



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN INHIBIDOR  
BIOLÓGICO DE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA  
CAPAZ DE MEDIAR TRANSCITOSIS EN MODELO *IN  
VITRO* DE BARRERA HEMATOENCEFÁLICA**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

VIANA MANRIQUE SUÁREZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2021

Profesor Guía: Dr. Oliberto Sánchez Ramos  
Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

© 2021 VIANA MANRIQUE SUÁREZ

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Oliberto Sánchez  
Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Gustavo Moraga  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción



---

Dr. Francisco Nualart  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dra. Francisca Bronfman  
Profesor Evaluador Externo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
P. Universidad Católica de Chile

---

Dr. Juan Pablo Henríquez  
Director del Programa Doctorado en Ciencias  
Biológicas Área Biología Celular y Molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas



*A mi familia,*

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Dr Oliberto Sánchez que guió el desarrollo de este trabajo, influyendo significativamente en mi formación profesional.

Al programa de doctorado en ciencias biológicas, de la Universidad de Concepción, por brindarme la oportunidad de ingresar al programa.

A las fuentes de financiamiento que permitieron el desarrollo de esta tesis:

- ANID ex CONICYT: PFCHA/Beca Doctorado Nacional/2017-21170539.
- Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción.
- Programa de Estrategias de desarrollo de Postgrado (EDPG), Interacciones químico-biológicas.

A todo el personal técnico y administrativo del departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Al laboratorio de Fisiopatología por su colaboración, tanto en reactivos, equipos, como en la interacción con los investigadores de este departamento.

A todos mis compañeros/as, profesores/as y amigos/as del laboratorio de Biofármacos recombinantes. Agradecer especialmente a Angélica, Frank, Eddy y Alain por el tiempo dedicado a la revisión del manuscrito. A Fátima y Yaneisis por tantas horas y protocolos compartidos.

A las secretarías de postgrado, Margareth Santana y Paula Veloso.

A todos aquellos que me enseñaron lo que hoy sé y supieron esculpir la mejor versión de mí.

A mi familia, gratitud infinita, a mis padres el ser quién soy, a mi hermano gracias por ser la punta de lanza, a mis hijas por ser mi motor impulsor y mi esposo por ser mi incansable compañero de vida.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>X</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XVI</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Factor de Necrosis tumoral.</b>	<b>4</b>
2.1.1 Estructura y función	4
2.1.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa y su papel en la neuroinflamación.	7
2.1.1 Agentes bloqueadores de TNF $\alpha$	11
2.1.1.1 Bloqueadores de TNF $\alpha$ en el tratamiento de enfermedades neurológicas	15
<b>2.2 Dominio de dimerización VEGF</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Caballos de Troya Moleculares para el paso de drogas a través de BHE</b>	<b>20</b>
2.2.1 Angiopéptido-2	24
<b>2.3 Tecnología Phage display</b>	<b>26</b>
2.4.1 Presentación de anticuerpos sobre fagos filamentosos	30
<b>III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Hipótesis</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Objetivos</b>	<b>36</b>
<b>IV. METODOLOGÍA</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Materiales</b>	<b>37</b>
4.1.1 Cepas bacterianas.	37
4.1.2 Plásmidos.	37
4.1.3 Bacteriófagos y fagémidos	39
4.1.4 Medios de cultivo de bacteria.	41
4.1.5 Antibióticos.	42
4.1.6 Líneas Celulares.	42
4.1.7 Reactivos y soluciones de cultivo celular.	43
4.1.8 Proteínas.	44
<b>4.2 Animales de laboratorio</b>	<b>46</b>

<b>4.3</b>	<b>Reactivos y soluciones generales.</b>	<b>46</b>
4.2.1	Soluciones para extracción y purificación de ADN plasmídico.	47
4.2.2	Soluciones para electroforesis de ADN.	47
4.2.3	Soluciones para electroforesis de proteínas.	47
4.2.4	Soluciones para Western blot.	49
4.2.5	Soluciones para cromatografía de afinidad a iones metálicos.	49
4.2.6	Soluciones para Selección por Phage Display.	50
4.2.7	Soluciones para Inmunoensayos.	51
4.2.8	Soluciones para inmunocitoquímica (ICC)	51
4.2.9	Kits comerciales.	52
<b>4.4</b>	<b>Equipos.</b>	<b>52</b>
<b>4.5</b>	<b>Métodos.</b>	<b>54</b>
4.5.1	Técnicas generales de análisis y manipulación de ADN.	54
	Electroforesis de ADN en gel de agarosa.	54
	Purificación de ADN plasmídico a escala mini-preparativa.	54
	Purificación de ADN desde gel de agarosa.	55
	Digestión analítica de ADN plasmídico con enzimas de restricción.	55
	Ligación de fragmentos de ADN.	56
	Preparación de bacterias quimiocompetentes y transformación con vector plasmídico.	57
4.5.2	Técnicas generales de análisis y manipulación de proteínas.	57
	Precipitación de muestras de proteínas con ácido tricloroacético.	58
	Preparación de geles de poliacrilamida.	58
	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).	59
	Western Blot.	60
	Dot Blot	60
	Concentración y diafiltración de muestras de proteínas.	61
	Cromatografía de afinidad a iones metálicos.	62
	Cuantificación de proteínas totales.	62
	Determinación de nivel de pureza de proteína por análisis densitométrico	63
	Identificación y caracterización de la glicosilación de proteína	63
4.5.3	Cultivo celular.	64
	Descongelación.	64
	Propagación.	64
	Congelación.	65
	Generación de clones estables de células CHO productoras de proteína MTV	65
	Expresión de proteína recombinante, MTV	66
	Ensayo de citotoxicidad celular de TNF $\alpha$ en células L929.	66
	Ensayo de neutralización de la citotoxicidad de TNF $\alpha$ en células L929.	67
	Cultivo en sistema transwell y medición de resistencia trans-endotelial	67
4.5.4	Actividad angiogénica	68
	Ensayo de la herida	68
	Ensayo ex vivo de anillos aórticos	69
4.5.5	Estudios de termoforesis microescala.	70
4.5.6	Diseño in silico de un dominio de dimerización VEGF mutado sin actividad angiogénica.	72
4.5.7	Inmunocitoquímica.	73

4.5.8	Phage Display.	74
	Infección de bacterias con fago auxiliador.	75
	Purificación de fagos por precipitación con polietilenglicol (PEG).	75
	Determinación del título de fagos.	76
	Selección de clones contra antígeno inmovilizado (biopanning)	76
	Identificación de anticuerpos de dominio único (dAbs) de unión a la proteína diana.	79
	Evaluación del reconocimiento de fagos portadores de dAbs contra la proteína diana.	81
4.5.9	Análisis estadístico	81
4.5.10	Bioética y bioseguridad	82
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>84</b>
<b>5.1</b>	<b>Diseño, obtención y purificación de la proteína recombinante MTV.</b>	<b>84</b>
5.1.1	Expresión y purificación de la proteína recombinante MTV	88
5.1.2	Caracterización del dominio dimerizante, VEGF mutado.	97
<b>5.2</b>	<b>Caracterización del dominio bloqueador de TNF<math>\alpha</math></b>	<b>103</b>
5.2.1	Caracterización de la unión de la proteína recombinante MTV y rhTNF $\alpha$	103
5.2.2	Evaluación in vitro del efecto de la proteína recombinante MTV en la inhibición de la citotoxicidad inducida por TNF $\alpha$ .	105
<b>5.3</b>	<b>Caracterización del dominio Caballo de Troya molecular.</b>	<b>107</b>
5.3.1	Caracterización de la unión de la proteína recombinante MTV y el receptor LRP1	107
5.3.2	Transcitosis in vitro de la proteína recombinante MTV	109
5.3.3	Obtención de nuevos dominios "caballo de Troya molecular" con capacidad de unir LRP1.	112
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>120</b>
<b>6.1</b>	<b>Diseño de la proteína recombinante MTV</b>	<b>120</b>
<b>6.2</b>	<b>Expresión, purificación y caracterización molecular de la proteína MTV.</b>	<b>125</b>
<b>6.3</b>	<b>Caracterización del dominio bloqueador de TNF<math>\alpha</math> en la proteína MTV.</b>	<b>126</b>
<b>6.4</b>	<b>Caracterización del dominio MTH en la proteína MTV</b>	<b>129</b>
<b>6.5</b>	<b>Identificación y caracterización de dAbs con capacidad de mediar transcitosis en modelo in vitro de BHE, vía LRP1.</b>	<b>131</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>137</b>
<b>VIII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>138</b>
<b>X.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>139</b>
<b>XI.</b>	<b>Anexos</b>	<b>159</b>
10.1	Informe del comité de bioética y bioseguridad	159

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DENATURANTES.....	59
TABLA 2. ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN RELATIVA DE LOS DOMINIOS VEGF MUTADOS A SUS RECEPTORES FLTR-1 Y KDR.....	88
TABLA 3. ANTICUERPOS DE DOMINIO ÚNICO (dAbs) DE UNIÓN A LRP1 IDENTIFICADOS POR <i>PHAGE DISPLAY</i> . .....	115



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE TNFA.....	5
FIGURA 2. MECANISMO MOLECULAR DEL TNFA EN LA NEUROINFLAMACIÓN.....	8
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS BLOQUEADORES DE TNFA APROBADOS POR LA FDA.....	13
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR.....	18
FIGURA 5. SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR.....	19
FIGURA 6. PHAGE DISPLAY.....	29
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE ANTICUERPOS TRADICIONALES, FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS VS NANOBODIES (Nb) Y ANTICUERPOS DE DOMINIO ÚNICO (DABS).....	31
FIGURA 8. PRESENTACIÓN DE ANTICUERPOS SOBRE FAGOS FILAMENTOSOS.....	34
FIGURA 9. ESTRATEGIA DE CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN PENTRY-MTV.....	39
FIGURA 10. PROCESO DE SELECCIÓN DE CLONES CONTRA ANTÍGENO INMOVILIZADO (BIOPANING).....	78
FIGURA 11. MOLÉCULA RECOMBINANTE MTV: MTH-TNFR2-VEGF.....	85
FIGURA 12. DISEÑO <i>IN SILICO</i> DEL DOMINIO DE DIMERIZACIÓN VEGF MUTADO.....	86
<b>FIGURA 13. CHEQUEO DE RESTRICCIÓN DEL VECTOR PENTRY-MTV CON ENZIMA NcoI.</b> ....	89
FIGURA 14. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MTV EN LÍNEA CELULAR CHO TRANSFECTADA CON EL VECTOR DE PENTRY-MTV.....	91
FIGURA 15. SELECCIÓN DE CLON CHO-PENTRYMTV PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE MTV.....	93
FIGURA 16. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MTV DESDE MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS CHO-PENTRYMTV.....	95
FIGURA 17. DEGLICOSILACIÓN DE LA PROTEÍNA MTV.....	96
FIGURA 18. DIMERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA MTV.....	98
FIGURA 19. ACTIVIDAD PROLIFERATIVA <i>IN VITRO</i> DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MTV.....	100
FIGURA 20. ACTIVIDAD ANGIOGÉNICA <i>IN VITRO</i> DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MTV.....	102
FIGURA 21. ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS MTV-RHTNF $\alpha$ .....	104
FIGURA 22. EFECTO DE LA PROTEÍNA MTV Y RHTNFA EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS L929.....	106
<b>FIGURA 23. NEUTRALIZACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR TNFA.</b> .....	107
FIGURA 24. INTERACCIÓN MTV-LRP1.....	109
<b>FIGURA 25. CAPACIDAD DE LA PROTEÍNA MTV DE ATRAVESAR LA MONOCAPA CELULAR EN MODELO <i>IN</i> <i>VITRO</i> DE BHE.</b> ....	111
FIGURA 26. INTERNALIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA PROTEÍNA MTV.....	112
FIGURA 27. RONDAS DE SELECCIÓN ANTICUERPO DE DOMINIO ÚNICO (DABS) AFINES CON ANTÍGENO LRP1. .....	113
FIGURA 28. RECONOCIMIENTO DE FAGOS MOSTRANDO FRAGMENTOS DABS POR LRP1.....	116
FIGURA 29. TRANSCITOSIS DE LOS CLONES DE FAGOS RECOMBINANTES EXPRESANDO FRAGMENTOS DABS EN MODELO <i>IN VITRO</i> DE BHE.....	117
FIGURA 30. CAPACIDAD DE CLONES DE FRAGMENTOS DABS DE ATRAVESAR LA MONOCAPA CELULAR EN MODELO <i>IN VITRO</i> DE BHE.....	119

## LISTADO DE ABREVIATURAS

AA: Aminoácido.

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Amp: Ampicilina.

ARN: Ácido Ribonucleico.

BCA: Ácido Bicinconínico.

bEnd3: Células endoteliales de microvasos de cerebro de ratón.

BHE: Barrera hematoencefálica.

BMECs: Células endoteliales que conforman los microvasos del cerebro.

BSA: Albúmina de Suero Bovino.

CDC: Citotoxicidad dependiente del complemento.

CDR: Regiones determinantes de la complementariedad.

CHO: Células de ovario de hámster chino.

CMVp: Promotor del citomegalovirus humano.

dAbs: Anticuerpos de dominio único.

DO: Densidad óptica.

EC<sub>50</sub>: Concentración media efectiva.

*E. coli*: *Escherichia coli*.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

Fab: Fragmento de unión a antígeno.

Fc: Fragmento cristizable.

FDA: *Food and Drug Administration*.

Flk: *Fetal liver kinase-1*.

Flt-1: *fms-like tyrosine kinase 1*.

GFP: Proteína fluorescente verde.

HCAbs: Anticuerpo de cadena pesada solamente.

HR: Humedad Relativa.

IgG: Inmunoglobulina G.

IMAC: Cromatografía de afinidad a iones metálicos.

IRES: Sitio interno de entrada al ribosoma.

Kan: Kanamicina.

Kd: Constante de disociación.

kDa: Kilo Dalton.

KDR: *Kinase insert Domain Receptor*.

LB: Medio Luria Bertani.

LRP1: Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad.

mAb: Anticuerpo monoclonal.

MTH: *Molecular Trojan Horse*. Caballo de troya molecular.

MST: *Microscale thermophoresis*. Termoforesis microescala.

Neo: Neomicina.



Nb: *Nanobodies*.

NF- $\kappa$ B: Factor Nuclear Kappa Beta.

OPD: o-Fenilendiamina.

p/v: Peso/Volumen.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PBS-T: PBS conteniendo 0.1 % (v/v) de Tween-20.

PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

PEG: Polietilenglicol.

PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo.

PSA: Persulfato de Amonio.

RMT: Transcitosis mediada por receptor.

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute.

ScFv: Fragmentos variables de cadena única.

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio.

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

SNC: Sistema nervioso central.

TAE: Tris-Acetato-EDTA.

TEER: Resistencia transendotelial.

TBS: Tampón Tris Salino.

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.

TNFI: Bloqueadores del factor de necrosis tumoral alfa.



TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral alfa.

TfR: Receptor de transferrina.

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VH: Dominio variable de cadena pesada.

VHH: Dominio variable de cadena pesada de anticuerpo de cadena pesada solamente.

v/v: Volumen/Volumen.



## RESUMEN

Los inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ) podrían prevenir los trastornos neurológicos, pero su diseño generalmente se basa en moléculas incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). El objetivo de esta investigación fue diseñar y caracterizar un nuevo inhibidor del  $\text{TNF}\alpha$  compuesto por tres dominios: el angiopéptido-2 como molécula lanzadera de la BHE, el dominio extracelular del receptor 2 del  $\text{TNF}\alpha$  humano para bloquear al  $\text{TNF}\alpha$  y un dominio de dimerización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con mutaciones para eliminar su actividad angiogénica. Esta nueva proteína quimérica (MTV) podría desencadenar la transcitosis a través de la BHE mediada por la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 1 (LRP1) e inhibir el efecto citotóxico del  $\text{TNF}\alpha$  con mayor eficacia debido a su estructura dimérica.

La transformación estable de células CHO permitió la expresión de la MTV, que luego se purificó mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos con un alto nivel de pureza. Las mutaciones realizadas al dominio VEGF de MTV evitaron las actividades de proliferación celular y angiogénica analizadas por ensayos de cierre de herida en células ECV304 y generación de vasos en anillos aórticos, respectivamente. Las interacciones entre las moléculas MTV- $\text{TNF}\alpha$  y MTV-LRP1 mostraron alta afinidad por termoforesis a microescala, y se observó un aumento significativo de la supervivencia celular tras bloquear el  $\text{TNF}\alpha$  con MTV en un ensayo de citotoxicidad celular. La unión y posible internalización de MTV en células endoteliales bEnd3 se demostró mediante inmunocitoquímica. Adicionalmente, se identificaron anticuerpos de dominio único (dAbs) afines a LRP1 mediante exposición antigénica en la superficie de fagos filamentosos (*phage display*). La transcitosis de estos fragmentos de anticuerpos a través de la BHE se demostró en modelo *in vitro* de BHE. Este estudio evidenció el funcionamiento de los tres dominios que componen la MTV, estableciéndola como candidato potencial para el tratamiento sistémico de los trastornos neurológicos. La identificación de dAbs que atraviesan la BHE constituye un hallazgo significativo, debido a que pudiesen sustituir al angiopéptido-2 en la molécula MTV o pudiesen utilizarse para conjugarlos a otros agentes terapéuticos para su acción en el sistema nervioso central.

## ABSTRACT

Tumor necrosis factor-alpha ( $TNF\alpha$ ) inhibitors could prevent neurological disorders, but their design generally relies on molecules unable to cross the blood-brain barrier (BBB). This research was aimed to design and characterize a novel  $TNF\alpha$  inhibitor composed from three domains: angiopeptide-2 as the BBB shuttle molecule, the extracellular domain of human  $TNF\alpha$  receptor 2 to block  $TNF\alpha$ , and a vascular endothelial growth factor (VEGF) dimerization domain with mutations to eliminate its angiogenic activity. This novel chimeric protein (MTV) would be able to trigger transcytosis through BBB via low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) and inhibit the cytotoxic effect of  $TNF\alpha$  more effectively due to its dimeric structure.

Stable transformation of CHO cells allowed the expression of MTV, which was then purified by Immobilized-Metal Affinity Chromatography rendered high purity degree. Mutations made to the VEGF domain included in MTV prevented cell proliferation and angiogenic activities measured by scratch assays in ECV304 cells and vessel generation in aortic rings, respectively. These results demonstrated that the function of this domain is restricted to dimerization only. Interactions between MTV- $TNF\alpha$  and MTV-LRP1 molecules showed high affinity by microscale thermophoresis, and a significant increase in cell survival was observed after blocking  $TNF\alpha$  with MTV in a cell cytotoxicity assay. Binding and possible internalization of MTV in bEnd3 cells was demonstrated by immunocytochemistry. Additionally, single domain antibodies (dAbs) targeting to LRP1 were identified by antigenic exposure on the surface of filamentous phages (phage display). Transcytosis of these antibody fragments across the BBB was demonstrated in an *in vitro* BBB model. This study evidenced the functioning of the three MTV's domains, establishing it as a potential candidate for systemic treatment of neurological disorders. The identification of dAbs that cross the BBB is a significant finding because they could substitute for angiopeptide-2 in the MTV molecule or could be used to conjugate to other therapeutic agents for action in the central nervous system.

## I. INTRODUCCIÓN

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es una citoquina pleiotrópica que participa en la inflamación y defensa contra agentes infecciosos y tumores<sup>1-2</sup>. En el sistema nervioso central, el TNF $\alpha$  es expresado por neuronas y células gliales con funciones homeostáticas y patológicas. En condiciones patológicas, la microglía libera grandes cantidades de TNF $\alpha$ , un componente importante de la respuesta neuroinflamatoria asociada con diversos trastornos neurológicos, incluyendo isquemia<sup>3-4</sup>, lesión cerebral traumática<sup>5</sup>, esclerosis múltiple<sup>6</sup>, enfermedad de Alzheimer<sup>7-8</sup> y enfermedad de Parkinson<sup>9-11</sup>.

La contribución del TNF $\alpha$  a la patogénesis de las enfermedades neurológicas convierte la inhibición de TNF $\alpha$  en una alternativa terapéutica. Los medicamentos anti-TNF (TNFI) se han utilizado en la clínica durante casi 20 años para el tratamiento de patologías autoinmunes. El gran tamaño de los actuales TNFI impiden su paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE), y por lo tanto su aplicación en el tratamiento de enfermedades neurológicas. Algunos estudios han evaluado la administración de TNFI intracraneal<sup>12</sup>, intratecal<sup>13-15</sup> o periespinalmente<sup>16</sup>. A pesar de que se han observado mejoras cognitivas en los pacientes tratados<sup>17</sup> las enfermedades neurodegenerativas crónicas como la

enfermedad de Alzheimer requieren tratamiento a largo plazo, lo que hace que estas vías de administración sean poco prácticas o seguras.

Uno de los enfoques más prometedores para facilitar el paso de las moléculas terapéuticas desde la circulación sistémica al sistema nervioso central (SNC) es su unión física a un caballo de Troya molecular (MTH, de sus siglas en inglés, *Molecular Trojan Horse*), que son anticuerpos monoclonales o péptidos que se unen a un receptor en el lado apical de la BHE permitiendo su transcitosis al SNC<sup>18</sup>. El Angiopéptido-2 es uno de los primeros péptidos reportados como MTH. Esta molécula fue diseñada para cruzar las células endoteliales de la BHE a través de transcitosis mediada por la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP1), un receptor altamente expresado en células endoteliales que conforman los microvasos del cerebro (BMECs)<sup>19-22</sup>. El Angiopéptido-2 tiene una capacidad aumentada de penetración cerebral, demostrada en modelo *in vitro* de BHE y perfusión cerebral *in situ* en ratones<sup>21</sup>.<sup>23</sup>. Además, este péptido ha sido explotado como ligando para el paso de genes dirigidos al cerebro<sup>24</sup> y conjugado con paclitaxel para el tratamiento de metástasis cerebrales de cáncer de mama, actualmente en ensayo clínico<sup>25</sup>.

En el presente trabajo se describe el diseño y la caracterización de la proteína recombinante, MTV, como un nuevo inhibidor biológico de TNF $\alpha$  dimérico y con capacidad potencial de atravesar la BHE. El diseño incluye la fusión del dominio

extracelular del TNFR2 como dominio TNFI, Angiopéptido-2<sup>26</sup> como Caballo de Troya Molecular, y un dominio VEGF mutado para lograr la dimerización de la molécula. Complementariamente, se utilizó la técnica de *phage display* para obtener anticuerpos de dominio único con capacidad de mediar transcitosis en células endoteliales mediante LRP1. Estos ligandos pueden ser utilizados para sustituir al Angiopéptido-2 en la molécula recombinante o para mediar el paso de otros agentes terapéuticos al sistema nervioso central.

