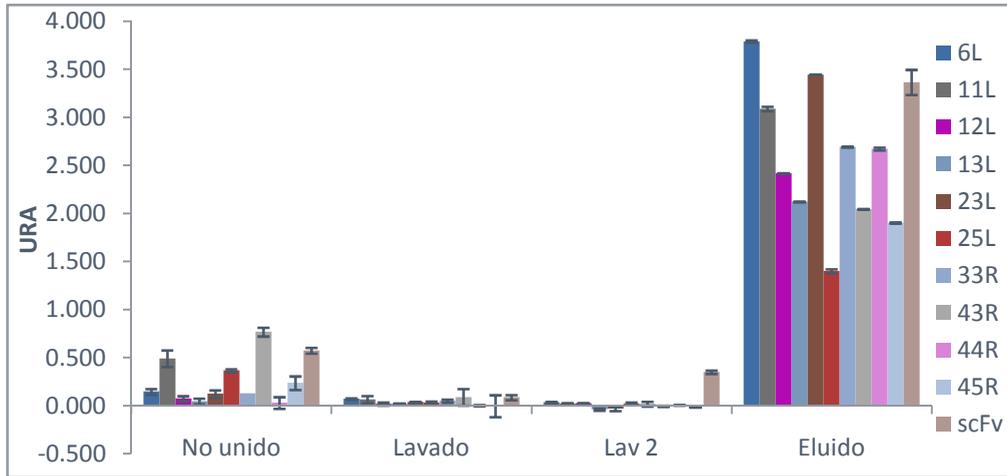
## **7.5 Expresión de clonas con secuencias vNAR íntegras y scFv anti-CD16.**

Los plásmidos con una secuencia íntegra fueron transformados en la cepa BL21 de *E. coli* y para cultivar biomasa fueron sometidos a inducción con IPTG para activar la expresión del vNAR recombinante. Para visualizar la expresión de las proteínas, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y con estos se practicó western blot (WB) contra la cola de histidinas que fue insertada en los vNAR por el vector fagémido (Fig 17). Una vez que se observó la inducción por parte de las clonas seleccionadas, se procedió a la obtención primero y a la purificación después de las proteínas del periplasma, usando cromatografía de afinidad por metales inmovilizados en contra de la cola de histidinas.

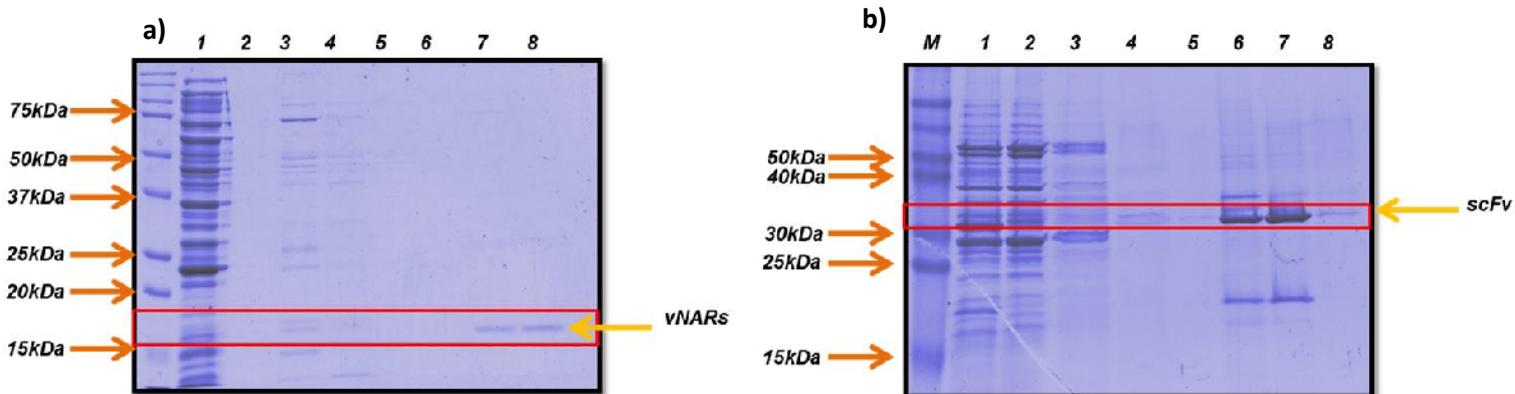


**Figura 17. Inducción de vNARs y scFv.** Visualización de los perfiles proteicos de las clonas inducidas. a) geles de poliacrilamida al 12 %, donde se descarta la banda correspondiente a las proteínas de interés, b) inmunodetección de las proteínas por wester blot donde se pueden apreciar las proteínas tipo vNARs, cuyo peso aproximado es de 17 kDa y del scFv cuyo tamaño es aproximadamente de 32 kDa.

Las proteínas periplasmáticas fueron mezcladas e incubadas con la resina de agarosa Ni-NTA, para permitir la unión de los residuos de la cola de histidinas con el metal de la resina. Los extractos en la elusión final fueron recuperados y analizados mediante ELISA para evaluar la cantidad de proteína presente en las fracciones finales recuperadas. Como se puede observar en las figuras 18 y 19, se logran ver las cantidades de la proteína de interés (vNAR) en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación.



**Figura 18. Rastreo por ELISA de vNARs recombinantes.** Comportamiento del proceso de purificación por afinidad de las proteínas vNARs, donde se logra observar que las proteínas son eluidas en las cuatro fracciones finales. Estas fracciones se mezclan y de aquí se tomó para realizar el ELISA.

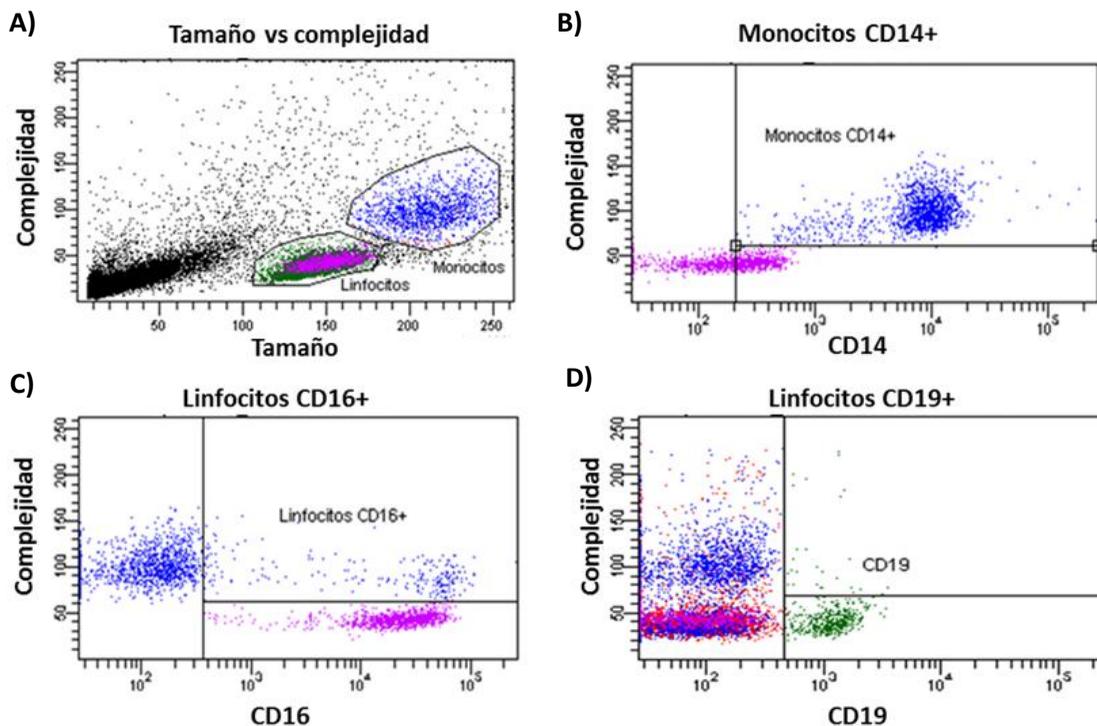


**Figura 19. Purificación de los extractos periplasmáticos.** Fracciones obtenidas durante el protocolo de purificación de los extractos periplasmáticos. a) purificación de uno de los diez vNARs aislados en el “panning”, cuyo tamaño anda alrededor de los 16 kDa. b) purificación del scFv, el cual tiene un tamaño aproximado teórico de 32 kDa. M = marcador de peso molecular, 1 = Extracto periplasmático; 2 = fracción no unida a la resina; 3 = Lavado 1 (20 mM de imidazol); 4 = Lavado 2 (50 mM de imidazol); 5-8 = fracciones de elución (250 mM de imidazol). Gel de poliacrilamida SDS al 12 %.

Las fracciones con la proteína purificada fueron utilizadas dializadas contra PBS y posteriormente empleadas para realizar los ensayos de reconocimiento celular.

