

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

## **DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

### **PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

Generación de un anticuerpo recombinante anti-DEC205 porcino



**TESIS**  
Que para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

**Edgar Alonso Melgoza González**

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2018

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

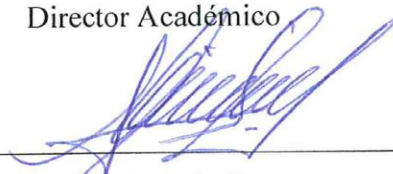
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **QBC Edgar Alonso Melgoza González**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud.

Atentamente:



---

Dr. Jesús Hernández López  
Director Académico



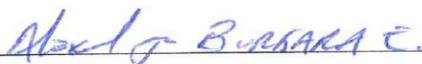
---

Dr. Eduardo Ruiz Bustos  
Secretario



---

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores  
Vocal



---

Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella  
Suplente

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindar el financiamiento al proyecto 248922 con el cual se realizó el presente trabajo de investigación.

A la Universidad de Sonora por permitir mi desarrollo académico en el Posgrado en Ciencias de la Salud.

Al Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme llevar a cabo el trabajo experimental en sus instalaciones.

Al Dr. Jesús Hernández López por recibirme e incluirme en su grupo de investigación, así como por la asesoría académica durante los estudios de posgrado.

A los miembros del comité sinodal Dr. Eduardo Ruiz Bustos, Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores y Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella por brindar su valiosa ayuda y oportunas observaciones para resolver las dificultades que se presentaron durante la realización del proyecto.

A la M. en C. Mónica Guadalupe Reséndiz Sandoval por su asesoría en la realización de las técnicas de laboratorio.

Al Dr. Alonso Alexis López Zavala por su asesoría y ayuda para llevar a cabo parte del trabajo experimental del presente trabajo.

A mis compañeros Lorena, Mariana, Lucy y Héctor por su valiosa amistad, apoyo y compartir su experiencia durante las horas de trabajo de laboratorio.

A los laboratorios de Investigación en Productos Naturales e Investigación en Alimentos de la Universidad de Sonora, por permitir realizar parte del trabajo experimental en sus instalaciones. Además de los compañeros Manuel Carretas, Luis Morado, Machuy Moreno y Elena Moreno, por apoyo y consejo durante las horas de trabajo experimental.

Esta tesis se llevó a cabo bajo la codirección del Dr. Eduardo Ruiz Bustos de la Universidad de Sonora y el Dr. Jesús Hernández López del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales y Laboratorio de Investigación en Alimentos de la Universidad de Sonora.

Esta tesis se realizó con el financiamiento del proyecto aprobado en la convocatoria de Problemas Nacionales 2015 No. 248922 titulado: Desarrollo de una plataforma que ayude a prevenir problemas sanitarios en animales.

## **DEDICATORIA**

*A Dios por llevarme a culminar las metas que he planteado en mi vida.*

*A mis padres Elva Nora y Jesús, pilares importantes en mi formación y mis hermanos Vania y Uriel, por su apoyo incondicional durante mi vida quienes han estado en buenos y no tan buenos momentos.*

*A mis amigos: Alejandra, Ilce, Ana Karenth, Anita, Guille y Toño quienes han sabido decir palabras indicadas en el momento justo. Sin su apoyo las cosas no hubieran sido igual.*

*A mis abuelos Rigoberto, Artemisa y Mary.*

## ÍNDICE

LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
OBJETIVOS.....	xii
Objetivo General.....	xii
Objetivos Particulares.....	xii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
Estructura de los Anticuerpos.....	3
Producción de Anticuerpos Recombinantes .....	3
Producción de Anticuerpos Recombinantes en Sistemas de Expresión Procariotas.....	6
Producción de Anticuerpos Recombinantes en Sistemas de Expresión Eucariota.....	7
Levaduras y Hongos Filamentosos .....	7
Células de Insectos.....	7
Expresión en Plantas .....	8
Líneas Celulares de Mamíferos.....	9
Anticuerpo Fragmento Variable de Cadena Sencilla (scFv) .....	10
Aplicación de los Anticuerpos Recombinantes en el Direccionamiento de Antígenos.....	11
Direccionamiento de Antígenos a Células Dendríticas DEC205 <sup>+</sup> .....	13

Características Receptor DEC205.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
Diseño del Gen scFv9H2F7 .....	16
Clonación de Gen scFv9H2F7 Procariota en Vector pET100/D-TOPO .....	16
Transformación de Células Químicamente Competentes.....	19
Identificación de Clonas Positivas por PCR de Colonia y Electroforesis en Gel de Agarosa al 1.2% .....	19
Aislamiento de DNA Plasmídico.....	22
Extracción de DNA Plasmídico Maxiprep.....	22
Extracción de DNA Plasmídico Miniprep .....	23
Secuenciación .....	23
Expresión de scFv anti-DEC205 en <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) .....	24
Lavado de Cuerpos de Inclusión y Replegamiento de scFv anti-DEC205 .....	25
Expresión de scFv anti-DEC205 en Línea Celular Expi293 .....	26
Evaluación de Actividad Biológica de scFv anti-DEC205.....	27
Reconocimiento de scFv Hacia Dominio Extracelular de DEC205 .....	27
Reconocimiento de scFv anti-DEC205 Hacia Células DEC205 <sup>+</sup> .....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
Diseño del Gen scFv9H2F7 .....	29
Amplificación y Purificación del Plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7 Para Expresión en Sistema Eucariota .....	32
Clonación de Gen scFv9H2F7 Procariota en Vector pET100/D-TOPO y Aislamiento de DNA Plasmídico Miniprep .....	32
Secuenciación y Alineamiento de los Productos .....	35



Expresión de scFv anti-DEC205 en línea celular Expi293 .....	44
Evaluación de Actividad Biológica de scFv anti-DEC205.....	47
Reconocimiento de scFv Hacia Dominio Extracelular de Receptor DEC205 .....	47
Reconocimiento de scFv anti-DEC205 Hacia Células DEC205 <sup>+</sup> .....	50
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	54
APÉNDICES .....	65

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Preparación de mezcla de reacción para amplificación de gen scFv9H2F7.	17
II	Protocolo de termociclador para amplificación del gen scFv9H2F7.	17
III	Preparación de mezcla de reacción para PCR de colonia.	20
IV	Protocolo de termociclador para PCR de colonia de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con pET100/scFv9H2F7.	20
V	Protocolo de termociclador para PCR de colonia de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con pcDNA3.1/scFv9H2F7.	21
VI	Alineamiento de la secuencia nucleotídica del plásmido purificado pcDNA3.1/scFv9H2F7 y la secuencia templado scFv9H2F7 eucariota.	36
VII	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7 y secuencia de aminoácidos templado scFv9H2F7 eucariota.	37
VIII	Alineamiento de la secuencia nucleotídica del plásmido purificado pET100/scFv9H2F7 y la secuencia templado scFv9H2F7 procariota.	38
IX	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del plásmido pET100/scFv9H2F7 y secuencia de aminoácidos templado scFv9H2F7 procariota.	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Representación gráfica de los diferentes formatos de anticuerpos recombinantes.	5
2	Ilustración del mecanismo de direccionamiento de antígenos a células dendríticas.	12
3	Familia de receptores de Lectina tipo C.	15
4	Constructo del gen scFv9H2F7 para expresión en sistema eucariota.	30
5	Mapa de la conformación del vector de expresión eucariota pcDNA 3.1 (-).	30
6	Constructo del gen scFv9H2F7 para expresión en sistema procariota.	31
7	Mapa de la conformación del vector de expresión procariota pET100/D-TOPO.	31
8	Electroforesis de productos PCR de colonia <i>E. coli</i> TOP 10 transformadas con el plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7.	33
9	Electroforesis del producto de amplificación del gen scFv9H2F7.	33
10	Electroforesis de productos de PCR de colonia <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con el plásmido pET100/scFv9H2F7.	34
11	Confirmación de la presencia del gen scFv9H2F7 en el plásmido purificado pET100/scFv9H2F7.	34
12	Expresión de scFv anti-DEC205 en <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) inducida con 1 mM de IPTG a 37°C durante 0 y 24 h.	41

## LISTA DE FIGURAS CONTINUACIÓN

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
13	Cuerpos de inclusión solubilizados y fracciones eluidas purificación de scFv anti-DEC205 por IMAC.	42
14	Análisis de sobrenadantes de transfección línea celular Expi293 con pcDNA3.1/scFv9H2F7.	45
15	Sobrenadante transfección de células Expi293 y fracciones eluidas de la purificación de scFv anti-DEC205 por IMAC.	46
16	Evaluación de la capacidad de reconocimiento de los scFv anti-DEC205 expresados en sistemas Expi293 y <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) hacia el dominio extracelular del receptor DEC205.	49
17	Evaluación de la capacidad de reconocimiento de los scFv anti-DEC205 hacia células DEC205 <sup>+</sup> en PBMCs de cerdo por citometría de flujo.	52

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Producir un anticuerpo recombinante scFv anti-DEC205 con capacidad de reconocer células DEC205<sup>+</sup> de cerdo de forma similar a un anticuerpo monoclonal anti-DEC205.

### **Objetivos Particulares**

1. Diseñar un gen sintético que codifique para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal anti-DEC205 de cerdo.
2. Expresar el scFv anti-DEC205 en un sistema de expresión procarionte y eucarionte.
3. Evaluar la capacidad de reconocimiento del scFv anti-DEC205 de cerdo hacia el receptor DEC205.

## RESUMEN

Los avances en biotecnología han permitido la producción de anticuerpos recombinantes, siendo los anticuerpos de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) los más comunes. Una de las aplicaciones de los anticuerpos es el direccionamiento de antígenos hacia células dendríticas (DCs) a través del reconocimiento de receptores como DEC205, el cual favorece el procesamiento y presentación de antígenos. La producción de un anticuerpo de cadena sencilla funcional anti-DEC205 de cerdo podría tener aplicación en el campo de direccionamiento de antígenos hacia DCs. El objetivo del presente trabajo fue producir un anticuerpo scFv anti-DEC205 de cerdo a través de sistemas de expresión procarionota y eucariota. Para conseguirlo, se diseñaron genes sintéticos que contienen las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anti-DEC205 y se clonaron en los plásmidos pET 100/ D-TOPO y pcDNA3.1 para ser expresado en los sistemas *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y la línea celular Expi293, respectivamente. Utilizando un SDS-PAGE y western blot, se confirmó la producción del anticuerpo scFv anti-DEC205 en ambos sistemas, mismos que fueron capaces de reconocimiento el receptor DEC205 en western blot y por citometría de flujo. En conclusión, se establecieron las condiciones de producción de scFv anti-DEC205 biológicamente funcional a través de ambos sistemas de expresión.

## INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos (Abs) son glicoproteínas producidas por los linfocitos B que juegan un papel importante en la defensa contra patógenos (Abbas y col., 2014). El desarrollo de herramientas biotecnológicas ha permitido la producción de Abs recombinantes (rAbs), los cuales se han convertido en un componente clave en el área de investigación, diagnóstico y terapéutica (Kunert y Reinhart, 2016). Estos rAbs se producen gracias a la manipulación de secuencias que codifican para el anticuerpo de interés y su posterior producción con el uso de vectores y sistemas de expresión biológicos (Frenzel y col., 2013).

Una aplicación de los Abs es el direccionamiento de antígenos a células dendríticas (DCs) (Ring y col., 2013). Un receptor comúnmente utilizado para estos fines es el DEC205, el cual pertenece a la familia de receptores de tipo lectina C. Este receptor se caracteriza por promover la captura, procesamiento y presentación de antígenos mediante Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase I y II (Petzold y col., 2012). Se ha observado que el dirigir antígenos fusionados a un anticuerpo anti-DEC205 promueve mayor proliferación de linfocitos T (LT)  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  y producción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Bonifaz y col., 2004). En la actualidad, se continúa explorando el potencial del direccionamiento de antígenos, optimizando los mecanismos y plataformas de entrega de antígenos hacia las DCs.

Dentro de la diversa gama de rAbs se encuentra el fragmento variable de cadena sencilla (scFv), conformado por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera unidas por un péptido enlazador (Ahmad y col., 2012). El scFv se ha convertido en uno de los formatos más utilizados por que conservan la capacidad de reconocimiento de antígeno del Ab del cual derivan, por su menor tamaño y mejor difusión en tejidos y, debido a que carece del fragmento cristalizante posee menor inmunogenicidad y puede ser expresado de manera funcional en *E. coli* (Ahmad y col., 2012; Holliger y Hudson, 2005).

Considerando las ventajas que presentan los scFv en cuanto a producción y aplicación en organismos vivos, en el presente estudio se establecieron las condiciones para la producción y evaluación de un anticuerpo recombinante scFv anti-DEC205 porcino. Dicho scFv con capacidad de reconocimiento de células DEC205<sup>+</sup> tiene potencial aplicación en el desarrollo de plataformas de entrega de antígenos hacia DCs DEC205<sup>+</sup> de cerdo.



## ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### Estructura de los Anticuerpos

Los Abs son proteínas producidas por los linfocitos B y proporcionan un mecanismo de defensa a través del reconocimiento y neutralización de antígenos (Ag) que invaden el organismo. Los Abs pertenecen a la familia de las Inmunoglobulinas (Ig), glucoproteínas especializadas en el reconociendo de Ag y forman parte de la inmunidad humoral (Machado y col., 2006).

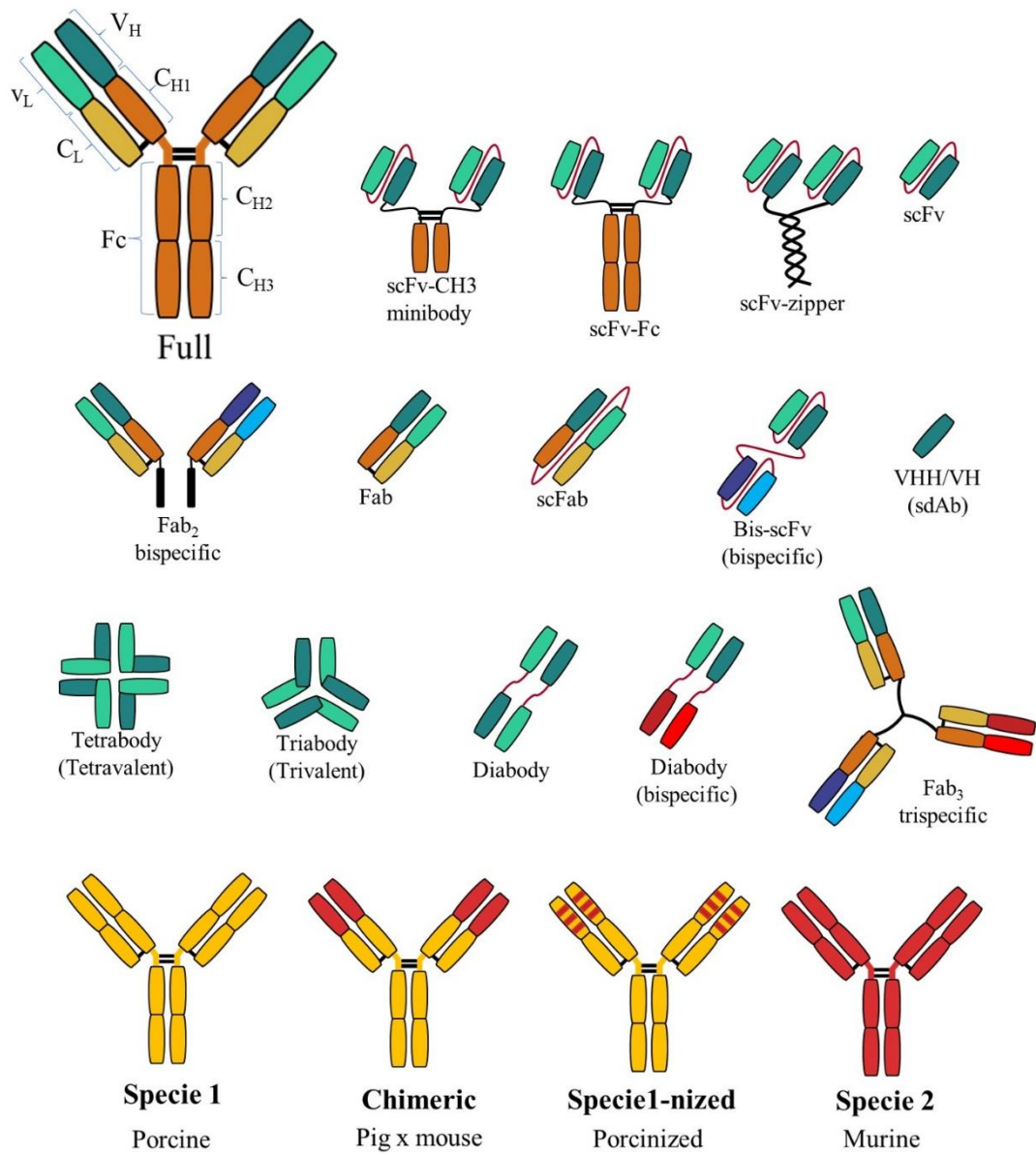
Las Igs están constituidas por cuatro cadenas proteicas: dos pesadas (H) y dos ligeras (L). Dichas cadenas se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro, resultando en una molécula con forma de “Y”. Ambos tipos de cadenas poseen dominios que le confieren al anticuerpo funciones específicas. Las cadenas ligeras poseen un dominio variable ( $V_L$ ) y uno constante ( $C_L$ ), mientras que las cadenas pesadas están conformadas por un dominio variable ( $V_H$ ) y 3 o 4 constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ - $C_{H4}$ ). Cada una de los dominios variables contiene tres regiones hipervariables, donde se encuentran las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) las cuales determinan la especificidad y afinidad del anticuerpo (Kenneth y col., 2009). La estructura de la Ig permite distinguir dos fracciones en particular: los fragmentos de unión a antígeno (Fab), conformado por una región variable y una constante de ambas cadenas ( $V_L$ - $C_L$  y  $V_H$ - $C_{H1}$ ) y la fracción cristalizable (Fc), conformada por el resto de los segmentos constantes. La función de Fab es el reconocimiento y unión del anticuerpo con el antígeno, mientras que la función del segmento Fc le confieren al anticuerpo su acción efectora como la activación del complemento o la opsonización (Ayala y Piedra, 2007; Machado y col., 2006; Merino, 2011; Otero González, 2010).

### Producción de Anticuerpos Recombinantes

La producción de anticuerpos monoclonales (mAbs) *in vitro* fue posible durante los años setenta gracias a César Milstein y Georges Köhler (Köhler y Milstein, 1975). Como su

nombre lo indica, son Abs producidos por una misma clona de células B. Para su obtención, se emplea la fusión de linfocitos provenientes de animales inmunizados y células de mieloma. Los mAbs se han utilizado ampliamente en distintas áreas como tratamiento terapéutico o herramienta en diagnóstico e investigación (Lakhchaura, 2014).

Actualmente, algunas de las limitaciones de los mAbs como agentes terapéuticos han sido superadas gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular e ingeniería genética. Estas técnicas permiten la selección, modificación y producción de Abs utilizando distintas herramientas y ensayos de laboratorio haciendo posible la producción de Abs recombinantes (rAbs) (de Marco, 2015). Los rAbs se pueden producir en una amplia variedad de presentaciones, que van desde anticuerpos completos hasta fragmentos de anticuerpo (Figura 1). Se producen gracias a la manipulación de secuencias que codifican para el anticuerpo de interés y posterior producción mediante el uso de vectores y sistemas de expresión biológicos (Kunert y Reinhart, 2016). Algunos sistemas de expresión de proteínas recombinantes utilizan microorganismos como bacterias, hongos, levaduras, líneas celulares de insectos y mamíferos y otros sistemas como animales y plantas transgénicas (Frenzel y col., 2013; Holliger y Hudson, 2005). En la industria de anticuerpos recombinantes, emplear una sola plataforma para la producción de rAbs sería lo preferible. Sin embargo, factores como el tamaño del rAb, secuencia de aminoácidos, modificaciones post-traduccionales, estabilidad y solubilidad, hacen que la elección del sistema de expresión se ajuste a los requerimientos y características del anticuerpo de interés (Weisser y Hall, 2009).



**Figura 1.** Representación gráfica de los diferentes formatos de anticuerpos recombinantes. Fuente: (Bustamante-Córdova y col., 2018).

## **Producción de Anticuerpos Recombinantes en Sistemas de Expresión Procariotas**

La bacteria *Escherichia coli* es el sistema de expresión por elección cuando la producción de rAbs no requiere modificaciones postraduccionales, tales como patrones de glucosilación, como sucede con los scFv. Dicho sistema posee ciertas ventajas entre las que destaca los altos niveles de producción de anticuerpo recombinante a un bajo costo de mantenimiento (Andersen y Reilly, 2004). Se ha reportado rendimiento en producción de rAbs solubles en *E. coli* entre 0.9 mg/g de bacteria a 4 mg/L de cultivo (Shadi y col., 2018; Sharma y col., 2014).

Teniendo en cuenta el deficiente sistema de plegamiento en *E. coli*, así como el ambiente citoplasmático reductor, la producción de rAbs con enlaces disulfuro no suele ser eficiente. Es común que la expresión de proteínas heterólogas en el citoplasma reductor de la bacteria resulte en la formación de agregados proteicos insolubles llamadas cuerpos de inclusión (Schmidt, 2004). Ante dicha situación, el tratamiento para recuperar rAbs funcionales a partir de cuerpos de inclusión consiste en el aislamiento de los agregados, solubilización con componentes desnaturalizantes como urea, purificación y finalmente replegamiento por métodos como diálisis, dilución o replegamiento en columna (Weisser y Hall, 2009). Sin embargo, a menudo se reporta eficiencia de hasta 75% en el replegamiento de rAbs scFv recuperados de cuerpos de inclusión (Guo y col., 2003).

Para superar limitaciones como la formación de cuerpos de inclusión y búsqueda de condiciones óptimas de replegamiento, se han desarrollado diversas estrategias que permitan favorecer las condiciones de plegamiento y formación de enlaces disulfuros *in vivo*. Entre ellas podemos encontrar el uso de cepas *E. coli* modificadas genéticamente para permitir la formación de ambiente reductor en citoplasma, tales como *E. coli* SHuffle, (Lobstein y col., 2012), co-expresión de moléculas chaperonas como la proteína Skp (Wang y col., 2013) o empleando secuencias señal secretoras a periplasma, como el péptido peIB, donde el ambiente oxidante permite la formación de enlaces disulfuro y correcto plegamiento de rAbs (Padiolleau-Lefèvre y col., 2006). Aunque se han desarrollado estrategias para superar los inconvenientes de producción de rAbs en *E. coli*,

la elección de un sistema de expresión eucariota ofrece una alternativa viable para evitar las dificultades de producción de rAbs en sistemas de expresión procariotas.