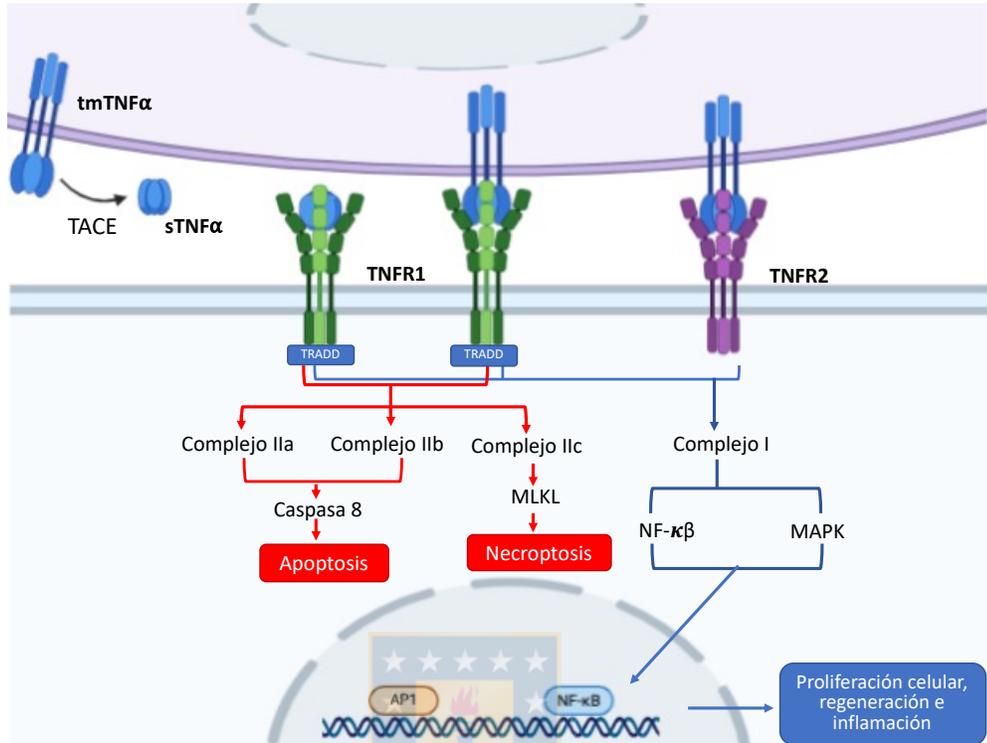


## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Factor de Necrosis tumoral.

#### 2.1.1 Estructura y función

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$  de sus siglas en inglés, *Tumor necrosis factor*) fue descrito en 1975 por Carswell y colaboradores como una proteína sérica producida tras una infección bacteriana<sup>1</sup>. Esta proteína ocasionaba necrosis hemorrágica en tumores animales, a lo que debe su nombre<sup>1</sup>. El TNF $\alpha$  es una citoquina pleiotrópica que participa en la inflamación y la defensa contra agentes infecciosos y tumores<sup>2, 27</sup>. Esta molécula es producida por células del sistema inmune, principalmente por macrófagos activados<sup>28</sup>. Se expresa como una proteína transmembrana de 26 kDa que se dispone formando homotrímeros<sup>29</sup>, la que es clivada por la enzima convertidora de TNF $\alpha$  (TACE/ADAM17) liberando el trímero soluble de TNF $\alpha$ <sup>30</sup>. Paralelamente, el dominio intracelular del TNF $\alpha$  transmembrana (tmTNF $\alpha$ ) puede ser escindido por las enzimas SPPL2a y SPPL2b, y transportado al núcleo celular para promover la expresión de genes (IL-1 e IL-12)<sup>31-32, 26</sup>.



**Figura 1. Ruta de señalización de TNFα.**

TNFα es producido como una proteína transmembrana (tmTNFα), mediante cortes proteolíticos por la enzima convertidora de TNFα (TACE) se liberan la forma soluble de TNFα (sTNFα) y su dominio intracelular. El TNFα lleva a cabo sus funciones como ligando al interactuar con los receptores TNFR1 y TNFR2. Según el tipo de célula diana y el microambiente, la señalización de TNFα desencadena muerte, proliferación o supervivencia celular, y expresión de genes relacionados con inflamación y defensa del organismo. **Figura creada en Biorender.com.**

Estructuralmente, cada monómero de 17 kDa que compone la forma soluble de TNFα consta de dos hojas beta, cada una formada por cuatro cadenas beta en posición antiparalela, formando una estructura tipo sándwich que es típica de la familia de TNF<sup>33</sup>. Los trímeros de TNFα ejercen su función al interactuar con sus receptores TNFR1 (CD120a, p55/60) y TNFR2 (CD120b, p75/80). Los receptores de TNFα, al entrar en contacto con su ligando, se agregan formando trímeros que

se unen al homotrímero central de TNF $\alpha$ <sup>34-35</sup>. Los receptores de TNF $\alpha$  son glicoproteínas con una región extracelular, que contiene 4 dominios ricos en Cisteína implicados en la interacción con el ligando, una región transmembrana, y una región intracelular responsable de reclutar proteínas del citosol que inician la señalización<sup>36</sup>.

TNFR1 es una glicoproteína de 55 kDa, se expresa en la mayoría de los tejidos, y se activa tanto por la forma soluble de TNF $\alpha$  como por el TNF $\alpha$  de membrana. La región intracelular de este receptor presenta un dominio de muerte cercano al extremo carboxilo terminal<sup>37-38</sup>, necesario para la señalización del receptor activado. TNFR2 es una proteína transmembrana de 75 kDa. Este receptor es expresado por tipos celulares específicos, tales como neuronas, células endoteliales y células del sistema inmunológico, y responde solamente al TNF $\alpha$  de membrana<sup>39</sup>. El TNFR2 carece de dominio de muerte en la región intracelular, por lo que no puede inducir la muerte celular programada directamente<sup>38</sup>. Ambos receptores activan vías de señalización que desencadenan la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1. Sólo el TNFR1 induce muerte celular por apoptosis o necroptosis<sup>27, 2</sup> (Figura 1). El TNF $\alpha$  promueve procesos de proliferación, sobrevivencia, muerte celular y expresión de genes pro-inflamatorios dependiendo del tipo de célula y el microambiente en que se encuentre<sup>2, 40</sup>

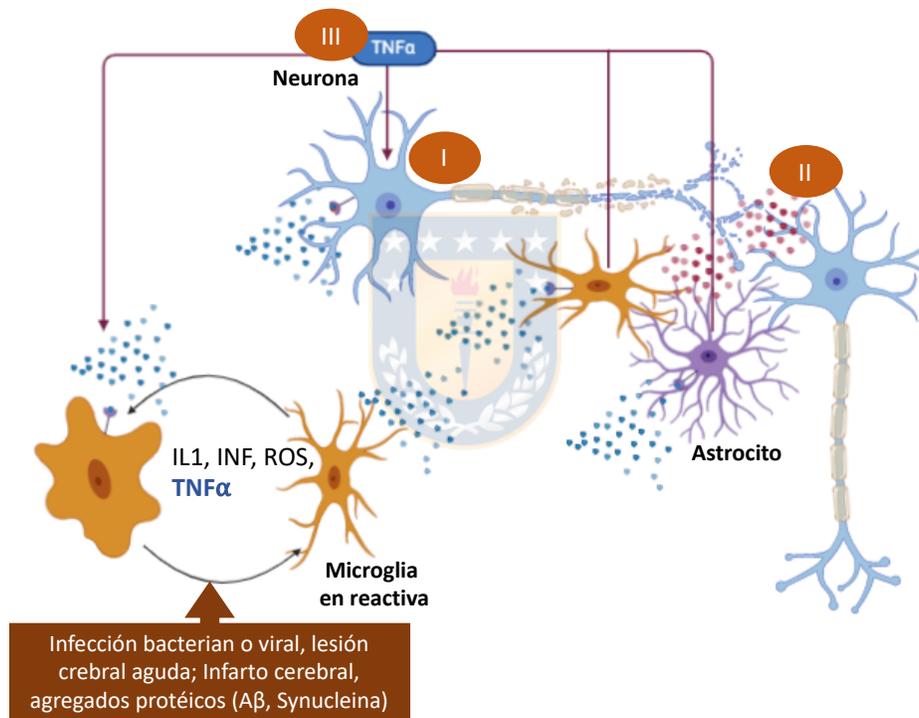
### 2.1.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa y su papel en la neuroinflamación.

El término neuroinflamación se utiliza para denotar las respuestas celulares e inflamatorias del tejido neuronal vascularizado mediante la activación de las células residentes en el cerebro (microglía, astrocitos y células endoteliales), el reclutamiento de leucocitos derivados de la sangre, incluyendo neutrófilos, linfocitos y macrófagos, y una serie de factores humorales<sup>41-42</sup>. La neuroinflamación además denota la inflamación asociada al cerebro y se caracteriza por la activación de la microglía y la expresión de los principales mediadores inflamatorios sin los rasgos típicos de la inflamación periférica<sup>43</sup>.

En el sistema nervioso central, el TNF $\alpha$  es expresado por las neuronas y las células gliales ejerciendo funciones tanto homeostáticas como fisiopatológicas<sup>44</sup>.

En condiciones patológicas, la microglía libera grandes cantidades de TNF $\alpha$  que constituye un componente importante de la llamada respuesta neuroinflamatoria asociada a varios trastornos neurológicos. La generación y liberación de TNF $\alpha$  es inducida por diversos estímulos celulares, que incluyen infección bacteriana o viral, lesión cerebral aguda o infarto cerebral y la formación de agregados proteicos en trastornos neurodegenerativos crónicos, como el péptido  $\beta$ -amiloide en la enfermedad de Alzheimer (EA) y synucleína en la enfermedad de Parkinson<sup>45</sup>.

Se han encontrado niveles elevados de  $\text{TNF}\alpha$  asociados a varios trastornos neurológicos que incluyen isquemia<sup>4, 3</sup>, lesión cerebral traumática<sup>5</sup>, esclerosis múltiple <sup>46-49, 6</sup>, enfermedad de Alzheimer <sup>7-8</sup> y enfermedad de Parkinson<sup>9-11</sup>. La activación de la microglía y la liberación de mediadores inflamatorios contribuyen a la patogénesis de estas enfermedades, induciendo muerte neuronal que a su vez induce inflamación generándose un círculo vicioso<sup>50</sup>.



**Figura 2. Mecanismo molecular del  $\text{TNF}\alpha$  en la neuroinflamación.**

(I). Degeneración del axón y cuerpo neuronal mediada por afectación actividad mitocondrial y reducción del ATP y subsecuente activación de enzimas de degradación. (II).  $\text{TNF}\alpha$  puede inducir citotoxicidad mediada por glutamato ya sea aumentando la producción de glutamato en microglía mediante la sobreexpresión de Glutaminasa, inhibiendo la recaptura de glutamato en astrocitos, o directamente aumentando la ubicación de receptores ionotrópicos AMPA y NMDA y disminuyendo la expresión de receptores inhibidores de GABA en la sinapsis. (III). El  $\text{TNF}\alpha$ , producido en microglías y astrocitos, actúa sobre las neuronas provocando degeneración y

muerte celular, e induciendo estado reactivo en las microglías en reposo. **Figura creada en Biorender.com.**

Ensayos en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón demostraron que TNF $\alpha$  induce muerte celular por un mecanismo dependiente de TNFR1 mediado por la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>51</sup>. La degeneración del axón y del cuerpo celular neuronal mediada por TNF $\alpha$  involucra varios mecanismos moleculares. Estudios recientes sugieren que el TNF $\alpha$  provoca efectos neurotóxicos al inducir disfunción mitocondrial mediada por la señalización de TNFR1<sup>52</sup>, que activa la caspasa 8 y conduce a la liberación de citocromo C<sup>53</sup>. El óxido nítrico (NO) producido por los macrófagos y la microglía reactiva puede inhibir la respiración celular normal y la producción de ATP mitocondrial en las neuronas. Las reducciones en la producción de ATP neuronal pueden provocar el fallo de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Los aumentos subsiguientes de las concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup> conducen a un funcionamiento inverso del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> y a la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles al voltaje, lo que da lugar a un aumento del Ca<sup>2+</sup> intra-axonal. Esto, a su vez, puede activar las enzimas de degradación (proteasas, fosfolipasas y calpainas), lo que da lugar a un mayor daño neuronal o axonal y a una disminución de la producción de ATP<sup>52</sup> (Figura 2-1). La microglía y los macrófagos reclutados en la zona producen glutamato, que puede interactuar con los receptores NMDA o AMPA, que también causan un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular. Adicionalmente TNF $\alpha$

puede potenciar la citotoxicidad mediada por Glutamato<sup>54</sup> por vías complementarias: indirectamente por inhibición de la recaptura y la degradación del glutamato en el astrocito, acompañado de una expresión reducida de la glutamina sintasa (GS) y la glutamato deshidrogenasa (GDH)<sup>55</sup>, incrementando la producción de Glutamato en las microglías debido a sobreexpresión de glutaminasa<sup>56-57</sup> y directamente, desencadenando en neuronas la expresión de receptores AMPA permeables a  $Ca^{2+}$ , receptores NMDA e inhibiendo la expresión de receptores GABA<sup>58-59</sup> y promoviendo la liberación de glutamato por hemicanales de *gap junction* vía TNFR1<sup>56</sup> (Figura 2-II). El TNF $\alpha$ , producido en microglías y astrocitos, actúa sobre las neuronas provocando degeneración y muerte celular, lo que induce un estado reactivo en las microglías en reposo y de esta manera auto-perpetuación del ciclo (Figura 2-III).

Por otra parte, el TNF $\alpha$  también tiene efectos en aspectos de la transmisión sináptica y la plasticidad<sup>60</sup>. La aplicación de TNF $\alpha$  exógeno a láminas de hipocampo de rata Wistar, disminuye la generación de potenciación a largo plazo (LTP, de sus siglas en inglés, *long-term potentiation*) de manera dosis dependiente<sup>61-63</sup>. Además, se observó que la señalización por TNF $\alpha$  afecta la generación de depresión a largo plazo (LTD, de sus siglas en inglés, *long-term depression*), lo que fue evidenciado en láminas de hipocampo de ratones deficientes de receptores para TNF $\alpha$ , al no observarse respuesta en neuronas

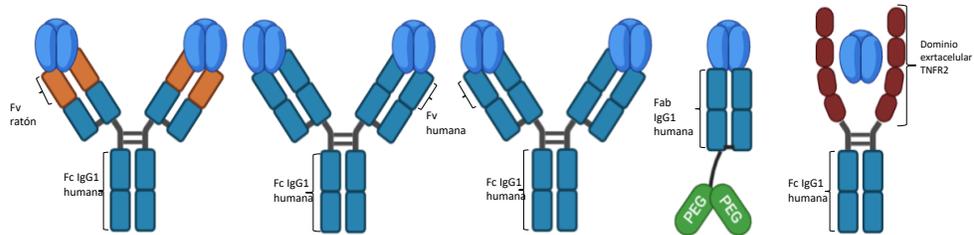
piramidales CA1 tras estimulación de colaterales de Schaffer<sup>62</sup>. La señalización TNF $\alpha$ /TNFR1 puede ser suficiente para inducir cambios dependientes de la región del SNC tanto en la conectividad sináptica como en la expresión del BDNF en condiciones de dolor neuropático<sup>64</sup>. El TNF $\alpha$  reduce las longitudes de las dendritas basales y el número de puntos de ramificación en neuronas piramidales CA1, mientras que aumenta significativamente la longitud total de las dendritas y el número de puntos de ramificación de las dendritas en las neuronas neurokinin-1-positivas (NK1-PNs) en la lámina espinal I, que es crítico para el desarrollo del dolor neuropático<sup>64</sup>.



### 2.1.1 Agentes bloqueadores de TNF $\alpha$

Los fármacos anti-TNF $\alpha$  se han utilizado en la clínica durante casi 20 años para el tratamiento de patologías asociadas a altos niveles de esta citoquina, como la artritis reumatoide<sup>65-67</sup>, la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica<sup>68-70</sup>, la enfermedad de Crohn<sup>71-72</sup> entre otras. Entre las alternativas de tratamiento para estas patologías se encuentran agentes biológicos bloqueadores de TNF $\alpha$  (TNFI, de sus siglas en inglés, *Tumor necrosis alpha inhibitor*). En la actualidad existen cinco agentes biológicos bloqueadores de TNF $\alpha$  aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration, USA*) (Figura 3)<sup>73</sup> que son:

- **Infliximab** (Remicade®): anticuerpo monoclonal quimérico que posee la región constante de inmunoglobulina G (IgG) humana y la región variable de origen murino. El uso de Infliximab está indicado para el tratamiento de pacientes que padecen artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis psoriásica y psoriasis.
- **Adalimumab** (Humira®): anticuerpo monoclonal humano tipo IgG subclase 1 (IgG1) específico para el TNF $\alpha$  humano. Este anticuerpo se identificó mediante la tecnología de *Phage display* y es producido en células de ovario de hámster chino (CHO, de sus siglas en inglés, *Chinese hamster ovary*). Adalimumab está indicado en el tratamiento de artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artritis psoriásica, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, hidradenitis supurativa y uveítis.
- **Etanercept** (Enbrel®): proteína de fusión que consiste en dos cadenas idénticas del dominio extracelular del TNFR2 unidas al fragmento cristalizante (Fc) de IgG1 humana. Esta proteína de fusión es producida mediante la tecnología de ADN recombinante en cultivos de células CHO. El tratamiento con Etanercept está aprobado para pacientes que padecen artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y psoriasis.
- **Certolizumab pegol** (Cimzia®): fragmento de anticuerpo (Fab') humanizado, producido en *Escherichia coli*, y posteriormente pegilado. Cimzia™ está aprobado para el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y enfermedad de Crohn.
- **Golimumab** (Simponi®): anticuerpo monoclonal humano de clase IgG1. Es producido en células de hibridoma murino. Este anticuerpo está aprobado para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y colitis ulcerosa.



Característica	Infiximab (IFX)	Adalimumab (ADA)	Golimumab (GOL)	Certolizumab pegol (CET)	Etanercept (ETA)
Unión TNF soluble	✓	✓	✓	✓	✓
Unión TNF de membrana	✓	✓	✓	✓	✓
ADCC/CDC mediada por Fc	✓	✓	✓	X	✓
Causa apoptosis en a célula que expresa TNF	✓	✓	✓	X	X

**Figura 3. Representación esquemática de los bloqueadores de TNF $\alpha$  aprobados por la FDA.** Infiximab, anticuerpo monoclonal quimérico; Adalimumab y Golimumab, anticuerpos monoclonales IgG1 humanos; Etanercept, proteína de fusión del dominio extracelular del TNFR2 humano y Fc de IgG1 humano; y Certolizumab pegol, un fragmento de anticuerpo humanizado y pegilado. Fab: Fragmento de unión al antígeno. Fc: Fragmento cristalizante. Fv: Fragmento hipervariable. **Figura creada en Biorender.com.**

El principal mecanismo de acción de todos los biofármacos descritos es unir específicamente TNF $\alpha$ , tanto en su forma soluble como transmembrana, y prevenir la interacción con sus receptores<sup>73 74</sup>. Todos los biofármacos se unen a TNF $\alpha$  con alta afinidad, reportándose valores de constante de disociación (Kd) entre 10 y 250 pM para la interacción con TNF $\alpha$  soluble<sup>75-77</sup>, y valores entre 0.4 y 15.5 nM para la interacción con TNF $\alpha$  transmembrana<sup>75-76</sup>. Dependiendo de su estructura y forma de interacción con la diana, los bloqueadores de TNF $\alpha$  tienen mecanismos de acción adicionales. Las moléculas que tienen en su estructura la

región Fc de IgG promueven funciones relacionadas a ella, y de este modo inducen lisis en células que expresan TNF $\alpha$  transmembrana mediante la activación del complemento (CDC, de sus siglas en inglés, *Complement-Dependent Cytotoxicity*) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, de sus siglas en inglés, *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*)<sup>74</sup>. Por otra parte, se ha descrito que algunos bloqueadores de TNF $\alpha$  activan la señalización reversa del TNF $\alpha$  transmembrana. Con excepción de Etanercept, los bloqueadores de TNF $\alpha$  inducen la muerte y arresto del ciclo celular de células T que expresan TNF $\alpha$  transmembrana<sup>31, 78</sup> y promueven la expresión de TGF- $\beta$  en macrófagos<sup>79-80</sup>. Las diferencias en los mecanismos de acción de los bloqueadores de TNF $\alpha$  explican las diferencias en la eficacia de estas moléculas en las distintas enfermedades inflamatorias autoinmunes.

Infliximab se une a las formas de monómero y trímero de TNF $\alpha$  soluble, mientras que Etanercept se une solo a la forma trimérica<sup>81</sup>. Cada molécula de Infliximab es capaz de unirse a dos moléculas de TNF $\alpha$ , y hasta tres moléculas de infliximab pueden unirse a cada homotrímero de TNF $\alpha$ . Por el contrario, Etanercept forma complejo 1:1 con el trímero TNF $\alpha$ <sup>81</sup>, aunque se han descrito estequiometría 1:2, TNF $\alpha$ -Etanercept, en presencia de exceso de Etanercept<sup>82-83</sup>. La naturaleza dimérica de Etanercept permite su unión a moléculas de TNF $\alpha$  libres o ligadas al

receptor con una afinidad de 50 a 1000 veces mayor comparada a la forma monomérica del TNFR, de ahí la efectividad en su actividad inhibitoria de TNF $\alpha$ <sup>84</sup>.

#### 2.1.1.1 Bloqueadores de TNF $\alpha$ en el tratamiento de enfermedades neurológicas

La mayoría de los trastornos neurológicos podrían tratarse con éxito con biofármacos recombinantes. Existe vasta evidencia que muestra el potencial de estos fármacos para el tratamiento de patologías cerebrales. Los factores neurotróficos, (NGF, de sus siglas en inglés, *Nerve growth factor*) y BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), han demostrado su capacidad para regular la supervivencia neuronal y la proliferación, y para mantener las redes dendríticas y axonales, así como la plasticidad sináptica<sup>85-86</sup>. Varios ensayos preclínicos y clínicos han mostrado resultados alentadores en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson cuando se administraron periespinalmente ligandos de la familia factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales<sup>87-88</sup> (GDNF, de sus siglas en inglés, *Glial derivate neurotrophic factor*). Recientemente, también se han obtenido resultados exitosos cuando los ligandos de la familia GDNF se administraron mediante convección intraputamental a través de un puerto transcutáneo montado en el cráneo<sup>89</sup>. Los experimentos en ratas también demuestran que la eritropoyetina humana recombinante previene la apoptosis neuronal dentro de la penumbra isquémica y reduce el volumen infarto<sup>90-91</sup>.

Existen pocos estudios que investiguen el uso de fármacos bloqueadores de TNF $\alpha$  para prevenir o tratar desórdenes neurológicos. Considerando que los TNFI biológicos son de gran tamaño y no cruzan la barrera hematoencefálica, en estos estudios se realizó la administración intracraneal<sup>12</sup>, intratecal<sup>14, 13, 92</sup> o periespinal<sup>93</sup> de los fármacos. Como resultado se observó mejoría cognitiva en los pacientes tratados. Existe un número significativo de resultados y testimonios que indican que, en pacientes con enfermedad de Alzheimer, la administración periespinal de Etanercept induce mejoras notables en el aprendizaje, la memoria y la fluidez verbal desde los primeros minutos después de la administración<sup>94, 16-17, 95</sup>.

El tratamiento de enfermedades neurodegenerativas crónicas como la EA requiere un tratamiento a largo plazo, lo que hace que estas vías de administración no sean prácticas ni seguras. Si los biofármacos anti-TNF $\alpha$  se van a emplear para el tratamiento de enfermedades neurológicas deben ser modificados para permitir su paso a través de la BHE tras administración sistémica mediante su fusión a un “Caballo de Troya Molecular” (MTH, de sus siglas en inglés, *Molecular trojan horse*).