## 7.6 Ensayos de reconocimiento celular.

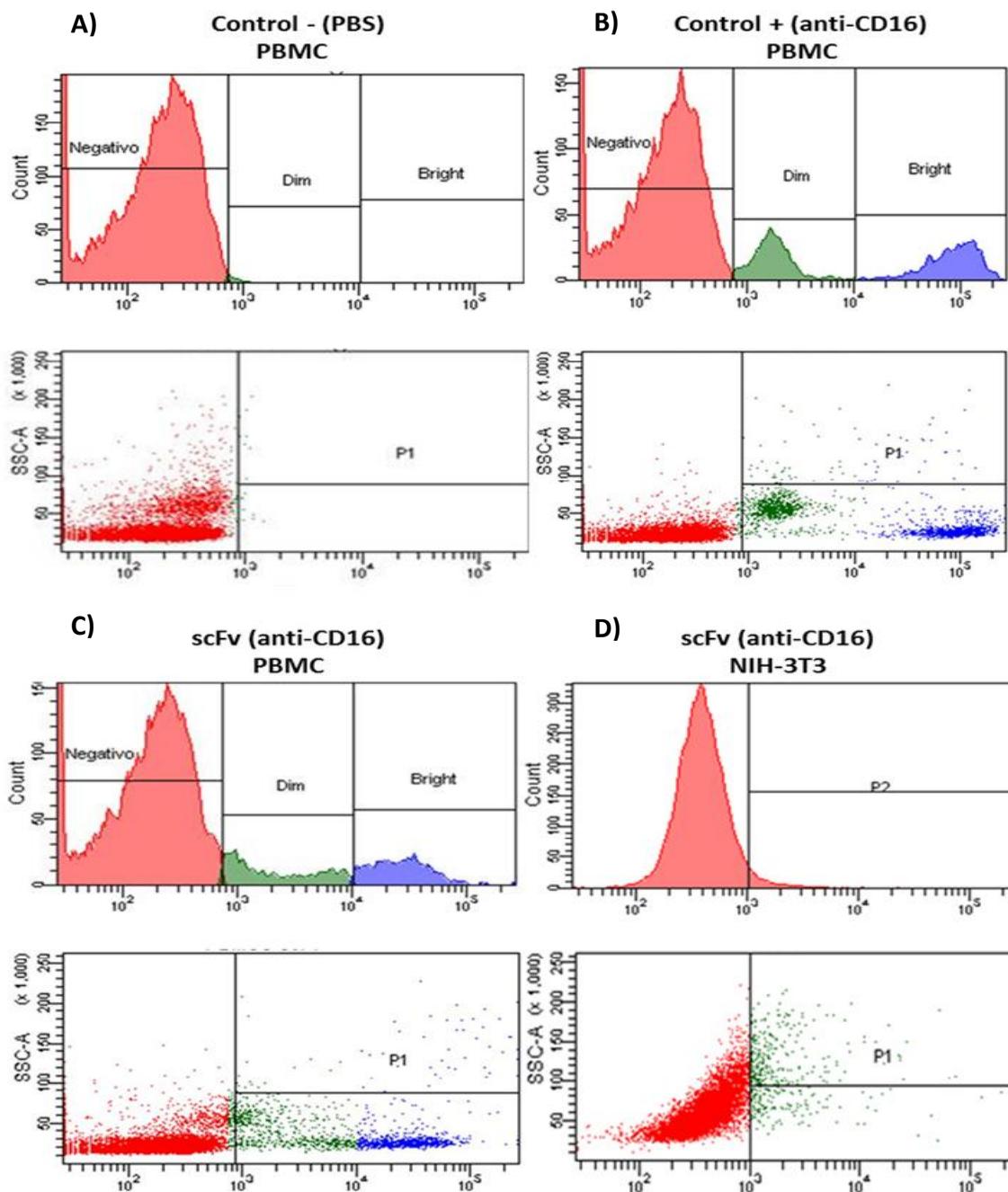
Antes de llevar a cabo los ensayos de reconocimiento celular con las proteínas aisladas, se procedió a comprobar la presencia de las proteínas de interés (CD16 y CD19) en las poblaciones de linfocitos aislados de sangre periférica. Como se puede observar en la figura 19, las PBMCs presentan dos poblaciones diferentes en tamaño y complejidad, las cuales corresponden a los linfocitos y a los monocitos (Fig 20). Lo anterior es corroborado al observar la presencia de la expresión de la proteína CD19 en el caso de los linfocitos (población en verde, Fig 20D), mientras en el caso de los monocitos la positividad es para la presencia del marcador de superficie CD14 (población en azul, Fig. 20B), además ambas poblaciones expresan la proteína de superficie CD16 (Fig. 20C).



**Figura 20. Caracterización inmunofenotípica de PBMCs.** Citogramas (dot-plot) de PBMCs. A) disposición espacial de los monocitos y los linfocitos en base a su tamaño y su complejidad. B) expresión de CD14 en la población de monocitos. C) expresión de CD16 en la población de linfocitos. D) expresión de CD19 en un grupo de linfocitos B.

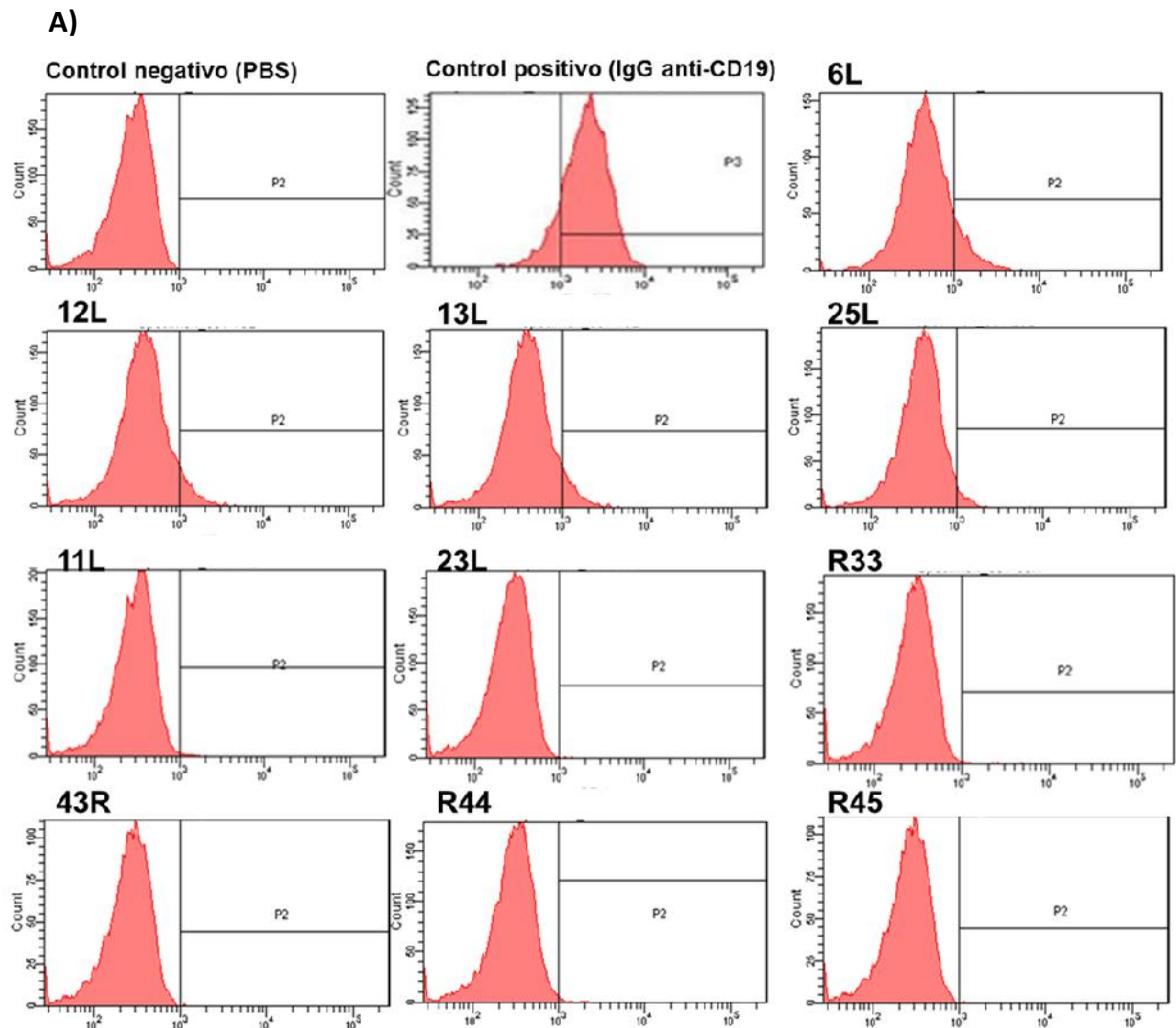
Con las proteínas purificadas se realizaron ensayos a fin de verificar la capacidad de éstas para reconocer su molécula blanco, mediante citometría de flujo. En el caso del scFv anti-CD16 se utilizaron PBMCs para evaluar si el fragmento de anticuerpo se podía unir hacia la proteína CD16 expresada en los linfocitos B y NK, empleando células NIH3T3 (fibroblastos de ratón) como control negativo; mientras que los vNARs obtenidos del “panning”, se utilizaron contra células CD19 positivas: por una lado dos líneas celulares de linfoma y por el otro linfocitos aislados de sangre periférica, recurriendo también a fibroblastos de ratón (CD19-) como control negativo.

En el caso del scFv anti-CD16, se logró observar que el fragmento era capaz de reconocer dos poblaciones dentro de las PBMCs. Esto se puede deducir por la diferencia en intensidad de la señal emitida por anticuerpo secundario anti-His por parte de cada población. Es decir, una población es CD16 “dim” mientras que la otra es CD16 “bright”; comportamiento que es igualmente observado en el control positivo, que en este caso fue una IgG anti-CD16 (Fig. 21). Por su parte, se logró demostrar la especificidad de la molécula ya que no fue capaz de unirse a las células NIH 3T3, comportamiento equivalente al control negativo en donde se utilizó PBS en lugar de la molécula.