## **Producción de Anticuerpos Recombinantes en Sistemas de Expresión Eucariota**

### **Levaduras y Hongos Filamentosos**

Los sistemas de expresión como levaduras y hongos filamentosos han ganado terreno en la producción de anticuerpos recombinantes, completos o fragmentos de anticuerpo (Ward y col., 2004). Entre los organismos comúnmente empleados se cuentan *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus awamori* y *Kluyveromyces lactis* (Gasser y Mattanovich, 2007). La principal ventaja que ofrecen dichos sistemas es el rendimiento en producción de bacterias aunado al eficiente sistema de plegamiento y modificaciones postraduccionales de sistemas eucariotas (Schirrmann y col., 2008). Además, las levaduras poseen un sistema excretor similar a eucariotas superiores, lo que permite que los rAbs sintetizados intracelularmente puedan ser transportados al ambiente extracelular (Yin y col., 2007) y el rendimiento en producción puede alcanzar niveles mayores a 1 g/L en procesos de fermentación (Martínez y col., 2012). Sin embargo, una desventaja de este sistema de producción es que las levaduras pueden llegar a adicionar patrones de glicosilación ajenos a los rAbs e incluso en sitios donde no son requeridos, aumentando su inmunogenicidad cuando son administrados en organismos eucariotas superiores (Sethuraman y Stadheim, 2006). En los últimos años se ha logrado inducir patrones N-glicosilación en levaduras similares al humano utilizando *S. cerevisiae* y especies del género *Pichia*, lo cual permite la producción de glicoproteínas con aplicación potencial en mamíferos (De Pourcq y col., 2010).

### **Células de Insectos**

Las células de insecto permiten producir proteínas heterólogas con el procesamiento y modificaciones postraduccionales similar al de organismos eucariotas superiores. Un

diverso número de fragmentos de anticuerpos y rAbs completos han sido expresados en conformación biológica funcional con este sistema (Yamaji, 2011). Por lo tanto, ofrece una alternativa eficiente para producción de rAbs, aunque se presenta el riesgo de adición de N-glucanos distintos a los encontrados en mamíferos, incrementando el riesgo de ser inmunogénicos (Ghaderi y col., 2012). Sin embargo, se ha llevado a cabo la expresión de rAbs en sistema de expresión de células de insecto-baculovirus derivado de *Spodoptera frugiperda* obteniendo como resultado Abs libres de patrones de glicosilación propios del sistema (Mabashi-Asazuma y col., 2013). El rendimiento de producción de rAbs varía en función de la optimización de condiciones de expresión y línea celular seleccionada. Empleando células de *Drosophila Schneider 2* en biorreactores, se puede alcanzar la producción de 8 g/L de cultivo (Wang y col., 2012). Por otro lado, la optimización de secuencias secretoras es altamente efectiva para producción rAbs secretados en *Trichoplusia ni* (Ohmuro-Matsuyama y Yamaji, 2017), sistema en el cual se ha obtenido rendimiento en producción de rAbs de 257 mg/L *in vivo* (Gómez-Sebastián y col., 2012) hasta 300 mg/L en cultivos de *Trichoplusia ni* (Yamaji y col., 2008).

### **Expresión en Plantas**

Los sistemas de expresión basados en plantas han sido empleados como una atractiva alternativa para la producción de rAbs que actualmente son expresados en sistemas basado en células de mamíferos o microbiológicos (Zvirin y col., 2018). Ofrece la ventaja de tener bajos costos de producción y flexibilidad en la obtención de rAbs a gran escala de acuerdo a las necesidades del mercado (Weisser y Hall, 2009). Las plantas pueden sintetizar y expresar anticuerpos completos o fragmentos derivados de ellos debido a los mecanismos de plegamiento y ensamblaje similares entre animales y plantas (Nair, 2017). Una desventaja del uso de sistemas de expresión basados en plantas, son los patrones de glicosilación distintos a los producidos en mamíferos, lo cual interfiere con la funcionalidad del fragmento Fc y posee potencial carácter inmunogénico (Larrick y col., 2001).

Desde la producción del primer anticuerpo expresado en la planta *Nicotiana tabacum* (Hiatt y col., 1989), se ha buscado la optimización de los sistemas de expresión para conseguir la obtención de rAbs funcionales alcanzándose hasta 1 g de proteína por kg de hojas de planta (Lomonosoff y D'Aoust, 2016). Dicha limitante ha sido en algunos casos superada con el desarrollo de plantas modificadas como *Nicotiana benthamiana* en la cual, fue posible la producción de un anticuerpo con patrones humanizados de N-glicosilación (Strasser y col., 2008) o mediante la eliminación de dichos patrones de glicosilación *in vivo* (Mamedov y col., 2017).

### **Líneas Celulares de Mamíferos**

A pesar de ser uno de los sistemas con mayores requerimientos de costos, debido a los medios de cultivo y dificultades en manipulación (Schirrmann y col., 2008), a la fecha, la mayoría de los rAbs terapéuticos son expresados en líneas celulares de mamíferos. Este sistema puede ser empleado para expresión transitoria o estable, dependiendo de las necesidades de la proteína a producir. Presenta diversas ventajas sobre los sistemas de expresión anteriormente descritos como: una correcta maquinaria de plegamiento, procesamiento post-traducciona l y sistema de secreción al espacio extracelular (Yin y col., 2007) lo cual, funcionalmente, lo vuelve más rentable. La elección de la línea celular depende de la aplicación del producto final. Entre las líneas celulares mayormente empleadas para la producción de rAbs a gran escala, se encuentra la línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) la cual han ganado creciente importancia en la obtención de rAbs terapéuticos, alcanzado hasta 300 mg/L en producción de proteínas recombinantes a escala de laboratorio (Costa y col., 2010; Rajendra y col., 2011). Particularmente, la línea celular de riñón embrionario humano (HEK) 293 es empleada para la expresión transitoria de anticuerpos a baja escala, debido a su alta eficiencia en transfección con plásmidos de DNA (Jäger y col., 2015) obteniéndose rendimiento de hasta 600 mg/L (Frenzel y col., 2013). Para optimizar los niveles de expresión de rAbs a baja escala en sistemas eucariotas, se han generado derivados de la línea celular HEK293 obteniéndose la línea celular FreeStyle293 y Expi293. Estos nuevos sistemas de expresión transitoria de rAbs

poseen la capacidad de crecer en suspensión, alcanzando mayor densidad celular por cultivo y con ello, rendimiento en producción de rAbs hasta 1 gramo/Litro en producción de IgG humana (Jones y col., 2012).

### **Anticuerpo Fragmento Variable de Cadena Sencilla (scFv)**

En aplicaciones terapéuticas, la región Fc del anticuerpo es de gran importancia dado que influye en la acción efectora del mismo (Frenzel y col., 2013). Sin embargo, hay ocasiones en las que esta acción efectora no es requerida y el efecto del reconocimiento del segmento Fc pudiera resultar indeseable (Holliger y Hudson, 2005). Ante este escenario, la elaboración de anticuerpos recombinantes carentes de Fc es una opción válida en la búsqueda de alternativas terapéuticas exitosas.

Una opción en la producción de anticuerpos recombinantes es la elaboración de fragmentos de anticuerpo, con capacidad de unión específica al antígeno, de manera similar a la de un anticuerpo completo. Entre los fragmentos de anticuerpo más pequeños que conservan su capacidad de reconocimiento de antígenos, se encuentra el Fragmento Variable de Cadena Sencilla (scFv) conformado por las regiones  $V_H$  y  $V_L$  del mAb del cual deriva unidas por un péptido de enlace (Ahmad y col., 2012). Además de extensión del péptido de unión de ambas regiones variables, la composición de aminoácidos de éste es importante para el correcto plegamiento de la cadena peptídica y rendimiento en la expresión de scFv en *E. coli* (Sharma y col., 2014), siendo la secuencia (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> la más común (Frenzel y col., 2013).

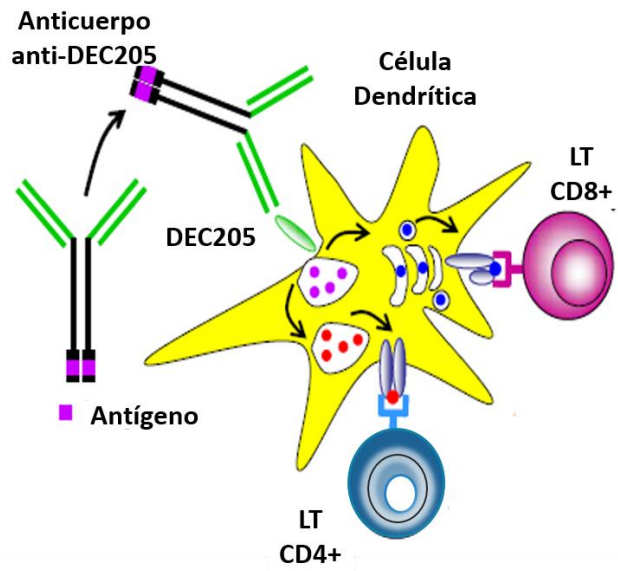
A la fecha, diversos scFv han sido exitosamente producidos en diversos sistemas de expresión tales como células de mamíferos (Ho y col., 2006), levaduras, plantas (Galeffi y col., 2006) y células de insectos (Choo y col., 2002). Estos pueden ser expresados correctamente plegados como proteínas activas o como agregados proteicos, los cuales requieren replegamiento *in vitro* para volverse activas. La posibilidad de ser expresado como proteína biológicamente funcional y ser secretado depende del sistema de expresión empleado (Ahmad y col., 2012). Sin embargo, scFv son frecuentemente expresados en



sistemas de expresión procariota, evitando así las dificultades tecnológicas y riesgo de contaminación en la utilización de sistemas de expresión eucariotas (Kunert y Reinhart, 2016).

### **Aplicación de los Anticuerpos Recombinantes en el Direccionamiento de Antígenos**

El desarrollo de herramientas profilácticas basadas en la utilización de anticuerpos ha sido explorado desde hace más de una década. Esta estrategia consiste en la entrega de antígenos a las DCs a través del uso de anticuerpos que reconozcan receptores de superficie (Figura 2), con la finalidad de promover la captura, procesamiento y presentación de antígenos (Alvarez y col., 2013). En el campo veterinario se ha evaluado el potencial de direccionamiento de antígenos hacia DCs como herramienta profiláctica. Se ha encontrado que al dirigir subunidades de Parvovirus canino (CPV) y Virus de Enfermedad Hemorrágica de Conejos (RHDV), acoplados a un scFv que reconoce el MHC-II, promueve un incremento en la producción de anticuerpos (hasta 600x) específicos y mayor supervivencia posterior a una infección con RHDV (Gil y col., 2011). Por otro lado, se ha evaluado el potencial de direccionamiento de antígeno hacia el receptor CD169, presente en macrófagos y monocitos, encontrándose que al acoplar la glicoproteína 4 (GP4) del Virus de Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) a un anticuerpo monoclonal anti-CD169, se favorece la producción de anticuerpos específicos y neutralización del virus *in vivo* (Ooms y col., 2013). En ratones, se ha direccionado antígenos de *Trypanosoma cruzi* hacia células dendríticas por reconocimiento del receptor de superficie DEC205, promoviendo un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  y proliferación de LT CD4<sup>+</sup> a diferencia de su contraparte sin direccionar (Rampazo y col., 2015).



**Figura 2.** Ilustración del mecanismo de direccionamiento de antígenos a células dendríticas. Modificado de: Petzold y col., 2012.

### **Direccionamiento de Antígenos a Células Dendríticas DEC205<sup>+</sup>**

Las DCs son parte fundamental del sistema inmune innato y juegan un papel importante en el inicio y regulación de la respuesta adaptativa (Banchereau y Steinman, 1998). Su principal función radica en el reconocimiento de antígenos y procesamiento de los mismos, con el propósito de presentar péptidos inmunogénicos a los linfocitos T no sensibilizados (náive) e iniciar la respuesta inmune adaptativa (Fadilah y Cheong, 2007). El reconocimiento e internalización de antígenos esta mediado por receptores presentes en la superficie de las DCs. Algunos ejemplos de estos son: receptores para el Fc de las inmunoglobulinas, receptores de complemento, integrinas, receptores tipo Lectina C (CD209, DEC205, langerina, receptores de manosa entre otros) (Platt y col., 2010; Clark y col., 2000). Estas células, tienen la característica de estimular a los linfocitos T nativos tanto *in vitro* como *in vivo*, brindando así la posibilidad de delimitar la infección mediante el establecimiento de una respuesta inmune específica. Además, pueden inducir la activación de las células NK y la activación de los linfocitos B a células productoras de anticuerpos (Banchereau y col., 2000).

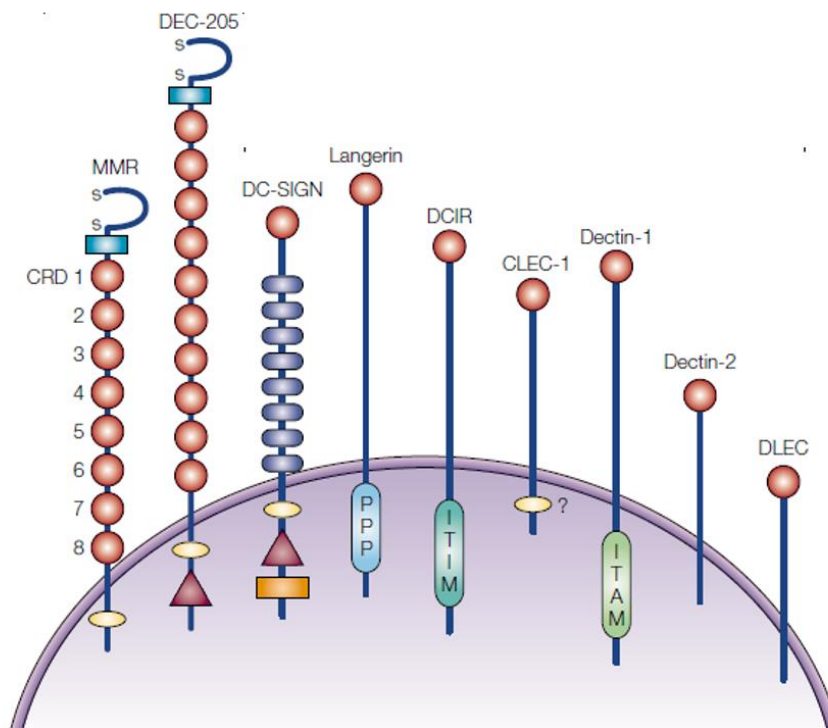
La habilidad de las DCS las ha convertido en un blanco potencial para el desarrollo de vacunas que promuevan una eficiente y duradera respuesta celular. Uno de los receptores de superficie en las DC más populares como blanco en direccionamiento de antígenos es el DEC205. En 2004, se realizaron ensayos de direccionamiento de antígenos en un modelo murino, en el cual se empleó (OVA) acoplada a un mAb anti-DEC205. Se observó una respuesta más eficiente en proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> así como en la producción de IFN- $\gamma$  en el grupo tratado con el OVA-anti-DEC205 en comparación al grupo únicamente tratado con OVA (Bonifaz y col., 2004). En aves, el direccionamiento de antígeno de influenza aviar hacia DEC205 promovió también una mejorada respuesta inmune humoral, con la producción de anticuerpos específicos (Jáuregui-Zúñiga y col., 2017). En becerros, se ha direccionado antígeno de rickettsia *Anaplasma marginale* empleando anticuerpos scFv anti-DEC205, donde el número de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$ , proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y títulos de anticuerpos IgG fue potenciado como efecto del direccionamiento de antígenos (Njongmeta y col., 2012).

También se ha evaluado el efecto de direccionamiento de antígenos hacia dendríticas DEC205<sup>+</sup> de cerdo, empleando diversos antígenos estructurales de PRRSV, lo cual promovió un aumento de producción de IFN- $\gamma$  así como IL-4 por parte de LT CD4<sup>+</sup> (Subramaniam y col., 2017).

En la búsqueda de herramientas antitumorales, también ha sido evaluado el efecto de direccionamiento de antígenos asociados a tumores de melanoma hacia células DEC205<sup>+</sup> mediante el uso de un anticuerpo scFv anti-DEC205, encontrándose *in vivo* una mayor proliferación de LT, producción de IFN- $\gamma$  y disminución en la tasa de crecimiento tumoral en modelo murino (Johnson y col., 2008).

### **Características Receptor DEC205**

Dentro de los receptores más explorados como blanco en direccionamiento de antígenos, se encuentra el DEC205. Ha sido caracterizado en especies como ratones, humanos, ovejas y cerdos (Flores-Mendoza y col., 2010; Kato y col., 1998; Swiggard y col., 1995). Dentro de esta familia de receptores de tipo lectina C (Figura 3), el DEC205 está formado por un dominio citoplasmático pequeño y un gran dominio extracelular siendo este último conformado por diversos subdominios: ricos en cisteína, fibronectina tipo II y 10 dominios continuos de reconocimiento de carbohidratos (Figdor y col., 2002). Mientras el dominio extracelular está involucrado en el reconocimiento de antígenos (Jiang y col., 1995), el extremo citoplasmático del receptor DEC205 contiene secuencias que regulan su orientación intracelular y posterior reciclado hacia la superficie de la célula a su vez mejorando la presentación de antígenos vía MHC clase II (Mahnke y col., 2000). Además, se ha observado que la internalización mediante este receptor resulta en presentación cruzada de antígenos, a través de moléculas de MHC clase I para la activación de LT CD8<sup>+</sup> (Joffre y col., 2012).



**Figura 3.** Familia de receptores de Lectina tipo C. Fuente: Modificado de Figdor y col., 2002.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño del Gen scFv9H2F7**

Para el diseño del gen sintético scFv9H2F7, las secuencias codificantes de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo monoclonal anti-DEC205 de cerdo, se obtuvieron previamente por el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Desarrollo y Alimentación, A.C. Ambas regiones fueron enlazadas por tres repeticiones de la secuencia codificante para G<sub>4</sub>S. La síntesis del gen scFv9H2F7 y optimización para expresión en los sistemas eucariota y procariota fue realizada por GenScript® obteniendo los genes optimizados scFv9H2F7 clonados en vector pcDNA3.1 y en pUC57, respectivamente.

### **Clonación de Gen scFv9H2F7 Procariota en Vector pET100/D-TOPO**

Con la finalidad de clonar el gen scFv9H2F7 en el vector de expresión pET100/D-TOPO, se diseñaron iniciadores específicos para el gen, agregando los nucleótidos CACC en el extremo 5' del iniciador sentido (Sentido: 5'- CAC CAT GGC TCA AGT CCA ACT G - 3' y antisentido 5'- TCA GTG GTG GTG ATG ATG ATG AGC CGC -3'). Utilizando el kit comercial Platinum™ Pfx DNA Polymerase de Invitrogen, se amplificó el segmento correspondiente al gen scFv9H2F7 a través de PCR, de acuerdo con la Tabla I. Se adicionó 1 µL de templado pUC57/scFv9H2F7 (100 ng/µL) al tubo de mezcla de PCR o 1 µL de H<sub>2</sub>O al control negativo. Se llevó a cabo la programación del termociclador de acuerdo con el protocolo descrito en la Tabla II.

**Tabla I.** Preparación de mezcla de reacción para amplificación del gen scFv9H2F7.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen por reacción</b>
10X Pfx Amplification Buffer	5 $\mu$ L
dNTP's 10 mM Invitrogen	1.5 $\mu$ L
MgSO <sub>4</sub> 50 mM	1 $\mu$ L
Platinum™ Pfx DNA Polimerasa	0.5 $\mu$ L
Primer pET9H2F7 Sentido 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Primer pET9H2F7 Antisentido 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O grado biología molecular	39 $\mu$ L

**Tabla II.** Protocolo de termociclador para amplificación del gen scFv9H2F7.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
94°C	5 min	1
94°C	15 seg	25
55°C	30 seg	25
68°C	1 min	25
68°C	10 min	1
10°C	$\infty$	1

La visualización del producto de PCR se realizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, cargando 10  $\mu$ L de producto de PCR + 2  $\mu$ L de buffer de carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 40% sacarosa, en agua). Las condiciones de corrida fueron 80 volts durante 60 min en cámara de electroforesis horizontal (Biorad). La visualización de bandas en gel se realizó en equipo Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ de Biorad.

Una vez confirmada la amplificación del gen scFv9H2F7 de extensión 766 pb, se procedió a purificar la banda del gel de agarosa, empleando el equipo comercial de purificación GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit. Brevemente, se cortó la banda del gel y se disolvió en 300  $\mu$ L de buffer de captura incubando a 60°C durante 5-15 min (agitación ocasional). Se transfirió la solución a columna de purificación y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la columna y se descartó el filtrado, para dar paso a 2 lavados con 500  $\mu$ L de buffer de lavado (centrifugando y descartando el filtrado entre lavados). Por último, se colocó la columna en tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo y se agregaron 20  $\mu$ L de buffer de elución incubando a temperatura ambiente durante 1 min y centrifugando para eluir el DNA purificado. Todas las centrifugaciones se realizaron a  $16\ 000 \times g$  durante 2 min a temperatura ambiente.

Utilizando equipo NanoDrop, se determinó concentración y pureza del producto. Posteriormente, se tomaron 3.5 ng de dicho producto para ser clonado en el vector de expresión pET100/D-TOPO del kit pET Directional TOPO® (Invitrogen). Brevemente, se preparó la reacción de ligación agregado 1 $\mu$ L de solución de sales, 1  $\mu$ L de agua estéril, 1  $\mu$ L de vector (los anteriores proporcionados por el equipo comercial) y finalmente, 1  $\mu$ L de la dilución del producto gen scFv9H2F7 purificado. Se incubó la mezcla de ligación durante 1 h a temperatura ambiente para posteriormente transformar por choque térmico células químicamente competentes (cqc) *E. coli* TOP10 (Invitrogen) con 3  $\mu$ L de reacción de ligación.



### **Transformación de Células Químicamente Competentes**

La transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de choque térmico. Brevemente, se agregaron 3  $\mu\text{L}$  de reacción de ligación (pET100/scFv9H2F7) o 100 ng de plásmido reconstituido (pcDNA3.1/scFv9H2F7) en un vial de células químicamente competentes *E. coli* TOP10, se homogenizó evitando pipetear y se incubó durante 30 min en hielo. Posteriormente, se dio choque térmico incubando el vial de bacterias en baño de agua a 42°C durante 30 seg para finalmente ser regresadas al hielo durante 2 min. Se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de medio S.O.C y se incubó durante 1 h a 37°C, en agitación orbital a 220 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se inocularon placas de medio Luria Broth (LB) suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) agregando 100 ó 150  $\mu\text{L}$  de bacterias transformadas y se realizó sembrado masivo con asa bacteriológica. Se incubaron las placas durante 24 h, a 37°C.