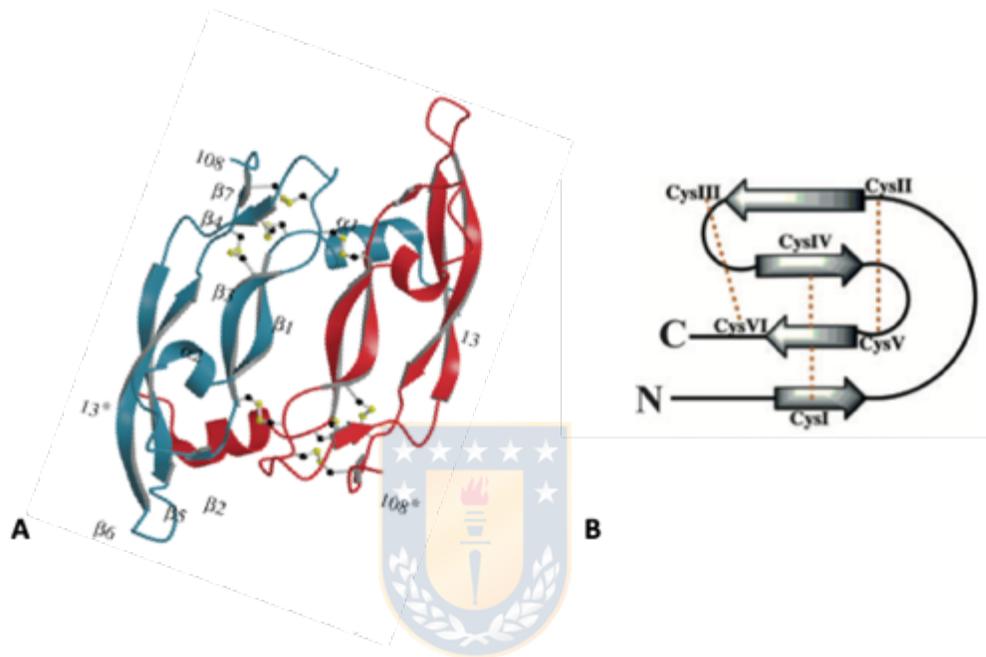
## 2.2 Dominio de dimerización VEGF

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), también denominado VEGF-A, es un potente agente mitogénico para las células del endotelio vascular.

Esta proteína señalizadora que pertenece a la familia VEGF, constituida por siete miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PIGF (Factor de Crecimiento Placentario). VEGF-A es el miembro más caracterizado de la familia VEGF, el que se encuentra presente en las isoformas VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, y VEGF<sub>206</sub> (el subíndice denota el número de aminoácidos), generadas por *splicing* alternativo de los exones codificantes<sup>96-97</sup>.

En la estructura de cada monómero se observan siete segmentos de lámina  $\beta$  y 2 de hélice  $\alpha$ , además de tres puentes disulfuro (Figura 4A). Esta familia de factores de crecimiento se caracterizan por compartir una región aminoacídica central estructurada en forma de un motivo tipo “nudo de Cisteínas”. Esta región está formada por un enlace disulfuro entre los residuos Cis26-Cis68 que pasa a través de una conformación cerrada por la presencia de los enlaces disulfuro Cis57-Cis102 y Cis61-Cis104 (Figura 4B). Desde este motivo se extiende una estructura secundaria tipo lámina  $\beta$  compuesta por 4 hebras interconectadas por tres bucles denominados LI, LII y LIII, que se encuentran expuestos hacia el solvente (Figura 4). El núcleo de Cisteína proporciona una excelente resistencia proteolítica y estabilidad térmica a estos factores de crecimiento. Los análisis de estabilidad termodinámica y térmica de diferentes mutantes de enlaces disulfuro del VEGF-A, realizados por Muller y col<sup>97</sup>, demostraron que el nudo de Cisteína

es responsable de la estabilización entrópica de la molécula y que ninguno de los puentes de disulfuro aumenta la estabilidad termodinámica del VEGF-A<sup>98</sup>.

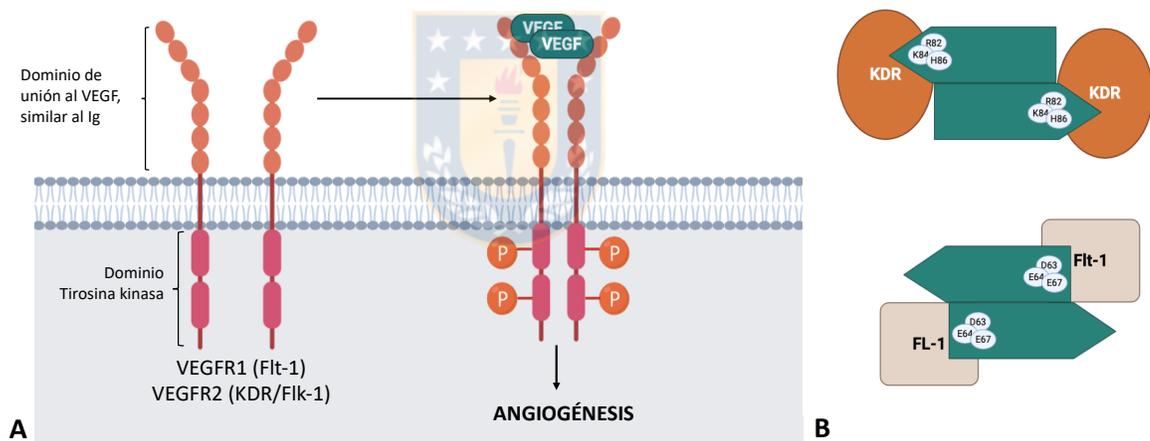


**Figura 4. Representación de la estructura tridimensional del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular.**

**A.** Representación en cinta de la estructura del dominio del VEGF de unión a los receptores. Los elementos de la estructura secundaria de un monómero están etiquetados:  $\alpha 1$  (residuos 16-24),  $\beta 1$  (27-34),  $\alpha 2$  (35-39),  $\beta 2$  (46-48),  $\beta 3$  (51-58),  $\beta 4$  (67-69),  $\beta 5$  (73-83),  $\beta 6$  (89-99) y  $\beta 7$  (103-105). Un monómero del dímero se muestra en azul y el otro en rojo; los enlaces disulfuro se muestran en blanco y los átomos de azufre en amarillo. **Figura tomada de Muller, 1997.** **B.** Representación esquemática del “nudo de Cisteína” típico de los factores de crecimiento. Los residuos de Cisteína involucrados se marcaron del I al VI y los puentes disulfuro se muestran con líneas punteadas. **Figura tomada de Lyer 2011.**

El VEGF-A se secreta en forma de homodímeros glicosilados anti-paralelos interconectados por dos enlaces disulfuro formados por los residuos Cys51 y Cys60<sup>99</sup>. Este ligando ejerce su función cuando se une en la superficie celular a

los receptores de la familia de la tirosina quinasa, proteínas transmembrana. Los miembros de esta familia de receptores corresponden a VEGFR-1 ó Flt-1 en ratones (de sus siglas en inglés, *fms-like tyrosine kinase*), VEGFR-2 (ó KDR de sus siglas en inglés; *Kinase insert Domain Receptor* en humanos y Flk1; *Fetal liver kinase-1*, en ratones) (Figura 5A). KDR es el principal mediador de los efectos mitogénicos, migratorios, anti-apoptóticos y angiogénicos del ligando VEGF-A sobre las células endoteliales. Flt-1 se une al VEGF con una afinidad 50 veces mayor que la KDR. Sin embargo, KDR domina la respuesta angiogénica<sup>100</sup>.



**Figura 5. Señalización del factor de crecimiento del endotelio vascular.**

**A.** Estructura representativa de los receptores de tirosina quinasa del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La familia de receptores del VEGF está representada por siete bucles similares a la inmunoglobulina en el dominio extracelular, que se unen al VEGF. Dos receptores VEGF forman un dímero para activar la autofosforilación de los residuos de tirosina en el dominio citoplasmático. Ig: inmunoglobulina; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; VEGFR: Receptor de VEGF, P: residuo de tirosina fosforilada. **B.** Diagrama de los sitios de unión del VEGF a los receptores KDR y Flt-1. El sitio que media la unión a KDR está compuesto por residuos de aminoácidos básicos (región 82-86). El sitio que media de unión al receptor Flt-1 está compuesto por residuos ácidos (región 63-67). **Figura creada en Biorender.com**

La dimerización del VEGF conduce a una estructura alargada con tres bucles superficiales que se agrupan en cada extremo de la molécula. Los bucles superficiales, LI al LIII, incluyen los aminoácidos desde 36 al 46, 61 al 68 y 84 al 87, respectivamente. El bucle LII, que incluye los residuos Asp63, Glu64 y Glu67 que media la unión del VEGF predominantemente a Flt-1, conforma una superficie cargada negativamente en el final de cada monómero (Figura 5B, abajo). En contraste, el bucle LIII que incluye los residuos Arg82, Lys84 y His86, que media predominantemente la unión al receptor KDR, conforma una superficie cargada positivamente en el otro extremo del monómero<sup>101, 97, 99</sup> (Figura 5B, arriba). Estudios de mutagénesis por sustitución con Alanina mostraron que el triple mutante de VEGF, R82A/K84A/H86A, disminuye 1000 veces la afinidad por el receptor KDR comparado con el VEGF no modificado. Dicho resultado está en correspondencia con una disminución de 20 veces en la potencia mitogénica *in vitro* del mutante R82A/K84A/H86A respecto al VEGF *wild type*<sup>102</sup>. Sin embargo el triple mutante D63A/E64A/E67A, con una unión 30 veces disminuida por el receptor Flt-1, posee una actividad mitogénica intacta<sup>102</sup>.

## 2.2 Caballos de Troya Moleculares para el paso de drogas a través de BHE

A pesar de su enorme potencial, el uso de biofármacos recombinantes para el tratamiento de trastornos neurológicos está lejos de ser plenamente explotado.

La barrera hematoencefálica representa el principal obstáculo para la administración de medicamentos en el sistema nervioso central (SNC). La BHE es una estructura microvascular compleja, formada por células endoteliales, los pericitos, la lámina basal abluminal, los astrocitos perivasculares y la microglía. En los capilares cerebrales, las células endoteliales microvasculares del cerebro (BMECs, de sus siglas en inglés, *Brain microvascular endothelial cell*) están conectadas por uniones estrechas, bloqueando el transporte paracelular de solutos de alta y baja masa molecular desde la sangre hasta el cerebro. Además, la falta de fenestraciones y la baja actividad pinocítica de las BMECs inhiben el paso transcelular de moléculas a través de la barrera<sup>103</sup>. Estas funciones fenotípicas únicas son el resultado de la interacción con pericitos residentes en el SNC, astrocitos, microglías y neuronas. Junto con las células endoteliales, estos tipos de células forman la llamada "unidad neurovascular"<sup>104</sup>. La BHE impide el acceso al cerebro del 98 % de las moléculas pequeñas y casi del 100 % de los fármacos terapéuticos de mayor tamaño<sup>105-107</sup>. Para los anticuerpos, se estima que sólo alrededor del 0.1- 0.2 % pasa del torrente sanguíneo al cerebro<sup>108</sup>.

Uno de los enfoques más prometedores para facilitar el paso de las moléculas terapéuticas de la circulación sistémica al cerebro es su unión física a una molécula lanzadera de BHE<sup>109</sup>. De acuerdo con este principio se han desarrollado

moléculas quiméricas o complejos terapéuticos para cruzar la BHE a través de diferentes mecanismos. Entre ellos, el transporte mediado por transportador<sup>110-111</sup>, transcitosis absorptiva<sup>112-115</sup>, transcitosis mediada por células<sup>116-117</sup> y la transcitosis mediada por receptores (RMT, de sus siglas en inglés, *receptor-mediated transcytosis*)<sup>18, 21, 118-120</sup>.

La RMT se ha utilizado con éxito para la administración no invasiva de fármacos al sistema nervioso central. El mecanismo implica la fusión de la molécula terapéutica a un anticuerpo o péptido que se une al receptor en el lado apical del BHE y activa la transcitosis. Por lo tanto, este anticuerpo, fragmento de anticuerpos o péptido funciona como una especie de “Caballo de Troya Molecular” (MTH, de sus siglas en inglés, *Molecular trojan horse*), permitiendo el paso de agentes terapéuticos a través del BHE<sup>18, 121</sup>

El proceso de transcitosis de péptidos y proteínas se describe como un movimiento vectorial de moléculas dentro de las vesículas endocíticas, desde el lado apical de la célula del endotelio vascular hacia el lado luminal donde se produce la exocitosis. Las células endoteliales de la BHE poseen dos categorías fundamentales de vesículas endocíticas: (i) las revestidas con Clatrina que están en mayor proporción, y permiten la mayoría de la endocitosis mediada por receptor, y (ii) las caveolas, que pueden mediar tanto la endocitosis absorptiva no

selectiva de proteínas extracelulares como el tráfico de algunos receptores de membrana, pero presentan baja ocurrencia en los capilares cerebrales<sup>122</sup>.

Idealmente, los MTH deben dirigirse a receptores con altos niveles de expresión en el lado apical de la vasculatura cerebral y que faciliten la transcitosis y no la endocitosis. Adicionalmente, la unión del MTH al receptor de la BHE debe tener alta afinidad (baja Kd) y mantenerse tras su fusión al biofármaco<sup>123</sup>. Existe varios receptores altamente expresados en las BMECs que media la RMT, incluyendo el receptor de insulina (IR), el receptor de Transferrina (TfR) y la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP1)<sup>121</sup>.

Las primeras aproximaciones para el paso de drogas al SNC se desarrollaron en la década de los 90 e incluyeron la conjugación de biofármacos o nanopartículas que contenían un anticuerpo monoclonal dirigido a receptores ubicados en la cara apical de las células del endotelio vascular de la BHE, como el receptor de Transferrina y el receptor de Insulina<sup>124-126, 18</sup>. Estudios realizados por Pardridge y col. con anticuerpo monoclonal (mAb) contra el receptor de la insulina, lograron traspasar la BHE con un péptido radiomarcado <sup>125</sup>I-Abeta<sub>1-40</sub><sup>127</sup>, así como su forma quimérica ratón/humano en cerebro de primates tras administración intravenosa<sup>128</sup>. Trabajos del año 2014 describen su posible empleo como terapia de reemplazo para el tratamiento de Mucopolysacaridosis tipo IIIA, al fusionar dicho mAb a la enzima lisosomal Sulfamidasa<sup>118</sup>. El sistema de transcitosis

mediada por receptor más estudiado es el del receptor de transferrina (TfR). Con estos mAb contra TfR, se ha logrado el paso de nanopartículas de Albumina de suero humana (HSA) para la liberación en cerebro de Loperamida, que de manera natural es incapaz de atravesar la BHE<sup>129, 126</sup>. En 2014 se evidenció *in vitro* e *in vivo* de que la unión monovalente de mAb contra TfR, facilita el transporte transcelular de anticuerpos contra el péptido  $\beta$ -Amiloide a través de la BHE, lo que disminuyó significativamente en los depósitos de amiloide<sup>130</sup>.

Investigaciones recientes han desarrollado TNFI biológicos que penetran la BHE tras administración sistémica, mediante la fusión del dominio extracelular del TNFR2 y anticuerpo monoclónico quimérico contra el receptor de Insulina humana (HIRmAb)<sup>131</sup> o anticuerpo monoclonal contra receptor de transferrina de ratón (TfRmAb)<sup>132</sup>. La incorporación de la proteína de fusión HIRmAb-TNFR2 en mono *Rhesus* es mayor del 3 % de la dosis inyectada, mientras que Etanercept, (dominio extracelular de TNFR2 fusionado a región Fc de IgG humana) no atraviesa la BHE *in vivo*<sup>133</sup>. La proteína de fusión TfRmAb-TNFR2 penetra el cerebro de ratones en cantidades terapéuticamente relevantes tras administración intravenosa, intraperitoneal y subcutánea<sup>134</sup>. Además, se ha observado el efecto protector de TfRmAb-TNFR2 en modelo animal de isquemia<sup>135</sup>, Parkinson<sup>136</sup> y enfermedad de Alzheimer<sup>137</sup>.

### 2.2.1 Angiopéptido-2

Aunque el LRP1 se ha considerado principalmente como un receptor que internaliza sus ligandos y los dirige a los lisosomas para su degradación proteolítica, estudios recientes han demostrado que el LRP1 también puede transportar varios ligandos transcelularmente a través de la BHE, incluido el péptido  $\beta$  amiloide<sup>19, 138</sup>, RAP<sup>139</sup>, activador tisular del plasminógeno<sup>140</sup> apoE2 y apoE3 libres de lípidos y lipidados, así como complejos de apoE2 y apoE3 con  $\beta$  amiloide<sup>20</sup>.

Con el objetivo de encontrar secuencias peptídicas que se unieran a LRP1 y mediaran el transporte en la BHE, Demeule y col. en 2008 alinearon secuencias de aminoácidos de ligandos conocidos de LRP1: Aprotinina, proteína precursora de  $\beta$ -Amiloide e inhibidores de proteasas con dominios Kunitz. Como resultado se obtuvo la identificación y el diseño de una familia de péptidos, denominada Angiopeps<sup>23</sup>. Posteriormente se comprobó que el transporte y la acumulación de Angiopéptido-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY) en las células endoteliales cerebrales pueden ser bloqueados por  $\alpha$ 2-macroglobulina, un ligando específico para LRP1, lo que indica que Angiopéptido-2 facilita la administración de fármacos dirigidos al cerebro a través de transcitosis mediada por LRP1<sup>21</sup>.

El Angiopéptido-2 es uno de los primeros péptidos reportados como MTH, posee una capacidad aumentada de transcitosis en la BHE, demostrada utilizando el

modelo *in vitro* y mediante perfusión cerebral *in situ* en ratones<sup>21, 23</sup>. Adicionalmente, este péptido ha sido utilizado como ligando en nano partículas funcionalizadas para la entrega eficaz de genes en cerebro<sup>24</sup>, conjugado con paclitaxel (GRN1005) para el tratamiento de metástasis cerebrales de cáncer de mama, ahora en ensayo clínico<sup>25</sup>. Los datos *in vivo* e *in vitro* muestran que la tasa de absorción del cerebro de GRN1005 es 86 veces mayor que paclitaxel.

La estrategia de funcionalización de nanopartículas con Angiopéptido-2 e IP10-EGFRvIIIscFv fue utilizada por Wang y col., en 2014, para lograr tanto la acumulación de las nanopartículas en el tejido cerebral después de la inyección intravenosa, como el reclutamiento de linfocitos T CD8+ activados en las células del glioblastoma<sup>141</sup>.



### 2.3 Tecnología *Phage display*

La tecnología *Phage display* fue descrita por primera vez en 1985 por George P. Smith (Premio Nobel de Química 2018)<sup>142</sup>, y se basa en dos aproximaciones:

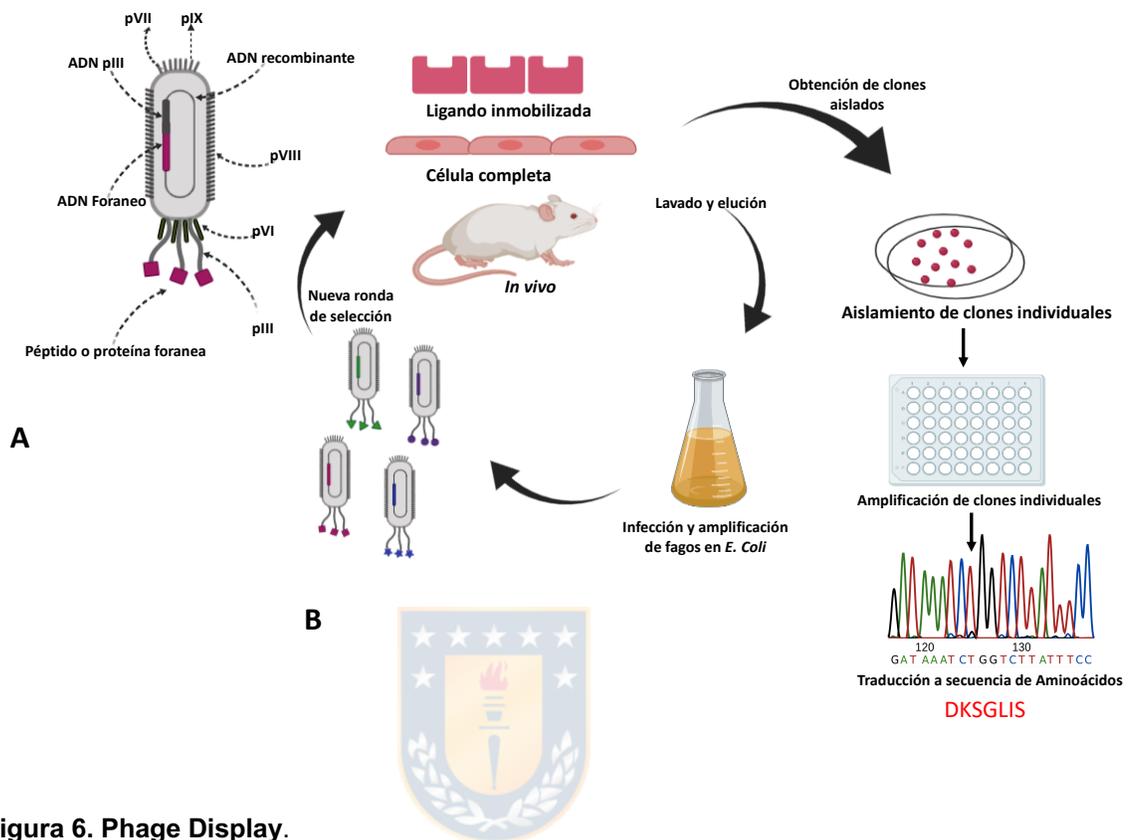
- La expresión de péptidos o polipéptidos foráneos fusionados a proteínas de la cápsida de bacteriófagos filamentosos.
- La selección y enriquecimiento de los fagos que presentan una actividad deseada.

El bacteriófago más utilizado en *Phage display* es el M13, que se caracteriza por tener un genoma circular de ADN de simple cadena de 6407 nucleótidos, el cual está protegido por una cápsida proteica cilíndrica. La cápsida consiste en aproximadamente 2700 copias de la proteína mayor pVIII, y sus extremos están cubiertos por tres a cinco copias de cada una de las proteínas menores pIII, pVI, pVII y pIX (Figura 6A). Las proteínas más utilizadas para la presentación de péptidos foráneos son pIII y pVIII. El uso de la proteína pIII permite la presentación de polipéptidos de hasta 43 aminoácidos, pero un bajo número de copias pueden exponerse. Mientras que la proteína pVIII generalmente es utilizada para la presentación multivalente de péptidos cortos (6 a 7 aminoácidos), para no alterar el ensamblaje de la cápsida del fago<sup>143</sup>.

La expresión de los péptidos foráneos se logra insertando el gen codificante del péptido en el gen codificante de una de las proteínas de la cápsida en un vector fagémido, que consiste en un plásmido al que se le ha incorporado el origen de replicación de un fago filamentoso (f1). Las bibliotecas más utilizadas son aquellas de péptidos aleatorios, cuya construcción se logra con el uso de oligonucleótidos sintéticos degenerados y su clonación en el genoma del fago<sup>144</sup>. El poder de esta tecnología radica en la producción de grandes y diversas bibliotecas que pueden presentar hasta  $10^{10}$  moléculas diferentes, y en la relación entre el fenotipo y el genotipo que existe en una misma partícula viral<sup>145-146</sup>.