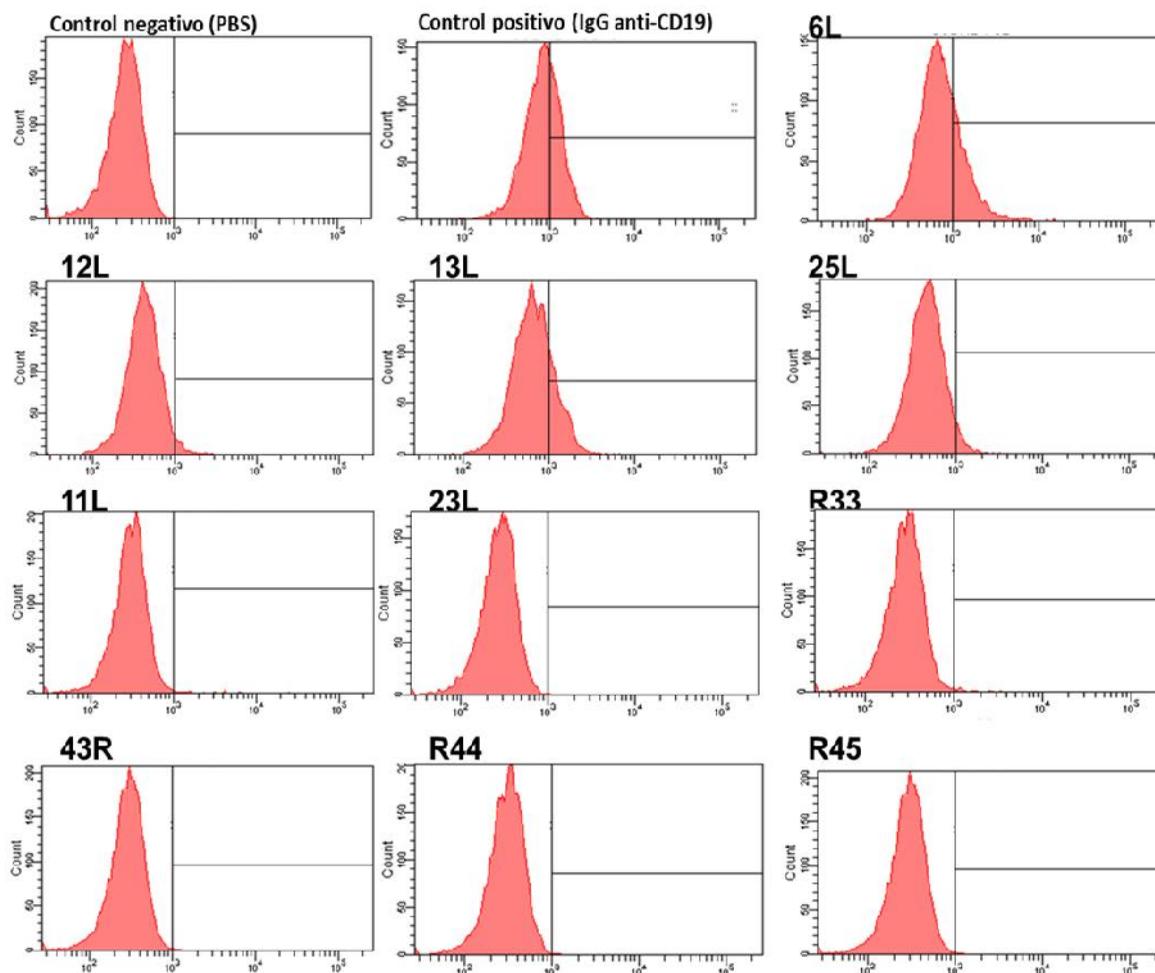


**Figura 21. Caracterización funcional del scFv anti-CD16.** Citogramas de la evaluación funcional del scFv anti-CD16, A) PBMCs sin marcar, solo se utilizó PBS, B) PBMCs marcadas con un anti-CD16 comercial marcado con PE y donde se logra observar como las poblaciones CD16 positivas se colocan a la derecha C) PBMCs marcadas con el scFv anti-CD16 a evaluar y donde se observa el mismo comportamiento que utilizando en anticuerpo comercial, D) NIH 3T3, la cual es una línea celular CD16 negativa y en donde al marcar con el scFv no se logra ver señal alguna.

En el caso de la capacidad de reconocimiento de los vNAR recombinantes, se observó que cuatro moléculas, las de las clonas 6L, 12L, 13L, y 25L, mostraron un ligero grado de reconocimiento hacia las células tumorales, comparado con el control negativo en donde se puede observar la falta señal (Fig. 22). Pero en mucho menor grado con respecto a la intensidad de la señal del control positivo (IgG anti-CD19), donde se puede observar el desplazamiento de la curva hacia la derecha. Es decir, cuatro de las diez clonas mostraron cierto grado de unión hacia el antígeno presente en las células tumorales, mientras que las seis restantes se comportan igual que el control negativo, fallando en emitir señal alguna.



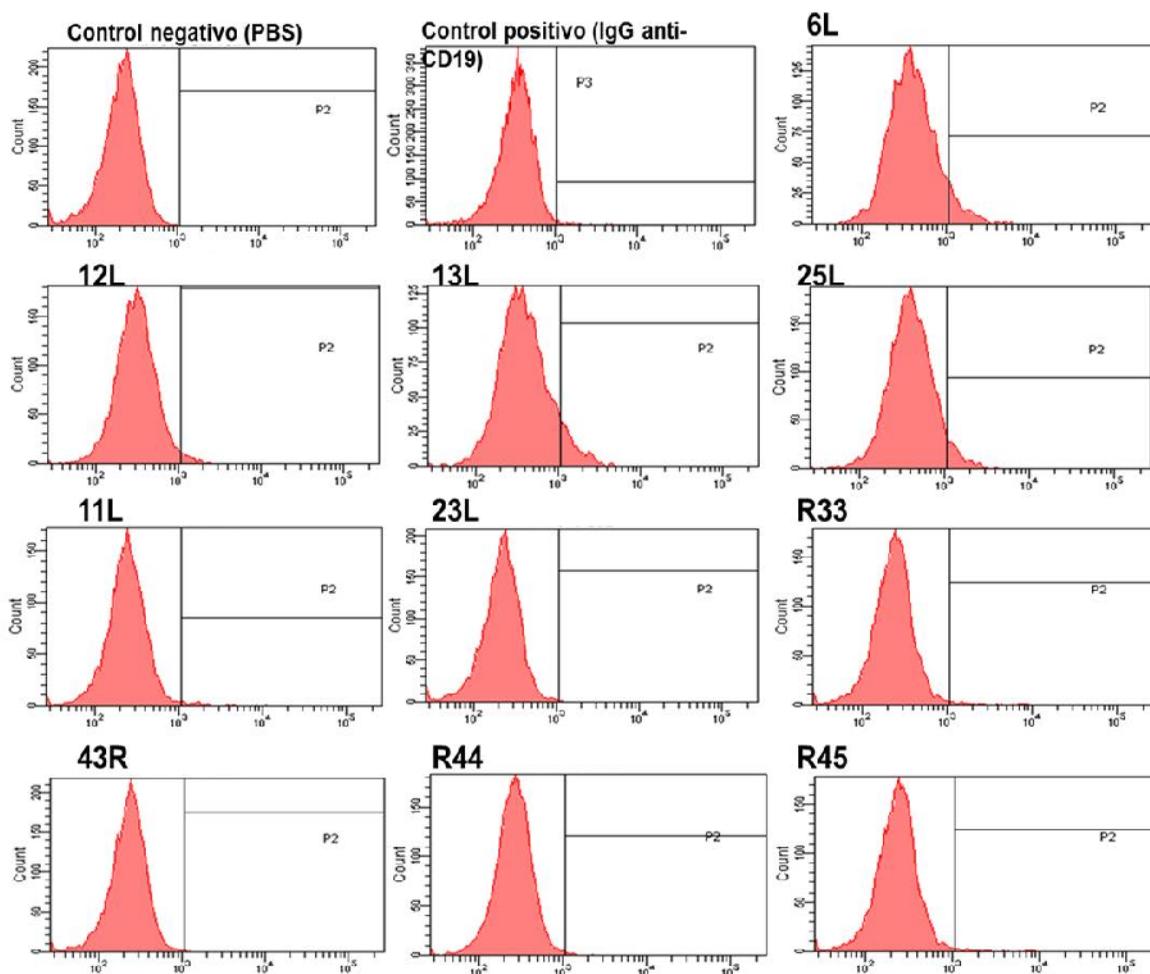
B)



**Figura 22. Caracterización funcional de los vNARs aislados.** Resultados de los ensayos de reconocimiento sobre las líneas celulares. A) Sobre la línea celular OCI-Ly7, donde en las muestras marcadas con asterisco se observa un ligero desplazamiento de la curva hacia la derecha (positividad). B) mismo análisis empleando la línea celular SUDHL-4.

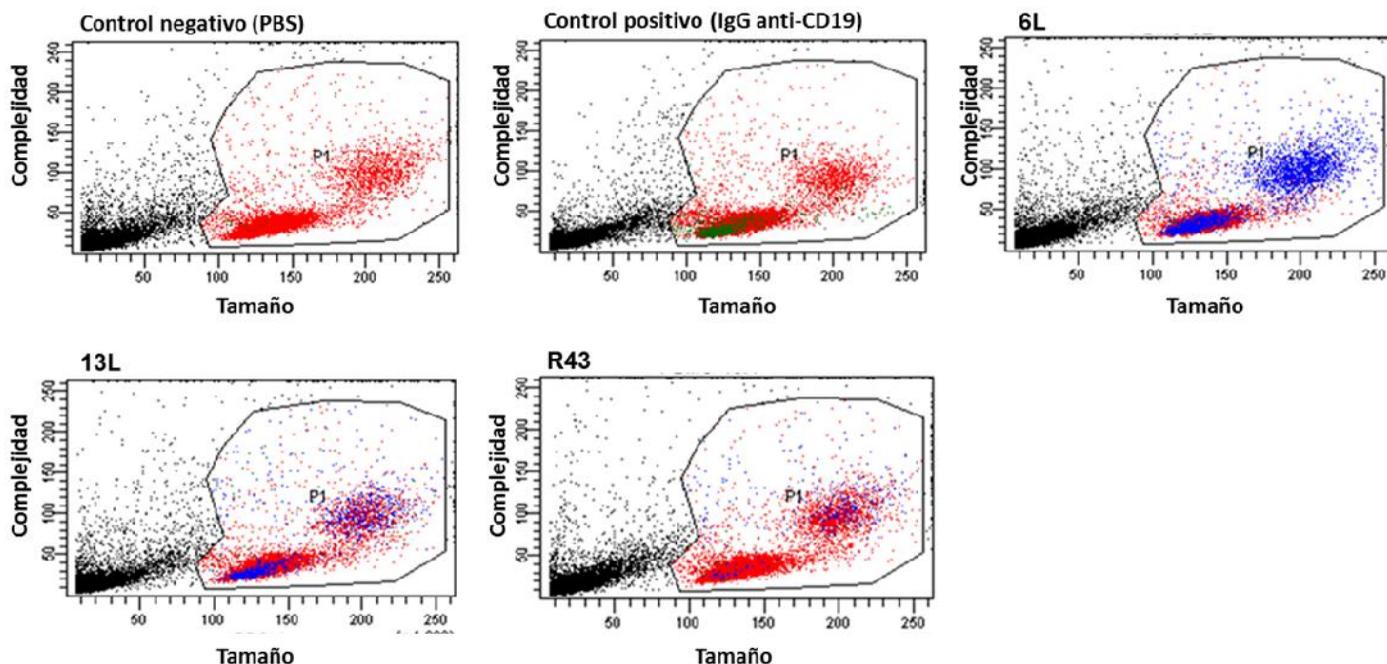
Una vez que se observó cierto grado de afinidad por parte de cuatro de los diez vNARs producidos, se analizó si este grado de reconocimiento era específico de células derivadas de linfocitos (CD19+), por lo que se realizó un ensayo utilizando células negativas para este marcador de superficie celular. En este caso, por la disponibilidad que se tenía, se utilizó la línea celular NIH 3T3, la cual es una línea