### **Identificación de Clonas Positivas por PCR de Colonia y Electroforesis en Gel de Agarosa al 1.2%**

Posterior al periodo de incubación, se seleccionaron colonias de bacterias para realizar reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objetivo de encontrar aquellas que fueron transformadas ya sea con pET100/scFv9H2F7 o pcDNA3.1/scFv9H2F7. Utilizando el equipo comercial Taq DNA Polymerase, recombinant de Invitrogen™, se llevó a cabo la preparación de la mezcla de reacción y se agregaron 25  $\mu\text{L}$  por tubo de PCR. Para la carga del templado, utilizando asa bacteriológica en punta, se tomó una porción de colonia bacteriana y se suspendió en la mezcla de reacción. Las cantidades de mezcla de PCR y protocolo de termociclador se describen en las Tablas III, IV y V. La visualización del producto de PCR se realizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, cargando 10  $\mu\text{L}$  de producto de PCR + 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga. Las condiciones de corrida fueron 80 volts durante 60 min en cámara de electroforesis horizontal (Biorad). La visualización de bandas en gel se realizó en equipo Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ de Biorad.

**Tabla III.** Preparación de mezcla de reacción para PCR de colonia.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen por reacción</b>
10X PCR Buffer	1.25 $\mu$ L
dNTP's 10 mM	0.25 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75 $\mu$ L
Taq DNA Polimerasa	0.06 $\mu$ L
Primer Sentido 10 $\mu$ M	0.25 $\mu$ L
Primer Antisentido 10 $\mu$ M	0.25 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O grado biología molecular	22.19 $\mu$ L

**Tabla IV.** Protocolo de termociclador para PCR de colonia de *E. coli* TOP10 transformadas con pET100/scFv9H2F7.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Numero de ciclos</b>
94°C	3 min	1
94°C	30 seg	25
61°C	1 min	25
72°C	1 min	25
72°C	10 min	1
10°C	$\infty$	1

Tabla V. Protocolo de termociclador para PCR de colonia de *E. coli* TOP10 transformadas con pcDNA3.1/scFv9H2F7.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Numero de ciclos</b>
94°C	3 min	1
94°C	30 seg	25
50°C	1 min	25
72°C	1 min	25
72°C	10 min	1
10°C	∞	1

## **Aislamiento de DNA Plasmídico**

### **Extracción de DNA Plasmídico Maxiprep**

Se preparó cultivo primario de la colonia 1 *E. coli* TOP10 positiva al plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7 en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Se incubó durante 8 h a 37°C, 220 rpm. Transcurrido el periodo de incubación, se vació el contenido del cultivo primario en 100 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y se incubó durante 16 h, 37°C, 220 rpm. Se cosecharon las bacterias centrifugando el volumen total del cultivo a 6,000 x g, durante 15 min, 4°C.

Posteriormente, la extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo empleando el equipo comercial EndoFree Plasmid Maxi Kit de QIAGEN. Se resuspendió el botón de bacterias en 10 mL de buffer P1. A continuación se agregaron 10 mL de buffer P2, se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 10 mL de buffer P3 y se homogenizó mezclando por inversión 4-6 veces. Se vació el lisado en el cartucho de QIAFilter y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se removió la tapa de la boquilla de salida y se colocó el émbolo para posteriormente filtrar el lisado empujando el émbolo hacia abajo. Se colectó el filtrado y se agregaron 2.5 mL de buffer ER, se mezcló por inversión 10 veces y se incubó en hielo durante 30 min. Se equilibró una columna QIAGEN tip 500 agregando 10 mL de buffer QBT, permitiendo que filtrara por gravedad. Se agregó el lisado en la columna QIAGEN tip 500 equilibrada y se permitió que entrara en la resina por flujo por gravedad. Se lavó la columna 2 veces agregando 30 mL de buffer QC. Después, se eluyó el DNA plasmídico agregando 15 mL de buffer QN.

Una vez eluido de la columna, el DNA fue precipitado agregando 10.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló y centrifugó a 15,000 x g, durante 20 min a 4°C. Cuidadosamente, se descartó el sobrenadante, se agregaron 5 mL de etanol al 70% y se centrifugó 15,000 x g, 10 min, 4°C. Finalmente, se descartó cuidadosamente el sobrenadante, se dejó secar el precipitado en campana de flujo laminar y se resuspendió

el DNA en 1 mL de buffer TE libre de endotoxinas. Se determinó pureza y concentración en equipo NanoDrop.

### **Extracción de DNA Plasmídico Miniprep**

Se cultivó la colonia 1 *E. coli* TOP10 positiva a la presencia del plásmido pET100/scFv9H2F7 en 5 mL de medio LB con ampicilina. Se incubó durante 18 h, 37°C, en agitación orbital a 220 rpm. Posteriormente, la extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo empleando el equipo comercial GeneJET Plasmid Miniprep kit-Thermo Fisher Scientific. Se cosecharon las bacterias del cultivo centrifugando  $8,000 \times g$  durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 250  $\mu$ L de Buffer de resuspensión. Se transfirió la solución a un tubo de microcentrífuga y se agregaron 250  $\mu$ L de solución de lisis, mezclando por inversión hasta que la solución se tornó viscosa y ligeramente clara. Se agregaron 350  $\mu$ L de solución neutralizante, se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo 4 a 6 veces y se centrifugó durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante a columnas GeneJET por pipeteo evitando suspender el precipitado blanco. Se centrifugó la columna durante 1 min y se descartó el filtrado.

Se realizaron dos lavados agregando 500  $\mu$ L de solución de lavado, centrifugando 1 min y descartando el sobrenadante. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo y se agregaron 20  $\mu$ L de buffer de elución directamente sobre la membrana de la columna. Se incubó 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó para eluir el DNA plasmídico. Todas las centrifugaciones se realizaron a  $12,000 \times g$ .

### **Secuenciación**

Para confirmar identidad de las secuencias y ausencia de mutaciones, los plásmidos pcDNA3.1/scFv9H2F7 y pET100/scFV9H2F7 fueron secuenciados por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (IBT-UNAM). Se realizó alineamiento de las secuencias obtenidas con las secuencias templado, con el uso de la

base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI). Para confirmar que las proteínas codificadas en cada una de las secuencias obtenidas no presentaran ningún codón de terminación temprano y que los tripletes no fueron modificados, se realizó la traducción a proteína utilizando el programa en línea “ExPASy Translate tool” y alineamiento con la secuencia de aminoácidos templado.

### **Expresión de scFv anti-DEC205 en *E. coli* Rosetta 2 (DE3)**

Una vez confirmada la identidad del plásmido pET100/scFv9H2F7, se transformaron *E. coli* Rosetta 2 (DE3) mediante choque térmico con 30 ng de plásmido pET100/scFv9H2F7. Se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron 18 h a 37°C. Mediante PCR de colonia, se confirmó la presencia del plásmido en los aislamientos en placa.

Del aislado obtenido, se seleccionó una colonia para preparar el preinóculo en 20 mL de medio LB con ampicilina y se incubó 16 h, a 37°C, en agitación 220 rpm. Se tomaron 10 mL de cultivo y se inoculó un litro de medio fresco LB con ampicilina (100 µg/mL). Se incubó a 37°C, en agitación a 220 rpm hasta alcanzar densidad óptica (D.O) entre 0.6 y 0.8 a 600 nm para posteriormente inducir la expresión del scFv anti-DEC205 adicionando Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a concentración final de 1 mM. Se muestrearon a tiempo 0 y 24 h post-inducción. Las muestras fueron centrifugadas (8,000 x g, 5 min), los botones celulares resuspendidos en 200 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y lisados mediante sonicación en hielo (3-4 pulsos de 10 seg, amplitud 15%). Las fracciones obtenidas (proteínas solubles e insolubles) fueron separadas por centrifugación (16,000 x g, 2 min) y analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras (SDS-PAGE).

Posteriormente los gels fueron teñidos durante 1 h con Azul de Coomassie R-250 y el exceso de colorante se eliminó incubando el gel en solución desteñidora (50% metanol, 40% agua, 10% ácido acético) durante al menos 4 h a temperatura ambiente.

### **Lavado de Cuerpos de Inclusión y Replegamiento de scFv anti-DEC205**

Se cosecharon las bacterias del cultivo de expresión centrifugando el volumen total de cultivo a 8, 000 x g, 4°C, durante 30 min, obteniéndose 4.7 gramos de biomasa por litro de cultivo. Posteriormente, se tomó 1 gramo de bacterias y se resuspendió agregando 4 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, Benzamidina 5 mM). Se sonicó en hielo (6 pulsos de 10 seg, amplitud 40%). Posteriormente, se centrifugó a 16, 000 x g, 4°C, 30 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 4 mL de buffer de lavado 1 (Tris-HCl 50 mM, pH 7.0, DTT 5 mM, Tritón X-100 (2%), EDTA 5 mM). Se sonicó hasta resuspender totalmente y se centrifugó bajo las condiciones previamente mencionadas. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer de lavado 2 (Tris-HCl 50 mM, pH 7.0, DTT 5 mM, EDTA 5 mM). Se centrifugó nuevamente, y se descartó el sobrenadante. Se repitió el lavado con buffer de lavado 2 por segunda ocasión.

Una vez lavados los cuerpos de inclusión, se llevó a cabo la solubilización de éstos agregando 4 mL de buffer de solubilización (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, Urea 8 M, NaCl 0.25 M, β-mercaptoetanol 5 mM), se sonicaron en hielo hasta resuspender y se dejaron en agitación durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el periodo de solubilización, se centrifugó a 16, 000 x g, 4°C durante 30 min. Se tomó el sobrenadante y se filtró en membrana de 0.22 µM. Una vez solubilizados, se llevó a cabo purificación mediante cromatografía de afinidad en metales inmovilizados (IMAC) empleando columnas HisTrap FF crude de GE Healthcare Life Sciences.

La elución se realizó empleando el equipo ÄKTAprime plus, a través de un gradiente de elución de 0-100 % de buffer de elución (Buffer A: Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, Urea 8 M, Imidazol 20 mM, pH 7.4; Buffer B: Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, Urea 8 M, Imidazol 500 mM, pH 7.4). Se colectaron fracciones de 1 mL y fueron analizadas por SDS-PAGE al 12% y cuantificación de proteínas por ensayo de Bradford.

Después de confirmar la purificación del scFv de cuerpos de inclusión, se llevó a cabo el replegamiento del scFv anti-DEC205 por el método de dilución. Se ajustó la

concentración de scFv purificado a concentración de 1 mg/mL y posteriormente, se tomaron 4 mg y se adicionaron gota por gota en 100 mL de buffer de replegamiento (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 0.15M, EDTA 1 mM, Arginina HCl 0.5 M, Glutati3n reducido 2 mM, Glutati3n oxidado 1 mM, Glicerol 5%) en placa de agitaci3n, a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, se dej3 en agitaci3n a 4°C durante 48 h para finalmente evaluar su funcionalidad.

### **Expresi3n de scFv anti-DEC205 en L3nea Celular Expi293**

Se sembraron  $6 \times 10^7$  c3lulas viables en 30 mL de Medio de Expresi3n Expi293. Para llevar a cabo la transfecci3n en 30 mL se cultivaron  $7.5 \times 10^7$  c3lulas/mL. Se incubaron a 37°C, 8% CO<sub>2</sub>, agitaci3n orbital 125 rpm. Posteriormente, se agregaron  $7.5 \times 10^7$  c3lulas a 25.5 mL de Medio de Expresi3n Expi293 ( $2.9 \times 10^6$  c3lulas/mL) en un matraz de 125 mL.

Se diluyeron 30  $\mu$ g de pl3smido pcDNA3.1/scFv9H2F7 en Medio Opti-MEM reducido en suero en un volumen total de 1.5 mL. Se mezcl3 suavemente. Posteriormente, se diluyeron 81  $\mu$ L de Expifectamine en Medio Opti-MEM reducido en suero a un volumen total de 1.5 mL. Se Mezcl3 suavemente e incub3 por 5 min a temperatura ambiente. Despu3s de la incubaci3n de 5 min, se agreg3 el DNA diluido al reactivo Expifectamine diluido para obtener un volumen final de 3 mL. Se incub3 la mezcla por 20 min a temperatura ambiente para permitir la formaci3n del complejo DNA-Expifectamine. Se agregaron 3 mL de complejo DNA:Expifectamine al matraz de cultivo obteniendo volumen final de 28.5 mL. Se incub3 20 h a 37°C, 8% CO<sub>2</sub>, 125 rpm.

Despu3s de las 20 h de incubaci3n, se agregaron 150  $\mu$ L de Expifectamine 293 Transfection Enhancer 1 y 1.5 mL de Expifectamine 293 Transfection Enhancer 2 al matraz de cultivo. (Enhancers 1 y 2 pueden ser combinados previo a la adici3n del cultivo celular). El volumen final result3 ser aproximadamente 30 mL. Se determin3 viabilidad celular y se tom3 muestra de sobrenadantes diariamente durante los 4 d3as posteriores a la transfecci3n para ser analizadas por SDS-PAGE al 12%.



Confirmada la expresión de scFv anti-DEC205 se llevó a cabo su purificación a través de IMAC empleando columnas Histrap FF crude de GE Healthcare Life Sciences. Se equilibró la columna con buffer A (20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.4). Una vez equilibrada, se cargó el sobrenadante clarificado del cultivo de transfección de células Expi293 centrifugado a 328 x g durante 10 min a temperatura ambiente. La elución de la muestra se llevó a cabo en un gradiente lineal con un cambio de 0 a 100% de buffer de B (20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7.4) utilizando el equipo ÄKTAprime plus. Se colectaron fracción de elución de 3 mL y fueron analizadas por SDS-PAGE y cuantificación proteica por ensayo de Bradford.

### **Evaluación de Actividad Biológica de scFv anti-DEC205**

#### **Reconocimiento de scFv Hacia Dominio Extracelular de DEC205**

Para evaluar la capacidad de reconocimiento del scFv anti-DEC25 hacia el dominio extracelular del receptor DEC205 (antígeno que reconoce el mAb anti-DEC205), se realizó SDS-PAGE al 10%, corriendo el dominio extracelular del DEC205 en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, se realizó transferencia a membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con leche al 5% reducida en grasa en buffer de lavado e incubación (PBS con 0.05% de Tween-20) durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con buffer de lavado e incubación (10 mL por lavado). Se incubó durante 1 h, 37°C, agitación orbital ya sea con el scFv anti-DEC205 producido en sistema Expi o *E. coli* Rosetta 2 (DE3) a concentración final de 0.5 µg/mL en buffer de incubación. Se realizaron 3 lavados. Finalmente se incubó durante 1 h a 37°C, en agitación orbital con anticuerpo anti-poli-histidina conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:2000 en buffer de lavado e incubación. Tras la adición del sustrato de fosfatasa alcalina, se reveló el reconocimiento del scFv hacia el dominio extracelular del receptor DEC205.

### **Reconocimiento de scFv anti-DEC205 Hacia Células DEC205<sup>+</sup>**

Para la evaluación de capacidad de reconocimiento del scFv anti-DEC205 hacia células DEC205<sup>+</sup> se llevó a cabo de manera indirecta, realizando ensayos de bloque de receptor DEC205. Se extrajo sangre periférica de cerdos sanos alojados en la granja experimental de CIAD. Posteriormente, mediante técnica de Ficoll-Paque <sup>TM</sup>, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, se realizó separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de cerdo.

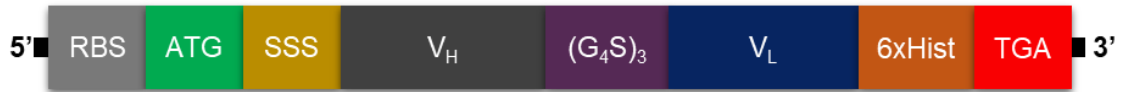
Se bloquearon  $1 \times 10^6$  células para cada tubo de ensayo, con suero porcino al 10% en PBA (PBS 1X con 0.1% de suero fetal bovino) durante 15 min. Posteriormente se detuvo el bloqueo agregando 2 mL de PBA, centrifugando a  $328 \times g$  durante 10 min y descartando el sobrenadante. Se suspendieron los botones celulares y se agregaron 50 o 100  $\mu\text{L}$  de scFv producido por cualquiera de los sistemas de expresión (células Expi293 o *E. coli* Rosetta 2 (DE3)). Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se realizaron 2 lavados con 2 mL de PBA. Posteriormente, se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de mAb anti-DEC205 conjugado con PE (diluido 1:100). Se incubó 15 min y realizaron 2 lavados con PBA. Finalmente, las células marcadas fueron analizadas en el equipo BD FACSCanto II.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

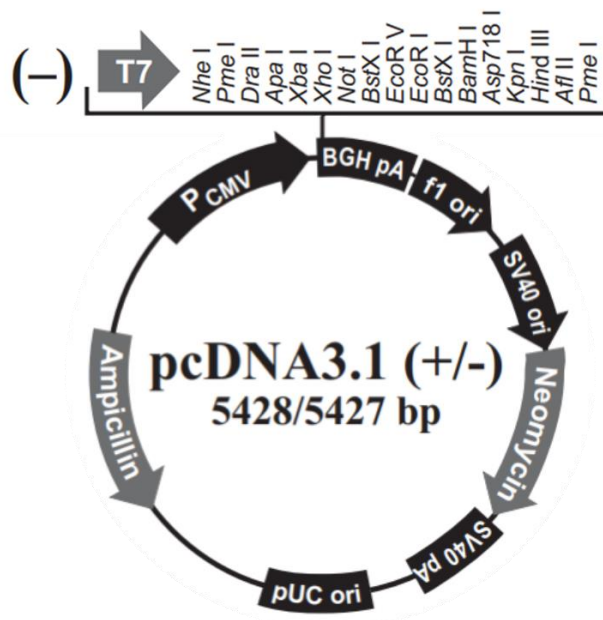
### Diseño del Gen scFv9H2F7

El gen scFv9H2F7 (Figura 4) optimizado para expresión en sistema eucariota presenta una extensión de 825 pb. Se encuentra conformado por un sitio de unión a ribosoma (RBS), un codón de inicio de traducción (ATG), una secuencia señal secretora (SSS), secuencia variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) y la secuencia variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) unidas a través de tres repeticiones de la secuencia ( $G_4S$ ) como péptido enlazador y seis repeticiones histidina (6xHist) finalizando con el codón de término AUG. Dicho gen fue sintetizado y obtenido en el vector de expresión pcDNA3.1 (Figura 5), obteniendo así el plásmido de expresión en sistema eucariota pcDNA3.1/scFv9H2F7.

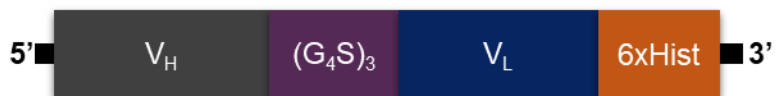
El diseño del constructo para expresión en sistema procariota se muestra en la Figura 6. Con una extensión de 762 pares de bases (pb), el gen scFv9H2F7 optimizado para expresión en sistema procariota, se encuentra conformado por la secuencia variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) y la secuencia variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) unidas a través de tres repeticiones de la secuencia ( $G_4S$ ) como péptido enlazador y seis repeticiones histidina (6xHist) con la que se permite su purificación y detección. El vector pET100/D-TOPO contiene el resto de los elementos requeridos para la transcripción y traducción del gen scFv9H2F7 (Figura 7). Se ha reportado que la orientación de las secuencias en sentido  $V_H - V_L$  tiene un efecto positivo en producción de scFv en *E. coli*, en comparación con el orden  $V_L - V_H$  (Kim y col., 2008). Debido a los antecedentes mencionados, el diseño y optimización del gen scFv9H2F7 fue en orientación  $V_H - V_L$  para ser expresado en ambos sistemas.



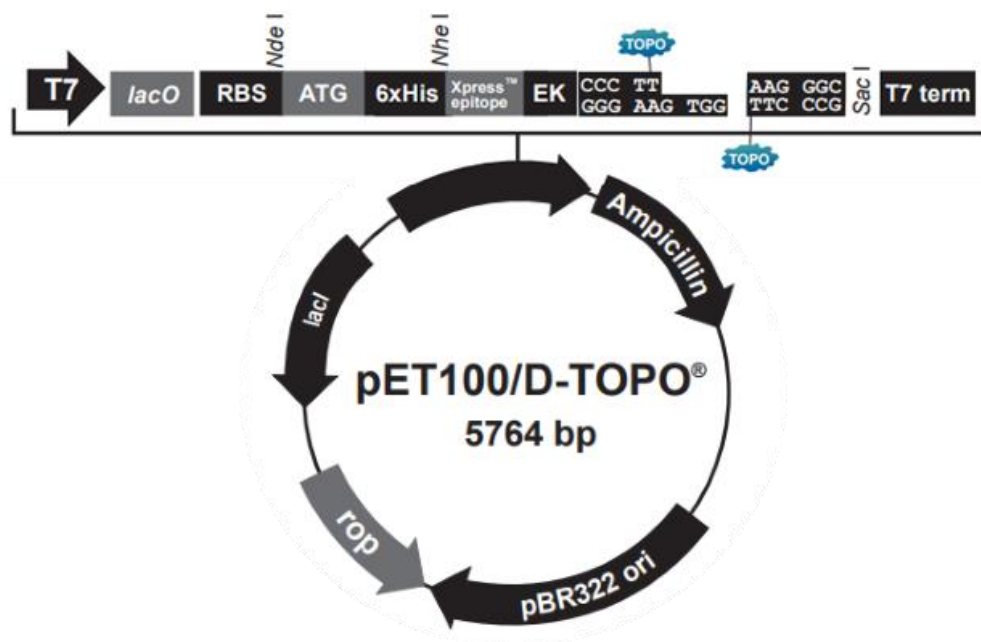
**Figura 4.** Constructo del gen scFv9H2F7 para expresión en sistema eucariota. Extensión 825 pares de bases. RBS: sitio de unión a ribosoma; ATG: codón de inicio; SSS: secuencia señal secretora; V<sub>H</sub>: región variable cadena pesada; (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>: péptido de enlace; V<sub>L</sub>: región variable cadena ligera; 6xHist: cola de histidinas; AUG: codón de término.



**Figura 5.** Mapa de la conformación del vector de expresión eucariota pcDNA 3.1 (-).



**Figura 6.** Constructo del gen scFv9H2F7 para expresión en sistema procariota. Extensión 762 pares de bases. V<sub>H</sub>: región variable cadena pesada; (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>: péptido de enlace; V<sub>L</sub>: región variable cadena ligera; 6xHist: cola de histidinas.