Una vez construida la biblioteca de *Phage display*, se realiza el proceso de selección de aquellos fagos que presentan péptidos que se unen a una diana determinada o que tienen una actividad deseada. El proceso de selección es conocido como *Biopanning*<sup>147</sup> e involucra los siguientes pasos (Figura 6B): (1) Inmovilización de la molécula diana, que pueden incluir péptidos o proteínas, como anticuerpos, receptores, enzimas u objetivos aún más complejos, como líneas celulares o tejidos, en un animal completo. (2) Exposición de la biblioteca a la diana, (3) Eliminación de fagos no unidos, (4) Elución de los fagos unidos a la diana. Los fagos recuperados son amplificados tras infección en la bacteria *E. Coli* y utilizados para repetir el proceso de tres a seis veces. Luego, se secuencian el ADN de los fagos seleccionados para identificar los péptidos de unión a la diana<sup>147, 144-145</sup>.





**Figura 6. Phage Display.**

**A.** Representación esquemática del bacteriófago M13. **B.** Diagrama del proceso de *Biopanning*.  
Figura creada en Biorender.com.

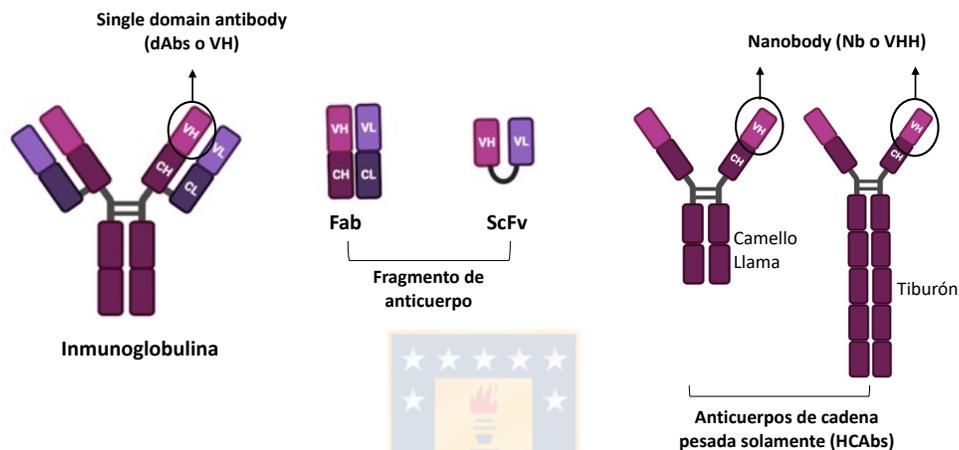
Desde su introducción, esta técnica ha revolucionado distintas áreas en el desarrollo de agentes terapéuticos debido a sus aplicaciones en los estudios de la interacción entre proteínas<sup>148-149</sup>, la determinación de especificidad del sustrato en la enzimología<sup>150</sup>, el desarrollo de moduladores de enzimas<sup>151-152</sup>, el descubrimiento de nuevos fármacos contra enfermedades infecciosas<sup>153</sup> y en la generación de anticuerpos específicos<sup>154</sup>. Además, esta técnica es un método barato y rápido para mapear el epítipo del antígeno que participa en la

interacción específica con el anticuerpo<sup>155-158</sup>. La identificación de epítomos ha sido esencial en el diagnóstico, la inmunoterapia y el desarrollo de vacunas<sup>159-160</sup>. Las bibliotecas de fagos pueden contener además, ADN que codifique proteínas con actividad biológica<sup>161-162</sup>, anticuerpos<sup>163</sup> o enzimas<sup>164</sup>. En otra aproximación, se han desarrollado vectores de fagos para suministrar genes específicos en células de mamíferos como terapia génica<sup>165</sup>.

#### 2.4.1 Presentación de anticuerpos sobre fagos filamentosos

Los anticuerpos se han convertido en excelentes candidatos para la investigación, el diagnóstico y las aplicaciones terapéuticas debido a sus características de alta afinidad y especificidad<sup>166-167</sup>. La mayoría de las aplicaciones se basan en las moléculas convencionales de inmunoglobulina G (IgG). Estos anticuerpos, producidos por los linfocitos B, constan de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas<sup>168</sup>. El peso molecular de una IgG es de aproximadamente 150 kDa, y es una molécula compleja formada por cadenas pesadas y ligeras, que juntas forman el sitio de unión al antígeno<sup>169</sup> (Figura 7). Sin embargo, algunas limitaciones de las IgG como su gran tamaño, su complicada estructura, la larga y costosa producción, su inestabilidad y la necesidad de expresión en células de mamífero<sup>170</sup>, crean numerosos problemas

en las aplicaciones prácticas. Un enfoque alternativo consiste en utilizar algunos fragmentos de anticuerpos, como los fragmentos de unión a antígeno (Fabs, *antigen-binding fragment*) y los fragmentos variables de cadena única (scFvs, *Single-chain variable fragment*).



**Figura 7. Representación esquemática de anticuerpos tradicionales, fragmentos de anticuerpos Vs nanobodies (Nb) y anticuerpos de dominio único (dAbs).**

Comparado las inmunoglobulinas tradicionales (150Kda) y los fragmentos de anticuerpos (*fragment antigen binding*, Fab-50KDa y *single-chain variable fragment*, ScFv-27KDa) el peso molecular de los Nanobodies (Nb) y *single domain antibodies* (dAbs)-14KDa es inferior. Los nanobodies (Nb) pueden derivarse de la cadena pesada (VHH) de los anticuerpos de cadena pesada solamente (*Heavy-chain only antibodies*-HCAbs) que ocurren naturalmente en camellos, llamas y tiburones. V-variable, C-constante, L-ligera, H-pesada. **Figura creada en Biorender.com.**

Con el rápido desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, los Fabs (50 kDa) y los scFvs (27 kDa) se han utilizado ampliamente como alternativas a los anticuerpos clásicos (Figura 7) ya que estos fragmentos de anticuerpos pueden mantener la especificidad hacia los antígenos. Los Fabs son la clase más antigua de fragmentos derivados de anticuerpos monoclonales, que extensamente

caracterizados<sup>171</sup>. Debido a su gran tamaño (50 kDa, aproximadamente), los Fabs dan lugar a grandes moléculas oligoméricas<sup>172</sup>. Los scFvs son los fragmentos intactos de unión a antígeno más pequeños que pueden derivarse de una molécula IgG convencional<sup>169</sup>. Son fragmentos recombinantes de unión a antígeno en los que las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas se combinan en un único polipéptido. El pequeño tamaño de los scFv permite la penetración en sitios inaccesibles para los anticuerpos convencionales de tamaño completo, como los tumores<sup>173</sup>. Sin embargo, los scFv tienden a formar oligómeros bivalentes o de mayor tamaño<sup>172</sup>. Además, la producción de estos fragmentos es difícil debido a su bajo rendimiento, escasa solubilidad y estabilidad<sup>174</sup>. Asimismo, su susceptibilidad a la temperatura y al pH<sup>175</sup> los hace inadecuados para su uso en el diagnóstico o como candidatos terapéuticos.

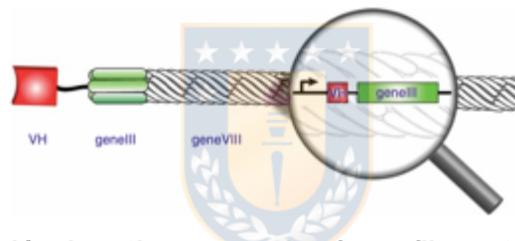
Además de las IgG clásicas, ciertos animales como los camélidos y los tiburones<sup>176-177</sup>, son capaces de producir un tipo único de anticuerpo que carece naturalmente de cadenas ligeras, denominado anticuerpos de cadena pesada solamente (HCAbs, *heavy chain-only antibodies*) (Figura 7). Los sitios de unión al antígeno de los HCAbs están compuestos por dos únicos dominios variables, denominados dominio variable de cadena pesada del anticuerpo de cadena pesada solamente (VHH)<sup>169</sup>. Los VHH se distinguen de las IgG convencionales y de varios derivados de las IgG por su pequeño tamaño molecular (14kDa)<sup>178</sup> por

lo que también se conoce como *Nanobody* (Nbs). Los Nbs son los fragmentos de unión a antígeno más pequeños y completamente funcionales que se conocen<sup>178</sup>. En 1989 Ward, Winter y cols. reportaron un fragmento de anticuerpo formado solamente por un dominio variable pesado (VH) que es capaz de plegarse independientemente y reconocer antígenos con alta afinidad<sup>179</sup>. Estos dominios VH de 12-15 kDa fueron nombrados anticuerpos de dominio único (sdAbs, de sus siglas en inglés, *Single domain antibodies*) (Figura 7), ya que son los fragmentos de anticuerpos de menor talla que mantienen la actividad de unión a antígenos. Aunque la superficie de unión en estos fragmentos contiene solamente 3 regiones hipervariables (CDRs, de sus siglas en inglés, *complementarity-determinant region*) en comparación con los 6 CDRs que contienen los fragmentos de tipo Fab y scFv, estos tienen afinidades comparables con los fragmentos clásicos<sup>180</sup>.

Debido a su pequeño tamaño y a su naturaleza de dominio único, los dAbs y Nbs son entidades ideales para la investigación básica, el diagnóstico y las aplicaciones terapéuticas. Estos fragmentos monoméricos de unión a antígenos presenta varias características especiales en términos de su alta estabilidad térmica y conformacional<sup>181</sup>, alta solubilidad acuosa, producción sencilla en microorganismos<sup>174</sup>, resistencia al pH ácido y alcalino<sup>182</sup>, excelente afinidad y especificidad<sup>178</sup>, facilidad de fabricación<sup>172</sup> y baja inmunogenicidad. Además, los

dAbs y Nbs presentan una distribución corporal superior, una penetración en los tejidos y una tasa de eliminación de sangre más rápida<sup>174</sup>.

La generación de anticuerpos monoclonales completos de origen humano estuvo estrechamente vinculada al desarrollo de la tecnología de *Phage display*. George Smith describió por primera vez la visualización de fagos en 1985<sup>142</sup>, pero inicialmente la técnica se limitaba a la selección de péptidos. Sin embargo, posteriormente se demostró que los fragmentos de anticuerpos podían ser mostrados con éxito en fagos<sup>183</sup>.



**Figura 8. Presentación de anticuerpos sobre fagos filamentosos.**

El fragmento de anticuerpo (cadena pesada variable, VH) en rojo, es presentada fusionada a la proteína pIII (verde) del bacteriófago. Ambas proteínas están codificadas por el ADN fagémico (magnificado) y expresadas bajo el mismo promotor. Figura tomada de <sup>184</sup>

La pequeña talla de Nd y dAbs, así como su compacto plegamiento unido a elevados niveles de expresión en bacterias y levaduras hacen a estas moléculas atractivos marcos para el diseño de bibliotecas combinatorias. Aunque se han descrito varios formatos de presentación, el formato más común para la presentación de fragmentos de anticuerpos en fagos es la fusión genética de

cadenas variables con la región terminal del gen de la proteína pIII del fago  
(Figura 8)<sup>184</sup>.



### III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

“La modificación de un dominio que inhibe la actividad citotóxica de TNF $\alpha$ , por adición de un ligando del receptor LRP1, permite su transcitosis en células del endotelio vascular de cerebro”

#### 3.2 Objetivos

##### Objetivo general:

Desarrollar y caracterizar un biofármaco de administración sistémica con actividad bloqueadora de TNF $\alpha$  en el sistema nervioso central.

##### Objetivos específicos:

- 1 Diseñar y obtener moléculas bloqueadoras de TNF $\alpha$  que atraviesen la BHE mediante transcitosis.
- 2 Evaluar que las moléculas diseñadas puedan unirse y bloquear al TNF $\alpha$  en estudios *in vitro*.
- 3 Evaluar que las moléculas diseñadas atraviesan modelo *in vitro* de BHE.

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Cepas bacterianas.

- *Escherichia coli*, cepa Top10 (Life Technologies, EE.UU.): F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK  $\lambda$ <sup>-</sup> rpsL(StrR) endA1 nupG. Cepa bacteriana utilizada para la amplificación de plásmidos.
- *Escherichia coli*, cepa TG1 (Lucigen, EE.UU.): [F' traD36 proAB lacIqZ  $\Delta$ M15] supE thi-1  $\Delta$ (lac-proAB)  $\Delta$ (mcrB-hsdSM)5(rK-mK-). Cepa bacteriana utilizada para la amplificación y titulación de fagos.

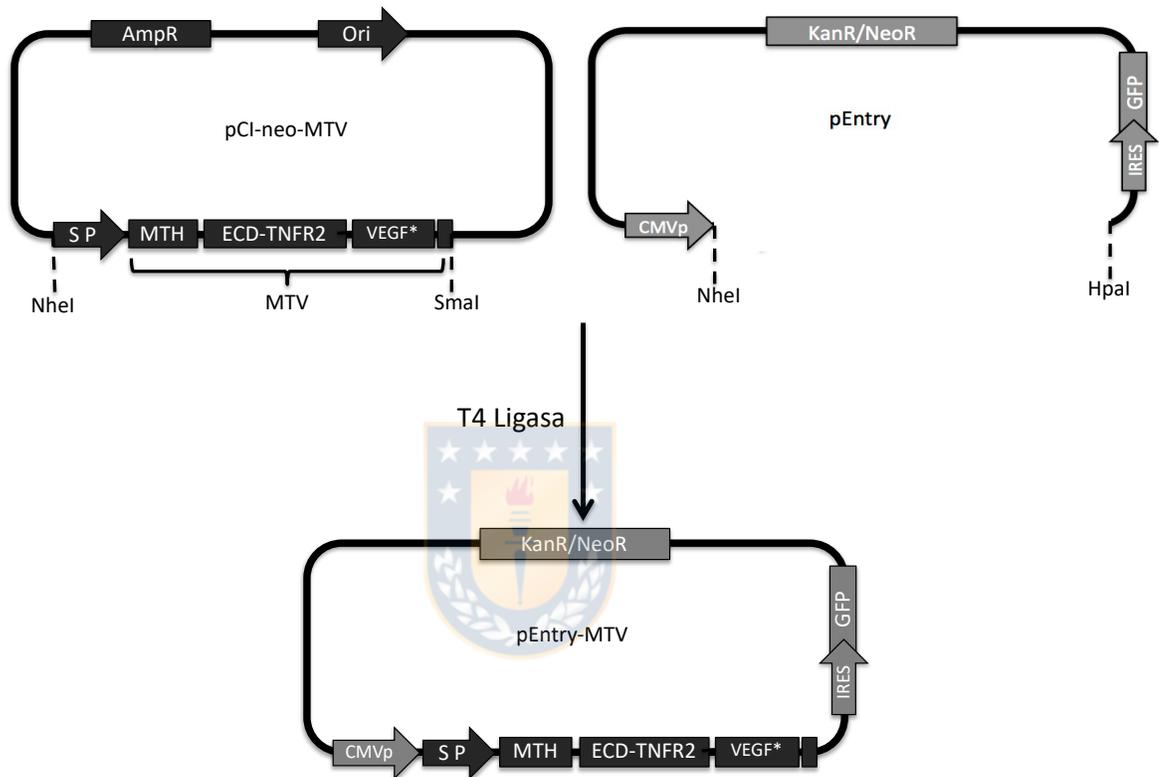
#### 4.1.2 Plásmidos.

- pCI-neo-MTV: La secuencia de ADN codificadora para la proteína MTV fue provista por la compañía GeneScript (<https://www.genscript.com/>) en el vector de expresión pCI-neo. El vector de expresión pCI-neo contiene la región promotora del citomegalovirus humano (CMVp) para promover la expresión constitutiva de las inserciones de ADN clonado en las células de mamíferos. Posee el gen de la neomicina fosfotransferasa, un marcador de selección para las células de mamíferos. Este vector puede utilizarse para la expresión

transitoria o para la expresión estable mediante la selección de células transfectadas con el antibiótico G-418. El origen de replicación en bacterias, Ori, permite su amplificación en *E. coli*, así como la selección de clones debido a la presencia de región codificadora para Beta-Lactamasa, que le confiere resistencia a Ampicilina.

- pEntry-FSH<sup>185</sup>: Vector de expresión pEntry-FSH comprende una unidad transcripcional bicistrónica basada en el gen de la Hormona folículo estimulante humana (hscFSH, de sus siglas en inglés, *Follicle stimulating hormone*) y una secuencia IRES (de sus siglas en inglés, *Internal ribosome entry site*), seguida de un gen que codifica la proteína GFP (de sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*). Esta disposición permite la selección de los clones mejor productores en base a la intensidad de la fluorescencia de las células. La región codificadora de la proteína de interés está bajo el promotor CMVp. Adicionalmente posee el gen de la neomicina fosfotransferasa, que permite la selección de células transfectadas con el antibiótico G-418.
- pEntry-MTV: El segmento de ADN para la expresión de FSH se eliminó del vector pEntry por digestión con enzimas de restricción *NheI/HpaI* (Figura 9). La secuencia de ADN para la expresión de la proteína quimérica se extrajo del vector pCI-neo-MTV por restricción enzimática con *NheI/SmaI* y fue

clonada en el vector pEntry obteniéndose el vector pEntry-MTV, que permite la expresión en células superiores y selección de clones en base a la intensidad de la fluorescencia.



**Figura 9. Estrategia de construcción del vector de expresión pEntry-MTV.**

El segmento de ADN que codifica para la expresión de la proteína MTV fue extraído del vector pCI-Neo-MTV por restricción enzimática e insertado en el vector pEntry. La secuencia de ADN codificadora para la proteína quimérica MTV contiene: un dominio MTH (*Molecular trojan horse*), el dominio extracelular del TNFR2 (ECD-TNFR2), el dominio de dimerización de VEGF (VEGF\*) y una cola con 6 Histidinas. A la secuencia la precede un péptido señal (SP) y están bajo el promotor de Citomegalovirus (CMVp).

#### 4.1.3 Bacteriófagos y fagémidos

- Fago auxiliador KM13<sup>186</sup>. El fago KM13 es un fago auxiliador obtenido por modificación del fago fd-K108 que conlleva a la inserción de una secuencia de aminoácidos (PAGLSEGSTIEGRGAHE) que comprende varios sitios proteolíticos insertados en la región flexible rica en glicina entre los dominios D2 y D3 de la proteína pIII del fago. Esto hace que el corte proteolítico rinda fago no infectivo. El fago auxiliador proporciona todas las funciones del bacteriófago necesarias para la síntesis del ADN circular de simple cadena y para el ensamblaje de nuevas partículas de fagos que presentan proteínas híbridas.
- Biblioteca de fago distribuida por *Source BioScience*. La biblioteca presenta repertorio de anticuerpos de dominio único (*single domain antibodies*; dAbs) humanos, sobre la proteína pIII, en formato fagémido pR2 con una diversidad de  $3 \times 10^9$ . El repertorio se basa en un único marco VH humano (V3-23/D47) con diversidad introducida en el sitio de unión al antígeno. El repertorio ha sido diseñado para contener 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada, manteniendo al mismo tiempo buenas propiedades de unión al antígeno. El fagémido pR2 diseñado para *Phage display* es un derivado de pHEN1<sup>187</sup> y contiene en su secuencia un tag VSV (*Vesicular stomatitis virus*) y otro MYC río arriba del gen que codifica para la proteína pIII del fago. pR2 permite la expresión de la región VH fusionada

al extremo amino terminal de la proteína pIII del bacteriófago M13. El vector contiene la secuencia del gen de pIII precedida por la señal de secreción pelB bajo el control transcripcional del promotor lacZ. El fagémido contiene el origen de replicación f1 que permite su empaquetamiento en las partículas de fago que expresan péptidos foráneos.

#### 4.1.4 Medios de cultivo de bacteria.

Los componentes microbiológicos como Triptona, Extracto de levadura y Agar se compraron a Becton, Dickinson and Company (EE.UU.). Mientras que las sales y suplementos se adquirieron en las compañías Merck (Alemania) y Sigma (Alemania).

- Medio LB: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl.
- Medio LB Agar: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar.
- 2xYT: 16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl.
- Medio YTE/ Glucosa/ Agar: 15g/L de agar, 8 g/L NaCl, 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y Glucosa 4 %.
- Medio Mínimo M9 sólido: 12.8 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g/L NaCl, 15 g/L agar. Suplementar con 5 mL/L de Glucosa 2 M, 1 mL/L de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 1 mL/L de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M, 1 mL/L de Vitamina B1 (1 mg/mL).

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados de 20 a 30 min a 121°C en autoclave vertical.

#### 4.1.5 *Antibióticos.*

- Ampicilina (US Biological, EE.UU.).
- Carbenicilina (Sigma, Alemania).
- Kanamicina (Merck, Alemania).
- Tetraciclina (Sigma, EE.UU.).
- Estreptomicina (Merck, Alemania).
- G418 (Sigma, Alemania).
- Neomocin (Sigma, Alemania).



#### 4.1.6 *Líneas Celulares.*

- **L929**: fibroblastos de ratón (ATCC, CCL-1). Línea celular utilizada para realizar ensayos de citotoxicidad de TNF $\alpha$ .
- **CHO**: células tipo epitelial derivadas de ovario de hámster chino. (ATCC, CCL-61). Línea celular utilizada para la expresión de molécula recombinante, tras transfección con vector de expresión.
- **bEnd3**: Células endoteliales de microvasos de cerebro de ratón (ATCC, CRL-2299). Estas células en cultivo presentan características similares a las células del endotelio vascular de cerebro que forman parte de la BHE. Por tal motivo

se utilizaron en modelo *in vitro* de BHE y en los ensayos de inmunocitoquímica para evaluar trasncitosis y endocitosis, respectivamente.

- **ECV304:** Inicialmente identificada como una línea celular endotelial de la vena umbilical humana (ATCC, CRL-1998) y luego demostrado que exhibe características fenotípicas similares a las de la línea celular del cáncer de vejiga humana, se utiliza para estudios de BHE debido a su capacidad de generar uniones estrechas. Poseen además una aumentada y reproducible actividad angiogénica *in vitro*. Línea celular utilizada para ensayos de cierre de la herida en la evaluación de la actividad angiogénica de la proteína recombinante, MTV.



#### 4.1.7 *Reactivos y soluciones de cultivo celular.*

- Medio RPMI-1640 (Biological Industries, Israel).
- DMEN High Glucose (Biological Industries, Israel).
- Medio Optimen (GIBCO, Thermo Scientific, EE.UU.).
- Medio M-199 (Biological Industries, Israel).
- Suero Fetal Bovino (FBS) (Biological Industries, Israel).
- Medio de crecimiento células CHO-K1 y L929: RPMI-1640 suplementado con 10 (v/v) suero fetal bovino.
- Medio de crecimiento células ECV304 y bEnd3: DMEN suplementado con 10 % (v/v) suero fetal bovino.