de fibroblastos de ratón y cuya expresión de CD19 es nula, tal y como se puede constatar en el control donde se utilizó la IgG anti-CD19 comercial, en el se puede apreciar la falta de positividad (Fig. 23). En esta misma figura 22, los cuatro vNARs (6L, 12L, 13L y 25L) presentaron un grado de reconocimiento por las células NIH 3T3, lo que muestra la falta de especificidad de nuestras clonas, los seis vNARs restantes carecen de afinidad por la línea celular al igual que con las otras dos líneas celulares tumorales.



**Figura 23. Reconocimiento sobre la línea celular NIH 3T3.** Histogramas de citometría, al igual que en los otros dos ensayos, se puede observar cierto grado de afinidad hacia la línea de fibroblastos por parte de las mismas cuatro clonas; mientras que las seis clonas restantes carecen de unión.

Con los resultados anteriores, se decidió analizar el grado de reconocimiento de tres vNARs en linfocitos aislados de sangre periférica: Las clonas 6L y 13L, cuyos vNARs mostraron mayor grado de positividad en las líneas celulares anteriores y el vNAR de la clona 43R, el cual no fue capaz de mostrar señal de reconocimiento en ninguna de las líneas celulares anteriores. En este ensayo se encontró el mismo comportamiento antes descrito: las clonas 6L y 13 mostraron afinidad por ciertas poblaciones de linfocitos, mientras que la clona 43R no lo hizo. Cabe señalar que en una gráfica de tamaño vs complejidad, mientras el control positivo (IgG anti-CD19) fue capaz de reconocer sólo una población posicionada a la altura y nivel de los linfocitos (como era de esperarse por marcar sólo linfocitos), nuestras clonas además de marcar la misma población celular, fueron capaces de reconocer una población que se colocó en la zona habitual de los monocitos (en la misma gráfica de tamaño vs complejidad), lo que reafirma la falta de especificidad de los vNARs aislados, ya que los monocitos carecen de la expresión de la proteína CD19 (Fig. 24).

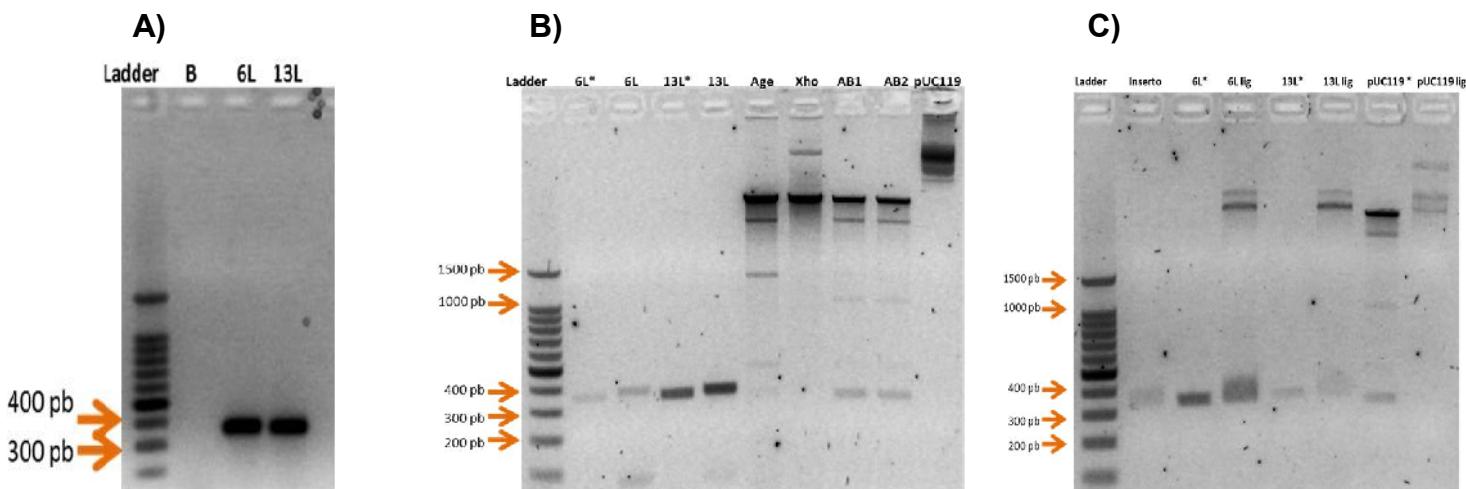


**Figura 24. Reconocimiento de vNARs sobre PBMCs.** Citrogramas (dot-plot) en los que se muestra el reconocimiento (azul) de los vNARs 6L y 13L sobre dos poblaciones celulares de tamaños y complejidades distintas, que dada la localización, se asume que son linfocitos y monocitos. El control positivo (IgG anti CD19) reconoce una pequeña población de linfocitos (verde), mientras que el control negativo (PBS) y la clona R43 no son capaces de emitir señal alguna.

### 7.7 Generación de formato bi-específico.

Aun cuando las clonas no tuvieron una especificidad adecuada por el antígeno blanco, se decidió sacar estos cuatro vNARs y ligarlos al scFv anti-CD16 para evaluar el re-direccionamiento de células B hacia las células tumorales por parte de esta construcción bi-específica scFv-vNAR (AntCD16-anti-CD19). En la amplificación de vNAR mediante PCR, se logró obtener las secuencias de las clonas 6L y 13L, a los cuales se les agregaron sitios de corte homólogos al vector que expresa el scFv. Posteriormente se logró la digestión de estos productos amplificados junto con el vector pUC119 (que contiene la secuencia anti-CD16)

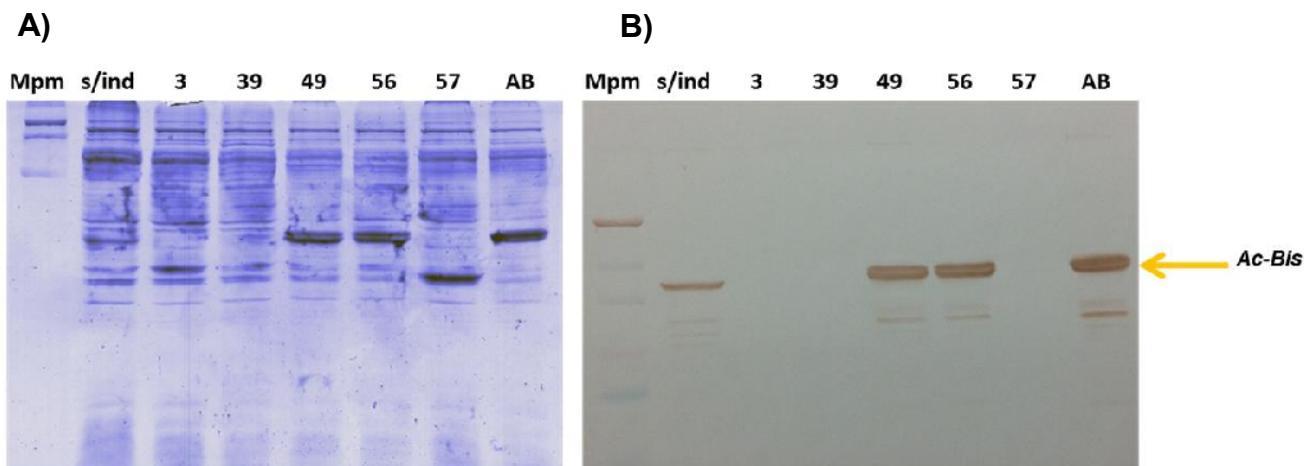
con las enzimas *Nde* I y *Xho* I, después de comprobada la digestión se realizó la ligación, la cual esta vez sí se logró observar en el gel de agarosa (Fig. 25) y posteriormente se llevo á cabo la transformación de la ligaciones realizadas.



**Figura 25. Etapas de la generación del ac. bi-específico.** A) Amplificación de los vNARs donde se insertaron los sitios de corte homólogos al vector pUC119, B) digestión de los productos de PCR y del vector, C) ligación de productos de digestión con *Nde* I y *Xho* I. Geles de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

Las clonas que crecieron en LB agar con carbenicilina se tamizaron por PCR para evaluar la presencia del fragmento vNAR; se obtuvieron pocas colonias positivas para el fragmento de 13L y estas se mandaron a secuenciar, con lo que se comprobó la inserción del vNAR dentro del vector, además de su localización con respecto a la secuencia codificante del scFv (en el extremo 3') (ver anexo); la clonas con la secuencia 6L resultaron negativas. La clona positiva para la construcción del bi-específico scFv-vNAR13L se creció en LB y se realizó la inducción con las mismas condiciones realizadas en las etapas anteriores, donde se pudo comprobar mediante WB la expresión en formato bi-específico del vNAR

13L; es decir, el aumento en tamaño de la clona 13L de pasar de 16 kDa a cerca de 40 kDa (Fig. 26).