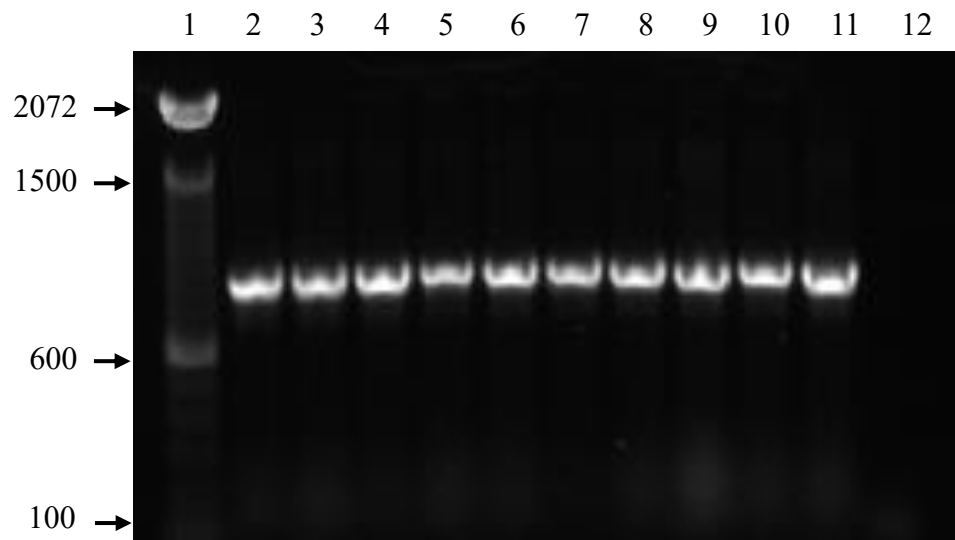
**Figura 7.** Mapa de la conformación del vector de expresión procariota pET100/D-TOPO.

### **Amplificación y Purificación del Plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7 Para Expresión en Sistema Eucariota**

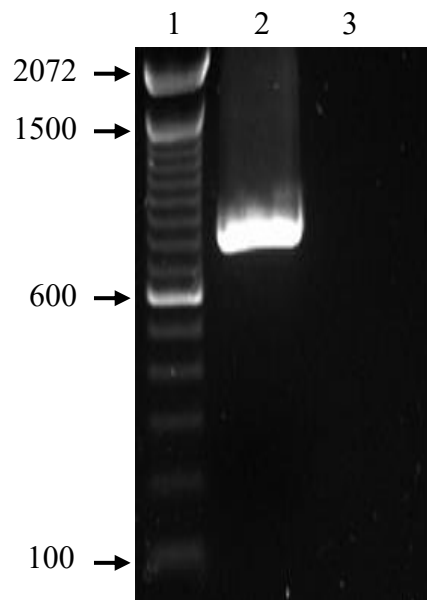
Posterior a la transformación de cqc *E. coli* TOP10 con el plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7, se lograron identificar 10 colonias positivas a amplificación del gen scFv9H2F7 (Figura 8). Únicamente se seleccionó la colonia 1 para la extracción de DNA plasmídico Maxiprep. Se logró aislar el plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7 con una concentración de 461 ng/μL y pureza de 1.81.

### **Clonación de Gen scFv9H2F7 Procariota en Vector pET100/D-TOPO y Aislamiento de DNA Plasmídico Miniprep**

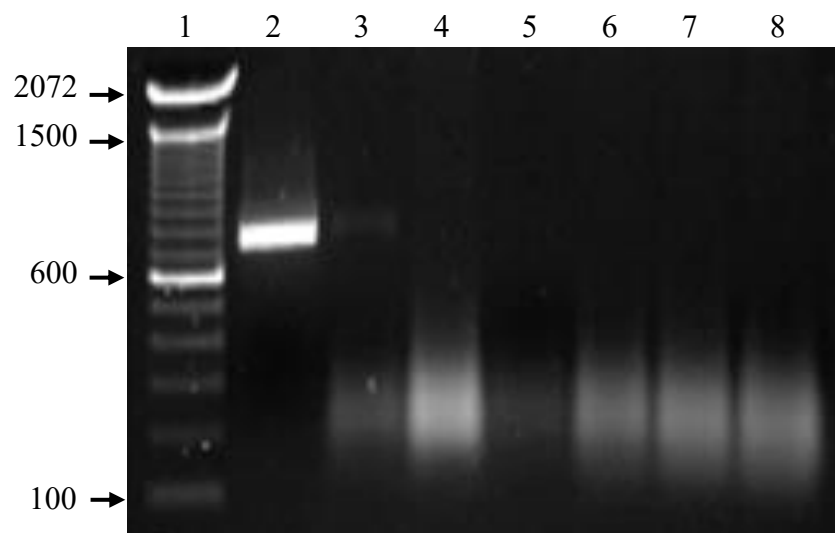
Con el uso de iniciadores especificados se logró amplificar el segmento correspondiente al gen scFv9H2F7, contenido en el vector pUC57, obteniéndose una banda de aproximadamente 766 pb (Figura 9, carril 2). Después de ser purificado de la banda del gel, se obtuvo el gen scFv9H2F7 en concentración 64.2 μg/μL. Posterior a la clonación en vector pET100/D-TOPO y transformación de *E. coli* TOP 10, se lograron aislar colonias de las cuales, solamente 1 presentó resultado positivo a la amplificación del gen scFv9H2F7 observándose una banda de 766 pb aproximadamente (Figura 10, carril 3). Al realizar la extracción de DNA plasmídico Miniprep, se obtuvo un producto de concentración 121.6 ng/μL y pureza 1.98. Se confirmó mediante PCR, la presencia del gen scFv9H2F7 en el DNA plasmídico aislado (Figura 11, carril 3) de la colonia 1.



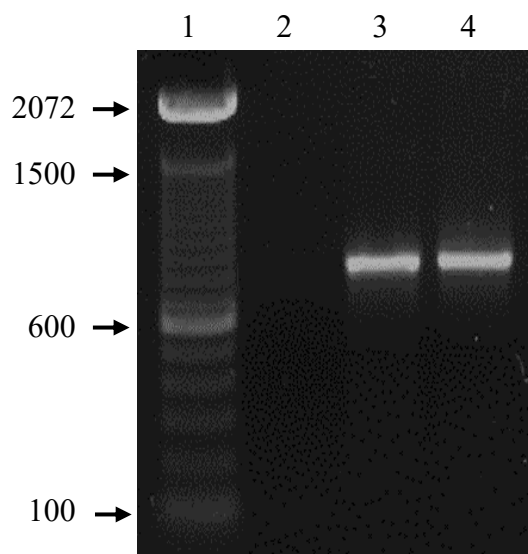
**Figura 8.** Electroforesis de productos PCR de colonia *E. coli* TOP 10 transformadas con el plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7. 1: Marcador 100 pb Invitrogen; 2-11: Productos PCR colonias 1 a la 10, respectivamente; 12: Blanco de PCR.



**Figura 9.** Electroforesis del producto de amplificación del gen scFv9H2F7. 1: marcador 100 pb Invitrogen; 2: producto de PCR amplificación gen scFv9H2F7; 3: Blanco de PCR.



**Figura 10.** Electroforesis de productos de PCR de colonia *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pET100/scFv9H2F7. 1: marcador 100 pb Invitrogen; 2: control positivo; carriles 3-8: productos de PCR colonia 1-6 respectivamente.



**Figura 11.** Confirmación de la presencia del gen scFv9H2F7 en el plásmido purificado pET100/scFv9H2F7. 1: marcador 100 pb Invitrogen; 2: Blanco de PCR; 3: Producto PCR de plásmido pET100/scFv9H2F7; 4: Control positivo de PCR (gen scFv9H2F7 purificado).



### **Secuenciación y Alineamiento de los Productos**

Se realizó alineamiento de los resultados obtenidos en la secuenciación de los plásmidos aislados pcDNA3.1/scFv9H2F7 y pET100/scFv9H2F7 con sus respectivas secuencias templado. En el caso del plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7 se encontró un 100% de identidad en la secuencia nucleotídica (Tabla VI) y al hacer la deducción a aminoácidos, 100% de identidad (Tabla VII). Por lo contrario, al realizar alineamiento en la secuencia del plásmido aislado pET100/scFv9H2F7 se encontró un 99% de identidad en las secuencias (Tabla VIII) dado que se presentó un cambio de nucleótido C por T (letra señalada en color rojo) en la posición 583, modificando el codón de GGC a GGT, ambos codificantes para el aminoácido glicina (correspondiente a la región del péptido enlazador). Debido a la mutación silenciosa (se traduce al mismo aminoácido), al obtener la secuencia de aminoácidos deducida encontramos 100% de identidad con la secuencia esperada (Tabla IX). Por lo anterior, se decidió continuar con los ensayos de expresión utilizando el plásmido purificado pET100/scFv9H2F7. Por motivos de confidencialidad, en las Tablas de alineamientos de nucleótidos (Tablas VI y VIII) y aminoácidos (Tablas VII y IX), las secuencias correspondientes a las regiones determinantes de complementariedad fueron sustituidas por letras X.

**Tabla VI.** Alineamiento de la secuencia nucleotídica del plásmido purificado pcDNA3.1/scFv9H2F7 y la secuencia templado scFv9H2F7 eucariota.

		Identities: 825/825(100%)		Gaps: 0/825(0%)	
Query	1	GAATTC	CGCGCCACCATGGGCTGGTCCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCA	60	
Sbjct	1	GAATTC	CGCGCCACCATGGGCTGGTCCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCA	60	
Query	61	CCGGCGTGC	ACTCTCAAGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGCGCGGACTGGTTCAACCTGGCG	120	
Sbjct	61	CCGGCGTGC	ACTCTCAAGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGCGCGGACTGGTTCAACCTGGCG	120	
Query	121	GATCTCTGA	AGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCXXXXXXXXXXXXXCT	180	
Sbjct	121	GATCTCTGA	AGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCGACTTCAGCXXXXXXXXXXXXXCT	180	
Query	181	GGGTCCGAC	AGGCCCTGGCAAAGACTGGAATGGATCGGCXXXXXXXXXXXXXXXXXX	240	
Sbjct	181	GGGTCCGAC	AGGCCCTGGCAAAGACTGGAATGGATCGGCXXXXXXXXXXXXXXXXXX	240	
Query	241	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXAAGTTCATCATCAGCCGGGACAACGCCA	300	
Sbjct	241	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXAAGTTCATCATCAGCCGGGACAACGCCA	300	
Query	301	AGAACACCC	TGTACTGCAGATGAGCAAAGTGGCGGAGCGAGGACACAGCCCTGTACTACT	360	
Sbjct	301	AGAACACCC	TGTACTGCAGATGAGCAAAGTGGCGGAGCGAGGACACAGCCCTGTACTACT	360	
Query	361	GTGCCAGAX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGGGCCAGGGCACCACCGTGA	420	
Sbjct	361	GTGCCAGAX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGGGCCAGGGCACCACCGTGA	420	
Query	421	CAGTTTCTA	GCGGAGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTGGATCTGGCGGTGGTGGCTCTGATA	480	
Sbjct	421	CAGTTTCTA	GCGGAGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTGGATCTGGCGGTGGTGGCTCTGATA	480	
Query	481	TCCAGATGA	CACAGAGCCCCAGCAGCCTGTTTGCCAGCCTGGGCGATACCATCACCATCA	540	
Sbjct	481	TCCAGATGA	CACAGAGCCCCAGCAGCCTGTTTGCCAGCCTGGGCGATACCATCACCATCA	540	
Query	541	CCTGTXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGTATCAGCAGAAGCCCGGCA	600	
Sbjct	541	CCTGTXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGTATCAGCAGAAGCCCGGCA	600	
Query	601	ACATCCCCA	AAGCTGCTGATCTACXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGCGTGCCACAGCAGAT	660	
Sbjct	601	ACATCCCCA	AAGCTGCTGATCTACXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGCGTGCCACAGCAGAT	660	
Query	661	TTTCTGGC	AGCGGCTCTGGCACCGGCTTCACCCTGACAATATCTAGCCTGCAGCCTGAGG	720	
Sbjct	661	TTTCTGGC	AGCGGCTCTGGCACCGGCTTCACCCTGACAATATCTAGCCTGCAGCCTGAGG	720	
Query	721	ATATCGCC	ACCTACTACTGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTTGGCGGAGGCA	780	
Sbjct	721	ATATCGCC	ACCTACTACTGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTTGGCGGAGGCA	780	
Query	781	CCAAGCTGG	AATCAAGCACCACCATCATCACCCTGATAAGCTT	825	
Sbjct	781	CCAAGCTGG	AATCAAGCACCACCATCATCACCCTGATAAGCTT	825	

**Tabla VII.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del plásmido pcDNA3.1/scFv9H2F7 y secuencia de aminoácidos templado scFv9H2F7 eucariota.

		Identities 266/266(100%)	Positives 266/266(100%)	Gaps 0/266(0%)
Query	1	MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSDXXXXXXXXWVRQAP		60
Sbjct	1	MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSDXXXXXXXXWVRQAP		60
Query	61	GKGLEWIGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKFIISRDNANTLYLQMSKVRSEDTALYYCARXXX		120
Sbjct	61	GKGLEWIGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKFIISRDNANTLYLQMSKVRSEDTALYYCARXXX		120
Query	121	XXXXXXXXWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLFASLGDITITITCXXXX		180
Sbjct	121	XXXXXXXXWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLFASLGDITITITCXXXX		180
Query	181	XXXXXXXXWYQQKPGNIPKLLIYXXXXXXXXGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYY		240
Sbjct	181	XXXXXXXXWYQQKPGNIPKLLIYXXXXXXXXGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYY		240
Query	241	XXXXXXXXXXFGGGTKLEIKHHHHHH	266	
Sbjct	241	XXXXXXXXXXFGGGTKLEIKHHHHHH	266	

**Tabla VIII.** Alineamiento de la secuencia nucleotídica del plásmido purificado pET100/scFv9H2F7 y la secuencia templado scFv9H2F7 procariota.

		Identities: 953/954(99%)	Gaps: 0/954(0%)
Query	1	GGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG	60
Sbjct	32	GGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG	91
Query	61	CGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATG	120
Sbjct	92	CGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATG	151
Query	121	GGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCATGGCTCAAGTCCAA	180
Sbjct	152	GGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCATGGCTCAAGTCCAA	211
Query	181	CTGCAAGAATCGGGTGGTGGTCTGGTCCAACCGGGTGGCTCCCTGAAACTGTCGTGTGCG	240
Sbjct	212	CTGCAAGAATCGGGTGGTGGTCTGGTCCAACCGGGTGGCTCCCTGAAACTGTCGTGTGCG	271
Query	241	GCGTCGGGCTTTGATTTTAGTXXXXXXXXXXXXXXXXXGGGTTCCGCCAGGCACCGGGCAAA	300
Sbjct	272	GCGTCGGGCTTTGATTTTAGTXXXXXXXXXXXXXXXXXGGGTTCCGCCAGGCACCGGGCAAA	331
Query	301	GGTCTGGAATGGATTGGCXX	360
Sbjct	332	GGTCTGGAATGGATTGGCXX	391
Query	361	XXXXXXXXXXAAATTCATTATCTCAGTGACAACGCGAAAAATACGCTGTACCTGCAGATG	420
Sbjct	392	XXXXXXXXXXAAATTCATTATCTCAGTGACAACGCGAAAAATACGCTGTACCTGCAGATG	451
Query	421	AGCAAAGTCCGTTCTGAAGATACCGCGCTGTATTACTGCGCCCGCXXXXXXXXXXXXXXXX	480
Sbjct	452	AGCAAAGTCCGTTCTGAAGATACCGCGCTGTATTACTGCGCCCGCXXXXXXXXXXXXXXXX	511
Query	481	XXXXXXXXXXXXXXXXXGGGGCCAAGGCACACGCTGACGGTTTCCTCAGCGGTGGCGGT	540
Sbjct	512	XXXXXXXXXXXXXXXXXGGGGCCAAGGCACACGCTGACGGTTTCCTCAGCGGTGGCGGT	571
Query	541	TCAGCGGTGGTGGTTCGGGCGGTGGCGGTAGCGATATTCAGATGACCCAATCTCCGTCG	600
Sbjct	572	TCAGCGGTGGCGGTTTCGGGCGGTGGCGGTAGCGATATTCAGATGACCCAATCTCCGTCG	631
Query	601	AGCCTGTTTGCAAGTCTGGGTGACACCATTACGATCACCTGTXXXXXXXXXXXXXXXXXX	660
Sbjct	632	AGCCTGTTTGCAAGTCTGGGTGACACCATTACGATCACCTGTXXXXXXXXXXXXXXXXXX	691
Query	661	XXXXXXXXXXXXXXXXXGGTATCAGCAAAAACCGGTAACATTCCGAAACTGCTGATCTAC	720
Sbjct	692	XXXXXXXXXXXXXXXXXGGTATCAGCAAAAACCGGTAACATTCCGAAACTGCTGATCTAC	751
Query	721	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGTGTGCCGAGTCGCTTTTCCGGCTCAGGTTCCGGGCACC	780
Sbjct	752	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGTGTGCCGAGTCGCTTTTCCGGCTCAGGTTCCGGGCACC	811
Query	781	GGTTTCACGCTGACCATTCTAGTCTGCAGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCAG	840
Sbjct	812	GGTTTCACGCTGACCATTCTAGTCTGCAGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCAG	871
Query	841	CAAGGTCAAAGCTATCCGTACACCTTCGGCGCGGCACGAAACTGGAATCAAACGCGCA	900
Sbjct	872	CAAGGTCAAAGCTATCCGTACACCTTCGGCGCGGCACGAAACTGGAATCAAACGCGCA	931
Query	901	GCGGCTCATCATCATCACCACCCTGAAAGGGCGAGCTCAACGATCCGGCTGCT	954
Sbjct	932	GCGGCTCATCATCATCACCACCCTGAAAGGGCGAGCTCAACGATCCGGCTGCT	985

**Tabla IX.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del plásmido pET100/scFv9H2F7 y secuencia de aminoácidos templado scFv9H2F7 procariota .

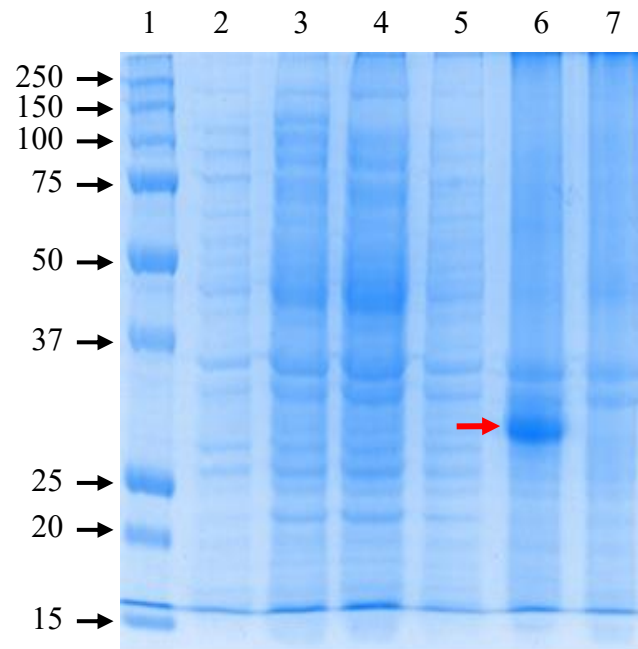
		Identities 313/313(100%)	Positives 313/313(100%)	Gaps 0/313(0%)
Query	1	QFPSRNNFVLEGDIHMRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHFFDMAQVQLQES		60
		QFPSRNNFVLEGDIHMRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHFFDMAQVQLQES		
Sbjct	12	QFPSRNNFVLEGDIHMRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHFFDMAQVQLQES		71
Query	61	GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSXXXXXWVRQAPGKGLEWIGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		120
		GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSXXXXXWVRQAPGKGLEWIGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		
Sbjct	72	GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSXXXXXWVRQAPGKGLEWIGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		131
Query	121	FIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARXXXXXXXXXXWGQGTTVTVSSGGGGSGGG		180
		FIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARXXXXXXXXXXWGQGTTVTVSSGGGGSGGG		
Sbjct	132	FIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARXXXXXXXXXXWGQGTTVTVSSGGGGSGGG		191
Query	181	GSGGGSDIQMTQSPSSLFASLGDTITITCXXXXXXXXXXWYQKPGNIPKLLIYXXXX		240
		GSGGGSDIQMTQSPSSLFASLGDTITITCXXXXXXXXXXWYQKPGNIPKLLIYXXXX		
Sbjct	192	GSGGGSDIQMTQSPSSLFASLGDTITITCXXXXXXXXXXWYQKPGNIPKLLIYXXXX		251
Query	241	XXXGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCXXXXXXXXXXFGGGTKLEIKRAAAHH		300
		XXXGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCXXXXXXXXXXFGGGTKLEIKRAAAHH		
Sbjct	252	XXXGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCXXXXXXXXXXFGGGTKLEIKRAAAHH		311
Query	301	HHHHKGE LNDPAA 313		
		HHHHKGE LNDPAA		
Sbjct	312	HHHHKGE LNDPAA 324		

### **Expresión de scFv anti-DEC205 en *E. coli* Rosetta 2 (DE3)**

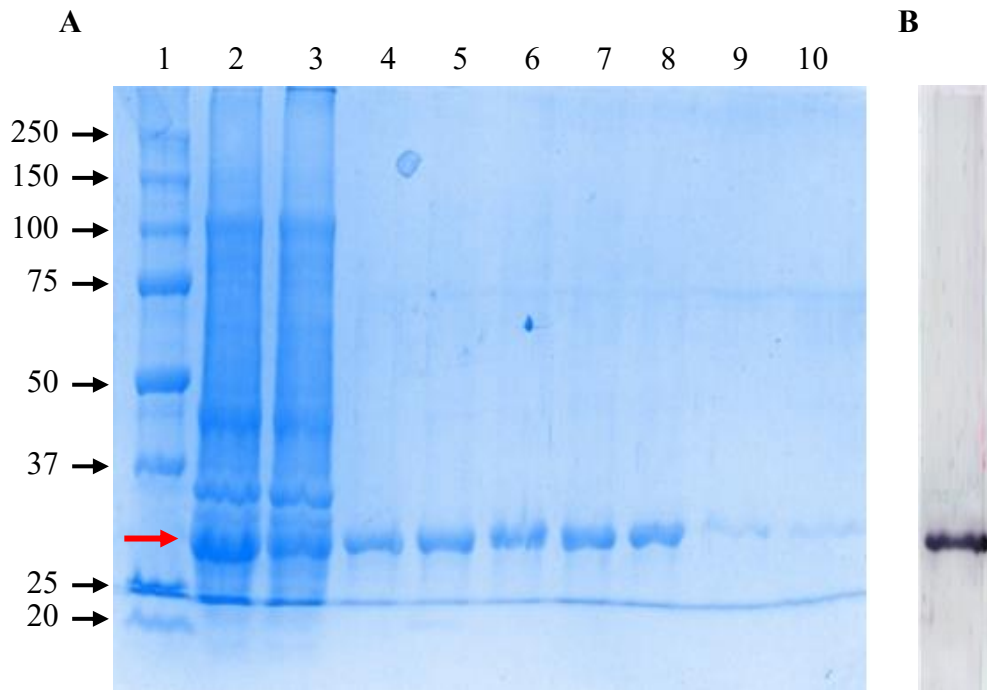
Ante las condiciones de expresión empleadas, concentración de IPTG de 1 mM, 37°C, 24 h de expresión, se detectó la producción del scFv anti-DEC205 en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión (Figura 12, carril 6, flecha roja). Al cosechar la biomasa posterior a la cinética de sobreexpresión, se obtuvieron 4.7 gramos de pellet por litro de cultivo, rendimiento semejante al reportado por otros autores empleando la cepa *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y condiciones de expresión similares (Sharma y col., 2014; Lamberski y col., 2006). Debido a que la cepa de expresión empleada no posee características que permitan la formación de enlaces disulfuro, el scFv fue expresado como proteína incorrectamente plegada, como agregados en cuerpos de inclusión. Después de extraer y lavar los cuerpos de inclusión de 1 gramo de pellet, estos fueron solubilizados mediante la adición de urea 8 M, la cual lleva a la disrupción de interacciones no covalentes en los agregados proteicos. Seguido al tratamiento de extracción y solubilización, se analizó el producto obtenido observándose una banda de peso aproximado a 31 kDa (Figura 13 A, carril 2, flecha roja).