- Medio de congelación: RPMI-1640 ó DMEN suplementado con 40 % (v/v) de suero fetal bovino y 10 % (v/v) DMSO.
- Tampón fosfato salino (PBS): 137 mM NaCl (Merck, Alemania), 2.7 mM KCl (Merck, Alemania), 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Alemania), 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Alemania).
- Tripsina (Sigma, EE.UU.)-EDTA 0.25 % (p/v).
- Azul de Tripán: 5 g/L Azul de Tripán (Sigma, EE.UU.), 8.5 g/L NaCl (Merck, Alemania).
- Actinomicina D (Merck, Alemania).
- Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Thermo Scientific, EE.UU.).
- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Life Technologies, EE.UU.).
- Colágeno tipo I de cola de rata (Sigma, EE.UU.)

Todos los medios de cultivo se prepararon según instrucciones del fabricante y esterilizados por filtración con membrana de 0.2 µm.

#### 4.1.8 Proteínas.

- Endonucleasas de restricción y enzimas de modificación: Las endonucleasas de restricción y las enzimas de modificación (T4 Ligasa, Fosfatasa Antártica, PNGasaF y ADN Polimerasas) utilizadas en este trabajo se compraron a New

England Biolabs (Inglaterra) y se utilizaron según las recomendaciones del fabricante.

- Citoquina TNF $\alpha$  humano recombinante: Producida en laboratorio biofármacos recombinantes, UdeC <sup>82</sup>.
- Factor de crecimiento del endotelio vascular recombinante humano (hrVEGF). Producido en laboratorio biofármacos recombinantes, UdeC <sup>188</sup>.
- Anticuerpo monoclonal anti-poli histidina: Producido en ratón (BioLegend, EE.UU.).
- Anticuerpo contra IgG de ratón conjugado a Alexa-Fluor 680 (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.).
- Anticuerpo contra IgG de ratón conjugado a Alexa-Fluor 790 (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.).
- Anticuerpo contra IgG humana conjugado a Alexa-Fluor 790 (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.).
- Etanercept (Enbrel<sup>®</sup>, Pfizer): Etanercept es una proteína quimérica generada por la fusión del dominio extracelular del receptor-2 del factor de necrosis tumoral humano (TNFR2/p75) y el dominio Fc de IgG1 humana.
- Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>, Roche): Anticuerpo monoclonal humanizado contra VEGF.

- LRP1 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein*) (Sigma-Aldrich, EE.UU.)
- Anticuerpo monoclonal anti-M13 producido en ratón (GE, Suecia).
- Anticuerpo monoclonal anti-M13 producido en ratón conjugado a HRP (GE, Suecia).
- Anticuerpo monoclonal anti-poli histidina producido en conejo (Abcam, EE.UU.).
- Anticuerpo monoclonal anti IgG humano producido en cabra, conjugado a Alexa fluor 488nm (INVITROGEN, Thermo Scientific, EE.UU.)
- Anticuerpo monoclonal anti conejo producido en cabra, conjugado a Alexa fluor 546nm (INVITROGEN, Thermo Scientific, EE.UU.).
- Anticuerpo monoclonal anti ratón producido en cabra, conjugado a Alexa fluor 488nm (Abcam, EE.UU.).
- Conjugado Phalloidin-iFluor 488nm (Abcam, EE.UU.).
- Conjugado Phalloidin iFuor-594nm (Abcam, EE.UU.).

#### **4.2 Animales de laboratorio**

Ratones c57bl/6 de 8 semanas, hembras 25g a 30g, machos de 28 a 30 g de peso.

#### **4.3 Reactivos y soluciones generales.**

#### *4.2.1 Soluciones para extracción y purificación de ADN plasmídico.*

- Solución I: 50 mM Glucosa (Merck, Alemania), 25 mM Tris-Cl pH 8.0 (SIGMA, EE.UU.), 10 mM EDTA pH 8.0 (Calbiochem, Alemania), 0.1 mg/mL RNasa A (Macherey - Nagel, Alemania).
- Solución II: 0.2 M NaOH (Merck, Alemania), 1 % (p/v) SDS (Merck, Alemania).
- Solución III: 5 M Acetato de potasio (Merck, Alemania), Acido acético glacial (Merck, Alemania).
- Cloroformo (Winkler, Chile), Isopropanol (Merck, Alemania), Etanol absoluto (Merck, Alemania).



#### *4.2.2 Soluciones para electroforesis de ADN.*

- Tampón TAE: 40 mM Tris (Calbiochem, Alemania), 1 mM EDTA (Calbiochem, Alemania), 20 mM ácido acético (Merck, Alemania).
- Tampón de carga ADN 6x: 30 % (v/v) Glicerol (Calbiochem, Alemania) y 0.25 % (p/v) Azul de bromofenol (Merck, Alemania).
- 1 % Bromuro de etidio en agua (Merck, Alemania).
- Agarosa (Lonza, EE.UU.).
- Marcador de peso molecular de ADN 1kb (New England BioLabs, Inglaterra).

#### *4.2.3 Soluciones para electroforesis de proteínas.*

- 30 % (p/v) Acrilamida (Merck, Alemania), 0.8 % (p/v) Bisacrilamida (Merck, Alemania).
- 1.5 M Tris-HCl (Calbiochem, Alemania), pH 8.8.
- 0.5 M Tris-HCl (Calbiochem, Alemania), pH 6.8.
- 10 % (p/v) SDS (Calbiochem, Alemania).
- 10 % (p/v) Persulfato de amonio (Calbiochem, Alemania).
- TEMED (Merck, Alemania).
- Tampón de corrida: 25 mM Tris-HCl (Calbiochem, Alemania), 192 mM Glicina (Calbiochem, Alemania), 0.1 % (p/v) SDS (Calbiochem, Alemania).
- Tampón de carga 6X con  $\beta$ -Mercaptoetanol (Condición denaturante y reductora): 10 % (p/v) SDS (Calbiochem, Alemania), 0.6 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma, Alemania), 0.012 % (p/v) azul de bromofenol (Sigma, EE.UU.), 0.35 M Tris (Calbiochem, Alemania), 30 % (v/v) glicerol (Calbiochem, Alemania).
- Tampón de carga 6X (Condición denaturante y no reductora): 10 % (p/v) SDS (Calbiochem, Alemania), 0.012 % (p/v) azul de bromofenol (Sigma, EE.UU.), 0.35 M Tris-Cl (Calbiochem, Alemania), 30 % (v/v) Glicerol (Calbiochem, Alemania).

- Tampón de carga 6X Condición nativa: 0.012 % (p/v) azul de bromofenol (Sigma, EE.UU.), 0.35 M Tris-Cl (Calbiochem, Alemania), 30 % (v/v) Glicerol (Calbiochem, Alemania).
- Patrón de peso molecular AccuRuler RGB Plus (MaestroGen, USA)
- Solución de tinción Azul de Coomassie: 0.25 % (p/v) Azul de Coomassie brillante R250 (Merck, Alemania), 10 % (v/v) ácido acético (Merck, Alemania), 45 % (v/v) Metanol (Merck, Alemania).
- Solución de destinción: 5 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) ácido acético.

#### 4.2.4 Soluciones para Western blot.

- Tampón de transferencia: 48 mM Tris (Calbiochem, Alemania), 39 mM Glicina (Calbiochem, Alemania), 0.037 % (p/v) SDS (Calbiochem, Alemania), 20 % (v/v) Metanol (Merck, Alemania).
- TBS: 3.0 g/L Tris, 8.0 g/L NaCl, pH 7.6.
- Solución de bloqueo: 5 % (p/v) leche descremada en TBS.
- TBS-T: TBS con 0.1 % (v/v) Tween-20 (Sigma, EE.UU.).
- Membrana Nitrocelulosa, Amersham Protran 0.2  $\mu$ m, 300 mm x 4 m (GE Healthcare Life Science, Alemania).

#### 4.2.5 Soluciones para cromatografía de afinidad a iones metálicos.

- NiSO<sub>4</sub> (Merck, Alemania) 200 mM.

- Imidazol (Merck, Alemania).
- Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Bio-Science, Suecia).
- Solución de descarga: 0.5 M NaCl (Merck, Alemania), 50mM EDTA (Calbiochem, Alemania), 50 mM Fosfato (Merck, Alemania).

#### 4.2.6 Soluciones para Selección por Phage Display.

- 20 % (p/v) PEG 8000 - 2.5 M NaCl.
- Tampón de recubrimiento: 2.93 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1.52 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
- Tampón Fosfato Salino (PBS): 137 mM NaCl (Merck, Alemania), 2.7 mM KCl (Merck, Alemania), 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Alemania), 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Alemania).
- Solución de bloqueo: Leche descremada 5 % (p/v) diluida en PBS.
- PBS-T: PBS con 0.1 % (v/v) Tween-20 (Sigma, EE.UU.).
- Tampón TBSC: 10 mM Tris (SIGMA, EE.UU.) pH 7.4, 137 mM NaCl (Merck, Alemania), 1 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck, Alemania).
- Solución de tripsina. Tripsina (SIGMA, EE.UU.) 10 mg/mL en tampón TBSC (stock de tripsina). Congelar en alícuotas a -20°C. Para el experimento, disolver solución stock hasta 0.1 mg/mL de tripsina en tampón TBSC (solución de tripsina).
- Tampón Fosfato de sodio 200 mM pH 7.2.

#### 4.2.7 Soluciones para Inmunoensayos.

- Tampón de recubrimiento: 2.93 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1.52 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
- Tampón Fosfato Salino (PBS): 137 mM NaCl (Merck, Alemania), 2.7 mM KCl (Merck, Alemania), 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Alemania), 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Alemania).
- PBS-T: PBS con 0.1 % (v/v) Tween-20 (Sigma, EE.UU.).
- Tampón sustrato (peroxidasa): 29.4 g/L Citrato trisódico dihidratado (Merck, Alemania), pH 4.5 ajustado con HCl.
- Solución de revelado: mezcla de 5 mg de OPD (o-Fenilendiamina) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), 12.5 mL de tampón sustrato, 5 µL de 30 % peróxido de hidrógeno (Merck, Alemania).
- Solución de parada: 2.5 M Ácido sulfúrico.

#### 4.2.8 Soluciones para inmunocitoquímica (ICC)

- Solución de lavado: PBS 1X.
- Solución de fijación de células: 4 % Paraformaldehído (SIGMA, EE.UU.) en PBS 1X.
- Solución de permeabilización: 0.25 % Tritón X-100 (SIGMA, EE.UU.) en PBS 1X.
- Solución de bloqueo: 2 % BSA (SIGMA, EE.UU.) en PBS 1X.

- Solución de lavado: PBS-Tween 0.2 % (SIGMA, EE.UU.).
- Medio de montaje con dapi (VECTASHIELD, EE.UU.).

#### 4.2.9 Kits comerciales.

- E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II (Omega Bio-Tek, EE.UU.), kit utilizado para purificar ADN plasmídico desde bacterias.
- E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega-Biotek, EE.UU.), kit utilizado para purificar ADN plasmídico desde gel de agarosa.
- E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega-Biotek, EE.UU.), kit utilizado para purificar productos de PCR o extraer bandas de ADN desde gel de agarosa.
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, EE.UU.), kit utilizado para la cuantificación de proteínas totales.
- Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS (NanoTemper Technologies, Alemania).

#### 4.4 Equipos.

- Agitador magnético con placa calefactora MSH-20A (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Agitador Orbital SHO-1D (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Bloque térmico MaXtable H10-Set (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Cabina de Flujo Laminar AVC-4D1 (ESCO Technologies, Inc., Singapur).

- Centrífuga Rotina 380 (Hettich, Alemania).
- Centrífuga refrigerada 3K20 (Sigma, Alemania).
- Centrífuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific, Alemania).
- Centrífuga Sorvall RC6 plus (Thermo Fisher Scientific, Alemania).
- Electroporador Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, EE.UU.).
- Lector de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek, EE.UU.).
- Equipo purificador de agua Maxima SC (ELGA, Bélgica).
- Equipo de Termoforesis Microescala Monolith NT.115 Pico (NanoTemper Technologies, Alemania).
- Equipo de Trasferencia semi-húmeda Trans-Blot SD Cell (Bio-Rad, EE.UU.).
- Equipo foto-documentador Odyssey (LI-COR Biosciences, USA).
- Fuente de poder PowerPac™ Basic (Bio-Rad, Singapur).
- Fuente de poder EV 202 (Consort, Bélgica).
- Incubador digital SWIG-50 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Incubador digital WIS-20 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Licor Odyssey® CLx. Sistema de imágenes infrarrojas (LI-COR, EE.UU.)
- Mezclador Vortex VM-10 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Microscopio de fluorescencia Fluid™ Cell imaging station (Life Technologies, EE.UU.).

- Microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX83 equipado con cámara ORCA-R (Olympus-lifescience, Japón).
- Sistema de Cromatografía ÄKTA™ Start (GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia).
- Tanque de Nitrógeno 8207 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).
- Transiluminador UV WUV-L10 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter. EVOM<sup>2</sup> (World precision Instrument, EE.UU.).

## **4.5 Métodos.**



### *4.5.1 Técnicas generales de análisis y manipulación de ADN.*

#### Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

Se prepararon geles de agarosa al 0.8 % (p/v) en tampón TAE con bromuro de etidio a una concentración final de 0.02 %. A las muestras se les añadió tampón de carga, y se cargaron en el gel. Las corridas se realizaron a 100 V constantes por 30 min. Los geles se visualizaron en transiluminador UV.

#### Purificación de ADN plasmídico a escala mini-preparativa.

Para purificación del ADN a escala mini-preparativa se inocularon colonias individuales de bacterias transformadas con plásmidos en tubos de vidrio

conteniendo 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Los tubos se incubaron a 37°C con agitación durante 16 h. Los cultivos se centrifugaron a 8000 g por 5 min, se eliminó el sobrenadante por inversión y el *pellet* de bacterias se resuspendió en 100 µL de solución I. Luego, a cada tubo se adicionó 100 µL de solución II, se mezcló por inversión 6-10 veces y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A cada muestra se adicionó 100 µL de solución III, se mezcló por inversión y se incubó 15 min en hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se añadió 240 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 g por 15 min. El sobrenadante fue aspirado y se dejó secar el precipitado 5 min a temperatura ambiente. Cada muestra de ADN se resuspendió en 20 µL de agua. La presencia de ADN se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### Purificación de ADN desde gel de agarosa.

Para la extracción del ADN a partir de gel de agarosa se utilizó el kit comercial E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega-Biotek). Se procedió según las instrucciones del fabricante.

#### Digestión analítica de ADN plasmídico con enzimas de restricción.

Con el objetivo de corroborar la identidad de plásmidos, se procedió a realizar chequeos de restricción. Para esto se prepararon reacciones en un volumen de 20  $\mu$ L que contenían entre 0.5 y 1  $\mu$ g de ADN, enzima de restricción a razón de 5U de enzima por cada 1 $\mu$ g de ADN y el tampón correspondiente. Las reacciones de digestión se incubaron por 2 h a 37°C (o temperatura indicada por el fabricante). El resultado se analizó mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa.

#### Ligación de fragmentos de ADN.

Las ligaciones se llevaron a cabo usando 2X Rapid Ligation Buffer (Promega) y enzima T4 ligase (New England Biolabs). En todas las reacciones de ligación se emplearon 100 ng de vector y se probaron proporciones banda: vector (3:1, 5:1). La cantidad de banda en cada reacción se calculó según la guía de protocolos de NEB (1998).

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{talla (en kb) de la banda}}{\text{talla (en kb) del vector}} \times \text{proporción banda/vector} = \text{ng de banda}$$

Las ligaciones se realizaron en volumen final de 10  $\mu$ L a temperatura ambiente durante 1 h.

### Preparación de bacterias quimiocompetentes y transformación con vector plasmídico.

Para la transformación de las cepas bacterianas se prepararon bacterias quimiocompetentes y se transformaron mediante *shock* térmico con los plásmidos correspondientes. Para esto inoculó una colonia aislada de las bacterias a transformar en 20 mL de medio LB suplementado con antibiótico correspondiente, y se cultivó hasta alcanzar  $DO_{600nm}$  de 0.6. Por cada reacción de transformación, se traspasó 1.5 mL de cultivo a un microtubo estéril y frío, y se centrifugó a 4000 g por 5 min. El sobrenadante se eliminó, y las bacterias se resuspendieron en 250  $\mu$ L de 0.1 M  $CaCl_2$  (Merck, Alemania) frío. Se centrifugó a 4000 g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 50  $\mu$ L de 0.1 M  $CaCl_2$ . Para la transformación, se añadió 1-5  $\mu$ L de plásmido a cada reacción y se incubó en hielo por 30 min. Se dio un golpe de calor incubando a 42°C por 1min, y luego, se incubó en hielo por 5 min. Para la recuperación bacteriana, se añadió 450  $\mu$ L de medio LB y se incubó 1 h a 37°C. Finalmente, se realizó la siembra en medio LB agar suplementado con antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 30°C o 37°C dependiendo de la cepa bacteriana utilizada durante toda la noche para la obtención de colonias aisladas.

#### 4.5.2 *Técnicas generales de análisis y manipulación de proteínas.*

### Precipitación de muestras de proteínas con ácido tricloroacético.

La muestra de proteínas a precipitar se traspasó a un microtubo, se añadió 0.1 volumen de 0.15 % (p/v) desoxicolato de sodio (Merck, Alemania), se agitó con vortex, y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se añadió 0.1 volumen de 76 % (p/v) ácido tricloroacético (Merck, Alemania) a cada muestra y se centrifugó a 12000 g durante 15 min. Luego, se eliminó el sobrenadante, se añadió un volumen de acetona fría y se centrifugó a 12000 g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante por aspiración y se dejó secar los tubos. Finalmente, se resuspendió la muestra en el volumen deseado de agua.

### Preparación de geles de poliacrilamida.

Se prepararon geles denaturantes de poliacrilamida al 12 % o 15 % de 1.0 mm de grosor para todos los análisis realizados. Los geles para electroforesis de proteínas en condiciones denaturantes se prepararon de acuerdo con la Tabla 1. La preparación de geles para electroforesis de proteínas en condición nativa se realizó de igual modo, pero sin añadir SDS.

	Gel Separador		Gel
	12 %	15 %	Concentrador
Agua (mL)	4	2.8	2.6
Acrilamida 30 %-bisacrilamida 0.8 % (mL)	4.8	6	1.0
Tris-HCl 1.5 M pH 8.0 (mL)	3	3	-
Tris-HCl 0.5 M pH 6.5 (mL)	-	-	1.25
SDS 10 % (μL)	120	120	50
PSA 10 % (μL)	120	120	50
TEMED (μL)	12	12	10

**Tabla 1. Preparación de geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes.**

#### Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).

En el caso de electroforesis denaturante en condición reductora, a las muestras de proteínas se les añadió el volumen adecuado de tampón de carga 6X conteniendo β-mercaptoetanol y se incubó a 95°C por cinco min en placa térmica. En el caso de realizar electroforesis denaturante en condiciones no reductora o nativa, a las muestras sólo se les añadió tampón de carga 6X. Luego, se cargaron las muestras y patrón de peso molecular en los geles de poliacrilamida. Las corridas se realizaron a corriente constante de 25 mA por cada gel durante 60-75 min. A continuación, se procedió a realizar una tinción con Azul de Coomassie por 30 min en agitación. El resultado se digitalizó utilizando el equipo LI-COR ODYSSEY-Clx y el software Image Studio v3.1.4.

### Western Blot.

Para las muestras en las que fue necesario realizar la inmunodetección de proteínas, al finalizar la corrida de SDS-PAGE se procedió con el siguiente protocolo de Western Blot. Se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa utilizando una celda de transferencia semi-seca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad), a corriente constante correspondiente a cinco veces el área de membrana y a voltaje máximo de 25 V durante 30 min. Una vez terminada la transferencia, se realizó el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con leche descremada al 5 % (p/v) en TBS durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, la membrana se incubó con una solución de anticuerpo primario preparado en leche descremada al 2% (p/v) en TBS-T, durante 2 h. La membrana se lavó 3 veces por 10 min con TBS-T, y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo preparado en leche descremada al 2 % (p/v) en TBS-T. Tras 1 h de incubación, la membrana se lavó 3 veces y se analizó en el equipo ODYSSEY-Clx (LI-COR Biosciences, EE.UU.) para la detección de fluorescencia. La imagen se digitalizó utilizando el software Image Studio.

### Dot Blot

Se realizó la transferencia de proteínas desde solución a una membrana de nitrocelulosa utilizando dispositivo de microfiltración (Bio-Dot® Microfiltration Apparatus, BioRad) conectado a bomba de vacío. Una vez terminada la transferencia, se realizó el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con leche descremada al 5 % (p/v) en TBS durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, la membrana se incubó con una solución de anticuerpo primario preparado en leche descremada al 2% (p/v) en TBS-T, durante 2 h. La membrana se lavó 3 veces por 10 min con TBS-T, y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo preparado en leche descremada al 2 % (p/v) en TBS-T. Tras 1 h de incubación, la membrana se lavó 3 veces y se analizó en el equipo ODYSSEY-Clx (LI-COR Biosciences, EE.UU.) para la detección de fluorescencia. La imagen se digitalizó utilizando el software Image Studio.

#### Concentración y diafiltración de muestras de proteínas.

Muestras de proteínas purificadas fueron concentradas y diafiltradas utilizando tubos Amicon Ultra con membranas de tamaño de poro de 3 ó 10 kDa (Merck Millipore, Alemania). Para este procedimiento, la muestra de proteína se centrifuga de 25-40 min a 5000 g a 4°C hasta obtener 1 mL de concentrado de proteína. A continuación, se procedió a diafiltrar con PBS añadiendo 10 mL al tubo, y se realizaron centrifugaciones de 25-40 min a 5000 g, hasta obtener 1 mL

de concentrado de proteína, este procedimiento se repitió 3-8 veces. La muestra obtenida fue alicuotada y almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Cromatografía de afinidad a iones metálicos.

El medio recolectado fue prefiltrado por poro de  $0.7\ \mu\text{m}$ , fibra de vidrio hidrófila (Merck Millipore, EE.UU.) y ultrafiltrado con una membrana de PVDF  $0.2\ \mu\text{m}$  (Merck Millipore, EE.UU). Para alcanzar una concentración inicial de 5 mM de Imidazol, se añadió cantidad suficiente de solución de PBS 1X imidazol 300mM. El volumen total del cultivo se aplicó a una columna de 25 mL de Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Bio-Science, Suecia) cargada con  $\text{NiSO}_4$  y equilibrada con PBS1X, 5 mM de imidazol. La columna se lavó con PBS1X, Imidazol 40 mM, y la proteína recombinante MTV fue eluida con PBS1X, Imidazol 80 mM y PBS1X, Imidazol 250 mM. El eluato se mezcló, concentró e intercambió a PBS 1X como se describió anteriormente. La solución de proteína fue alicuotada y almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### Cuantificación de proteínas totales.

La cuantificación de proteínas totales se realizó utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Se utilizó para ello una curva de soluciones de Albúmina de suero bovina (BSA) de concentraciones conocidas,

preparadas según instrucciones del fabricante. La reacción se realizó por protocolo para microplacas.

#### Determinación de nivel de pureza de proteína por análisis densitométrico

La imagen digital del gel SDS-PAGE, con resolución de 300 dpi o superior en formato TIFF obtenida en equipo Licor Odyssey® CLx, se analizó con el programa ImageJ versión 2.1 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) para determinar la pureza de la proteína purificada mediante densitometría. La concentración de proteína purificada se obtuvo multiplicando el porcentaje de pureza por la concentración de proteínas totales en la muestra.