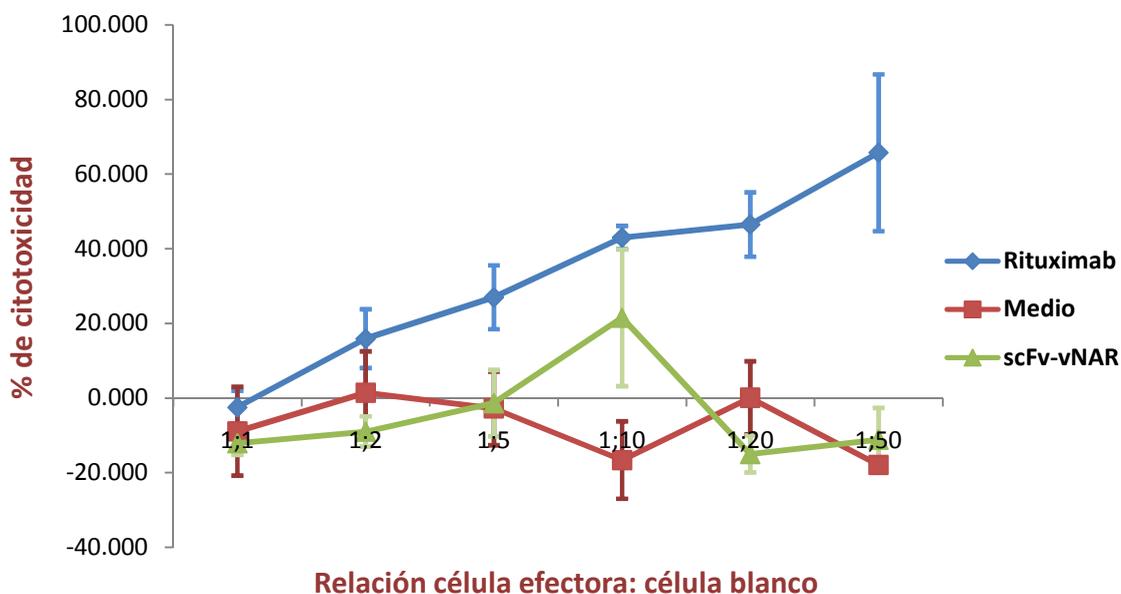


**Figura 26. Inducción de las clonas con insertos de scFv-vNAR13L.** a) gel de poliacrilamida residual de la transferencia b) Western blot para la inmunodetección de las cola de histidinas que es agregada por el plásmido de expresión.

### 7.8 Ensayos de lisis celular por re-direccionamiento de células CD16.

Una vez que se logró obtener el anticuerpo bi-específico conformado por la secuencia codificante del fragmento scFv dirigido contra la proteína CD16 y su unión con el vNAR (clona 13L) dirigido contra la proteína CD19 (con cierto grado de inespecificidad), se realizaron los ensayos de lisis celular dependiente de anticuerpo. Para esto se dejaron incubando diferentes concentraciones de células efectoras (CD16 positivas) con una concentración constante de células blanco (SUDHL-4, CD19 positivas) junto con una concentración constante del Rituximab (Anti-CD20, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), el cual se usó como control positivo ya que es el anticuerpo utilizado actualmente en el tratamiento de ciertos tipo de leucemias y

linfomas de células B; y en el caso de nuestra proteína, utilizamos un volumen constante del extracto purificado (50  $\mu$ L), misma cantidad que utilizamos en los ensayos de citometría de flujo. Al analizar los resultados se logró observar el efecto citotóxico en el caso del Rituximab, mientras que en el caso de nuestra construcción no fue posible constatar efecto alguno sobre las células tumorales (Fig. 27).



**Figura 27. Ensayo de lisis celular.** Diferentes concentraciones de células efectoras incubadas con células blanco, evidenciando el efecto lítico del Rituximab (línea azul), mientras que la construcción scFv-vNAR13L muestra el mismo comportamiento que las células incubadas con medio de cultivo.

## 8. DISCUSIÓN.

Diversos han sido los abordajes tecnológicos para la explotación de la proteína CD19 como blanco terapéutico en el tratamiento de malignidades hematológicas; abordajes que van desde los anticuerpos conjugados, los anticuerpos bi-específicos y últimamente los receptores quiméricos antigénicos de células T (CART cells, por sus siglas en inglés) [65, 67, 78-81]. Por esta razón, el desarrollo de moléculas con capacidad de reconocimiento específico para este antígeno leucocitario, es una piedra angular en el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas. Para contribuir en esta meta, nosotros generamos una biblioteca de dominios vNAR a partir de un tiburón cornudo (*Heterodontus francisci*) inmunizado con la proteína CD19, con el fin de asilar moléculas capaces de reconocer el dominio extramembranal.

Con respecto a la complejidad de nuestra biblioteca, se logró obtener un tamaño de  $1.5 \times 10^8$  ufc, que es de un tamaño considerado como aceptable cuando es comparado con el reportado por Nuttall, quien aisló una biblioteca de  $3 \times 10^7$  ufc utilizando otra especie de tiburón [82].

Después del proceso de “panneo” contra la proteína CD19, se lograron aislar 10 secuencias tipo vNARs con sus dominios y secuencias características, como es el dominio CDR3 que presentó tamaños que van desde los 11 hasta los 28 residuos aminoacídicos. Además, de acuerdo a la presencia de una leucina en lugar del triptófano en la posición 31, se logró deducir que correspondían a secuencias vNAR del tipo 2 [50, 83]. Además de lo anterior, cuatro de estas secuencias

canónicas comparten una cisteína en la posición 29, la cual es otra característica de un vNAR tipo 2 y cuya función es la de unir y estabilizar las dominios CDR1 con el CDR3 a través de un enlace disulfuro con una cisteína dentro del CDR3 [84].

Con respecto al proceso de producción y semi-purificación, tanto las clonas de vNARs como la clona del fragmento de anticuerpo en formato scFv donado por el Dr. Louis Weiner [38], se lograron expresar así como semi-purificar mediante cromatografía de afinidad. Aunque es de resaltar que a pesar de expresarse en la misma cepa de *E. coli*, los resultados de los ELISA de expresión antes y después de la purificación mostraron una mayor cantidad de la proteína scFv en la fracción del extracto periplásmico con respecto a los vNARs. El hallazgo anterior puede deberse a las secuencias de exportación utilizadas, ya que mientras los vNARs se encuentran en el pComb3X, cuya secuencia de exportación es la utilizada por la “outer membrane protein A” (ompA) de *E. coli* (MKKTAIAIAVALAGFATVAQA), el scFv se encuentra en el vector pUC119 y cuya secuencia de exportación es la utilizada por la peptidasa B (pepB) de *Erwinia caotocora* (MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA) [85], lo que podría explicar las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas en el espacio periplásmico y es que los niveles de expresión en los extractos de proteína total fueron muy similares tanto de vNARs como del scFv.

En cuanto a la funcionalidad de los vNAR expresados, se logró observar una capacidad de reconocimiento o unión moderada de cuatro clonas, mientras que las seis clonas restantes no mostraron señal alguna de unión hacia las células de

linfoma. Sin embargo, estas cuatro clonas también mostraron unión hacia fibroblastos de ratón (células CD19 negativas). Por otro lado, debido a que la propuesta de este trabajo fue la generación de moléculas con capacidad de unión (vNARs) hacia una proteína expresada en linfocitos B (CD19), tres clonas fueron evaluadas por su capacidad de reconocimiento con células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Como se puede observar en la figura 22, los vNARs 6L y 13L se unen a una población celular que se localiza en la zona de los linfocitos (con respecto a su tamaño y complejidad) [86-87], además de reflejar el mismo patrón que es observado al usar un anti-CD19 comercial para marcar linfocitos B. Sin embargo, en este mismo análisis (tamaño vs complejidad), los vNARs se unen otra población celular diferente a los linfocitos en tamaño y complejidad. Dicha población asemeja a los monocitos y esto fue corroborado al teñir las muestras con el CD14 (marcador presente en monocitos y algunos linfocitos B)[88], lo cual confirma que los vNARs analizados no son específicos para linfocitos B. La 3er clona analizada (R43) no fue capaz de reconocer población alguna en las PBMCs. De manera interesante, las clonas 6L, 12L, 13L y 23L, las cuales mostraron cierto grado de reconocimiento hacia células tumorales y hacia linfocitos B de sangre periférica, son las únicas que presentan una cisteína en la posición 29 en la CDR1 y una cisteína dentro del CDR3, haciendo posible un enlace estable CDR1-CDR3, lo que podría explicar la capacidad de unión (aunque moderada y de baja especificidad) de estas clonas, con respecto al resto de las mismas, las cuales carecen de estos aminoácidos y a la vez de cualquier grado de unión.

Una de las posibles razones de la falta de especificidad de los vNARs aislados, muy a pesar de tener secuencias estructuralmente adecuadas (en longitud y diversidad de la CDR3) o que se pensarían como muy buenas candidatas para unirse de manera afín y específica, puede deberse a que en la inmunización del tiburón se utilizó la secuencia extramembranal completa de la proteína CD19, en cuya secuencia se presentan dos dominios “IgG-like”, dominio encontrado frecuentemente en las proteínas de membrana de la mayoría de las células [89-91], por lo que posiblemente haya una reacción de reconocimiento cruzada por parte de los vNARs obtenidos.