Una vez solubilizados, la terminación de 6 repeticiones de histidina en el scFv anti-DEC205, permitió llevar a cabo su purificación por IMAC, donde se aisló una banda pura (Figura 13 A, carriles 4 al 8). Al realizar cuantificación de proteína por ensayo de Bradford, se determinó una concentración total de 7 mg de scFv obtenido en las fracciones eluidas de la columna de IMAC, rendimiento bajo considerando lo reportado por otros autores, donde se alcanzan hasta 13 mg de scFv en cuerpos de inclusión por gramo de pellet bacteriano (Patil y col., 2017).

Sin embargo, el rendimiento de la columna de purificación IMAC no fue el óptimo, dado que se observa la presencia de la banda de 31 kDa en remanente de cuerpos de inclusión solubilizados y filtrados por la columna (Figura 13, carril 3) correspondiente al scFv que no fue capturado por la matriz de IMAC.



**Figura 12.** Expresión de scFv anti-DEC205 en *E. coli* Rosetta 2 (DE3) inducida con 1 mM de IPTG a 37°C durante 0 y 24 h. SDS-PAGE 12%, tinción azul de Coomassie. **1:** Marcador kDa. **2:** fracción soluble tiempo 0. **3:** fracción soluble inducida, tiempo 24. **3:** fracción soluble no inducida, tiempo 24; **4:** fracción insoluble, tiempo 0. **5:** fracción insoluble inducida, tiempo 24. **6:** fracción insoluble no inducida, tiempo 24.



**Figura 13.** Cuerpos de inclusión solubilizados y fracciones eluidas purificación de scFv anti-DEC205 por IMAC. **A.** SDS-PAGE al 12%, tinción azul de Coomassie. **1:** Marcador kDa; **2:** Cuerpos de inclusión solubilizados. **3:** Cuerpos de inclusión solubilizados post-IMAC. **4:** scFv fracción 11. **5:** scFv fracción 12. **6:** scFv fracción 13. **7:** scFv fracción 14. **8:** scFv fracción 15. **9:** scFv replegado. **10:** scFv replegado. **B. Western blot.** Confirmación de purificación de scFv empleando anticuerpo anti-polihistidina conjugado con fosfatasa alcalina.



Los sistemas de expresión procariotas son eficientes en la producción de rAbs que no requieren modificaciones postraduccionales. Cuando la proteína heteróloga a sobre expresar requiere la formación de puentes disulfuro, suelen emplearse cepas de *E. coli* modificadas para promover un ambiente oxidante en citoplasma (Gopal y Kumar, 2013), secuencias señal secretoras al espacio periplásmico (Schlegel y col., 2013), y co-expresión de moléculas chaperonas citoplasmáticas (Yousefi y col., 2018), condiciones que permiten la formación de enlaces disulfuro y correcto plegamiento de scFv.

Aun cuando existen diversas opciones para facilitar la formación de enlaces disulfuro y correcto plegamiento de los scFv *in vivo*, el tratamiento para replegamiento *in vitro* es una opción para la producción de scFv funcionales (Sun y col., 2014). Puesto que las condiciones de expresión del scFv en el sistema no fueron previstas para prevenir la formación de agregados proteicos y correcto plegamiento *in vivo*, fue requerido llevar a cabo el replegamiento de la proteína scFv *in vitro*. Durante el proceso de replegamiento, la presencia de 1 mM de glutatión disulfuro y 2 mM de glutatión permitió la formación de enlaces disulfuro controlando la relación molar de glutatión oxidado a reducido. Según condiciones para replegamiento de scFv establecidas en estudios previos, se reporta rendimiento de 10.2 mg de proteína activa por litro de cultivo (Bu y col., 2013), relativamente bajo en comparación con otros sistemas de expresión. Sin embargo, para el caso del scFv anti-DEC205 no se llevó a cabo el cálculo en rendimiento en recuperación de scFv biológicamente funcional. Se confirmó la purificación del scFv anti-DEC205 mediante western blot, empleando un anticuerpo de detección anti-polihistidinas conjugado con fosfatasa alcalina (Figura 13 B).

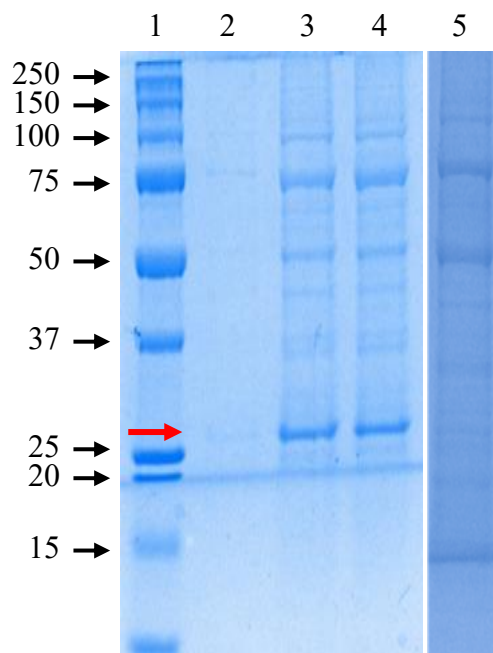
A la fecha, han sido reportados diversos sistemas de replegamiento de scFv insolubles (Guo y col., 2006; Sinacola y Robinson, 2002; Tsumoto y col., 1998). La presencia de puentes disulfuro en los scFv puede representar un desafío para la apropiada expresión de la proteína recombinante en el citoplasma reductor de *E. coli* (Guglielmi y Martineau, 2009). Utilizando el protocolo de purificación, solubilización y replegamiento *in vitro* del

scFv anti-DEC205 en cuerpos de inclusión, se logró obtener un scFv biológicamente funcional expresado en el sistema *E. coli* Rosetta 2 (DE3).

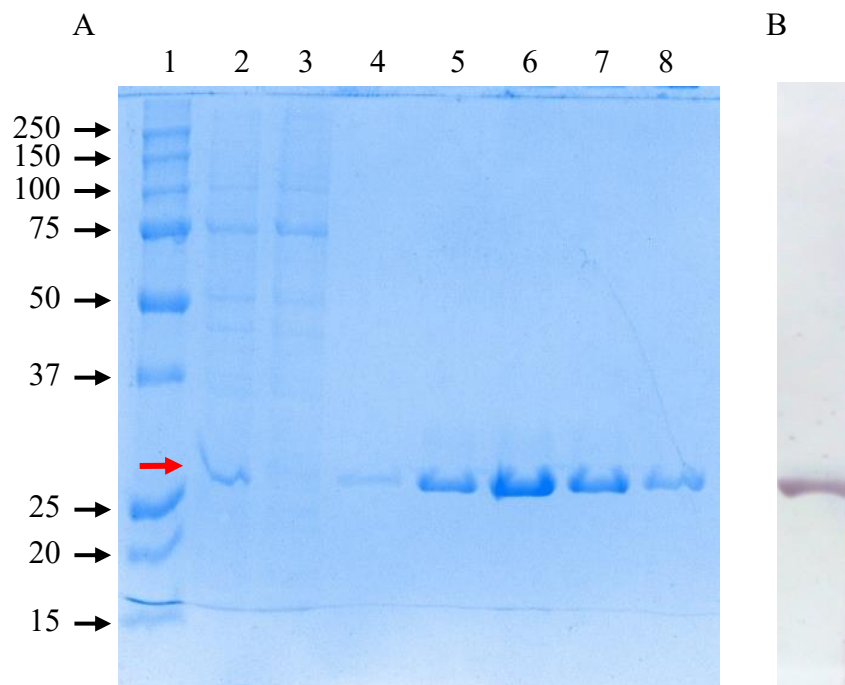
### **Expresión de scFv anti-DEC205 en línea celular Expi293**

En diferentes tiempos post-transfección de la línea celular Expi293, se tomaron muestras de sobrenadante para ser analizadas en busca de la expresión del scFv anti-DEC205. La construcción del gen scFv9H2F7 para expresión en sistema eucariota contiene la secuencia señal secretora MGWSCILFLVATATGVHS, la cual ha sido funcional para el transporte de rAbs al espacio extracelular (Lu y Zhu, 2014). De manera similar, fue posible la secreción del anticuerpo scFv hacia el sobrenadante, siendo confirmada su expresión desde el día 1 al día 4 (Figura 14, carril 2 al 4, flecha roja) observándose la presencia de múltiples bandas entre las que se encuentra una de 27 kDa. Al comparar el patrón de bandas del sobrenadante de células Expi293 transfectadas con el plásmido vector de expresión (Figura 14, carril 5), se observa la ausencia de la banda de 27 kDa presente en la transfección con pcDNA3.1/scFv9H2F7. Con lo anterior, se descartó la posibilidad de que se tratara de una proteína propia del sistema de expresión y su metabolismo.

A diferencia del gen scFv9H2F7 para expresión en sistema procariota, el constructo de expresión en eucariotas resulta en la producción de un scFv anti-DEC205 con un peso estimado de 27 kDa, dado que el vector le otorga menos aminoácidos extras a los del propio scFv. El periodo óptimo de cosecha fue al día 4 post-transfección, puesto que la viabilidad celular se encontraba alrededor de 55% y la concentración de proteína en sobrenadante aproximadamente 353.5 µg/mL. Al realizar la purificación mediante IMAC, se retuvo en su totalidad el scFv anti-DEC205 en la columna cromatográfica, dado que no se observa la presencia de la banda de 27 kDa en el sobrenadante que fue pasado a través de la columna (Figura 15, carril 3). Posterior a la elución del scFv, se obtuvieron 5 fracciones de 3 mL, las cuales resultaron positivas a la presencia de una banda única de 27 kDa. A través de western blot, empleando un anticuerpo anti-polihistidinas conjugado con fosfatasa alcalina, se confirmó la purificación del scFv anti-DEC205 (Figura 15 B).



**Figura 14.** Análisis de sobrenadantes de transfección línea celular Expi293 con pcDNA3.1/scFv9H2F7. SDS-PAGE al 12%, tinción azul de coomassie. **1:** Marcador kDa. **2:** sobrenadante transfección Expi293 día 1. **3:** sobrenadante transfección Expi293 día 3. **4:** sobrenadante transfección Expi293 día 4. **5:** sobrenadante transfección Expi293 día 4 con control de expresión (codificante a IgG de conejo).



**Figura 15.** Sobrenadante transfección de células Expi293 y fracciones eluidas de la purificación de scFv anti-DEC205 por IMAC. **A.** SDS-PAGE, tinción azul de Coomassie. **1:** Marcador kDa. **2:** Sobrenadante transfección Expi293. **3:** Sobrenadante transfección Expi293 post-IMAC. **4:** scFv fracción 6. **5:** scFv fracción 7. **6:** scFv fracción 8. **7:** scFv fracción 9. **8:** scFv fracción 10. **9:** scFv fracción 11. **10:** scFv fracción 12. **B.** Western blot. Confirmación de purificación de scFv empleando anticuerpo anti-polihistidina conjugado con fosfatasa alcalina.

La línea celular Expi293 ha sido adaptada para crecer en suspensión alcanzando mayor densidad celular que su línea celular parental HEK293 y, por lo tanto, mayor rendimiento en la producción de rAbs (Chiou y col., 2014). Posterior a la purificación, se obtuvo rendimiento total de aproximadamente 6 mg de scFv anti-DEC205 por transfección de células Expi293 en 30 mL de cultivo. El rendimiento obtenido es por mucho mayor a los 30 mg/L y 22 mg/L que reportan otros autores en producción de rAbs a través del sistema de expresión Expi293 (Fang y col., 2017; Hultqvist y col., 2017).

Aunque existen diversos reactivos empleados para la transfección transitoria de líneas celulares de mamífero, en el presente trabajo se utilizó el reactivo de transfección mediada por lípidos Expifectamine™ 293. Dicho reactivo está conformado por lípidos catiónicos, los cuales ofrecen una mayor eficiencia en la transfección de células de mamífero (Zhi y col., 2010). Contrastando con el sistema empleado por Fang y cols., 2017 y Hultqvist y cols., 2017, aunque fue utilizado el mismo sistema de expresión Expi293, el reactivo de transfección que los autores eligieron fue a base del polímero catiónico polietiliminina (PEI). Si bien posee la ventaja de ser más económico y accesible, el PEI presenta un menor rendimiento en transfección y por ello la producción de rAbs por litro de cultivo resulta en menor concentración, en comparación con el reactivo de transfección Expifectamine.

### **Evaluación de Actividad Biológica de scFv anti-DEC205**

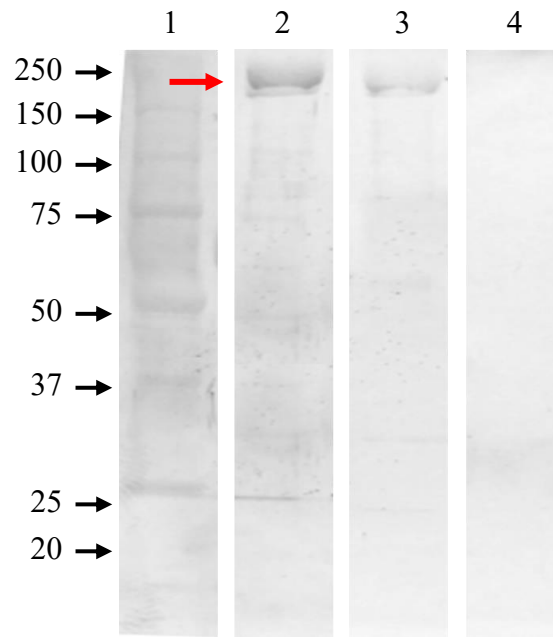
#### **Reconocimiento de scFv Hacia Dominio Extracelular de Receptor DEC205**

Partiendo de la caracterización del receptor DEC205 porcino (Flores-Mendoza y col., 2010), se empleó el fragmento correspondiente a los aminoácidos 810-925 del dominio extracelular del receptor para generar el mAb anti-DEC205 (Flores-Mendoza y col., 2012). Basados en el hecho que las secuencias para la construcción del scFv anti-DEC205 provienen del mAb anti-DEC205 porcino, se evaluó la capacidad de reconocimiento del scFv anti-DEC205 hacia dominio extracelular del receptor. Considerando la característica de los scFv en conservar la especificidad del mAb parental del cual derivan, mediante

western blot se llevó a cabo la evaluación de reconocimiento de los scFv hacia el dominio extracelular del receptor (peso estimado 190 kDa). Como resultado, se observó que los scFv expresados en sistema *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y en línea celular Expi293, presentan capacidad de reconocer el dominio extracelular del DEC205, (Figura 16, carriles 2 y 3, respectivamente).

La detección del reconocimiento del scFv hacia el dominio extracelular del receptor DEC205 se realizó empleando el mAb anti-poli-histidina conjugado con fosfatasa alcalina y posterior adición del sustrato de la enzima. El carril 4 de la Figura 16 corresponde al tratamiento del dominio extracelular del receptor DEC205 únicamente con el anticuerpo de detección. Tras no observar una banda positiva en carril 4 de la Figura 16, se comprobó que la detección de la banda de 190 kDa en los carriles 2 y 3 corresponde al reconocimiento del scFv anti-DEC205 expresados en los sistemas procariota y eucariota, respectivamente. Al observar reconocimiento por parte de los scFv anti-DEC205 en western blot, se puede inferir que el antígeno que se reconoce es un epítoto lineal del dominio extracelular del receptor, puesto que su estructura nativa fue desnaturalizada mediante el tratamiento por SDS-PAGE.

Siendo consistente con la capacidad de reconocimiento a antígeno del mAb anti-DEC205 del cual derivan, ambos scFv anti-DEC205 conservaron su capacidad de reconocer al dominio extracelular del receptor DEC205 con peso aproximado a 190 kDa.



**Figura 16.** Evaluación de la capacidad de reconocimiento de los scFv anti-DEC205 expresados en sistemas Expi293 y *E. coli* Rosetta 2 (DE3) hacia el dominio extracelular del receptor DEC205. Western blot. **1:** Marcador kDa. **2:** Dominio extracelular del DEC205 incubado con scFv anti-DEC205 expresado en *E. coli* + mAb anti-polihistidina conjugado con fosfatasa alcalina. **3:** Dominio extracelular del DEC205 incubado con scFv anti-DEC205 expresado en Expi293 + mAb anti-polihistidina conjugado con fosfatasa alcalina. **4:** Dominio extracelular del DEC205 incubado con mAb anti-polihistidina conjugado con fosfatasa alcalina.

### **Reconocimiento de scFv anti-DEC205 Hacia Células DEC205<sup>+</sup>**

La estrategia de direccionamiento de antígenos hacia células presentadoras ha mostrado resultados prometedores en el establecimiento de la respuesta inmune celular y humoral. En particular, el direccionamiento de antígenos a células dendríticas a través del reconocimiento de receptores de superficie es una estrategia popular para el desarrollo de herramientas profilácticas (Kwon y col., 2005). El creciente interés en células dendríticas DEC205<sup>+</sup> como blanco para el direccionamiento de antígenos radica en su capacidad de captar antígenos, activación de linfocitos T naïve y presentación cruzada por MHC clase I y II (Johnson y col., 2008). Sin embargo, la optimización de mecanismos de entrega de antígenos hacia células dendríticas sigue siendo explorada.

Una forma de evaluar la capacidad de reconocimiento de los scFv es utilizar un anticuerpo secundario anti-6xHist, ya que es común utilizar este tipo de etiquetas para facilitar su identificación. Algunos autores utilizando este tipo de etiquetas han logrado identificar scFv por citometría (Zhu y col., 2012). Sin embargo, en las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio esto no fue posible (datos no mostrados). Otra estrategia es realizar un marcaje directo del scFv con algún fluorocromo, pero esto no fue posible. Por lo anterior, la capacidad de reconocimiento se evaluó con ensayos de bloqueo de receptor, donde el scFv evitaría el reconocimiento del anticuerpo monoclonal hacia el receptor DEC205.

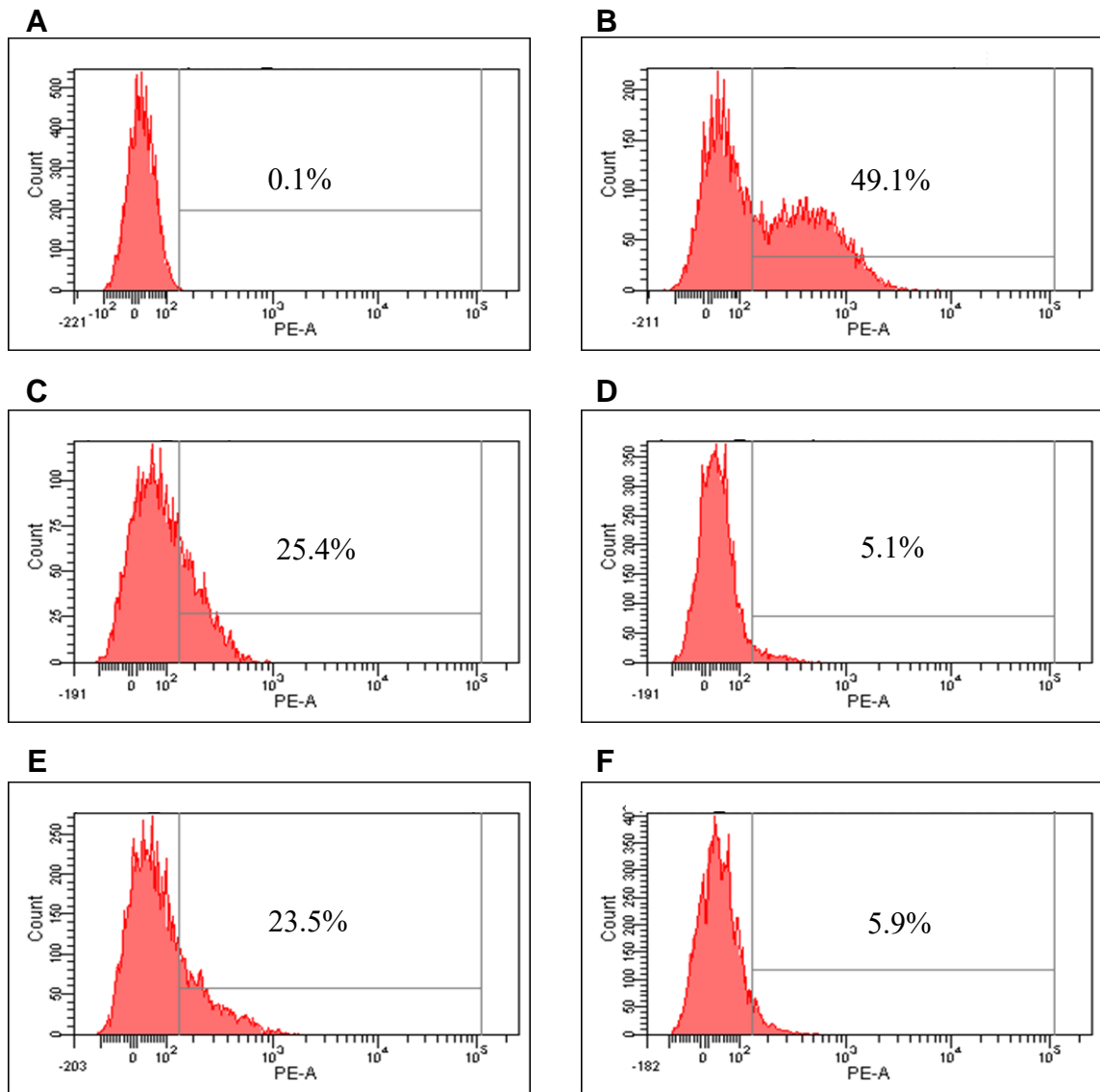
Con la finalidad de confirmar la especificidad del scFv hacia el receptor DEC205 en su conformación nativa, se realizaron ensayos de bloqueo de receptor con los scFv producidos por los sistemas de expresión *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y Expi293. El fundamento de dichos ensayos consiste en la incubación de las PBMCs con los scFv anti-DEC205 y posteriormente con el mAb anti-DEC205 conjugado con PE. Al presentar reconocimiento de scFv hacia el receptor DEC205, se impide el reconocimiento por parte del mAb anti-DEC205 conjugado con PE, produciendo una disminución en el porcentaje de células DEC205<sup>+</sup> reconocidas por el anticuerpo conjugado.