#### Identificación y caracterización de la glicosilación de proteína

La proteína purificada fue desglicosilada por la PNGasa F (New England Biolabs; Inglaterra). A 10 µg de la proteína purificada se le añadió 1 µL de *Glycoprotein Denaturing Buffer* 10X en un volumen final de 10 µL. La muestra se desnaturalizó calentándola a 90°C durante 10 min. Después de enfriar la muestra durante 5 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se completó con 2 µL de NP-40 10 % y se digirió con 1 µL de PNGasa F (500000 u/mL) durante toda la noche a 37°C. Las proteínas desglicosiladas y el control negativo, procesado de forma similar, pero sin incluir la PNGasa F, fueron analizadas por SDS-PAGE como se describió anteriormente.

#### 4.5.3 *Cultivo celular.*

##### Descongelación.

El proceso en general se llevó a cabo de forma rápida, se descongeló el ámpula que contenía las células en un baño de agua a 37°C. El contenido se llevó a un tubo con medio de cultivo correspondiente, se centrifugó a 1000 g durante 5 min en centrífuga de ángulo libre (Hettich, Alemania). El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en medio de crecimiento con pipeta serológica. Las células se sembraron en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro (Corning, EE.UU.) y se incubaron a 37°C, en presencia de CO<sub>2</sub> al 5 % y con una humedad relativa (HR) del 95 %.



##### Propagación.

A partir de un cultivo a un 95 % de confluencia celular, el medio se eliminó y las células se lavaron con PBS 1X. Se adicionó solución de tripsina y se incubó a 37°C entre 1 y 3 min. Las células se despegaron mecánicamente mediante golpes leves en el fondo de la placa o pipeteo. Se recuperó el medio con las células, se resuspendieron en medio de crecimiento y se centrifugó a 1000 g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en medio de crecimiento. Se realizó conteo celular y se determinó la cantidad a

sembrar según tipo de placa. Las células sembradas se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5 % y HR del 95 %.

### Congelación.

Una vez tripsinizadas, las células se resuspendieron en medio de congelación, previamente enfriado entre 2-4°C. La suspensión celular se dispensó a criotubos (Nalgene, EE.UU.), los cuales se mantuvieron a -80°C durante 24 h, y luego, se almacenaron en tanque de nitrógeno líquido.

### Generación de clones estables de células CHO productoras de proteína MTV

El vector pEntry-MTV linealizado con la enzima de restricción *AgeI* fue transfectado en células CHO utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Thermo Scientific, EE.UU.), con una proporción de 1 µg de ADN /1.5 µL de Lipofectamina según lo descrito por el fabricante. Transcurridas 24 h de la transfección, las células fueron tripsinizadas y sembradas en medio de selección (medio de crecimiento suplementado con 0.5 mg/mL de G418). Después de 20 días, con los cambios de medio correspondientes, los clones resistentes a G418 fueron observados en microscopio de fluorescencia y seleccionados los clones mejor productores en base a la fluorescencia de GFP. Para ello se realizó un *cell sorting* con citómetro de flujo BD FACSAria III. Los clones seleccionados fueron

expandidos y congelados hasta analizar su capacidad para producir la molécula de fusión.

#### Expresión de proteína recombinante, MTV

Para la producción de molécula de fusión se cultivó un clon de células CHO productoras de molécula de fusión en medio RPMI-1640 conteniendo 10 % FBS, a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Una vez que los cultivos alcanzaron entre 90-100 % de confluencia se procedió a lavarlos 3 veces con PBS1X, dejándolos en medio RPMI sin suero para cosechar la proteína de interés. Luego de 72 h, se procedió a colectar los medios de cultivo de todas las placas. La molécula de fusión se purificó mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos, ya que presenta una cola de poli-histidina.



#### Ensayo de citotoxicidad celular de TNF $\alpha$ en células L929.

Las células L929 se sembraron en una placa de 96 pocillos a densidad de  $3 \times 10^4$  células/pocillo y cultivadas en RPMI-1640 conteniendo 10 % FBS. Tras 24 h, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio RPMI-1640 suplementado con 1  $\mu$ g/mL de Actinomicina-D y concentraciones variables de rhTNF $\alpha$ . Luego de 20 h, se determinó viabilidad celular mediante ensayo MTT, para esto el medio de cada pocillo se reemplazó por 110  $\mu$ L de RPMI-1640 conteniendo 0.45 mg/mL de MTT. Después de 4 h de incubación a 37°C, se

removió el sobrenadante cuidadosamente y se añadió a cada pocillo 100 µL de isopropanol, se incubó 5 min a 37°C con agitación de 250 rpm. Se registró DO<sub>570nm</sub>. Los resultados se representaron como porcentaje de viabilidad celular calculado como:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{DO \text{ grupo experimental}}{DO \text{ grupo } 100 \% \text{ viabilidad}} \times 100$$

#### Ensayo de neutralización de la citotoxicidad de TNFα en células L929.

Las células L929 se sembraron en placa de 96 pocillos a densidad de 3×10<sup>4</sup> células/pocillo y cultivadas en RPMI-1640 conteniendo 10 % FBS. Tras 24 h, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio RPMI-1640 suplementado con 1 µg/mL de Actinomicina D, 25 ng/mL de rhTNFα y concentraciones variables de moléculas bloqueadoras de TNFα. Luego de 20 h, se determinó viabilidad celular mediante ensayo MTT como se describe en el acápite anterior.

#### Cultivo en sistema *transwell* y medición de resistencia trans-endotelial

Las células bEnd3 se sembraron en inserto semipermeable de 24 pocillos (poliéster, tamaño de poro de 0.4 µm, área 0.33 cm<sup>2</sup>, Corning Inc.) a una densidad celular entre 1 y 2 x 10<sup>4</sup> células/pocillo. El valor de la resistencia transendotelial (TEER) se monitoreó con voltímetro epitelial, EVOM<sup>2</sup> (*World precision Instrument*, EE.UU.). Para las mediciones eléctricas se utilizan dos electrodos,

uno de ellos colocado en el compartimento superior y el otro en el inferior separados por la monocapa celular. Se cambió el medio cada 3 días hasta alcanzar un valor de TEER constante.

El procedimiento de medición incluye la medición de la resistencia del blanco ( $R_{\text{Blanco}}$ ), inserto con medio, pero sin células y la medición de la resistencia a través de la capa de células ( $R_{\text{Total}}$ ). La resistencia específica ( $R_{\text{Específica}}$ ) en ohm, se puede obtener como:

$$R_{\text{Específica}} = R_{\text{Total}} - R_{\text{Blanco}}$$



Los valores de TEER son reportados en ohm x cm<sup>2</sup> y calculados como:

$$\text{TEER} = R_{\text{Específica}} (\text{ohm}) \times \text{ÁREA}(\text{cm}^2)$$

#### 4.5.4 *Actividad angiogénica*

##### Ensayo de la herida

El ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente<sup>189</sup>. Brevemente, las células ECV-304 se cultivaron en un medio M-199 complementado con un 10 % de FBS en una placa de 24 pozos hasta que se obtuvo un crecimiento en

monocapa 100 % confluyente. Después de dos lavados estériles con solución de PBS1X el medio fue reemplazado por el medio M-199 suplementado con 0.5 % de FBS. La monocapa se raspó con una punta de micropipeta estéril de 200  $\mu$ L y luego se lavó con PBS1X para remover las células no adheridas y para suavizar los bordes de la herida. Se añadió 1 mL de medio M-199 suplementado con 0.5 % de FBS (control negativo), medio de crecimiento suplementado con 10 ng/mL de hVEGF<sub>121</sub><sup>188</sup> (control positivo) o 10 ng/mL de proteína MTV (muestra de ensayo). Después de 12 h de incubación, se obtuvieron imágenes bajo iluminación de campo brillante utilizando un microscopio invertido DSU Olympus IX83 (magnificación 4X) para evaluar la migración celular al área de la herida. El área de la herida libre de células se midió utilizando el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

#### Ensayo *ex vivo* de anillos aórticos

Los cultivos de anillos aórticos de ratones se prepararon según el procedimiento de Nicosia y Ottinetti<sup>190</sup>. Ratones c57bl/6 de 8 semanas, fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub>. La aorta torácica fue cuidadosamente removida de un ratón de 6-8 semanas de edad e inmediatamente transferido a una placa de cultivo que contenía una solución estéril de PBS 1X fría. El tejido fibro-adiposo periaórtico fue cuidadosamente removido evitando dañar la pared aórtica. Los anillos

aórticos de un milímetro de largo fueron seccionados y enjuagados extensamente en cinco lavados consecutivos de PBS 1X. A continuación, los anillos se incrustaron individualmente en una placa de 96 pozos previamente recubierta con 30  $\mu$ L de gel de colágeno de cola de rata tipo I polimerizado (Sigma, EE.UU.) y se colocaron 50  $\mu$ L adicionales de solución de colágeno no gelificado (1.5 mg/mL) sobre cada anillo. Después de 15 min a 37°C para permitir la polimerización, se añadieron 100  $\mu$ L de medio Optimen con FBS 2.5 % (control negativo), medio de crecimiento suplementado con 10 ng/mL de hVEGF<sub>121</sub><sup>188</sup>(control positivo) o 10 ng/mL de proteína MTV (muestra de prueba). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora de CO<sub>2</sub> humidificada a 37 °C. El medio de cultivo se cambió cada tres días. Las imágenes se obtuvieron bajo una iluminación de campo brillante utilizando un microscopio invertido DSU Olympus IX83 equipado con una cámara de 35 mm, magnificación 4X. La angiogénesis se cuantificó contando los brotes angiogénicos según los criterios publicados<sup>190</sup>.

#### 4.5.5 Estudios de termoforesis microescala.

La técnica de Termoforesis microescala (MST, de sus siglas en inglés, *Microscale thermophoresis*) se utilizó para realizar estudios de interacciones proteína-proteína, y para la determinación de constantes de disociación (Kd) de estas interacciones. Todos los experimentos se realizaron en el equipo Monolith NT.115 Pico (NanoTemper Technologies, Alemania) y los insumos

correspondientes de la misma compañía. Se utilizó el kit de marcaje de proteínas *Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation* (unión covalente a aminas primarias). Además, se utilizaron los capilares *Monolith NT.115 Premium Capillaries* (NanoTemper Technologies, Germany). Los resultados se analizaron en el *software* M.O. Affinity Analysis v.2.3 (NanoTemper Technologies, Alemania) según los parámetros que se indiquen.

La marca fluorescente se adhirió covalentemente a la diana: rhTNF $\alpha$  o LRP1 (Sigma, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante para el acoplamiento de N-hidroxisuccinimida (NHS) del colorante fluorescente RED NT650. Se realizó un ensayo previo para probar la adsorción de la diana fluorescente-NT650 a las paredes capilares. Se estableció la siguiente condición para el ensayo MST:

- TNF $\alpha$ -NT650: Tampón de unión, PBS-Tween 0.05 %; concentración de la diana, 1nM; concentración del ligando, de 4 $\mu$ M a 0.000122  $\mu$ M, potencia de excitación 40 %; potencia MST, 40 %; temperatura, 25°C.
- LRP1-NT650: Tampón de unión, PBS-1M Urea-Tween 0.05 %; concentración de la diana, 20nM; concentración de ligando, de 12.8 $\mu$ M a 0.000391 $\mu$ M; potencia de excitación 20 %; potencia MST, 60 %; temperatura, 25°C.

Se prepararon las mezclas correspondientes de diana fluorescente-NT650 y proteína MTV o Etanercept en tampón de unión. Después de 10 min de

incubación, las muestras se cargaron en los capilares de vidrio premium, y se estableció una temperatura de 25°C para los experimentos de MST. Todas las mediciones se realizaron en tres experimentos independientes, y el análisis de los datos para la determinación de Kd se realizó con el software M.O. Affinity Analysis v.2.3 (NanoTemper Technologies, Alemania).

#### 4.5.6 *Diseño in silico de un dominio de dimerización VEGF mutado sin actividad angiogénica.*

Se realizaron mutaciones sistemáticas *in silico* en las secuencias de aminoácidos del VEGF utilizando el servidor BeAtMuSiC (<http://babylone.ulb.ac.be/beatmusic/query.php>). Se utilizó la estructura cristalina del VEGF en complejo con el dominio 2 del receptor FLTR-1 (PDB ID: 1FLT) y el receptor KDR (PDB ID: 3V2A). Los residuos de aminoácidos de la interfaz del VEGF con respecto al FLTR-1 y el receptor KDR se identificaron por una diferencia superior al 5 % en la accesibilidad a los disolventes del complejo respecto a la estructura libre. La energía libre de enlace relativa ( $\Delta\Delta G_{\text{binding}}$ ) fue calculada por BeAtMuSiC para cada uno de los mutantes del VEGF. Los valores de  $\Delta\Delta G_{\text{binding}} \geq 2.0$  kcal/mol se consideraron como un *hot spot*<sup>191</sup> y se incluyeron en el modelo final. La energía libre de enlaces relativa del mutante múltiple del VEGF, que incluye los residuos de la interfaz propuestos en este

estudio y residuos importantes en su actividad biológica, reportados anteriormente<sup>102</sup> fue calculada por Rosetta Flex ddG.

El modelo tridimensional de la proteína MTV se obtuvo con el protocolo Modeller v9.18 utilizando el patrón desarrollado para las proteínas recombinantes.

#### 4.5.7 *Inmunocitoquímica.*

Las células crecidas a confluencia mayor al 80 % en cámara Nunc Lab-Tek de 4 pocillos (Thermo Scientific, EE.UU.) o células crecidas en sistema *transwell*, se incubaron con medio de cultivo sin suero 2 h a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>, para limpiar los receptores. Luego se añadió la molécula a evaluar o solución de fago en medio de cultivo, permitiendo su internalización durante 2 h a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo las células fueron lavadas con medio de cultivo sin suero y fijadas en paraformaldehído al 4 % durante 20 min, a temperatura ambiente. Después de la fijación, las células fueron permeabilizadas con 0.25 % TritonX-100 en PBS 1X durante 10 min, seguido de un lavado con PBS 1X, y bloqueadas con 2 % de solución de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS 1X durante 30 min a temperatura ambiente. Luego las células fueron incubadas en una solución de anticuerpos primarios preparados en una solución de BSA al 2 %, durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: el anticuerpo

anti-poli His tag (Abcam, ab9108), anti-IgG humano, Alexa Fluor 488 (Thermofisher, A-11013) o anti-M13 producido en ratón (GE, Suecia).

Las células fueron lavadas con PBS-Tween 0.2 % (PBS-T), tres veces, e incubadas con anticuerpos secundarios y conjugado Phalloidin-iFluor para la tinción de filamentos de actina durante 1 h a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó: IgG anti-conejo, Alexa Fluor 546 (Thermofisher, A-11010) y el reactivo Phalloidin-iFluor 488 (Abcam, ab176753) o IgG Anti-mouse, Alexa fluor 488nm (Abcam, ab150113 ) y el reactivo Phalloidin-iFluor 594 (Abcam, ab176757) para la visualización del citoesqueleto. Después de tres lavados con PBS-T, los ácidos nucleicos fueron teñidos por el medio de montaje para la fluorescencia con DAPI (Vectashield, H-1200). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia invertida DSU Olympus IX83, equipado con una cámara ORCA-R, La cámara y el microscopio fueron controlados por el software Xcellence RT 1.1.

Imágenes compuestas (Z-stack) se obtuvieron en el Centro de Microscopia Avanzada, utilizando microscopio confocal espectral LSM780 NLO Zeiss con lentes objetivo de 63X.

#### *4.5.8 Phage Display.*

### Infección de bacterias con fago auxiliar.

Un cultivo de bacterias *E. coli* TG1 conteniendo o no fagémido se creció en medio líquido 2xYT suplementado con los antibióticos correspondientes hasta alcanzar  $DO_{600nm}$  entre 0.4 y 0.6. Se añadió el fago auxiliar KM13 a concentración final de  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias, ufc/mL y se incubó a 37°C por 1 h. Luego, los cultivos se centrifugaron a 2500 g y el pellet bacteriano se resuspendió en medio líquido 2xYT suplementado con antibióticos correspondientes. El cultivo se incubó por 20 h a 30°C para la producción de fagos.

### Purificación de fagos por precipitación con polietilenglicol (PEG).

Un cultivo en producción de fagos se centrifugó a 8000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se traspasó a tubos nuevos, se añadió 1/5 de volumen de solución 20 % (p/v) PEG 8000 - 2.5 M NaCl, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por al menos 1h. Las muestras fueron centrifugadas a 6000 g por 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en PBS 1X respetando la proporción de 500  $\mu$ L de PBS 1X por cada 50 mL de medio de cultivo procesado. Se traspasó la muestra a un microtubo y se centrifugó a 12000 g por 5 min. El sobrenadante conteniendo los fagos se traspasó a un nuevo microtubo. Las muestras de fagos se almacenan a -20°C (corto plazo), o se añade glicerol a concentración final de 10 % (v/v) y se mantienen a -80°C (largo plazo).

### Determinación del título de fagos.

La determinación del título de fagos se realizó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (ufc). Para esto, se prepararon diluciones seriadas de las muestras de fago desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-11}$  (factor de dilución 10) en un volumen final de 90  $\mu\text{L}$  de medio LB. A modo de control negativo se utiliza una muestra de medio LB sin fagos. A cada dilución se le añadieron 90  $\mu\text{L}$  de un cultivo de *E. coli* TG1 crecido hasta una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  entre 0.4 y 0.6, y se incubó por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Rápidamente, se sembraron 5  $\mu\text{L}$  de cada dilución en medio YTE/ Glucosa/ Agar suplementado con ampicilina o kanamicina según corresponda. Las placas se incubaron toda la noche a  $37^\circ\text{C}$ . El recuento de colonias se realizó en la última dilución en la que se encuentran colonias aisladas. El título de fago se determinó con la fórmula:

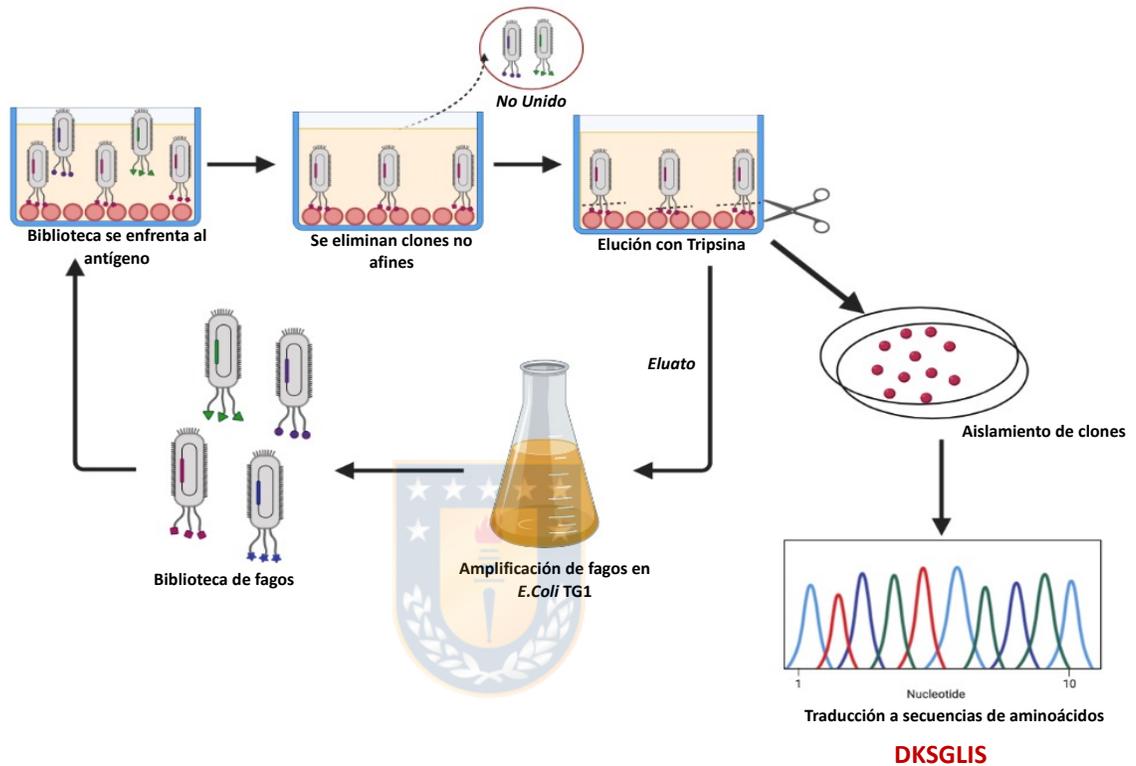
$$\text{Título } \left( \frac{\text{ufc}}{\mu\text{L}} \right) = \frac{2 \times \text{número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{5}$$

### Selección de clones contra antígeno inmovilizado (*biopanning*)

La selección de péptidos de unión al antígeno LRP1 (Sigma-Aldrich Cat. No. APREST86752) se realizó utilizando la biblioteca de anticuerpos de dominio único (dAbs) (Source Bioscience, Inglaterra) fusionados a la proteína pIII del fago

KM13. Un esquema general del procedimiento se muestra en la Figura 10. Se recubrieron 16 pocillos de placas High binding (Costar, EE.UU.) con 100  $\mu$ L de una solución de antígeno LRP1 a 10  $\mu$ g/mL en PBS Urea 1M, y se incubó en cámara húmeda a 4°C toda la noche. Se realizó el bloqueo de los pocillos con 200  $\mu$ L de 5 % (p/v) leche en PBS 1X y se incubó en cámara húmeda a 4°C toda la noche. La biblioteca conteniendo  $2 \times 10^{11}$  ufc en solución de bloqueo se enfrentó por 1h a pocillos recubiertos solo con solución de bloqueo, para eliminar los clones de fagos que se unen inespecíficamente a la placa. A continuación, se procedió a enfrentar la solución de fagos a los pocillos conteniendo la diana durante 1 h con agitación suave. El sobrenadante fue recuperado y se denominó No Unido (NU). Se realizaron 10 lavados de 10 min en agitación usando 200  $\mu$ L/pocillo de PBS-T, y 2 lavados con PBS 1X. Inmediatamente, se realizó la elución utilizando una solución de tripsina 0.1 g/L en PBS (100 $\mu$ L/pocillo) y se incubó por 1 h a 37°C con agitación suave. La solución de elución se recuperó y

se nombró Eluato. Ambas fracciones se titularon según se describió anteriormente.



**Figura 10. Proceso de selección de clones contra antígeno inmovilizado (biopanning).** El antígeno LRP1(círculos rojos) inmovilizado en placas de ELISA se enfrentó a la biblioteca de dABs. Tras recuperar la fracción No Unido, se realizaron lavados con PBS-T. La elución se realizó con una solución conteniendo tripsina 0.1 mg/mL. Los fagos recuperados se amplificaron, purificados, y utilizados para la siguiente ronda de selección. Tras varias rondas de selección los clones aislados fueron secuenciados y traducidos a secuencias de aminoácidos. **Figura creada en Biorender.com.**

La fracción de fagos Eluato fue amplificada, para esto se infectaron bacterias *E. coli* TG1 crecidas hasta una  $DO_{600nm}$  entre 0.4 y 0.6, y se incubó por 1h a 37°C. Se centrifugó a 3200 g durante 5 min y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio

2xYT. Se sembraron 166  $\mu\text{L}$ /placa en seis placas YTE/glucosa/agar suplementadas con ampicilina 100 g/L y glucosa al 4 % con rastrillo bacteriológico de vidrio. Se incubaron las placas a 37°C durante la noche. Las colonias se recuperaron de la superficie de la placa en 5 mL de medio y se adicionaron en 250 mL de medio 2xTY suplementado con 4 % de glucosa y 100  $\mu\text{g}$  /mL de ampicilina. Se crecieron a 37°C, 200 rpm hasta una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.5. Luego, se realizó la súper-infección con el fago auxiliador KM13 ( $10^{12}$  ufc) por 1h a 37°C, estático. Se centrifugó el cultivo, y las bacterias fueron resuspendidas en 500 mL de medio 2xTY suplementado con 0.1 % de glucosa, 100  $\mu\text{g}$ /mL de ampicilina y 50  $\mu\text{g}$ /mL de kanamicina y se cultivaron a 25°C con agitación de 200 rpm. Tras 20 h, se purificaron los fagos mediante precipitación con PEG y se determinó el título de fagos según se describió anteriormente. Este procedimiento, se repitió 4 veces utilizando los fagos amplificados de la ronda anterior como muestra de entrada.