Por otra parte, en lo que se refiere a la funcionalidad del scFv anti-CD16, este fragmento de anticuerpo si fue capaz de reconocer a la población de los linfocitos CD16+. Se sabe que este antígeno se encuentra en aproximadamente el 15 % de los linfocitos de sangre periférica [92] y estos valores fueron muy parecidos a los encontrados en los experimentos en cuestión, ya que mientras el anticuerpo comercial anti-CD16 (IgG, marcada con PE) logró reportar un 15.9 % de positividad de este tipo celular, el scFv reconoció un 16 % de positividad; además de que no fue capaz de reconocer o unirse a las células NIH 3T3 (CD16 negativas), demostrando así, la especificidad hacia las células CD16 positivas. Lo anterior demuestra la correcta funcionalidad del fragmento de anticuerpo donado por el Dr. Louis Weiner y expresado a la par de nuestros vNARs obtenidos [38].

En lo que se refiere a la generación del anticuerpo bi-específico, para la unión del vNAR con el scFv, se utilizaron los vNARs que presentaron cierto grado de reconocimiento, además de una clona aislada en el laboratorio de nuestro

colaborador, el Dr Licea, que se sabe está dirigida contra una línea celular de linfoma (clona 1L). En este sentido, se logro la inserción de las clonas 13L y 1L en la orientación adecuada, mientras que las clonas restantes 6L, 12L y 23L no se lograron clonar adecuadamente. La secuencias de las clonas se muestran en el anexo 9.3. Una vez que realizaron la expresión y la semi-purificación de las proteína producida, se probó la capacidad de re-direccionar la citotoxicidad celular de la clona 13L (scFv-vNAR). Desafortunadamente la construcción (scFv-vNAR) no mostró poder re-direccionar la citotoxicidad de las células del sistema inmune (células CD16+) hacia las células blanco (células de linfoma CD19+), como sí fue posible observar este efecto al utilizar el anticuerpo comercial Rituximab (Anti-CD20), la cual es la molécula utilizada actualmente en los esquemas terapéuticos para tratar malignidades de células B.

Una de las posibilidades por las que nuestra construcción no despertó la respuesta de las células efectoras, puede explicarse debido al tipo linker utilizado para unir los dos fragmentos de anticuerpos, en este sentido, Simmons y cols., reportaron un linker de mayor efectividad para la unión de fragmentos de anticuerpos del tipo vNAR, argumentando una mejor disposición espacial de los vNARs, mientras que el linker que utilizamos en este trabajo, principalmente es utilizado para la generación de bi-especificos a base de scFv para ambos blancos (scFv-scFv) [93-94].

## 9. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en cada una de las etapas de este proyecto nos dejan la generación de una biblioteca de vNARs aislados de un tiburón cornudo inmunizado con la proteína parcial CD19, de una complejidad considerablemente buena con respecto a las reportadas por otros investigadores. Las etapas de selección o tamizaje nos arrojaron 10 clonas con secuencias canónicas de vNAR, cuatro de las cuales exhibieron cierto grado de reconocimiento por células de linfoma, pero sin la especificidad esperada.

La generación del formato bi-específico a base de un scFv y un vNAR fue otra de las conclusiones a las que se lograron acceder, desafortunadamente no se logró obtener el resultado esperado y gran parte de esto se debe a que los vNARs obtenidos no cumplieron con la especificidad y afinidad esperadas.

En este sentido, diversas aproximaciones para la maduración de secuencias pueden ser utilizadas para aumentar la afinidad y la especificidad. Tecnologías tales como PCR degenerada, DNA shuffling y mutagénesis *in vivo*, con lo que la aplicación de estas tecnologías a nuestros vNAR aislados pueden mejorar su eventualmente potencial para el tratamientos de malignidades de células B.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Shaffer, A.L., A. Rosenwald, and L.M. Staudt, *Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 920-32.
2. Lenz, G., et al., *Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13520-5.
3. Fisher, R.I., et al., *Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med, 1993. **328**(14): p. 1002-6.
4. Maloney, D.G., et al., *IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma*. Blood, 1997. **90**(6): p. 2188-95.
5. Anderson, D.R., et al., *Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma*. Biochem Soc Trans, 1997. **25**(2): p. 705-8.
6. Bonavida, B., *What signals are generated by anti-CD20 antibody therapy?* Curr Hematol Malig Rep, 2006. **1**(4): p. 205-13.
7. Bornstein, G.G., et al., *Development of a new fully human anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies*. Invest New Drugs, 2010. **28**(5): p. 561-74.
8. Bowles, J.A., et al., *Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2648-54.
9. Bayry, J., et al., *Monoclonal antibody and intravenous immunoglobulin therapy for rheumatic diseases: rationale and mechanisms of action*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(5): p. 262-72.

10. Dalakas, M.C., *B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders*. Nature Clinical Practice Neurology, 2008. **4**(10): p. 557-567.
11. Mori, K., et al., *Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies*. Cytotechnology, 2007. **55**(2-3): p. 109-14.
12. Chames, P. and D. Baty, *Bispecific antibodies for cancer therapy*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2009. **12**(2): p. 276-83.
13. Chames, P. and D. Baty, *Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel?* MAbs, 2009. **1**(6): p. 539-47.
14. Chames, P., et al., *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(2): p. 220-33.
15. Cartron, G., et al., *Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene*. Blood, 2002. **99**(3): p. 754-8.
16. Zalevsky, J., et al., *The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcgamma receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates*. Blood, 2009. **113**(16): p. 3735-43.
17. Cardarelli, P.M., et al., *A nonfucosylated human antibody to CD19 with potent B-cell depletive activity for therapy of B-cell malignancies*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(2): p. 257-65.
18. Hudson, P.J. and C. Souriau, *Engineered antibodies*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 129-34.
19. Fossati, G., R.C. Bucknall, and S.W. Edwards, *Fcgamma receptors in autoimmune diseases*. Eur J Clin Invest, 2001. **31**(9): p. 821-31.

20. Lynch, R.G., *Regulatory roles for FcγRIII (CD16) and FcγRII (CD32) in the development of T- and B-lineage lymphoid cells*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(3): p. 279-84.
21. Lisi, S., et al., *Advances in the understanding of the Fc gamma receptors-mediated autoantibodies uptake*. Clin Exp Med, 2011. **11**(1): p. 1-10.
22. Baeuerle, P.A. and C. Reinhardt, *Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy*. Cancer Res, 2009. **69**(12): p. 4941-4.
23. Kufer, P., R. Lutterbuse, and P.A. Baeuerle, *The promise of bispecific antibodies*. Discov Med, 2004. **4**(23): p. 325-32.
24. Johnson, S., et al., *Effector cell recruitment with novel Fv-based dual-affinity re-targeting protein leads to potent tumor cytotoxicity and in vivo B-cell depletion*. J Mol Biol, 2010. **399**(3): p. 436-49.
25. Moore, P.A., et al., *Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma*. Blood, 2011. **117**(17): p. 4542-51.
26. Wesolowski, J., et al., *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity*. Med Microbiol Immunol, 2009. **198**(3): p. 157-74.
27. Moran, N., *Boehringer splashes out on bispecific antibody platforms*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(1): p. 5-6.
28. Karpovsky, B., et al., *Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies*. J Exp Med, 1984. **160**(6): p. 1686-701.
29. Fury, M.G., et al., *A phase-I trial of the epidermal growth factor receptor directed bispecific antibody MDX-447 without and with recombinant human granulocyte-*

- colony stimulating factor in patients with advanced solid tumors.* Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(2): p. 155-63.
30. James, N.D., et al., *A phase II study of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-HER2 x CD64) with GM-CSF in HER2+ advanced prostate cancer.* Br J Cancer, 2001. **85**(2): p. 152-6.
31. Pullarkat, V., et al., *A phase I study of a HER2/neu bispecific antibody with granulocyte-colony-stimulating factor in patients with metastatic breast cancer that overexpresses HER2/neu.* Cancer Immunol Immunother, 1999. **48**(1): p. 9-21.
32. Valone, F.H., et al., *Phase Ia/Ib trial of bispecific antibody MDX-210 in patients with advanced breast or ovarian cancer that overexpresses the proto-oncogene HER-2/neu.* J Clin Oncol, 1995. **13**(9): p. 2281-92.
33. Valone, F.H., et al., *Clinical trials of bispecific antibody MDX-210 in women with advanced breast or ovarian cancer that overexpresses HER-2/neu.* J Hematother, 1995. **4**(5): p. 471-5.
34. Mack, M., G. Riethmuller, and P. Kufer, *A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7021-5.
35. Traunecker, A., A. Lanzavecchia, and K. Karjalainen, *Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells.* EMBO J, 1991. **10**(12): p. 3655-9.
36. Tang, Y., et al., *Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology.* J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15682-6.
37. Schier, R., et al., *Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site.* J Mol Biol, 1996. **263**(4): p. 551-67.

38. McCall, A.M., et al., *Isolation and characterization of an anti-CD16 single-chain Fv fragment and construction of an anti-HER2/neu/anti-CD16 bispecific scFv that triggers CD16-dependent tumor cytotoxicity*. Mol Immunol, 1999. **36**(7): p. 433-45.
39. Baeuerle, P.A., P. Kufer, and R. Bargou, *BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy*. Curr Opin Mol Ther, 2009. **11**(1): p. 22-30.
40. Gleason, M.K., et al., *Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(12): p. 2674-84.
41. Kellner, C., et al., *Heterodimeric bispecific antibody-derivatives against CD19 and CD16 induce effective antibody-dependent cellular cytotoxicity against B-lymphoid tumor cells*. Cancer Lett, 2011. **303**(2): p. 128-39.
42. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
43. Shakir, E.M., D.S. Cheung, and M.H. Grayson, *Mechanisms of immunotherapy: a historical perspective*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2010. **105**(5): p. 340-7; quiz 348, 368.
44. Peng, L., et al., *The CEA/CD3-bispecific antibody MEDI-565 (MT111) binds a nonlinear epitope in the full-length but not a short splice variant of CEA*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36412.
45. Yoshida, S., et al., *T-cell activation and cytokine production via a bispecific single-chain antibody fragment targeted to blood-stage malaria parasites*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2300-6.
46. Nagorsen, D., et al., *Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(6): p. 886-91.