Cuando se utilizó el scFv anti-DEC205 producido en *E. coli* Rosetta 2 (DE3), se observó una reducción en la capacidad de reconocimiento del mAb anti-DEC205 conjugado con PE hacia células DEC205<sup>+</sup> del 49.1% (Figura 17 B) a 25.4% (Figura 17 C). De manera interesante, cuando se duplicó la cantidad de scFv empleado para el bloqueo del receptor, el reconocimiento del mAb anti-DEC205 conjugado con PE disminuyó hasta 5.1% (Figura 17 D). Por otro lado, resultados similares fueron observados cuando se realizó bloqueo del receptor con el scFv anti-DEC205 producido en la línea celular Expi293, observándose disminución de 49.1% a 23.5% (Figura 17 E) y 5.9% cuando se duplicó la cantidad de anticuerpos scFv anti-DEC205 (Figura 17 F).

Como se observa en la Figura 17, el marcaje previo de PBMCs con scFv produce el bloqueo del receptor DEC205 lo cual culmina en la disminución del porcentaje de reconocimiento de células DEC205<sup>+</sup> por parte del mAb anti-DEC205. Además, dicho efecto se observó incrementado cuando la cantidad de anticuerpo scFv anti-DEC205 fue duplicada, siendo de esta forma confirmada la capacidad de reconocimiento de scFv hacia el receptor DEC205. Basado en lo anterior, se afirma la funcionalidad de los scFv al unirse a la forma nativa del receptor DEC205 en PMBCs de cerdo.

Actualmente, anticuerpos scFv los cuales conservan la especificidad de reconocimiento a antígeno del mAb parental han sido popularmente utilizados en aplicaciones clínicas y diagnósticas. Su creciente aplicación se debe a las cualidades que poseen, como un bajo peso molecular, mayor penetración en tejidos y reducción en inmunogenicidad (Raju y Strohl, 2013). La producción de rAbs como los scFv, representan una alternativa válida para ensayos de direccionamiento de antígenos. Ante esta situación, la construcción de un anticuerpo scFv funcional con la capacidad de reconocer al receptor DEC205 porcino, representa una opción viable en la búsqueda de plataformas de entrega de antígenos hacia células dendríticas DEC205<sup>+</sup> de cerdo. Los scFv anti-DEC205 generados por ambos sistemas de expresión, conservaron la capacidad de reconocimiento del mAb del cual derivaron las secuencias para su diseño. Ambos scFv tienen potencial para ser utilizados como sistemas de entrega en ensayos de direccionamiento de antígenos hacia células dendríticas DEC205<sup>+</sup> de cerdo, sustituyendo así el empleo de mAbs.



**Figura 17.** Evaluación de la capacidad de reconocimiento de los scFv anti-DEC205 hacia células DEC205<sup>+</sup> en PBMCs de cerdo por citometría de flujo. Resultados representativos de 1 de los 3 ensayos realizados (n=3). **A:** PBMCs sin marcar. **B:** PBMCs marcados con mAb anti-DEC205 conjugado con PE. **C:** Bloqueo con 50  $\mu$ L de scFv anti-DEC205 producido en *E. coli* Rosetta 2(DE3). **D:** Bloqueo con 100  $\mu$ L de scFv anti-DEC205 producido en *E. coli* Rosetta 2(DE3). **E:** Bloqueo con 50  $\mu$ L de scFv anti-DEC205 producido en Expi293. **F:** Bloqueo con 100  $\mu$ L de scFv anti-DEC205 producido en Expi293.

## CONCLUSIONES

1. El diseño del gen scFv9H2F7 y las condiciones de expresión de scFv anti-DEC205 en el sistema expresión procariota *E. coli* Rosetta 2 (DE3), así como las condiciones empleadas para purificación, solubilización y replegamiento de scFv anti-DEC205 fueron eficientes para la obtención de un anticuerpo recombinante de cadena sencilla scFv anti-DEC205 biológicamente funcional.
2. El diseño del gen scFv9H2F7 para producción de scFv anti-DEC205 en sistema de expresión eucariota permitió la obtención del anticuerpo recombinante de cadena sencilla scFv anti-DEC205 de forma funcional en la línea celular Expi293.
3. Ambos scFv conservaron su capacidad de reconocimiento a antígeno, evaluado directamente por western blot e indirectamente por ensayos de bloqueo de receptor DEC205 en citometría de flujo.

Utilizando el sistema de expresión *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y Expi293 se logró la producción de un anticuerpo recombinante scFv anti-DEC205 porcino biológicamente funcional. Estos resultados sientan las bases para estudios posteriores de direccionamiento de antígenos hacia células DEC205<sup>+</sup> de cerdo.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. 2014. *Cellular and molecular immunology E-book*, Elsevier Health Sciences.
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M. & Hamid, M. 2012. scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- Alvarez, B., Poderoso, T., Alonso, F., Ezquerra, A., Domínguez, J. & Revilla, C. 2013. Antigen targeting to APC: from mice to veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*, 41, 153-163.
- Andersen, D. C. & Reilly, D. E. 2004. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. *Current opinion in biotechnology*, 15, 456-462.
- Ayala, V. S. & Piedra, A. L. 2007. Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas. *Revista Médicas UIS*, 20.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B. & Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18, 767-811.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245.
- Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S.-I., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T. M. & Steinman, R. M. 2004. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *The Journal of experimental medicine*, 199, 815-824.
- Bu, D., Zhou, Y., Tang, J., Jing, F. & Zhang, W. 2013. Expression and purification of a novel therapeutic single-chain variable fragment antibody against BNP from inclusion bodies of Escherichia coli. *Protein expression and purification*, 92, 203-207.

- Bustamante-Córdova, L., Melgoza-González, E. A. & Hernández, J. 2018. Recombinant Antibodies in Veterinary Medicine: An Update. *Frontiers in Veterinary Science*, 5.
- Clark, G. J., Angel, N., Kato, M., López, J. A., MacDonald, K., Vuckovic, S. & Hart, D. N. 2000. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and infection*, 2, 257-272.
- Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Azeredo, J. & Oliveira, R. 2010. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74, 127-138.
- Chiou, H. C., Vasu, S., Liu, C. Y., Cisneros, I., Jones, M. B. & Zmuda, J. F. 2014. Scalable transient protein expression. *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*, 35-55.
- Choo, A. B., Dunn, R. D., Broady, K. W. & Raison, R. L. 2002. Soluble expression of a functional recombinant cytolytic immunotoxin in insect cells. *Protein expression and purification*, 24, 338-347.
- de Marco, A. 2015. Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs. *Microbial cell factories*, 14, 1.
- De Pourcq, K., De Schutter, K. & Callewaert, N. 2010. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 1617-1631.
- Fadilah, S. & Cheong, S. 2007. Dendritic cell immunobiology and potential roles in immunotherapy. *Malaysian Journal of Pathology*, 29, 1.
- Fang, X. T., Sehlin, D., Lannfelt, L., Syvänen, S. & Hultqvist, G. 2017. Efficient and inexpensive transient expression of multispecific multivalent antibodies in Expi293 cells. *Biological procedures online*, 19, 11.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*, 2, 77-84.

- Flores-Mendoza, L., Sotelo-Mundo, R. R., Dawson, H., Mwangi, W. & Hernández, J. 2010. Characterization of porcine CD205. *Developmental & Comparative Immunology*, 34, 715-721.
- Flores-Mendoza, L., Velazquez, C., Bray, J., Njongmeta, L., Mwangi, W. & Hernández, J. 2012. Development and characterization of a monoclonal antibody against porcine CD205. *Veterinary immunology and immunopathology*, 146, 74-80.
- Frenzel, A., Hust, M. & Schirrmann, T. 2013. Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in immunology*, 4, 217.
- Galeffi, P., Lombardi, A., Pietraforte, I., Novelli, F., Di Donato, M., Sperandei, M., Tornambé, A., Fraioli, R., Martayan, A. & Natali, P. G. 2006. Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. *Journal of Translational Medicine*, 4, 39.
- Gasser, B. & Mattanovich, D. 2007. Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? *Biotechnology letters*, 29, 201-212.
- Ghaderi, D., Zhang, M., Hurtado-Ziola, N. & Varki, A. 2012. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 28, 147-176.
- Gil, F., Pérez-Filgueira, M., Barderas, M. G., Pastor-Vargas, C., Alonso, C., Vivanco, F. & Escribano, J. M. 2011. Targeting antigens to an invariant epitope of the MHC Class II DR molecule potentiates the immune response to subunit vaccines. *Virus research*, 155, 55-60.
- Gómez-Sebastián, S., Nuñez, M. C., Garaicoechea, L., Alvarado, C., Mozgovoij, M., Lasa, R., Kahl, A., Wigdorovitz, A., Parreño, V. & Escribano, J. M. 2012. Rotavirus A-specific single-domain antibodies produced in baculovirus-infected insect larvae are protective in vivo. *BMC biotechnology*, 12, 59.
- Gopal, G. J. & Kumar, A. 2013. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The protein journal*, 32, 419-425.
- Guglielmi, L. & Martineau, P. 2009. Expression of single-chain Fv fragments in *E. coli* cytoplasm. *Antibody Phage Display*. Springer.

- Guo, J.-Q., Li, Q.-M., Zhou, J.-Y., Zhang, G.-P., Yang, Y.-Y., Xing, G.-X., Zhao, D., You, S.-Y. & Zhang, C.-Y. 2006. Efficient recovery of the functional IP10-scFv fusion protein from inclusion bodies with an on-column refolding system. *Protein expression and purification*, 45, 168-174.
- Guo, J.-Q., You, S.-Y., Li, L., Zhang, Y.-Z., Huang, J.-N. & Zhang, C.-Y. 2003. Construction and high-level expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for acidic isoferitin in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 102, 177-189.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. & Bowdish, K. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342, 76.
- Ho, M., Nagata, S. & Pastan, I. 2006. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 9637-9642.
- Holliger, P. & Hudson, P. J. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology*, 23, 1126-1136.
- Hultqvist, G., Syvänen, S., Fang, X. T., Lannfelt, L. & Sehlin, D. 2017. Bivalent brain shuttle increases antibody uptake by monovalent binding to the transferrin receptor. *Theranostics*, 7, 308.
- Jäger, V., Büsow, K. & Schirrmann, T. 2015. Transient recombinant protein expression in mammalian cells. *Animal cell culture*. Springer.
- Jáuregui-Zúñiga, D., Pedraza-Escalona, M., Espino-Solís, G. P., Quintero-Hernández, V., Olvera-Rodríguez, A., Díaz-Salinas, M. A., López, S. & Possani, L. D. 2017. Targeting antigens to Dec-205 on dendritic cells induces a higher immune response in chickens: Hemagglutinin of avian influenza virus example. *Research in veterinary science*, 111, 55-62.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M. & Nussenzweig, M. C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, 375, 151.

- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12, 557.
- Johnson, T. S., Mahnke, K., Storn, V., Schönfeld, K., Ring, S., Nettelbeck, D. M., Haisma, H. J., Le Gall, F., Kontermann, R. E. & Enk, A. H. 2008. Inhibition of melanoma growth by targeting of antigen to dendritic cells via an anti-DEC-205 single-chain fragment variable molecule. *Clinical Cancer Research*, 14, 8169-8177.
- Jones, M. B., Liu, C. Y., Vasu, S., Cisneros, I., Chiou, H. & Zmuda, J. F. 2012. Mammalian Transient Transfection System: Novel Approach Produces Gram-Per-Liter Expression Levels of Biologically Active Proteins. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 32, 50-51.
- Kato, M., Neil, T. K., Clark, G. J., Morris, C. M., Sorg, R. & Hart, D. N. 1998. cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells. *Immunogenetics*, 47, 442-450.
- Kenneth, M., Travers, P. & Walport, M. 2009. Inmunobiología de Janeway. *México*, 94-100.
- Kim, Y.-J., Neelamegam, R., Heo, M.-A., Edwardraja, S., Paik, H.-J. & Lee, S.-G. 2008. Improving the productivity of single-chain Fv antibody against c-Met by rearranging the order of its variable domains. *J Microbiol Biotechnol*, 18, 1186-1190.
- Köhler, G. & Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- Kunert, R. & Reinhart, D. 2016. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 3451-3461.
- Kwon, Y. J., James, E., Shastri, N. & Fréchet, J. M. 2005. In vivo targeting of dendritic cells for activation of cellular immunity using vaccine carriers based on pH-responsive microparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 18264-18268.
- Lakhchaura, B. 2014. Monoclonal Antibody Production and Applications. *Advances in Biotechnology*. Springer.



- Lamberski, J. A., Thompson, N. E. & Burgess, R. R. 2006. Expression and purification of a single-chain variable fragment antibody derived from a polyol-responsive monoclonal antibody. *Protein expression and purification*, 47, 82-92.
- Larrick, J. W., Yu, L., Naftzger, C., Jaiswal, S. & Wycoff, K. 2001. Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Engineering*, 18, 87-94.
- Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P. & Berkmen, M. 2012. SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial cell factories*, 11, 753.
- Lomonosoff, G. P. & D'Aoust, M.-A. 2016. Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. *Science*, 353, 1237-1240.
- Lu, D. & Zhu, Z. 2014. Construction and Production of an IgG-Like Tetravalent Bispecific Antibody, IgG–Single-Chain Fv Fusion. *Human Monoclonal Antibodies*. Springer.
- Mabashi-Asazuma, H., Kuo, C.-W., Khoo, K.-H. & Jarvis, D. L. 2013. A novel baculovirus vector for the production of nonfucosylated recombinant glycoproteins in insect cells. *Glycobiology*, 24, 325-340.
- Machado, N. P., Tèllez, G. A. & Castaño, J. C. 2006. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*, 10, 186-197.
- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S. L., Nussenzweig, M. & Steinman, R. M. 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II–positive lysosomal compartments. *The Journal of cell biology*, 151, 673-684.
- Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R. & Hasanova, G. 2017. In vivo production of non-glycosylated recombinant proteins in Nicotiana benthamiana plants by co-expression with Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of Streptomyces plicatus. *PloS one*, 12, e0183589.

- Martínez, J. L., Liu, L., Petranovic, D. & Nielsen, J. 2012. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current opinion in biotechnology*, 23, 965-971.
- Merino, A. G. 2011. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, 26, 301-306.
- Nair, B. 2017. Plantibodies: Paving Novel Avenues for Immunotherapy. *MOJ Surg*, 4, 00078.
- Njongmeta, L. M., Bray, J., Davies, C. J., Davis, W. C., Howard, C. J., Hope, J. C., Palmer, G. H., Brown, W. C. & Mwangi, W. 2012. CD205 antigen targeting combined with dendritic cell recruitment factors and antigen-linked CD40L activation primes and expands significant antigen-specific antibody and CD4+ T cell responses following DNA vaccination of outbred animals. *Vaccine*, 30, 1624-1635.
- Ohmuro-Matsuyama, Y. & Yamaji, H. 2017. Modifications of a signal sequence for antibody secretion from insect cells. *Cytotechnology*, 1-8.
- Ooms, K., Van Gorp, H., Botti, S., Van Gaever, T., Delputte, P. L. & Nauwynck, H. J. 2013. Evaluation of viral peptide targeting to porcine sialoadhesin using a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccination-challenge model. *Virus research*, 177, 147-155.
- Otero González, A. J. 2010. Los anticuerpos y su papel como herramientas analíticas en los ensayos inmunoenzimáticos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 62, 85-92.
- Padiolleau-Lefèvre, S., Débat, H., Phichith, D., Thomas, D., Friboulet, A. & Avalle, B. 2006. Expression of a functional scFv fragment of an anti-idiotypic antibody with a  $\beta$ -lactam hydrolytic activity. *Immunology letters*, 103, 39-44.
- Patil, G., Rudolph, R. & Lange, C. 2017. Expression, refolding, purification and characterization of single chain antibody fragment produced in *Escherichia coli*.
- Petzold, C., Schallenberg, S., Stern, J. & Kretschmer, K. 2012. Targeted antigen delivery to DEC-205 (+) dendritic cells for tolerogenic vaccination. *Rev Diabet Stud*, 9, 305-18.

- Platt, C. D., Ma, J. K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R. A., Mellman, I. & Delamarre, L. 2010. Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 4287-4292.
- Rajendra, Y., Kiseljak, D., Baldi, L., Hacker, D. L. & Wurm, F. M. 2011. A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells. *Journal of biotechnology*, 153, 22-26.
- Raju, T. S. & Strohl, W. R. 2013. Potential therapeutic roles for antibody mixtures. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13, 1347-1352.
- Rampazo, E. V., Amorim, K. N., Yamamoto, M. M., Panatieri, R. H., Rodrigues, M. M. & Boscardin, S. B. 2015. Antigen targeting to dendritic cells allows the identification of a CD4 T-cell epitope within an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *PLoS One*, 10, e0117778.
- Ring, S., Maas, M., Nettelbeck, D. M., Enk, A. H. & Mahnke, K. 2013. Targeting of autoantigens to DEC205+ dendritic cells in vivo suppresses experimental allergic encephalomyelitis in mice. *The Journal of Immunology*, 191, 2938-2947.
- Schirrmann, T., Al-Halabi, L., Dubel, S. & Hust, M. 2008. Production systems for recombinant antibodies. *Front Biosci*, 13, 4576-4594.
- Schlegel, S., Rujas, E., Ytterberg, A. J., Zubarev, R. A., Luirink, J. & De Gier, J.-W. 2013. Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. *Microbial cell factories*, 12, 24.
- Schmidt, F. 2004. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, 363-372.
- Sethuraman, N. & Stadheim, T. A. 2006. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current opinion in biotechnology*, 17, 341-346.
- Shadi, A. M., Sarrafzadeh, M.-H., Barar, J. & Omid, Y. 2018. Cost-effective batch production process of scFv antibody in *Escherichia coli*. *Human antibodies*, 1-9.

- Sharma, S. K., Suresh, M. R. & Wuest, F. R. 2014. Improved soluble expression of a single-chain antibody fragment in *E. coli* for targeting CA125 in epithelial ovarian cancer. *Protein expression and purification*, 102, 27-37.
- Sinacola, J. R. & Robinson, A. S. 2002. Rapid refolding and polishing of single-chain antibodies from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein expression and purification*, 26, 301-308.
- Strasser, R., Stadlmann, J., Schähls, M., Stiegler, G., Quendler, H., Mach, L., Glössl, J., Weterings, K., Pabst, M. & Steinkellner, H. 2008. Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant biotechnology journal*, 6, 392-402.
- Subramaniam, S., Piñeyro, P., Derscheid, R. J., Madson, D. M., Magstadt, D. R. & Meng, X.-J. 2017. Dendritic cell-targeted porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens adjuvanted with polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I: C)) induced non-protective immune responses against heterologous type 2 PRRSV challenge in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 190, 18-25.
- Sun, H., Wu, G., Chen, Y., Tian, Y., Yue, Y. & Zhang, G. 2014. Expression, production, and renaturation of a functional single-chain variable antibody fragment (scFv) against human ICAM-1. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47, 540-547.
- Swiggard, W. J., Mirza, A., Nussenzweig, M. C. & Steinman, R. M. 1995. DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cellular immunology*, 165, 302-311.
- Tsumoto, K., Shinoki, K., Kondo, H., Uchikawa, M., Juji, T. & Kumagai, I. 1998. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent—application to a human single-chain Fv fragment. *Journal of immunological methods*, 219, 119-129.

- Wang, L., Hu, H., Yang, J., Wang, F., Kaisermayer, C. & Zhou, P. 2012. High yield of human monoclonal antibody produced by stably transfected *Drosophila schneider* 2 cells in perfusion culture using wave bioreactor. *Molecular biotechnology*, 52, 170-179.
- Wang, R., Xiang, S., Feng, Y., Srinivas, S., Zhang, Y., Lin, M. & Wang, S. 2013. Engineering production of functional scFv antibody in *E. coli* by co-expressing the molecule chaperone Skp. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3.
- Ward, M., Lin, C., Victoria, D. C., Fox, B. P., Fox, J. A., Wong, D. L., Meerman, H. J., Pucci, J. P., Fong, R. B. & Heng, M. H. 2004. Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2567-2576.
- Weisser, N. E. & Hall, J. C. 2009. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology advances*, 27, 502-520.
- Yamaji, H. 2011. Production of antibody in insect cells. *Antibody Expression and Production*. Springer.
- Yamaji, H., Manabe, T., Watakabe, K., Muraoka, M., Fujii, I. & Fukuda, H. 2008. Production of functional antibody Fab fragment by recombinant insect cells. *Biochemical Engineering Journal*, 41, 203-209.
- Yin, J., Li, G., Ren, X. & Herrler, G. 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127, 335-347.
- Yousefi, M., Farajnia, S., Mokhtarzadeh, A., Akbari, B., Khosroshahi, S. A., Mamipour, M., Dariushnejad, H. & Ahmadzadeh, V. 2018. Soluble Expression of Humanized Anti-CD20 Single Chain Antibody in *Escherichia coli* by Cytoplasmic Chaperones Co-expression.
- Zhi, D., Zhang, S., Wang, B., Zhao, Y., Yang, B. & Yu, S. 2010. Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery. *Bioconjugate chemistry*, 21, 563-577.

- Zhu, X., Wang, D., Li, S., Xiao, Q., Tao, K., Hu, J., Cao, W. & Feng, W. 2012. Expression of a humanized single-chain variable fragment antibody targeting chronic myeloid leukemia cells in *Escherichia coli* and its characterization. *International journal of molecular medicine*, 29, 939-945.
- Zvirin, T., Magrisso, L., Yaari, A. & Shoseyov, O. 2018. Stable Expression of Adalimumab in *Nicotiana tabacum*. *Molecular biotechnology*, 1-9.

## **APÉNDICES**



# Recombinant Antibodies in Veterinary Medicine: An Update

Lorena Bustamante-Córdova<sup>†</sup>, Edgar A. Melgoza-González<sup>†</sup> and Jesús Hernández<sup>\*</sup>

Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Yashpal S. Malik,  
Indian Veterinary Research Institute  
(IVRI), India

### Reviewed by:

Beatrix Foerster,  
University Medical Center Utrecht,  
Netherlands

Christi Swaggerty,  
United States Department of  
Agriculture, United States

### \*Correspondence:

Jesús Hernández  
jhdez@ciad.mx

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted to  
Veterinary Infectious Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Veterinary Science

**Received:** 26 May 2018

**Accepted:** 09 July 2018

**Published:** 27 July 2018

### Citation:

Bustamante-Córdova L,  
Melgoza-González EA and  
Hernández J (2018) Recombinant  
Antibodies in Veterinary Medicine: An  
Update. *Front. Vet. Sci.* 5:175.  
doi: 10.3389/fvets.2018.00175

The production of recombinant antibodies has had a tremendous impact on several research fields, most prominently in biotechnology, immunology and medicine, enabling enormous advances in each. Thus far, a broad diversity of recombinant antibody (rAb) forms have been designed and expressed using different expression systems. Even though the majority of rAbs approved for clinical use are targeted to humans, advances in veterinary medicine seem promising. The aim of this mini-review is to present an update regarding the rAbs in veterinary medicine reported to date, as well as their potential use in diagnostics, prophylaxis and therapeutics. Full- and single-chain fragment variables are the most common forms of rAbs developed for the detection, prevention and control of parasitic, bacterial and viral diseases, as well as pain and cancer treatment. Nonetheless, advances in research seem to be skewed toward economically important animals, such as pigs, cows, poultry and dogs. Although significant results have been obtained from the rAbs reported here, most have not been developed enough to be approved. Further research and clinical trials should be encouraged to enable important findings to fulfill their intended potential to improve animal well-being.