#### Identificación de anticuerpos de dominio único (dAbs) de unión a la proteína diana.

Una vez que se identificó el enriquecimiento en una fracción de fagos por su capacidad de unión a la proteína diana, se procedió a aislar clones desde la fracción de eluato correspondiente. Para esto, bacterias *E. coli* TG1 se infectaron con el eluato de fagos correspondiente, las muestras se sembraron en placas de

medio YTE/ Glucosa/ Agar suplementado con 100 µg/mL ampicilina, y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, colonias individuales de bacterias transformadas con los fagémidos se propagaron en 10 mL de medio 2xTY suplementado con 4 % de glucosa y 100 µg/mL de ampicilina. Se realizó la purificación del fagémido correspondiente a cada clon usando el E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II (Omega Bio-Tek, EE.UU.). El ADN purificado se chequeó mediante electroforesis en gel de agarosa y su concentración se determinó mediante lectura de la  $DO_{260nm}$ . Se prepararon muestras de 50 µL a una concentración de 100 ng/mL, y se enviaron para su secuenciación a la empresa MacroGen (<https://dna.macrogen.com>, Corea del Sur). Para ello se utilizó el oligonucleótido 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGA- 3'<sup>184</sup> que se encuentra a 83 pb corriente arriba del gen que codifica las regiones VH en el fagémido pR2. Las secuencias obtenidas se analizaron usando el programa SnapGene Viewer versión 5.1.5, lo que permitió identificar las secuencias de aminoácidos correspondiente a los dAbs. El análisis inmunogenético de las regiones variables se realizó con las herramientas disponibles en el sitio IMGT/V-QUEST (<http://www.imgt.org>)<sup>192</sup>, pudiendo identificar las secuencias correspondientes a regiones variables (VH) y sus correspondientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y regiones marco (*framework*).

### Evaluación del reconocimiento de fagos portadores de dAbs contra la proteína diana.

Se recubrieron pocillos de placa *high binding* (Costar, Corning) con 100  $\mu$ L de la proteína diana a concentración 5-10  $\mu$ g/mL en tampón de recubrimiento, se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda. La solución de recubrimiento fue eliminada, se realizó un lavado con 200  $\mu$ L por pocillo de PBS 1X, y se bloquearon los pocillos con leche descremada 3 % (p/v) en PBS 1X (200  $\mu$ L/pocillo) durante 2 h a 37°C. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo, y se añadieron las muestras de fagos (100  $\mu$ L/pocillo) preparadas en PBS-T a una concentración de  $10^9$  ufc/mL. Se incubó a 37°C por 1 h, y se realizaron 3 lavados con PBS-T (200  $\mu$ L/pocillo). Se añadió 100  $\mu$ L/pocillo de anticuerpo anti-M13-HRP (GE, Suecia) a dilución 1:5000 y se incubó a 37°C por 1 h. Luego, se realizaron 4 lavados con PBS-T, se añadió solución de revelado (100  $\mu$ L/pocillo) y se incubó en oscuridad por 10-20 min. La reacción se detuvo por adición de ácido sulfúrico 2.5 M (50  $\mu$ L/pocillo) y se realizó la lectura de  $DO_{492nm}$ .

#### 4.5.9 *Análisis estadístico*

Los datos se representaron como la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, a menos que se especifique otra cosa. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas con un valor  $p < 0.05$ . Las variables continuas se compararon

usando la prueba t de Student, análisis de varianza (ANOVA-one way), prueba Kruskal Wallis, o prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La concentración media efectiva ( $EC_{50}$ ) se calculó tras el ajuste sigmoideal de la curva: % de viabilidad Vs log(concentración) y corresponde al valor de la concentración que genera el 50 % de protección celular. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism versión 5.0.

#### *4.5.10 Bioética y bioseguridad*

El trabajo con animales de laboratorio fue desarrollado por personal altamente calificado y siguió las recomendaciones de GUIDE and USE of laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Science National Research Council), los principios elaborados por el Consejo de organizaciones internacionales de ciencias médicas. Organización mundial de la salud (1985) y el texto “Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal”, publicado por CONICYT en 2009. Con fecha del 22 de Mayo de 2018 fue aprobado el proyecto por el Comité de ética y bioseguridad. Secretaría e investigación. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. ANEXO1

El manejo de residuos se realizó según los reglamentos de la Universidad de Concepción a través de MATPEL, respetando las cláusulas del Manual de Normas de Bioseguridad editado por CONICYT en 2008. Todo material microbiológico fue inactivado con hipoclorito de sodio al 10 %, mientras que los

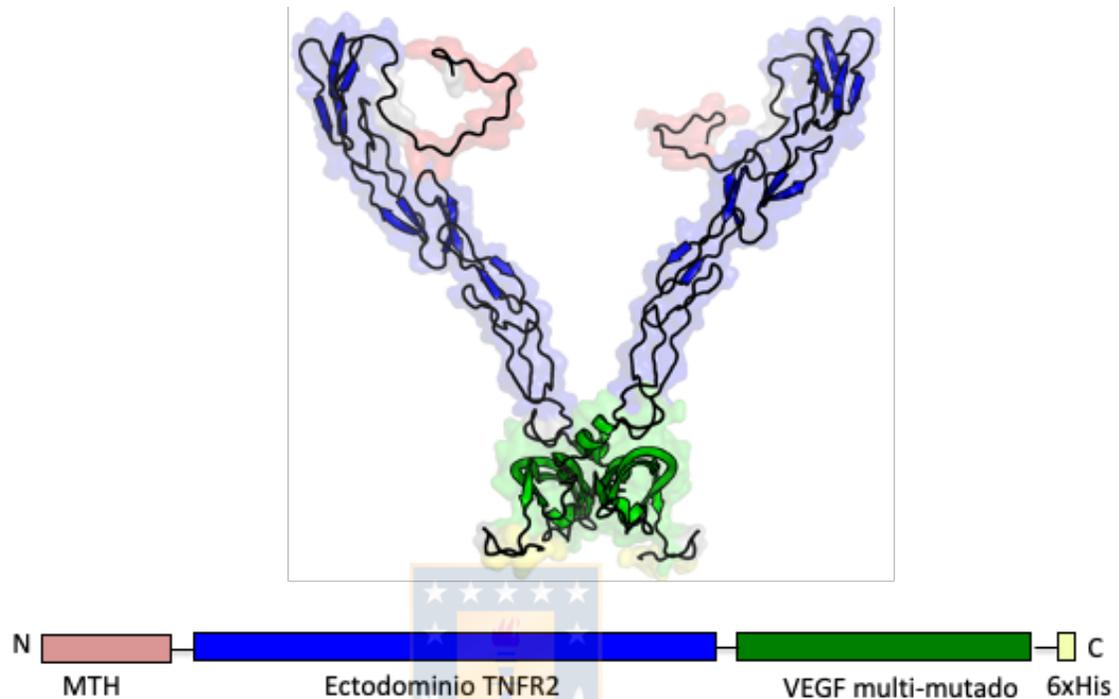
animales de experimentación sacrificados se congelaron y almacenará a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su entrega a MATPEL.



## V. RESULTADOS

### 5.1 Diseño, obtención y purificación de la proteína recombinante MTV.

Para obtener un nuevo inhibidor dimérico del TNF $\alpha$  con capacidad de administrarse sistémicamente, se fusionaron las secuencias nucleotídicas de tres moléculas diferentes para obtener una proteína recombinante. El orden desde el extremo amino al carboxilo terminal fue el siguiente: angiopéptido-2 como caballo de Troya para cruzar la BHE por medio de la transcitosis mediada por el LRP1<sup>21, 23</sup>, el dominio extracelular de TNFR2 como secuencia bloqueadora del TNF $\alpha$ <sup>34</sup> y un segmento de VEGF mutado como dominio de dimerización. La secuencia espaciadora SGGGG se utilizó entre cada dominio, para aportar flexibilidad sin modificar las funciones de los dominios<sup>193</sup>, además se incluyó una cola de poli-Histidina en el extremo carboxilo terminal para facilitar la inmunoidentificación y purificación de la proteína recombinante. Esta construcción se denominó MTV (Figura 11A).

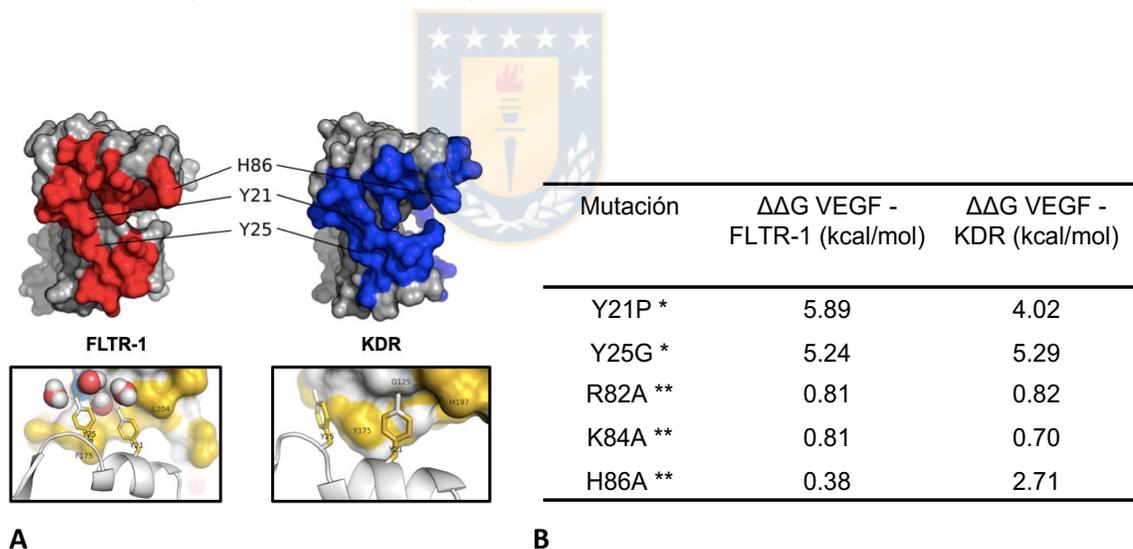


**Figura 11. Molécula recombinante MTV: MTH-TNFR2-VEGF.**

**A.** Modelo estructural de MTV obtenido mediante el software computacional Modeller v9.18. En el modelo la estructura está coloreada según la composición del dominio. MTH: “*Molecular trojan Horse*” para el paso en la BHE, que corresponde al Angiopeptido-2 (rosa). Ectodominio TNFR2: Dominio extracelular del TNFR2 (azúl); VEGF mutado: Dominio de dimerización de VEGF con mutaciones que impiden su actividad biológica (verde); 6XHis: Cola de polihistidina (amarillo).

Aunque las propiedades biológicas de los dos primeros dominios de MTV han sido bien establecidas <sup>21, 23, 84</sup>, el dominio VEGF tuvo que optimizarse de forma que sólo funcionara como dominio de dimerización sin efecto angiogénico. Anteriormente, se describió un dominio VEGF no funcional con mutaciones específicas (R82A, K84A, H86A)<sup>102</sup>. Para garantizar la ausencia de actividad angiogénica, se realizó análisis *in silico* de la secuencia del dominio VEGF, para

identificar mutaciones adicionales que disminuyan su unión con el receptor sin afectar su capacidad dimerizante. Se utilizaron mutaciones sistemáticas *in silico* para evaluar la interacción del VEGF con sus receptores FLTR-1 y KDR, se ubicaron los residuos de aminoácidos que se encuentran en la interfaz de los complejos, basándonos en una diferencia mayor del 5 % en accesibilidad del solvente entre el complejo y la estructura libre (Figura 12A). Se consideraron como *hot-spots* mutaciones sistemáticas en residuos que se encontraban en la interfaz del complejo con cada receptor y que provocan cambios en la energía libre de unión,  $\Delta G \geq 2.0$  kcal/mol, <sup>191</sup>.



**Figura 12. Diseño *in silico* del dominio de dimerización VEGF mutado.**

**A.** Los residuos de la interfaz del VEGF con respecto al receptor FLTR-1 y KDR se muestran en rojo y azul respectivamente. Se destacan los residuos de la interfaz mutada propuestos en este estudio (Y21, Y25) y el residuo H86 propuesto en Keyt et al. 1997. **B.** Energía libre de unión relativa calculada por BeAtMuSiC para los mutantes simples del VEGF. (\*) Mutantes propuestos por mutagenesis *in silico* (\*\*) Mutantes propuestos en Keyt et al. 1997.

Se identificaron, por el análisis *in silico* de la energía libre de enlace relativa, dos mutaciones, que no se habían reportado anteriormente, que afectan la unión VEGF con sus receptores, Y21P ( $\Delta G = 5.89$  kcal/mol; 4.02 kcal/mol) y Y25G ( $\Delta G = 5.24$  kcal/mol; 5.29 kcal/mol). La reducción en la energía libre de enlace indica que estas mutaciones, potencialmente disminuyen la unión del VEGF a ambos receptores, el FLTR-1 y el KDR. Igualmente se determinó la energía libre de unión relativa ( $\Delta G$ ) para las mutaciones del VEGF previamente reportadas, R82A, K84A y H86A<sup>102</sup>, involucradas en el reconocimiento de receptores y la actividad angiogénica (Figura 12B).

El aumento de más de 2.0 kcal/mol en la energía libre de enlaces relativa para el VEGF mutado (VEFG\*: Y21P/ Y25G/ R82A / K84A / H86A) respecto a la molécula nativa predice una disminución de la unión del ligando a ambos receptores y la atenuación de su actividad biológica (Tabla 2). La secuencia mutada del VEGF (VEFG\*: Y21P/ Y25G/ R82A / K84A / H86A) se consideró como un dominio de dimerización con actividad biológica disminuida y se incluyó en el diseño de la molécula recombinante.

Multi-mutant	Receptor	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
R82A/ K84A/ H86A	FLTR-1	0.317 $\pm$ 0.141
	KDR	1.737 $\pm$ 0.239
Y21P/ Y25G/ R82A/ K84A/ H86A	FLTR-1	5.611 $\pm$ 0.237
	KDR	6.779 $\pm$ 0.433

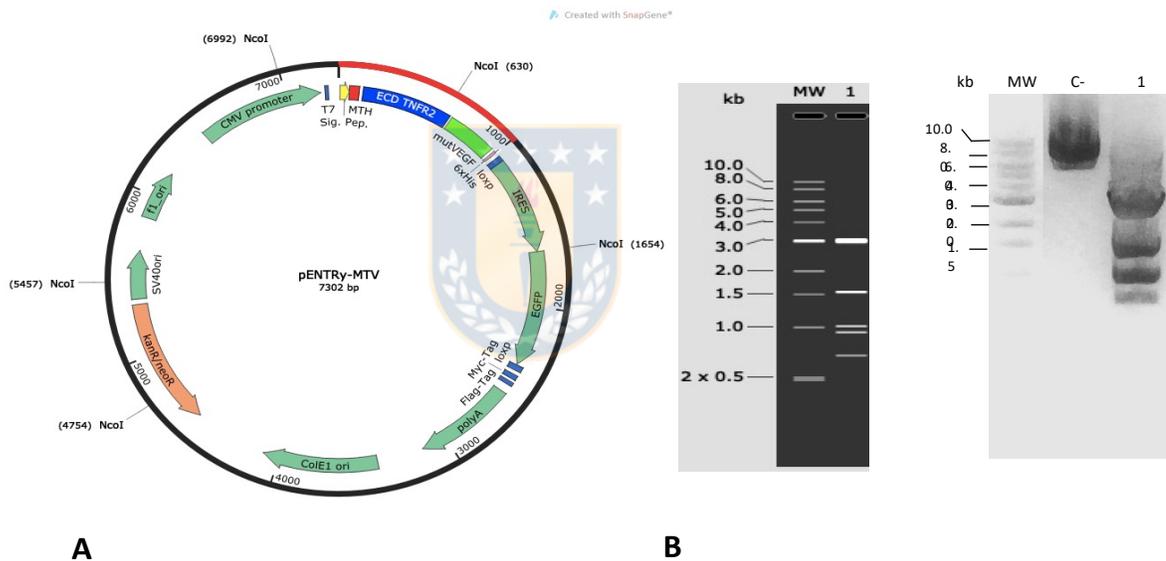
**Tabla 2. Energía libre de unión relativa de los dominios VEGF mutados a sus receptores FLTR-1 y KDR.**

VEGF mutante reportado por Keyt et al. 1997 (R82A/ K84A/ H86A) y el propuesto en este trabajo (Y21P/ Y25G/ R82A/ K84A/ H86A) calculada por Rosetta Flex.

### 5.1.1 Expresión y purificación de la proteína recombinante MTV

En base al diseño establecido anteriormente para la proteína recombinante, MTV, se envió la secuencia de ADN codificante para su síntesis y clonación en el vector de expresión pCI-neo a la empresa Genescript (<https://www.genscript.com/>). El vector resultante, pCI-neo-MTV, se amplificó y la secuencia de ADN para la expresión de la proteína recombinante MTV se extrajo por restricción enzimática con *NheI/SmaI*. El fragmento de ADN codificante para MTV se clonó en el vector de expresión pEntry-FSH digerido con las enzimas *NheI/HpaI*; obteniéndose el vector pEntry-MTV. En este vector la expresión de la proteína MTV está bajo control del promotor del citomegalovirus humano (CMVp). La secuencia codificante para MTV (MTH-ECD TNFR2-mutVEGF-6XHis) es seguida por una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) que permite la co-expresión de la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés *Green Fluorescen Protein*). De esta

manera se seleccionaron los clones con mayores niveles de expresión de la proteína de interés en base a la intensidad de la fluorescencia. Además, el vector de expresión posee un gen de resistencia a la Neomicina, que permitió seleccionar líneas celulares estables en presencia del antibiótico G418 (Figura 13A). El chequeo de restricción enzimática con la endonucleasa *NcoI* confirmó la identidad del vector y la inserción del gen de interés, obteniéndose segmentos de ADN de la talla esperada (3100, 1535, 1024, 940, 703 pb) (Figura 13B).

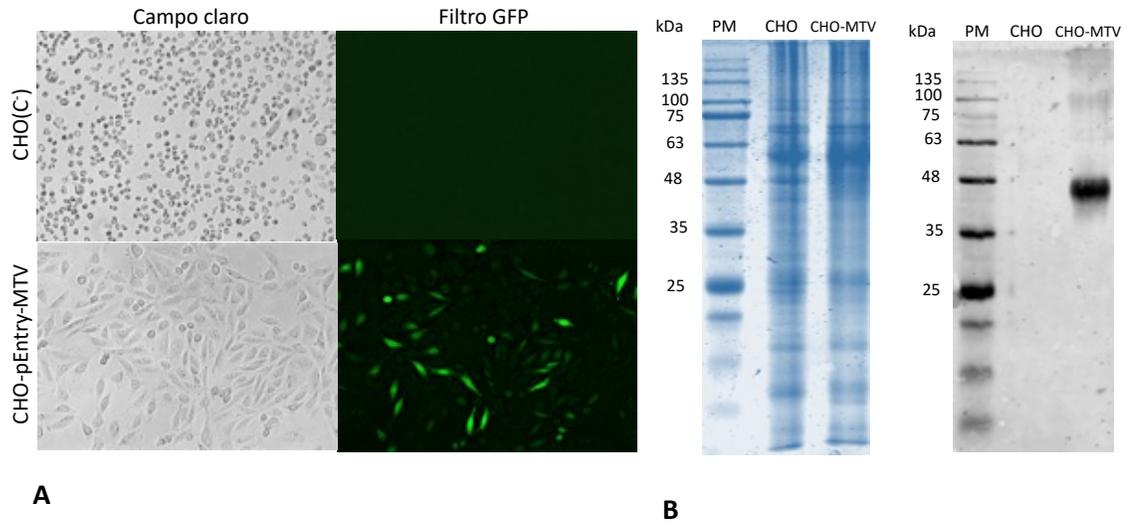


**Figura 13. Chequeo de restricción del vector pENTRY-MTV con enzima *NcoI*.**

**A.** Mapa del vector de expresión pENTRY-MTV. El promotor del CMV controla la expresión de la proteína MTV: péptido señal en amarillo, MTH en rojo, dominio extracelular TNFR2 en azul y dominio de dimerización del VEGF en verde fucsia. Al gen codificante para MTV le sigue una secuencia IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) y el gen GFP como reportero. Además, el vector contiene el gen NeoR, resistencia a Neomicina, como marcador de selección. **B.** Análisis de restricción del vector pENTRY-MTV con la enzima *NcoI* (3100, 1535, 1024, 940, 703 pb). A la izquierda: electroforesis simulada, derecha: electroforesis en gel de agarosa al 8%. MW: Patrón de peso molecular 1 kb DNA ladder.

Se seleccionaron células CHO establemente transformadas con el vector pENTRY-MTV por presión selectiva con el antibiótico G418. Luego de 12 días, se observó en microscopio de fluorescencia los niveles de expresión de GFP (Figura 14A). Las células CHO no transfectadas no mostraron fluorescencia y se observaron intensidades variables de fluorescencia en las células transfectadas. El medio de cultivo en cada caso se analizó para la expresión de la proteína MTV, por SDS page y reconocimiento en western blot con anticuerpo anti-poli histidina. Se observó, en el caso de las células transfectadas, dos bandas correspondientes a proteína con PM a la altura de 48 y 100KDa que pudiesen corresponder a las formas mono y dimérica de la proteína (Figura 14B).

Para elegir los clones con elevada producción de MTV se realizó una selección por citometría de flujo, tomando como criterio de selección la intensidad de fluorescencia. La selección de células (eventos individuales) se realizó a partir de la población P3 de células, que mostraban los mayores valores de intensidad de fluorescencia y correspondió al 1 % del total de eventos (Figura 14B).