47. Schnaiter, A. and S. Stilgenbauer, *Refractory chronic lymphocytic leukemia--new therapeutic strategies*. *Oncotarget*, 2010. **1**(7): p. 472-82.
48. Topp, M.S., et al., *Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(18): p. 2493-8.
49. Adelman, M.K., S.F. Schluter, and J.J. Marchalonis, *The natural antibody repertoire of sharks and humans recognizes the potential universe of antigens*. *Protein J*, 2004. **23**(2): p. 103-18.
50. Streltsov, V.A., J.A. Carmichael, and S.D. Nuttall, *Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype*. *Protein Sci*, 2005. **14**(11): p. 2901-9.
51. Wolfson, W., *Ablynx makes nanobodies from llama bodies*. *Chem Biol*, 2006. **13**(12): p. 1243-4.
52. Ulrichs, H., et al., *Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs*. *Blood*, 2011. **118**(3): p. 757-65.
53. Davis, T.A., et al., *Combination immunotherapy of relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interferon-alpha-2a*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(7): p. 2644-52.
54. Younes, A., et al., *Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(19): p. 1812-21.
55. Rothe, A., et al., *Brentuximab vedotin for relapsed or refractory CD30+ hematologic malignancies: the German Hodgkin Study Group experience*. *Blood*, 2012. **120**(7): p. 1470-2.

56. Gualberto, A., *Brentuximab Vedotin (SGN-35), an antibody-drug conjugate for the treatment of CD30-positive malignancies*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012. **21**(2): p. 205-16.
57. Vaklavas, C. and A. Forero-Torres, *Safety and efficacy of brentuximab vedotin in patients with Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma*. *Ther Adv Hematol*, 2012. **3**(4): p. 209-25.
58. Pastorelli, F., et al., *Severe peripheral motor neuropathy in a patient with Hodgkin lymphoma treated with brentuximab vedotin*. *Leuk Lymphoma*, 2013. **54**(10): p. 2318-21.
59. Baxley, A.A., et al., *Severe infusion reactions to brentuximab vedotin in two patients with Hodgkin lymphoma previously treated with allogeneic stem cell transplantation*. *J Oncol Pharm Pract*, 2013. **19**(3): p. 279-83.
60. Mayes, S., N. Brown, and T.M. Illidge, *New antibody drug treatments for lymphoma*. *Expert Opin Biol Ther*, 2011. **11**(5): p. 623-40.
61. Aurer, I., et al., *[90Y-ibritumomab tiuxetan in patients with follicular lymphoma relapsing or refractory to rituximab]*. *Lijec Vjesn*, 2006. **128**(7-8): p. 224-7.
62. Bhat, S.A. and M.S. Czuczman, *Novel antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma*. *Neth J Med*, 2009. **67**(8): p. 311-21.
63. Carter, R.H., Y. Wang, and S. Brooks, *Role of CD19 signal transduction in B cell biology*. *Immunol Res*, 2002. **26**(1-3): p. 45-54.
64. Zhou, L.J., et al., *Structure and domain organization of the CD19 antigen of human, mouse, and guinea pig B lymphocytes. Conservation of the extensive cytoplasmic domain*. *J Immunol*, 1991. **147**(4): p. 1424-32.

65. Molhoj, M., et al., *CD19-/CD3-bispecific antibody of the BiTE class is far superior to tandem diabody with respect to redirected tumor cell lysis*. Mol Immunol, 2007. **44**(8): p. 1935-43.
66. Edwards, J.C. and G. Cambridge, *B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 394-403.
67. Davila, M.L., et al., *CD19 CAR-targeted T cells induce long-term remission and B Cell Aplasia in an immunocompetent mouse model of B cell acute lymphoblastic leukemia*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61338.
68. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
69. Bolhuis, R.L. and J.J. Haaijman, [*Nobel Prizes for immunology 1984 (Niels K. Jerne, Cesar Milstein, George Kohler)*]. Ned Tijdschr Geneesk, 1984. **128**(52): p. 2433-5.
70. Lo, B.K.C., *Antibody engineering : methods and protocols*. Methods in molecular biology. 2004, Totowa, N.J.: Humana Press. xiv, 561 p.
71. Lo, B.K., *Antibody humanization by CDR grafting*. Methods Mol Biol, 2004. **248**: p. 135-59.
72. Figini, M., et al., *Conversion of murine antibodies to human antibodies and their optimization for ovarian cancer therapy targeted to the folate receptor*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(4): p. 531-46.
73. Yamashita, M., Y. Katakura, and S. Shirahata, *Recent advances in the generation of human monoclonal antibody*. Cytotechnology, 2007. **55**(2-3): p. 55-60.
74. Kim, S.J., Y. Park, and H.J. Hong, *Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies*. Mol Cells, 2005. **20**(1): p. 17-29.

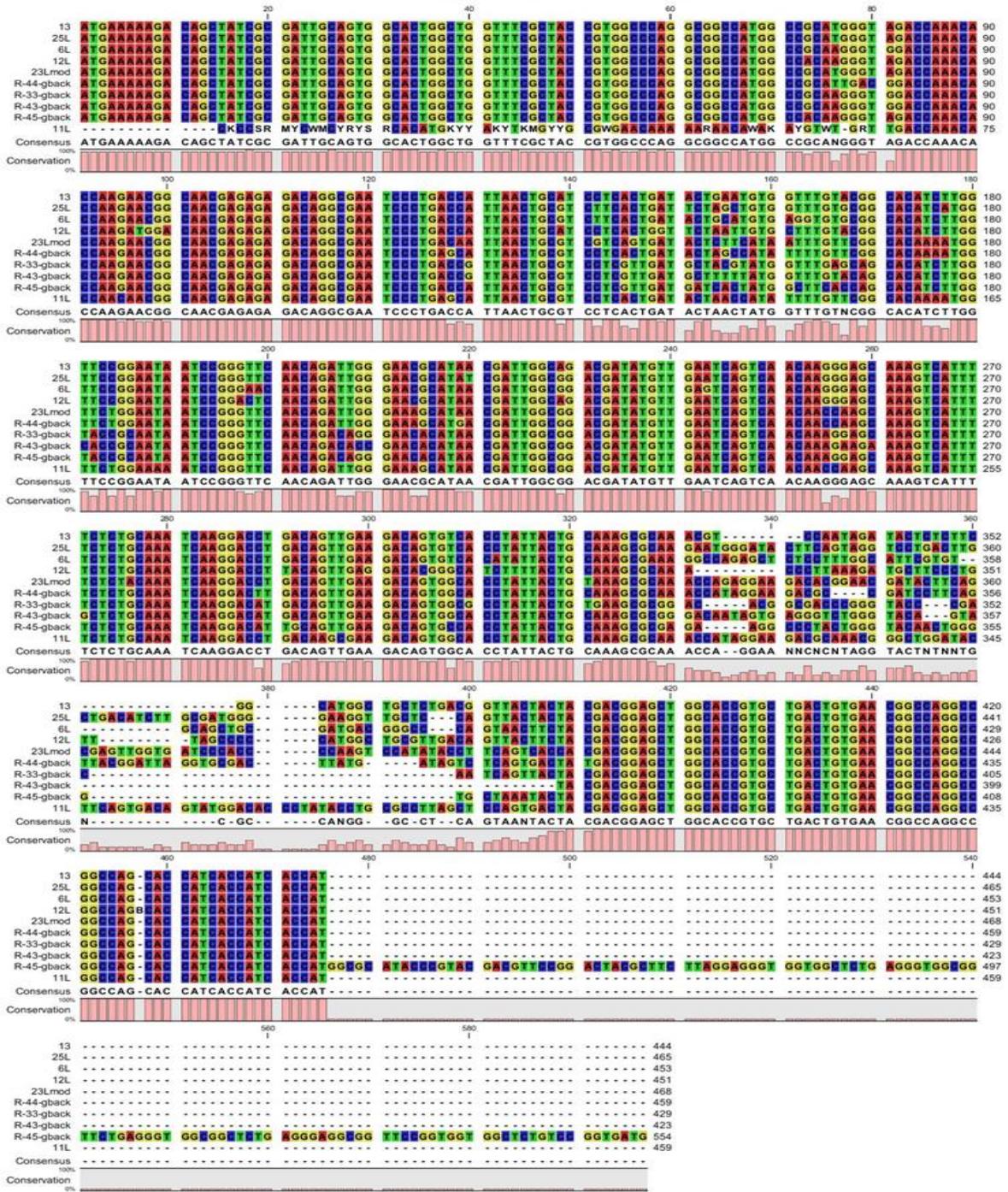
75. Barbas, C.F., *Phage display : a laboratory manual*. 2001, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1 v. in various pagings.
76. Sambrook, J. and D.W. Russell, *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. 2006, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v, 800 p.
77. Minsky, A., R.G. Summers, and J.R. Knowles, *Secretion of beta-lactamase into the periplasm of Escherichia coli: evidence for a distinct release step associated with a conformational change*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4180-4.
78. Jena, B., et al., *Chimeric antigen receptor (CAR)-specific monoclonal antibody to detect CD19-specific T cells in clinical trials*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57838.
79. Maher, J., *Clinical Immunotherapy of B-Cell Malignancy Using CD19-Targeted CAR T-Cells*. Curr Gene Ther, 2013.
80. Schlenzka, J., et al., *Combined effect of recombinant CD19 x CD16 diabody and thalidomide in a preclinical model of human B cell lymphoma*. Anticancer Drugs, 2004. **15**(9): p. 915-9.
81. Gerber, H.P., et al., *Potent antitumor activity of the anti-CD19 auristatin antibody drug conjugate hBU12-vcMMAE against rituximab-sensitive and -resistant lymphomas*. Blood, 2009. **113**(18): p. 4352-61.
82. Nuttall, S.D., et al., *Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70*. Eur J Biochem, 2003. **270**(17): p. 3543-54.
83. Streltsov, V.A., et al., *Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12444-9.