**Keywords:** recombinant antibodies, biotechnology, veterinary medicine, single-chain antibodies, nanobodies, chimeric antibodies

## INTRODUCTION

Biotechnology has allowed for alternative methods of antibody (Ab) production, thereby reducing or eliminating the use of experimental animals (1). The selection of an expression system, such as bacteria, yeast, insect and mammalian cell lines, and transgenic plants (2, 3), depends primarily on the type of Ab desired. Frenzel et al. (4) published an excellent review on the expression of recombinant antibodies, discussing the pros and cons of the most-used systems (4).

Ab are glycoproteins that consist of two heavy (H) and two light (L) chains united by disulfide bonds. Light and heavy chains have a variable (V) and a constant (C) region; in turn, the constant heavy domain (C<sub>H</sub>) is divided into three domains (C<sub>H1</sub>-C<sub>H3</sub>) and in some cases, four domains. Variable regions contain “complementarity determining regions” (CDR) that determine the affinity and specificity of an Ab. The union of variable domain of light chain-constant domain of light chain (V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>) and variable domain of heavy chain-constant domain of heavy chain (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>) form the “antigen-binding fragment” (Fab). The rest of the Ab forms the fragment crystallizable region (Fc) and gives the Ab its effector function (5). The above characteristics represent the classical structure of an Ab.

Based on the classical structure of an Ab, other forms of rAb have been developed (Figure 1). The most popular in veterinary medicine seems to be the single-chain fragment variable (scFv). The scFv comprises the V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> joined by a short peptide linker (6). Another highly reported rAb is the single-domain antibody (sdAb) or nanobodies, which present the heavy variable region (VHH) only (7).



Other rAbs, such as triabodies and tetrabodies (2), are not particularly reported in veterinary medicine (**Figure 1**). Hybrid rAbs, chimeric or “-nized,” are common in veterinary medicine. A chimeric Ab typically consists of the V regions of one Ab and the C region of another. The “-nized” Ab comprises the original Ab and CDRs from other species, such as humanized or porcinated. The main advantage of a hybrid rAb is reduced immunogenicity while maintaining the specificity of CDRs (8).

Orthoclone (Muromonab-CD3) was the first monoclonal Ab (mAb) approved in humans (9). Since then, Abs have become predominant products in the human pharmaceutical market (10). Since 2015, 23% of the drugs approved by the Food and Drug Administration in USA have been Abs, including humanized and chimeric, with just a few used in animals. This review presents an update of the rAbs reported in the field of veterinary medicine according to their use in diagnosis, prophylaxis and therapeutics in different species. However, there is an emphasis on rAbs in pigs and cows because they represent more prolific fields. **Table 1** summarizes all rAbs described in this mini-review, showing the expression system, form, target species and main results. A discussion of the results describing only rAb production was omitted in the following sections.

## RECOMBINANT ANTIBODIES IN VETERINARY DIAGNOSIS

### Pig

Research for new diagnostic tests using rAbs have been concentrated on porcine circovirus type II (PVC2), classic swine fever virus (CSF), *Brachyspira hyodysenteriae* and *Taenia* spp. A commercial PVC2 vaccine was used to immunize a camel and produce a sdAb anti-Cap protein (11). This sdAb showed high specificity and sensitivity for the detection of PVC2 without cross reactivity with PCV1, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) GP5 protein or CSF E2 protein. The sdAb was fused with alkaline phosphatase (sdAb-AP) to improve diagnosis, and the affinity and sensitivity were higher than those of the original sdAb (12). Recently, a porcinated rAb anti-E2 protein of CSFV was produced. This porcinated rAb was evaluated in diverse assays with good results and importantly, retained the ability to neutralize CSFV *in vitro*, suggesting that it has great potential as a diagnostic tool (13). Lobo et al. (14) described a scFv capable of detecting *B. hyodysenteriae*, an etiological agent of swine dysentery. After ELISA and immunofluorescent assay (IFA) evaluation, the authors concluded that this scFv can be used in new diagnostic tests (14). In the case of parasitic diseases, a sdAb showed no cross reactivity with *T. saginata*, *T. hydatigena*, *T. crassiceps*, and *Trichinella spiralis* antigens, allowing the specific diagnosis of *Taenia solium* infection (15).

### Cows

The rAbs for the most important pathogens affecting bovines, including foot and mouth disease virus (FMDV), *Mycobacterium bovis* and bovine spongiform encephalopathy (BSE), have been evaluated by new diagnostic tests. Two scFvs specific for the 3ABC antigen have been reported to differentiate between

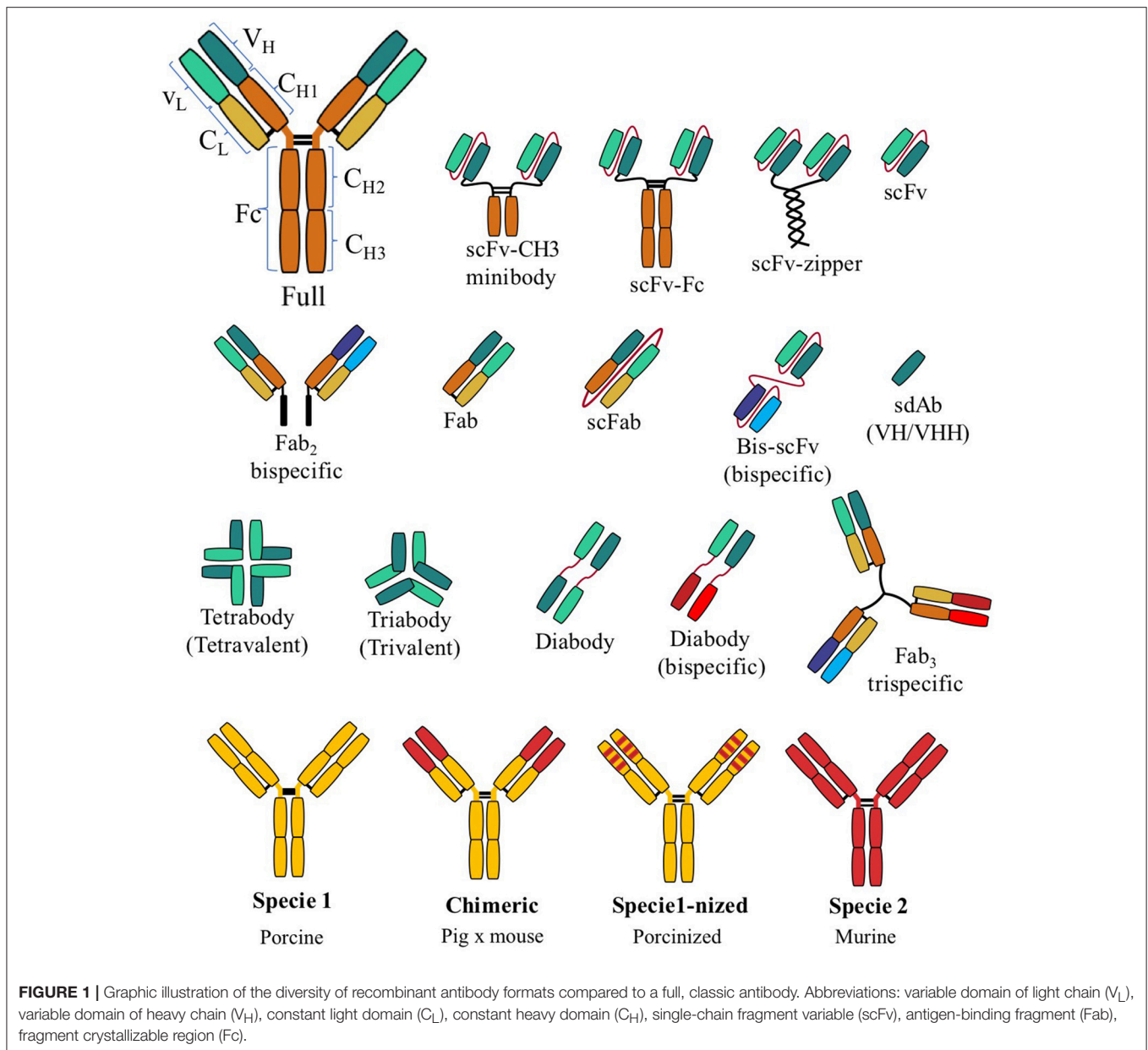
vaccinated and infected animals with FMDV. Foord et al. (16) produced a chicken scFv specific for the 3B region of the 3ABC antigen and concluded that scFv could be used in a FMDV differentiating infected from vaccinated animals (DIVA) test offering superior results compared with those of the 3ABC antigen in an ELISA, using sera from naïve and infected animals (16). Sharma et al. (17) validated a scFv in sandwich and competitive ELISAs and proposed it as an alternative to the diagnosis of FMDV (17). Other authors have produced a scFv anti-VP1 protein of FMDV in transgenic Tobacco plants (18). In the case of the bovine immunodeficiency virus (BIV), a scFv anti-capsid protein was produced and showed better sensitivity in ELISA and Western blot (WB) assays than did the mAb, which is considered the “gold standard” (19). A scFv anti-HSP65 protein was conjugated to colloidal gold and evaluated in immunochromatographic tests (ICT) as a capture/secondary antibody to improve *M. bovis* diagnosis. This combination could detect the HSP65 protein dimer by ICT but not by ELISA. Later, this scFv was fused with a chicken H chain, and the stability was improved without affecting functionality (20). In another study, a sdAb produced in camels immunized with intracellular bacteria *Brucella melitensis*, which is responsible for Mediterranean fever in animals and humans, could recognize antigens of a *B. melitensis* in ELISA (21). Finally, recombinant chicken immunoglobulin Y (IgY) (Ab3-15 and Ab4-19) anti-prion protein (PrP<sup>sc</sup>) was produced to diagnose BSE, showing that it can be used to diagnose BSE and other prion diseases (22).

### Others

In poultry, a scFv specific for the avian influenza virus (AIV) was produced and evaluated by ELISA; it showed higher sensitivity and specificity than previously established protocols (23). Additionally, scFv anti-phosphoprotein of the Newcastle disease virus (NDV) showed potential as a detection tool in ELISA and WB (24). A similar scenario was reported for a scFv specific to the infectious bursal disease virus (IBDV) (25, 26) and a scFv specific to avian coccidiosis (27). Taking advantage of the similarities between the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and its canine homologue protein, dog epidermal growth factor receptor (DER2), two rAbs with cross reactivity were produced, a Fc-sdAb and a GFP-sdAb. Recognition of HER2 and DER2 was evaluated by flow cytometry and IFA to detect breast cancer cells from humans (SKBR3) and dogs (SH1B and P114). Therefore, these rAbs can be used to identify malignant cells and have the potential to be used as immunotherapeutics in dogs and humans (28).

## RECOMBINANT ANTIBODIES IN IMMUNOPROPHYLAXIS

The amount of research on rAb as a new immunoprophylaxis for pigs has been enormous compared with that for bovine or other species. Different forms of rAb for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), PRRSV, FMDV, African swine fever virus (ASFV), and *Haemophilus parasuis* have been produced and evaluated.



However, the majority of rAbs have been directed to PRRSV control.

## Pigs

Antigen targeting to antigen-presenting cells, such as dendritic cells (DCs), has become an attractive approach in veterinary medicine (67). Other authors have evaluated this strategy but not with rAb (68–70). Subramaniam et al. has probed a scFv-Fc (mouse x pig) specific to DC-SIGN, DEC205 and Langerin receptors, and fused it with PRRSV structural proteins. The results showed that DEC205 targeting is the most successful in improving humoral and cellular responses while not inducing enough protective immunity (29, 30). In a similar approach, the administration of a rAb conjugated to peptides of PRRSV

glycoprotein 4 (GP4) was used to target sialoadhesin (CD169), a receptor present in macrophages and monocytes. This study showed the production of anti-GP4 and neutralizing antibodies in immunized and challenged pigs (31). In other strategies, a sdAb specific to the non-structural protein 9 (nsp9) (Nb6) was produced to block viral infection. The authors demonstrated that viral replication was inhibited in a stable Marc-145 cell line expressing Nb6, proving the potential of sdAb (Nb6) as a new form of protection against PRRSV (32). Similarly, a chimeric mouse x pig antibody anti-linear GP5 epitope had neutralizing activity similar to that of the native mAb (ISU25C1) (33).

Certainly, most rAbs reported today are used to seek control of PRRSV. However, there are also other rAbs that can be used to control other diseases. A scFv-Fc (mouse x pig) specific for

**TABLE 1** | Summary of mentioned recombinant antibodies with potential use in veterinary medicine.

Application	Ab format	Expression system	Species	Main result	Reference
Diagnosis	sdAb	<i>E. coli</i>	Pig	High specificity and affinity for the capsid protein of PVC type II.	(11)
	sdAb	<i>E. coli</i>	Pig	High sensitivity and specificity recognizing the capsid protein of PCV type II by ELISA.	(12)
	Porcinized full Ab	HEK293	Pig	Recognizes the E2 protein of CSFV.	(13)
	scFv	<i>E. coli</i>	Pig	Recognition of <i>B. hyodysenteriae</i> for the diagnosis of swine dysentery.	(14)
	sdAb	<i>E. coli</i>	Pig	Specific recognition of <i>T. solium</i> antigens for the control of cysticercosis.	(15)
	scFv	<i>E. coli</i>	Cow	Binds to the 3B region of 3ABC non-structural protein of FMDV.	(16, 17)
	scFv	Plants	Cow	scFv directed at the VP1 protein of FMDV.	(18)
	scFv	<i>E. coli</i>	Cow	Highly specific to the capsid protein of BIV.	(19)
	scFv	HEK293	Cow	Detection of HSP65 from <i>M. tuberculosis</i> .	(20)
	sdAb (VHH)	<i>E. coli</i>	Cow	Recognizes <i>B. melitensis</i> strain Riv1 by ELISA.	(21)
	Full Ab	CHO	Cow	Higher sensitivity to recognize the pathogenic isoform of prion protein (PrP <sup>Sc</sup> ) than its scFv form.	(22)
	scFv	<i>E. coli</i>	Chicken	Specific to the NP of AIV.	(23)
	scFv	<i>E. coli</i>	Birds	Targeted to P phosphoprotein of NDV involved in transcription and replication.	(24)
	scFv	<i>E. coli</i>	Chicken	Differential diagnosis of classical and very virulent strains of IBDV.	(25, 26)
	scFv	<i>E. coli</i>	Chicken	Recognizes oocyst and macrogamont stages of <i>E. tenella</i> for the diagnosis of avian coccidiosis.	(27)
	Fc-sdAb (Fc-VHH)	<i>E. coli</i>	Dog	Recognizes Canine EGFR to label breast cancer cells.	(28)
Prophylaxis	scFv-Fc	HEK293	Pig	Antigen targeting of important structural peptides for PEDV and PRRSV to dendritic cell receptors.	(29, 30)
	Full Ab	HEK293	Pig	Antigen targeting of the glycoprotein 4 of PRRSV to CD169 receptor.	(31)
	sdAb (VHH)	<i>E. coli</i>	Pig	Binds to non-structural protein 9 of PRRSV.	(32)
	Chimeric M x P Full Ab	Sf9 cells	Pig	Recognizes PRRSV glycoprotein 5 by WB and ELISA, neutralizing activity <i>in vitro</i> .	(33)
	scFv-Fc	HEK293	Pig	Antigen targeting to Langerin receptor. Enhances humoral and T CD4 responses against PEDV.	(34)
	scFv-Fc	HEK293	Pig	Reduction of RNA from PEDV in feces.	(35)
	scFv	<i>E. coli</i>	Pig	Neutralizing activity of PEDV <i>in vitro</i> .	(36)
	scFv	<i>E. coli</i>	Pig	Recognizes the recombinant C subunit of pAPN by ELISA.	(37)
	Fused sdAb with plg (VHH2)	Yeast	Pig	Neutralizing activity <i>in vitro</i> of FMDV and reduced viremia <i>in vivo</i> .	(38)
	VHH3s	Yeast	Pig	Neutralizing activity of FMDV <i>in vitro</i> and delayed clinical symptoms and transmission <i>in vivo</i> .	(39)
	scFv	Vero	Pig	Antigen targeting of ASFV to SLA.	(40)
	Chimeric M x P Full Ab	Yeast	Pig	Growth inhibition of <i>H. parasuis</i> <i>in vitro</i> and partial protection <i>in vivo</i> to prevent Glasser's disease.	(41)
	scFv	<i>E. coli</i>	Cow	Blocks cell adhesion of ETEC. Reduced ETEC infection <i>in vivo</i> .	(42)
	scFv	<i>E. coli</i>	Cow	Inhibits cell adhesion of ETEC by blocking K99 factor, evaluated <i>in vitro</i> .	(43)
	scFv	Plants	Cow	Diminished ETEC binding ability in calf enterocytes and in horse blood red cells.	(44)
scFv	<i>E. coli</i>	Chicken	Neutralizing activity against the IBV.	(45)	

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Application	Ab format	Expression system	Species	Main result	Reference
	scFv	<i>E. coli</i>	Chicken	Reduced viral infection of IBDV <i>in ovo</i> .	(46)
	scFv	LMH* cells	Chicken	Decreased viral titers <i>in vivo</i> of IBDV.	(47)
	scFv	<i>E. coli</i>	Chicken	Neutralization of NDV, low viral titers and cytopathic effect <i>in vitro</i> .	(48)
	scFv	Plants	Chicken	Diminished oocyst count of <i>E. tenella</i> (coccidia) in feces.	(49)
	Full Ab	Plants	Chicken	Recognizes oocysts, sporocyst walls and sporozoites antigens of <i>E. acervulina</i> .	(50)
	scFv	Plants	Chicken	Diminished oocysts count of <i>E. tenella</i> in feces.	(51)
	scFv	HEK293	Sheep	Improved cellular IFN response to Rift Valley Fever virus through antigen targeting.	(52)
Therapeutics	Full Ab	HEK293	Pigs	Recognition of groups 1 and 2 hemagglutinins and neutralizing activity against influenza virus.	(53)
	Full Ab	CHO	Pigs	Reduced gross pathology in lungs after challenge with influenza A virus. No effect on viral titers.	(54)
	scFv	<i>E. coli</i>	Cow	Obstruction of tissue adhesion by <i>S. aureus</i> to prevent bovine mastitis.	(55)
	sdAb (VHH)	<i>E. coli</i>	Cow	Recognizes $\beta$ -hemolysin of <i>S. aureus</i> . Shows neutralizing activity <i>in vitro</i> .	(56)
	Chimeric M x C Full Ab	CHO	Chicken	Recognition of VP2 protein of virulent strain of IBDV, 80% protection in chickens.	(57)
	sdAb	<i>E. coli</i>	Chicken	Neutralizing activity specific for the H5 hemagglutinin from AIV. High protection rates <i>in vivo</i> .	(58)
	Fab	<i>E. coli</i>	Chicken	Neutralization and inhibition of hemagglutination in infected mice.	(59)
	scFv	<i>E. coli</i>	Chicken	Reduced viral titers of avian influenza H5N1 virus.	(60)
	Chimeric M x D Full Ab	CHO	Dog	Effective to treat chronic inflammation in dogs.	(61)
	Caninized Full Ab	CHO	Dog	Treatment of atopic dermatitis, reduction of pruritus.	(62, 63)
	scFv	CHO and <i>E. coli</i>	Dog	Anti-canine CD20, potential use in the treatment and diagnosis of B cell malignancies.	(64)
	Caninized Full Ab	CHO	Dog	Recognizes EGFR. Antiproliferative effect of cancer cells <i>in vitro</i> .	(65)
	scFv	<i>E. coli</i>	Dog	Potential use for targeting to canine dendritic cells.	(66)

\*LMH, Leghorn male hepatoma cell line.

the Langerin receptor expressed on DCs was fused with the spike protein of PEDV and used to immunize pigs. This strategy induced IgG and IgA responses, as well as a CD4 T cell immune response (34). When this rAb was tested in sows, an IgG response but not an IgA response was produced. Piglets born from these sows were challenged, and maternal immunity reduced fecal viral shedding, while clinical signs were unaffected (35). In other reports, a scFv anti-PEDV was tested *in vitro* and showed neutralizing activity, a reduced cytopathic effect and a reduction in viral replication titers (36). Similarly, a scFv against porcine aminopeptidase N (pAPN) could block the interaction of PEDV with pAPN, the receptor present in the intestinal epithelium, thus inhibiting virus entry to cells (37).

FMDV has also been a focus of rAb production. Harmsen et al. (71) evaluated a sdAb (VHH) as a tool to control FMD in pigs (71). Subsequently, different forms of sdAbs (VHH2s and VHH3s) were produced to increase its half-life and neutralizing activity compared with those of VHH *in vitro*. In an *in vivo* experiment, the authors compared VHH2s and VHH3s forms,

showing the advantages of VHH3 forms; VHH3s delayed the development of clinical symptoms and FMDV transmission, basically for the doses, route of administration and higher neutralizing activity (38, 39). In an effort to control ASFV, a DNA vaccine encoding a scFv fused with p54 and p30 antigens was evaluated. Unfortunately, this strategy was unable to induce protection following a challenge (40).

For bacterial infections, only one rAb has been reported. This rAb (chimeric mouse  $\times$  pig antibody) recognizes all serotypes of *Haemophilus parasuis*, inhibits the growth of the bacteria *in vitro*, and partially protects piglets against infection *in vivo* (41).

## Cows

In contrast to those concerning pigs, there are fewer reports of rAbs being used to improve bovine diseases. Several attempts have been made to block *Escherichia coli* enterotoxigenic (ETEC) cell-adhesion capacity by targeting K99 fimbriae, a colonization factor. An *in vivo* evaluation of a scFv anti-F5 fimbriae (K99) resulted in less accumulation of fluid in the intestinal loops,

indicative of a reduced ETEC infection in neonatal calves (42). Moreover, similar scFvs directed at K99 factor have been evaluated *in vitro* using horse red blood cells and calf enterocytes (43, 44) where hemagglutination and binding activity has been reduced.

## Others

A scFv anti-infectious bronchitis virus (IBV) showed neutralizing activity (45); similarly, a scFv-Fc and scFv anti-infectious bursal disease virus (IBDV) reduced viral titers *in vivo* and *in ovo* (46, 47). NDV is a highly contagious viral infection that affects poultry and domestic birds. A scFv that recognizes NDV was produced and evaluated *in vitro*; the Ab showed neutralizing activity that resulted in reduced viral titers, as well as a lower cytopathic effect, in BHK21-infected cells (48). A scFv anti-*Eimeria tenella* and -*E. acervulina* produced in pea plants and *Nicotiana benthamiana*, respectively (49, 50), reduced the number of oocysts in the feces of chickens fed with transformed plants, especially when feeding with pea plants (51). Additionally, IgA rAb anti-*E. acervulina* antigens have been produced in *N. benthamiana* plants as potential immunotherapy agents for young broilers in which vaccination is not always successful (50).

In sheep, a DNA vaccine encoding a scFv fused with Rift Valley Fever Virus Gn peptide was directed at DEC205 and CD11c receptors. Compared with targeting to CD11c and untargeted treatment, targeting to DEC205 promoted IFN $\gamma$  production but showed an inefficient humoral response (52).

## RECOMBINANT ANTIBODIES FOR THERAPEUTIC PURPOSES

The use of rAb for therapy has been mainly focused on dogs where personalized treatments are less challenging than those for farm animals. Examples include therapies for cancer and inflammatory processes.

### Pigs

An anti-influenza virus antibody was obtained from a human donor after infection with H1N1 swine-origin influenza virus (SOIV). From this donor, a rAb named F16 was expressed and evaluated in several animal models. In mice and ferrets, F16 showed a therapeutic effect after a lethal challenge with H1N1 and H5N1 viruses, respectively (53). Nonetheless, when evaluated in pigs, F16 did not alter viral titers, although it reduced gross lung pathology when challenged (54).

### Cows

Bovine mastitis is caused by a variety of pathogens including *Staphylococcus aureus*. Tissue adhesion involves multiple proteins, including fibronectin-binding factor A and clumping factor A. These two proteins were targeted using a scFv to obstruct the adhesion mechanisms; therefore, they have potential to be used to prevent and treat bovine mastitis (55). Similarly, a sdAb that could recognize and neutralize  $\beta$ -hemolysin from *S. aureus* was generated and evaluated *in vitro* to confirm its neutralizing activity (56).

## Others

Therapy in poultry is, in most cases, not economically practical. However, the development of rAbs can simplify this practice. In this manner, a full-IgY rAb that can neutralize IBDV provides an 80% protection rate, in contrast to yolk antibody that offers only 40% protection in chickens challenged with IBDV (57). Similarly, a recombinant adenovirus (Ad5) containing the encoding sequence of a neutralizing sdAb specific for the HA1 domain of H5 virus was created. *In vivo* administration showed a 90–100% survival rate in lethally challenged mice (58). Additionally, a Fab that recognizes distinct HA0 hemagglutinin epitopes showed neutralizing activity and has great therapeutic potential (59). In this manner, a scFv anti-HA fused with truncated protamine (scFv-tP) designed to deliver siRNA was produced (scFv-tP) and evaluated *in vitro*, showing a reduction in viral titers (60).

In some cases, human medicine can be adapted for use in veterinary medicine. An example is a chimeric dog x mouse rAb derived from a mouse anti-human nerve growth factor (NGF) mAb (72) used to treat chronic inflammation. *In vivo*, a single dose of this rAb showed effectiveness in reducing chronic pain similar to that of 7 daily doses of meloxicam in dogs, proving it to be a good alternative for prolonged therapeutic treatments (61). A full caninized rAb anti-canine IL-31, lokivetmab, has been produced and evaluated in clinical trials with outstanding results concerning the control of atopic dermatitis (AD) in dogs (62). Compared to a daily dose of 5 mg/kg of ciclosporin, a drug typically used to treat AD, a single dose of 1 mg/kg ameliorated the symptoms of AD for a month (63). In the field of cancer, a scFv anti-canine CD20, a cell surface molecule expressed in normal and tumoral cells, was produced (64). Similarly, a caninized full Ab against epidermal growth factor receptor (EGFR) induces significant inhibition in proliferation *in vitro* and viability reduction in canine tumor cells that overexpress EGFR (65). Another anti-tumoral strategy is DC-based vaccination; a scFv capable of recognizing canine DCs has been produced for future use in vaccination and therapy (66).

## CONCLUSION

The continuous search for alternative ways to control pathogens influenced the application of rAbs in veterinary medicine, which appears to be influenced by the type of animal production. Most reports describing the use of rAbs for diagnosis are concentrated in cows. Their use for treatment is concentrated in dogs, and use for immunoprophylaxis is concentrated in pigs. Unsurprisingly, in the case of pigs, most reports are concentrated on a solution for PRRSV; alternatively, therapeutic rAb is used to identify treatments for dog diseases (Table 1). There is a wide diversity of rAb forms (Figure 1), and not all have been described in veterinary medicine. However, scFv, chimeric and sdAb are the most common forms of rAbs reported to date. In the upcoming years, the use of rAbs for the control of animal diseases will be a reality and will become a significant part of the economic world of pharmaceuticals. In summary, for the first time, the present mini-review describes the progress of rAb use in the

field of veterinary medicine. This technology has not been fully exploited for diseases of economically impactful animals. The development of rAbs has been proven to be a promising tool in the improvement of animal health.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

## REFERENCES

- Shoemaker CB. *When Will rAbs Replace mAbs in Labs?* WB Saunders (2005).
- Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* (2005) 23:1126–36. doi: 10.1038/nbt1142
- Kunert R, Reinhard D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2016) 100:3451–61. doi: 10.1007/s00253-016-7388-9
- Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol.* (2013) 4:217. doi: 10.3389/fimmu.2013.00217
- Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* (1988) 240:1041–3. doi: 10.1126/science.3285471
- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai, M.-S., Novotný J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1988) 85:5879–83. doi: 10.1073/pnas.85.16.5879
- Hammers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* (1993) 363:446. doi: 10.1038/363446a0
- Brüggenmann M, Winter G, Waldmann H, Neuberger M. The immunogenicity of chimeric antibodies. *J Exp Med.* (1989) 170:2153–7. doi: 10.1084/jem.170.6.2153
- Emmons C, Hunsicker L. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa Med.* (1987) 77:78–82.
- Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* (2015). 7:9–14. doi: 10.4161/19420862.2015.989042.
- Yang S, Shang Y, Yin S, Tian H, Chen Y, Sun S, et al. Selection and identification of single-domain antibody fragment against capsid protein of porcine circovirus type 2 (PCV2) from *C. bactrianus*. *Vet Immunol Immunopathol.* (2014) 160:12–9. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.03.004
- Yang S, Shang Y, Yin S, Wang D, Cai J, Gong Z, et al. A phage-displayed single domain antibody fused to alkaline phosphatase for detection of porcine circovirus type 2. *J Virol Methods* (2015) 213:84–92. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.11.023
- Chen S, Li S, Sun H, Li Y, Ji S, Song K, et al. Expression and characterization of a recombinant porcine antibody against the E2 protein of classical swine fever virus. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2018) 102:961–70. doi: 10.1007/s00253-017-8647-0
- Lobova D, Cížek A, Celer V. The selection of single-chain Fv antibody fragments specific to Bhlp 29.7 protein of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Folia Microbiol.* (2008) 53:517–20. doi: 10.1007/s12223-008-0081-3
- Deckers N, Saerens D, Kanobana K, Conrath K, Victor B, Wernery U, et al. Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *Int J Parasitol.* (2009) 39:625–33. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.10.012
- Foord AJ, Muller JD, Yu M, Wang LF, Heine HG. Production and application of recombinant antibodies to foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3ABC. *J Immunol Methods* (2007) 321:142–51. doi: 10.1016/j.jim.2007.01.014
- Sharma GK, Mahajan S, Matura R, Subramaniam S, Mohapatra JK, Pattnaik B. Production and characterization of single-chain antibody

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CONACyT-PN 2015 project number 248922. LB-C and EM-G received a scholarship from CONACyT. LB-C is part of the program Doctorado en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. EAMG is currently enrolled in Posgrado de Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora.

- (scFv) against 3ABC non-structural protein in *Escherichia coli* for serodiagnosis of foot and mouth disease virus. *Biologicals* (2014) 42:339–45. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.08.005
- Joensuu J, Brown K, Conley A, Clavijo A, Menassa R, Brandle J. Expression and purification of an anti-Foot-and-mouth disease virus single chain variable antibody fragment in tobacco plants. *Transgenic Res.* (2009) 18:685–96. doi: 10.1007/s11248-009-9257-0
- Bhatia S, Gangil R, Gupta DS, Sood R, Pradhan H, Dubey S. Single-chain fragment variable antibody against the capsid protein of bovine immunodeficiency virus and its use in ELISA. *J Virol Methods* (2010) 167:68–73. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.03.012
- Wemmer S, Mashau C, Fehrnsen J, Van Wyngaardt W, Duplessis DH. Chicken scFvs and bivalent scFv-CH fusions directed against HSP65 of *Mycobacterium bovis*. *Biologicals* (2010) 38:407–14. doi: 10.1016/j.biologicals.2010.02.002
- Abbadly A, Al-Mariri A, Zarkawi M, Al-Assad A, Muyldermans S. Evaluation of a nanobody phage display library constructed from a *Brucella*-immunised camel. *Veterinary Immunol Immunopathol.* (2011) 142:49–56. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.04.004
- Miyamoto K, Shimamoto T, Aosasa M, Kimura S, Nakamura N, Okubo Y, et al. Development of recombinant chicken IgY from single chain fragment of variable region for diagnosis of BSE. *Biologicals* (2007) 35:31–4. doi: 10.1016/j.biologicals.2006.01.003
- Sengupta D, Shaikh A, Bhatia S, Pateriya A, Khandia R, Sood R, et al. Development of single-chain Fv against the nucleoprotein of type A influenza virus and its use in ELISA. *J Virol Methods* (2014) 208:129–37. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.08.009
- Li B, Ye J, Lin Y, Wang M, Jia R, Zhu J. Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against phosphoprotein of newcastle disease virus. *Biologicals* (2014) 42:285–9. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.05.006
- Sapats S, Gould G, Trinidad L, Parede LH, David C, Ignjatovic J. An ELISA for detection of infectious bursal disease virus and differentiation of very virulent strains based on single chain recombinant chicken antibodies. *Avian Pathol.* (2005) 34:449–55. doi: 10.1080/03079450500367765
- Sapats S, Trinidad L, Gould G, Heine H, Van Den Berg T, Terradosi N, et al. Chicken recombinant antibodies specific for very virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol.* (2006) 151:1551–66. doi: 10.1007/s00705-006-0729-8
- Réfega S, Cluzeaud M, Péry P, Labbé M, Girard-Misguich F. Production of a functional chicken single-chain variable fragment antibody derived from caecal tonsils B lymphocytes against macrogamonts of *Eimeria tenella*. *Veter Immunol Immunopathol.* (2004) 97:219–30. doi: 10.1016/j.vetimm.2003.09.008
- Mazzega E, De Marco A. Engineered cross-reacting nanobodies simplify comparative oncology between humans and dogs. *Veter Compar Oncology* (2018) 16, E202–6. doi: 10.1111/vco.12359
- Subramaniam S, Pineyro P, Derscheid RJ, Madson DM, Magstadt DR, Meng XJ. Dendritic cell-targeted porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens adjuvanted with polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) induced non-protective immune responses against heterologous type 2 PRRSV challenge in pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* (2017) 190:18–25. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.07.003
- Subramaniam S, Pineyro P, Tian D, Overend C, Yugo DM, Matzinger SR, et al. *In vivo* targeting of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen through porcine DC-SIGN to dendritic cells elicits

- antigen-specific CD4T cell immunity in pigs. *Vaccine* (2014) 32:6768–75. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.10.005
31. Ooms K, Van Gorp H, Botti S, Van Gaever T, Delputte PL, Nauwynck HJ. Evaluation of viral peptide targeting to porcine sialoadhesin using a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccination-challenge model. *Virus Res.* (2013) 177:147–55. doi: 10.1016/j.virusres.2013.07.019
  32. Liu H, Wang Y, Duan H, Zhang A, Liang C, Gao J, et al. An intracellularly expressed Nsp9-specific nanobody in MARC-145 cells inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. *Veter Microbiol.* (2015) 181:252–60. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.10.021
  33. Jar AM, Osorio FA, López OJ. Mouse × pig chimeric antibodies expressed in Baculovirus retain the same properties of their parent antibodies. *Biotechnol Prog.* (2009) 25:516–23. doi: 10.1002/btpr.113
  34. Subramaniam S, Cao D, Tian D, Cao QM, Overend C, Yugo DM, et al. Efficient priming of CD4 T cells by Langerin-expressing dendritic cells targeted with porcine epidemic diarrhea virus spike protein domains in pigs. *Virus Res.* (2017) 227:212–9. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.007
  35. Subramaniam S, Yugo DM, Heffron CL, Rogers AJ, Sooryanarain H, Leroith T, et al. Vaccination of sows with a dendritic cell-targeted porcine epidemic diarrhea virus S1 protein-based candidate vaccine reduced viral shedding but exacerbated gross pathological lesions in suckling neonatal piglets. *J Gen Virol.* (2018) 99:230–9. doi: 10.1099/jgv.0.001001
  36. Pyo, H.-M., Kim, I.-J., Kim, S.-H., Kim, H.-S., Cho, S.-D., Cho, I.-S., et al. *Escherichia coli* expressing single-chain Fv on the cell surface as a potential prophylactic of porcine epidemic diarrhea virus. *Vaccine* (2009) 27:2030–6. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.130
  37. Sun D, Shi H, Chen J, Shi D, Zhu Q, Zhang H, et al. Generation of a mouse scFv library specific for porcine aminopeptidase N using the T7 phage display system. *J Virol Methods* (2012) 182:99–103. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.03.021
  38. Harmsen MM, Fijten HP, Dekker A, Eble PL. Passive immunization of pigs with bispecific llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease and porcine immunoglobulin. *Vet Microbiol.* (2008) 132:56–64. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.04.030
  39. Harmsen MM, Fijten HP, Engel B, Dekker A, Eble PL. Passive immunization with llama single-domain antibody fragments reduces foot-and-mouth disease transmission between pigs. *Vaccine* (2009) 27:1904–11. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.110
  40. Argilagué J, Perez-Martin E, Gallardo C, Salguero F, Borrego B, Lacasta A, et al. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine* (2011) 29:5379–85. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.084
  41. Chai Z, Fu F, Jiang F, Tian H, Wang Z, Zheng N, et al. Development of a neutralizing mouse-pig chimeric antibody with therapeutic potential against *Haemophilus parasuis* in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Lett.* (2014) 354:85–91. doi: 10.1111/1574-6968.12437
  42. Sahagun-Ruiz A, Velazquez LV, Bhaskaran S, Jay CM, Morales-Salinas E, Rathore K, et al. Reduction of enterotoxin induced fluid accumulation in ileal loops of neonatal calves with anti-F5 fimbriae recombinant antibody. *Vet Res Commun.* (2015) 39:229–36. doi: 10.1007/s11259-015-9646-1
  43. Golchin M, Aitken R. Isolation by phage display of recombinant antibodies able to block adherence of *Escherichia coli* mediated by the K99 colonisation factor. *Vet Immunol Immunopathol.* (2008) 121, 321–331. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.10.005
  44. Sunilkumar G, Waghela SD, Campbell LM, Rathore KS. Expression of anti-K99 scFv in transgenic rice tissues and its functional characterization. *Transgenic Res.* (2009) 18:347–60. doi: 10.1007/s11248-008-9223-2
  45. Lin Y, Li B, Ye J, Wang M, Wang J, Zhang Y, et al. Neutralization analysis of a chicken single-chain variable fragment derived from an immune antibody library against infectious bronchitis virus. *Viral Immunol.* (2015) 28:397–404. doi: 10.1089/vim.2014.0104
  46. Guo X, Cao H, Wang Y, Liu Y, Chen Y, Wang N, et al. Screening scFv antibodies against infectious bursal disease virus by co-expression of antigen and antibody in the bacteria display system. *Vet Immunol Immunopathol.* (2016) 180:45–52. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.09.004
  47. Greenall SA, Tyack SG, Johnson MA, Sapats SI. Antibody fragments, expressed by a fowl adenovirus vector, are able to neutralize infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* (2010) 39:339–48. doi: 10.1080/03079457.2010.507239
  48. Li B, Ye J, Lin Y, Wang M, Zhu J. Preparation and identification of a single-chain variable fragment antibody against Newcastle diseases virus F48E9. *Vet Immunol Immunopathol.* (2014) 161:258–64. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.08.009
  49. Khalafalla RE, Dausgies A. *In vivo* evaluation of anticoccidial effect of antibody fragments expressed in pea (*Pisum sativum*) on *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitol Res.* (2010) 107:983–6. doi: 10.1007/s00436-010-1964-1
  50. Wieland WH, Lammers A, Schots A, Orzáez DV. Plant expression of chicken secretory antibodies derived from combinatorial libraries. *J Biotechnol.* (2006) 122:382–91. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.020
  51. Zimmermann J, Saalbach I, Jahn D, Giersberg M, Haehnel S, Wedel J, et al. Antibody expressing pea seeds as fodder for prevention of gastrointestinal parasitic infections in chickens. *BMC Biotechnol.* (2009) 9:79. doi: 10.1186/1472-6750-9-79
  52. Chrun T, Lacote S, Urien C, Jouneau L, Barc C, Bouguyon E, et al. A rift valley fever virus Gn ectodomain-based DNA vaccine induces a partial protection not improved by APC targeting. *NPJ Vaccines* (2018) 3:14. doi: 10.1038/s41541-018-0052-x
  53. Corti D, Voss J, Gamblin SJ, Codoni G, Macagno A, Jarrossay D, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* (2011) 333:850–6. doi: 10.1126/science.1205669
  54. Morgan SB, Holzer B, Hemmink J, Salguero FJ, Schwartz JC, Agatic G, et al. Therapeutic administration of broadly neutralizing F16 antibody reveals lack of interaction between human IgG1 and pig Fc receptors. *Front Immunol.* (2018) 9:865. doi: 10.3389/fimmu.2018.00865
  55. Wang M, Zhang Y, Li B, Zhu J. Construction of scFv that bind both fibronectin-binding protein A and clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. *Res Vet Sci.* (2015) 100:109–14. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.02.012
  56. Jangra P, Singh A. *Staphylococcus aureus* β-hemolysin-neutralizing single-domain antibody isolated from phage display library of Indian desert camel. *Asian Pacific J Trop Med* (2010) 3:1–7. doi: 10.1016/S1995-7645(10)60020-X
  57. Zhang Y, Yin J, Li T, Zhou B, Xu P, Che R, et al. A recombinant avian antibody against VP2 of infectious bursal disease virus protects chicken from viral infection. *Res Vet Sci* (2017) 114:194–201. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.04.003
  58. Tutykhina IL, Sedova ES, Gribova IY, Ivanova TI, Vasilev LA, Rutovskaya MV, et al. Passive immunization with a recombinant adenovirus expressing an HA (H5)-specific single-domain antibody protects mice from lethal influenza infection. *Antiviral Res.* (2013) 97:318–28. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.12.021
  59. Pitaksajjakul P, Lekcharoensuk P, Upragarin N, Barbas CF, Ibrahim MS, Ikuta K, et al. Fab MAbs specific to HA of influenza virus with H5N1 neutralizing activity selected from immunized chicken phage library. *Biochem Biophys Res Commun.* (2010) 395:496–501. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.040
  60. Zhang T, Wang, C.-Y., Zhang W, Gao, Y.-W., Yang, S.-T., Wang, T.-C., et al. Generation and characterization of a fusion protein of single-chain fragment variable antibody against hemagglutinin antigen of avian influenza virus and truncated protamine. *Vaccine* (2010) 28:3949–55. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.03.045
  61. Gearing DP, Virtue ER, Gearing RP, Drew AC. A fully caninised anti-NGF monoclonal antibody for pain relief in dogs. *BMC Vet Res.* (2013) 9:226. doi: 10.1186/1746-6148-9-226
  62. Michels GM, Walsh KF, Kryda K, Mahabir SP, Walters RR, Hoeyers JD, et al. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the safety of lokivetmab (ZTS- 00103289), a caninized anti-canine IL-31 monoclonal antibody, in client owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* (2016) 27:505-e136. doi: 10.1111/vde.12364
  63. Moyaert H, Van Brussel L, Borowski S, Escalada M, Mahabir SP, Walters RR, et al. A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* (2017) 28:593. doi: 10.1111/vde.12478
  64. Jain S, Aresu L, Comazzi S, Shi J, Worrall E, Clayton J, et al. The development of a recombinant scFv monoclonal antibody targeting canine CD20 for use in comparative medicine. *PLoS ONE* (2016) 11:e0148366. doi: 10.1371/journal.pone.0148366
  65. Singer J, Fazekas J, Wang W, Weichselbaumer M, Matz M, Mader A, et al. Generation of a canine anti-EGFR (ErbB-1) antibody for passive immunotherapy in dog cancer patients. *Molecular Cancer Ther.* (2014) 13:1777–90. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0288

66. Fitting J, Killian D, Junghans C, Willenbrock S, Murua Escobar H, Lange S, et al. Generation of recombinant antibody fragments that target canine dendritic cells by phage display technology. *Vet Compar Oncol.* (2011) 9:183–95. doi: 10.1111/j.1476-5829.2010.00246.x
67. Alvarez B, Poderoso T, Alonso F, Ezquerro A, Dominguez J, Revilla C. Antigen targeting to APC: from mice to veterinary species. *Dev Comp Immunol.* (2013) 41:153–63. doi: 10.1016/j.dci.2013.04.021
68. Poderoso T, Martinez P, Alvarez B, Handler A, Moreno S, Alonso F, et al. Delivery of antigen to sialoadhesin or CD163 improves the specific immune response in pigs. *Vaccine* (2011) 29:4813–20. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.076
69. Revilla C, Poderoso T, Martinez P, Alvarez B, Lopez-Fuertes L, Alonso F, et al. Targeting to porcine sialoadhesin receptor improves antigen presentation to T cells. *Vet Res.* (2009) 40:14. doi: 10.1051/vetres:2008052
70. Deloizy C, Fossum E, Barnier-Quer C, Urien C, Chrun T, Duval A, et al. The anti-influenza M2e antibody response is promoted by XCR1 targeting in pig skin. *Sci Rep.* (2017) 7:7639. doi: 10.1038/s41598-017-07372-9
71. Harmsen MM, Van Solt CB, Fijten HP, Van Setten MC. Prolonged *in vivo* residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine* (2005) 23:4926–34. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.05.017
72. Ruberti F, Bradbury A, Cattaneo A. Cloning and expression of an anti-nerve growth factor (NGF) antibody for studies using the neuroantibody approach. *Cell Mol. Neurobiol.* (1993) 13:559–68. doi: 10.1007/BF00711464

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Bustamante-Córdova, Melgoza-González and Hernández. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.