84. Henderson, K.A., et al., *Structure of an IgNAR-AMA1 complex: targeting a conserved hydrophobic cleft broadens malarial strain recognition*. *Structure*, 2007. **15**(11): p. 1452-66.
85. Sockolosky, J.T. and F.C. Szoka, *Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone*. *Protein Expr Purif*, 2013. **87**(2): p. 129-35.
86. Carbonari, M., et al., *Detection and characterization of apoptotic peripheral blood lymphocytes in human immunodeficiency virus infection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method*. *Blood*, 1994. **83**(5): p. 1268-77.
87. Ormerod, M.G., et al., *Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter*. *Cytometry*, 1995. **21**(3): p. 300-4.
88. Bedner, E., et al., *Laser scanning cytometry distinguishes lymphocytes, monocytes, and granulocytes by differences in their chromatin structure*. *Cytometry*, 1997. **29**(3): p. 191-6.
89. Fujimoto, M., et al., *CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification*. *Immunol Res*, 2000. **22**(2-3): p. 281-98.
90. Fujimoto, M., et al., *CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification*. *Immunity*, 2000. **13**(1): p. 47-57.
91. Somani, A.K., et al., *The SH2 domain containing tyrosine phosphatase-1 down-regulates activation of Lyn and Lyn-induced tyrosine phosphorylation of the CD19 receptor in B cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(3): p. 1938-44.
92. Uciechowski, P., et al., *Analysis of CD16+dim and CD16+bright lymphocytes--comparison of peripheral and clonal non-MHC-restricted T cells and NK cells*. *Immunobiology*, 1992. **185**(1): p. 28-40.

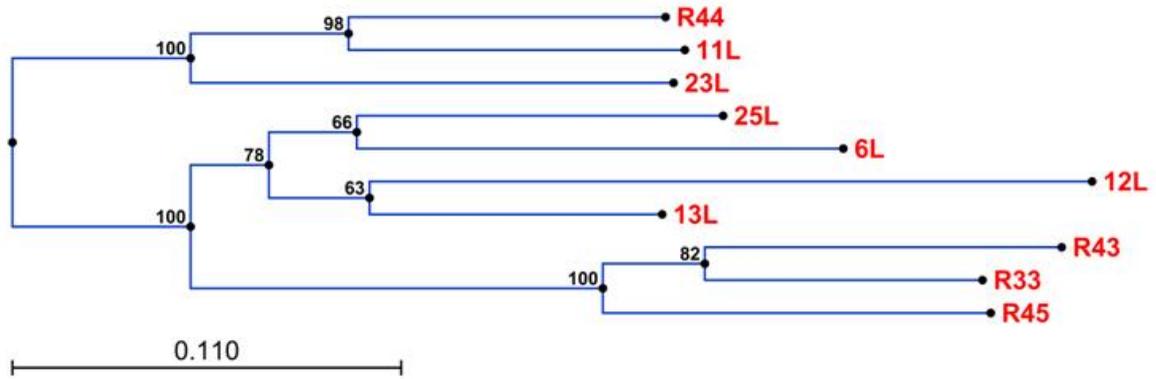
93. Simmons, D.P., et al., *Dimerisation strategies for shark IgNAR single domain antibody fragments*. J Immunol Methods, 2006. **315**(1-2): p. 171-84.
94. Simmons, D.P., et al., *Shark IgNAR antibody mimotopes target a murine immunoglobulin through extended CDR3 loop structures*. Proteins, 2008. **71**(1): p. 119-30.

## 11. ANEXOS.

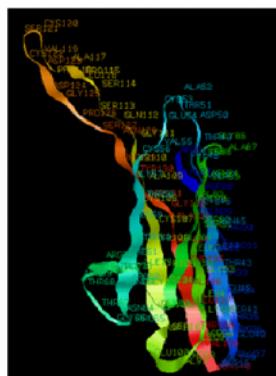
### 11.1 Alineamiento nucleotídico de secuencias obtenidas de rondas 3 y 4 del "panning".



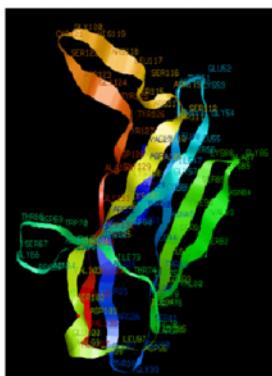
## 11. 2 Árbol filogenético de la relación de las clonas aisladas en base a su secuencia aminoacídica.



### 11.3 Estructuras tridimensionales teóricas de las secuencias aisladas.



6L



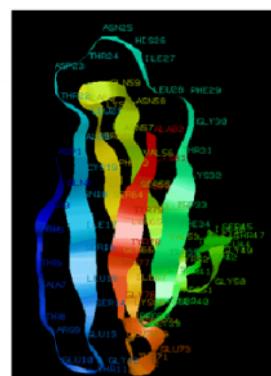
11L



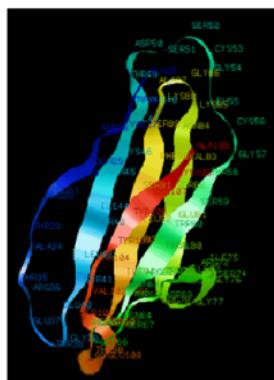
12L



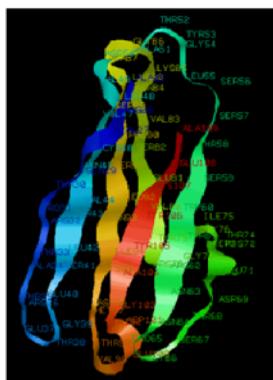
13L



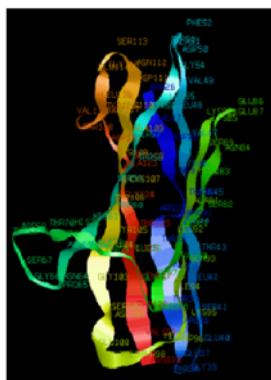
23L



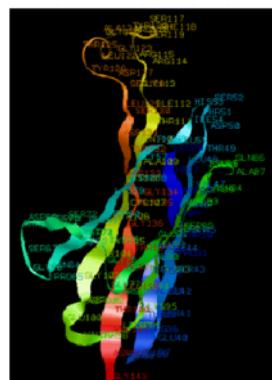
25L



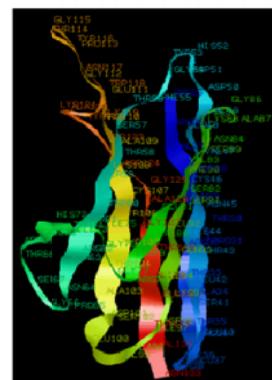
R33



R43



R44



R45

## 11.4 Alineamiento de las secuencia de iniciadores “Forward” y “Reverse” con secuencia de referencia 13L.

```

13      ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTTCGCTACCGTGGCCCAG
Reverse -----
Forward -----

13      GCGGCCATGGCCGCATGGGTAGACCAAACACCAAGAACGGCAACGAGAGAGACAGGCGAA
Reverse -----
Forward -----

13      TCCCTGACCATTAAGTGCATCCTCACTGATACTGAATGTGGTTTTGTACGGCACATCTTGG
Reverse -----GCAAATCATCATCGTATGATTGGTTTTKACGMMTCTTG
Forward -----TGCCCWMAACATAAAAACGACATGATGTGGTTTTGTACGGCAMPATCTTG
                *      *      *  **  **  **      *      *  *

13      TTCCGGAATAATCCGGGTTCAACAGATTGGGAACGCATAACGATTGGCAGACGATATGTT
Reverse GTTCCGGATAATCCGGGTTCAACAGATTGGGAACGCATAACGATTGGCAGACGATATGTT
Forward GTTCCGGAWAATCCGGGTTCAACAGATTGGGAACGCATAACGATTGGCAGACGATATGTT
        * * * * *****

13      GAATCAGTCAACAAGGGAGCAAAGTCATTTTCTCTGCAAATCAAGGACCTGACAGTTGAA
Reverse GAATCAGTCAACAAGGGAGCAAAGTCATTTTCTCTGCAAATCAAGGACCTGACAGTTGAA
Forward GAATCAGTCAACAAGGGAGCAAAGTCATTTTCTCTGCAAATCAAGGACCTGACAGTTGAA
        *****

13      GACAGTGTACCTATTACTGCAAAGCGCAAACGTCCAATAGATACTCTCTTCGGCATGGC
Reverse GACAGTGTACCTATTACTGCAAAGCGCAAACGTCCAATAGATACTCTCTTCGGCAKGGC
Forward GACAGTGTACCTATTACTGCAAAGCGCAAACGTCCAATAGATACTCTCTTCGGCATGGC
        ***** **

13      TGCTCTGACGGTTACTACTACGACGGAGCTGGCACCGTGCTGACTGTGAACGGCCAGGCC
Reverse TGCTCTGACGGTTACTACTACGACGGAGCTGGCACCGTGCTGACTGTGAACGGCCAGGCC
Forward TGCTCTGACGGTTACTACTACGACGGAGCTGGCACCGTGCTGACTGTGAACGGCCAGGCC
        *****

13      GGCCAGCACCATCACCATCACCAT-----
Reverse GGCCAGCACCATCACCATCACCATTAAGTTCGATCGAGCCCCAAGGGCGAC-ACCCATAA
Forward GGCCAGCACCATCACCATCACCATTAAGTTCGATCGAGCCCCAAGGGGCGACACCCATTA
        *****

13      -----
Reverse TTAGCCCGGGCGAAAAGGGCCAGTCTTT-----
Forward ATTAGCCCGGGCGAAAAGGGCCAGTCTTTTCTACTGAGCCTTTTCKTTTA
    
```

## 11.5 Genomas del vector fagémido pComb3X y del fago helper M13K07.