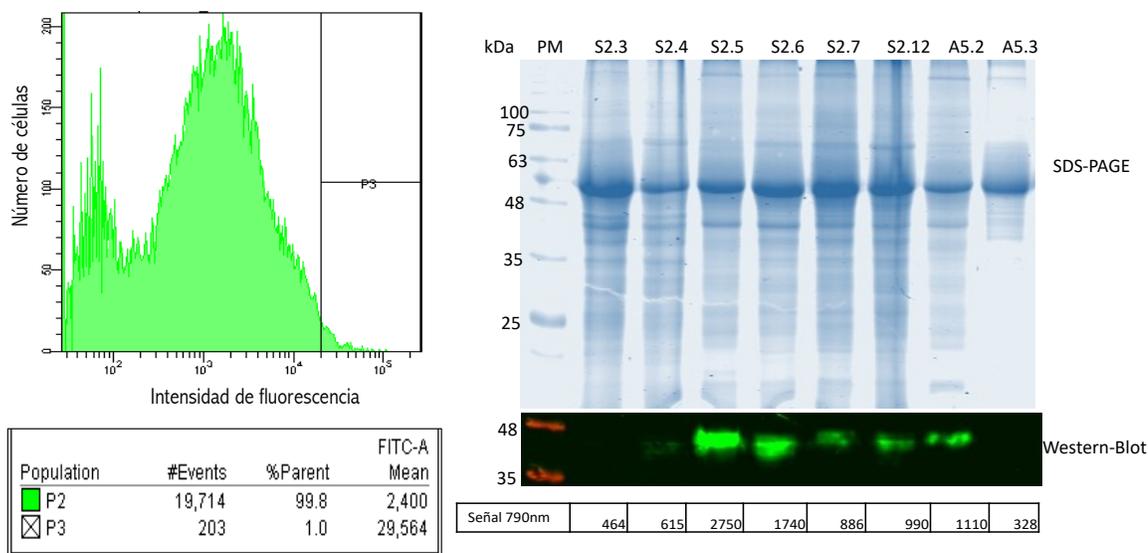
**Figura 14. Expresión de la proteína recombinante MTV en línea celular CHO transfectada con el vector de pEntry-MTV.**

**A.** Análisis de la expresión de GFP en células CHO productoras de proteína recombinante MTV por microscopía de fluorescencia en medio de crecimiento selectivo suplementado con G418. Microfotografía captada con Flouid Cell Imaging Station, magnificación 20X. **B.** Análisis de la expresión de la proteína MTV en medio de cultivo, por SDS-PAGE 12 % con tinción de azul de Coomassie y Western Blot con anti-6xHis Tag/ anti-mouse 790nm. PM: Marcador de peso molecular AccuteRuler RGB plus.

El análisis con las herramientas del servidor ExPASy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)), mostró que la proteína recombinante tiene un peso molecular estimado de 34289.58 Dalton y un punto isoeléctrico de 6.06. El análisis de la secuencia en el servidor NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), indica 3 sitios potenciales de N-glicosilación, dos en la región TNFR2 y una en la región VEGF\*. Para confirmar la expresión de proteína recombinante, el medio de cultivo de células amplificadas se analizó mediante SDS- PAGE y Western Blot (Figura 14B). En el

Western Blot se identificó una banda cercana a los 48 kDa y otra, pasados los 75 kDa, que deben corresponder a las formas glicosiladas de la proteína monomérica y dimérica, respectivamente y que está ausente en el control negativo.

La selección de clones mejor productores de proteína MTV se realizó en base a la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. La selección de células (eventos individuales) se realizó a partir de la población P3 de células, que mostraban los mayores valores de intensidad de fluorescencia y que correspondió al 1 % del total de eventos (Figura 15A). Tras selección de eventos individuales a placas de 96 pocillos se procedió a evaluar la expresión de la proteína en el medio de cultivo, de 8 clones individuales. Se utilizó como criterio, la intensidad de fluorescencia que se obtiene en el reconocimiento del anticuerpo secundario en ensayo de western blot (Figura 15B). En el clon S2.5 se detectó la mayor intensidad de señal; por tanto, se seleccionó para la producción de MTV.



**A**

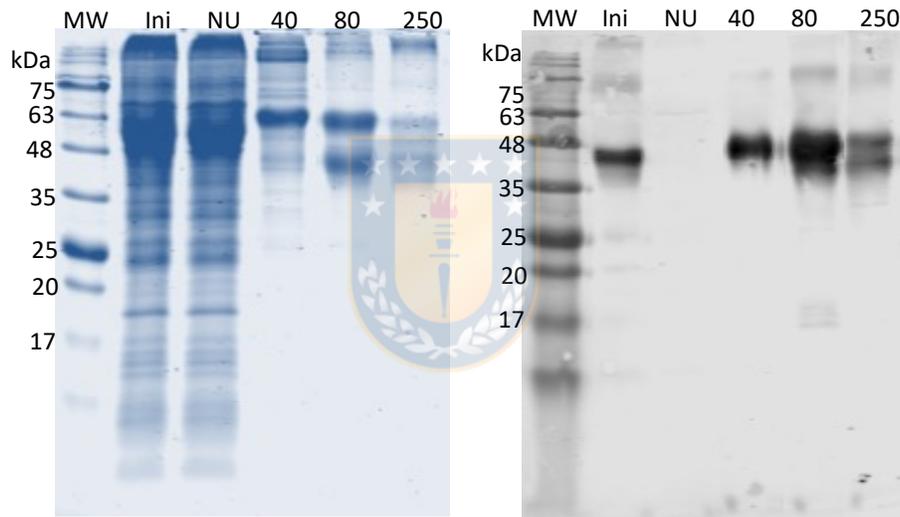
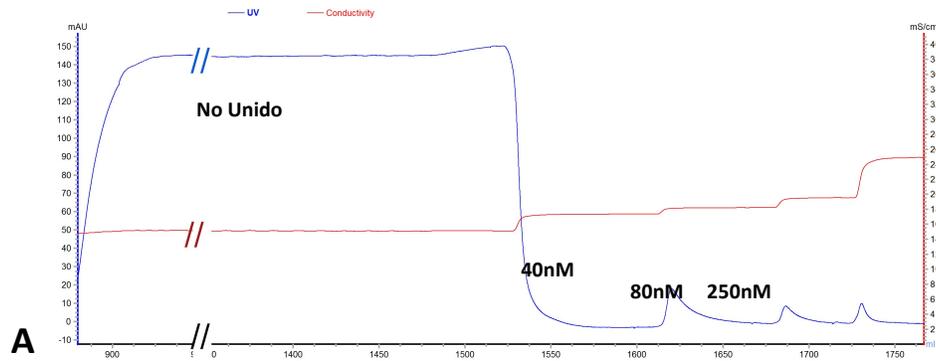
**B**

**Figura 15. Selección de clon CHO-pEntryMTV para la producción de proteína recombinante MTV.**

**A.** Citometría de flujo. Histograma de clasificación de células fluorescentes (número de eventos versus Intensidad de fluorescencia). La población de células, P3 (1 %), representa los eventos con mayor señal fluorescente. **B.** Análisis de la expresión de la proteína MTV desde el medio de cultivo de clones aislados. Las muestras de medio de cultivo celular de los clones productores de proteína MTV fueron analizadas por SDS-PAGE 12 % con tinción de azul de Coomassie y Western Blot con anti-6xHis Tag/ anti-mouse 790nm. PM: Marcador de peso molecular AccuteRuler RGB plus. Los clones evaluados fueron: S2.3, S2.4, S2.5, S2.6, S2.7, S2.12, A5.2 y A5.3. La cuantificación de la señal a 790nm se realizó mediante el software Image Studio del sistema Licor Odyssey.

La proteína MTV se purificó mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos desde el sobrenadante de cultivo del clon establemente transformado, S2.5. El cromatograma de la purificación (Figura 16A) presentó cuatro máximos de absorbancia a una  $DO_{280nm}$ , los que corresponden a la muestra no unida (NU), las dos muestras de lavado y la muestra eluida. Cada una de estas fracciones,

además de la muestra de entrada, se analizaron mediante SDS-PAGE y Western Blot (Figura 16B). En el western blot, con muestras corridas en condiciones reductoras, se observó en el carril de la muestra inicial una banda difusa alrededor los 48 kDa que debe corresponder a la proteína MTV y está ausente en la muestra de proteína no unida, lo que se confirmó mediante el Western Blot de estas fracciones; esta observación indica que la totalidad de la proteína de interés se adhiere a la columna. El análisis de las fracciones de lavado y elución mostró que 40 mM de imidazol no logró despegar la proteína de la matriz y que esta comienza a eluir en el lavado a 80 mM de imidazol acompañada de proteínas contaminantes. Este resultado sugiere que hay parte de la proteína que se adhirió de una manera más débil a la columna. En la fracción de 250mM, correspondiente a la elución se observó la proteína de interés con un 86 % de pureza estimado, según la evaluación realizada mediante densitometría.

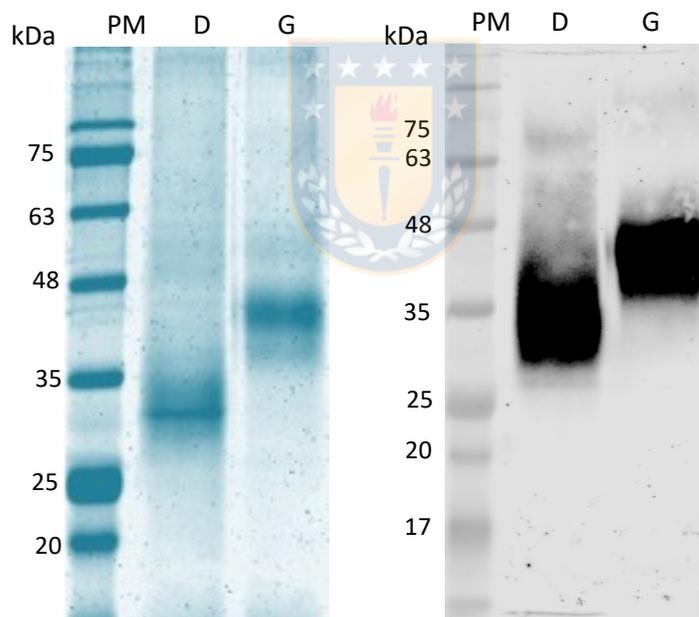


**B**

**Figura 16. Purificación y caracterización de la proteína recombinante MTV desde medio de cultivo de células CHO-pEntryMTV.**

**A.** Cromatograma de purificación por afinidad a iones metálicos (IMAC) utilizando una matriz *fast flow* Ni-Sepharose. **B.** Análisis de SDS-PAGE y Western Blot de muestras de los diferentes máximos de  $DO_{280nm}$  obtenidos en el IMAC. PM: Marcador de peso molecular AccuteRuler RGB plus; Ini: muestra inicial; NU: Muestra no unida; 40: proteínas del paso de lavado a 40 mM de Imidazol; 80: proteínas del paso de lavado a 80 mM de Imidazol; 250: elución de MTV a 250 mM de Imidazol. Las muestras de proteína se analizaron en 12 % de SDS-PAGE con una tinción azul Coomassie y el revelado del Western Blot se realizó con anti-6xHis Tag/ anti-mouse 790nm.

El patrón de migración obtenido durante la expresión de MTV en células CHO y el proceso de purificación mostró bandas correspondientes a pesos moleculares superiores a los esperados. Aunque el peso molecular teórico de MTV es de 34.3 kDa, tiene tres sitios potenciales para la N-glicosilación (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>): dos en el dominio extracelular del TNFR2 y uno en el dominio de dimerización del VEGF. La transferencia de glicanos a esos sitios podría aumentar la masa molecular de la proteína MTV y retrasar su migración en geles de poliacrilamida



**Figura 17. Deglicosilación de la proteína MTV.**

Análisis de SDS-PAGE y Western Blot de la proteína **MTV deglicosilada (D)**: Proteína MTV tratada con PNGasa F durante toda la noche a 37°C. **Proteína MTV glicosilada.(G)**: Proteína MTV con el mismo tratamiento, pero sin PNGasaF. PM: Marcador de peso molecular AccuteRuler RGB plus. Las muestras de proteína se analizaron en 12 % de SDS-PAGE con una tinción azul Coomassie y el revelado del Western Blot se realizó con anti-6xHis Tag/ anti-mouse 790nm.

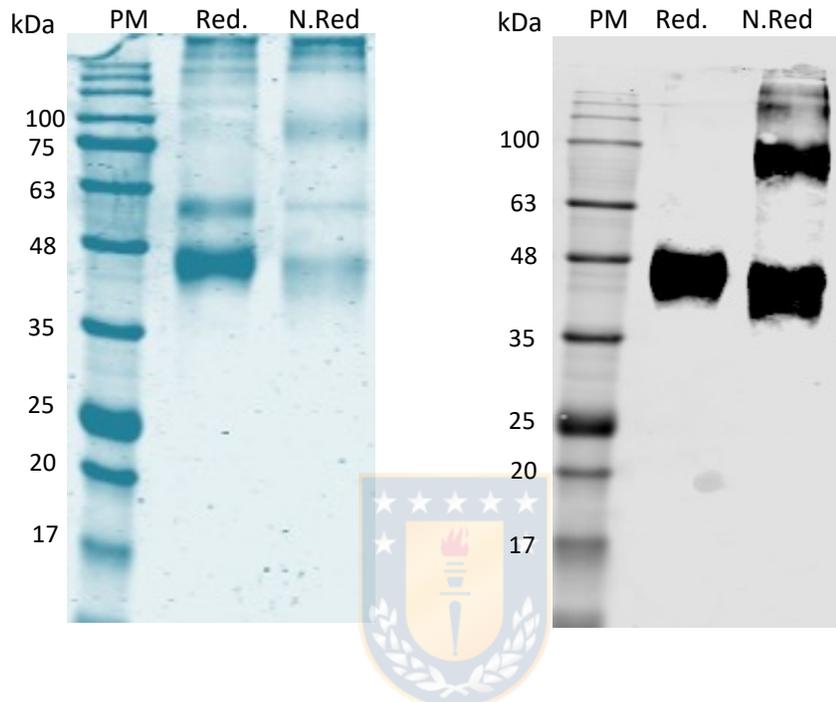
El estado de glicosilación de la proteína MTV se examinó mediante la deglicosilación con PNGasa F (Figura 17). Los productos digeridos y analizados mediante SDS-PAGE reductora mostraron, en el análisis por western blot, que el tratamiento con PNGasa F disminuyó el peso molecular de la proteína MTV. En el caso de la forma monomérica a un producto que migra cercano a los 35 kDa, correspondiente con el valor de peso molecular teórico y un producto entre 63 y 75 kDa para la forma dimérica.

Estos resultados permitieron establecer un proceso de expresión y purificación de la proteína MTV desde medio de cultivo de células CHO establemente transformadas con el vector de expresión. Dicho proceso permitió obtener la proteína recombinante, glicosilada y con alto grado de pureza.

### *5.1.2 Caracterización del dominio dimerizante, VEGF mutado.*

En el diseño de la proteína MTV se incluyó un dominio VEGF mutado con el objetivo de obtener un TNFI dimérico con mayor actividad biológica. El análisis *in silico* predijo la formación de dímeros fuertes sin ninguna actividad angiogénica. El ensamblaje de las estructuras diméricas del MTV en torno a los 95 kDa se corroboró por SDS-PAGE y Western Blot en condiciones no reductoras (Figura 18). Incluso en condiciones reductoras se detectó la presencia del dímero, probablemente debido a la acción parcial del tampón reductor y a la fuerza del

enlace del dímero. Inesperadamente se observó en condiciones no reductoras proteína en estado monomérico.



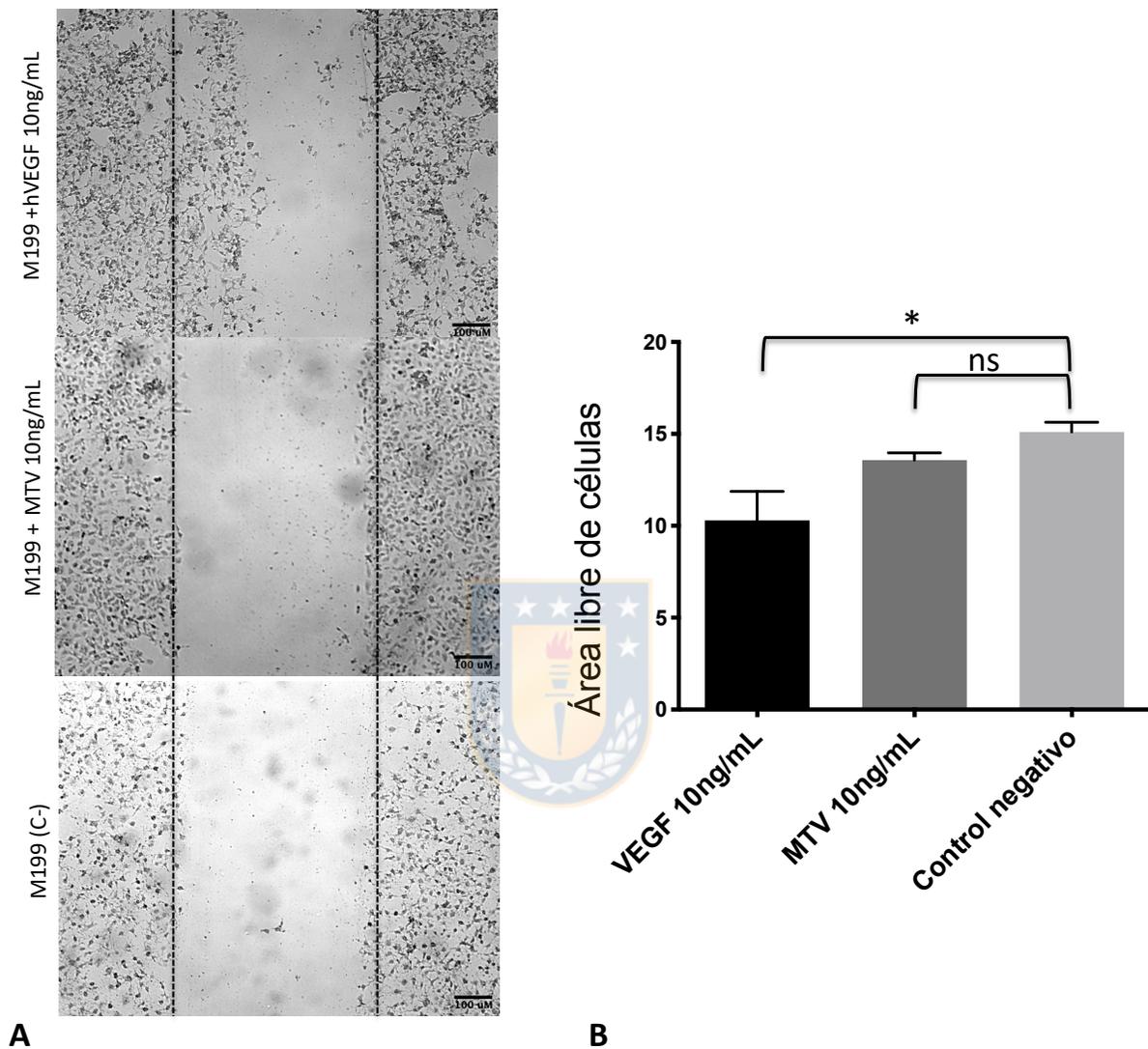
**Figura 18. Dimerización de la proteína MTV.**

Análisis de SDS-PAGE y Western Blot de proteína MTV purificada en Condición reductora (Red) y Condición no reductora (N.Red). Las muestras de proteína se analizaron en 12 % de SDS-PAGE con una tinción azul Coomassie y el revelado del Western Blot se realizó con anticuerpos anti-6xHis Tag/ anti-mouse 790nm. PM: Marcador de peso molecular AccuteRuler RGB plus.

La inhibición de la actividad proliferativa y angiogénica del motivo VEGF mutado se demostró en ensayo *in vitro* de cierre de la herida en cultivo celular de células ECV304 y *ex vivo* en anillos aórticos de ratón. En el ensayo de cierre de la herida, las células ECV304 tratadas con 10 ng/mL de proteína MTV durante 12 h no migraron significativamente al área de la herida comparado con el control

negativo (Prueba de comparación múltiple de Dunn,  $p=0.3594$ ). Cuando se añadió al medio igual concentración de hVEGF<sub>121</sub> como control positivo, alrededor del 46.7 % del área de la herida se recuperó debido a proliferación y subsecuente migración de las células ECV304 en presencia del factor angiogénico (Figura 19).

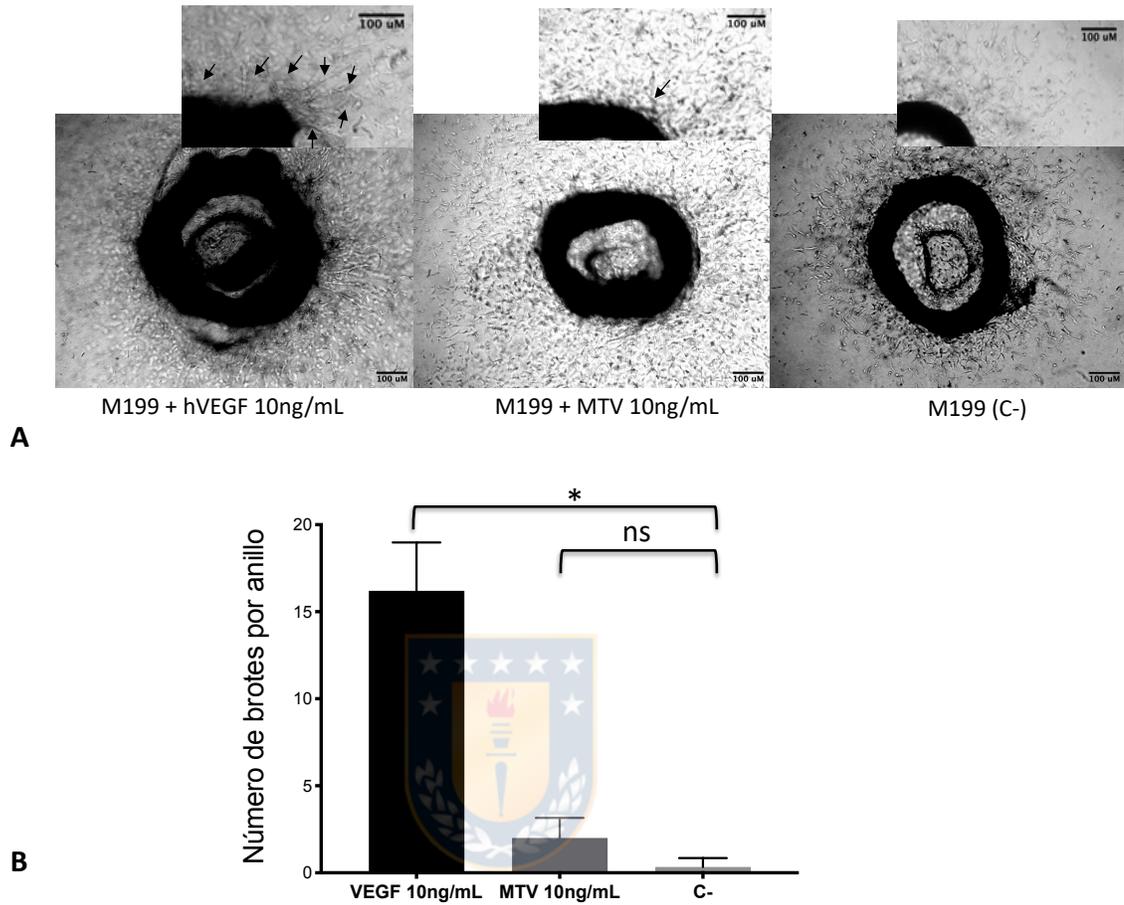




**Figura 19. Actividad proliferativa *in vitro* de la proteína recombinante MTV**

Ensayo de cierre de la herida en cultivo de células ECV304. Las imágenes se adquirieron 12 h después de la incubación con: medio M199 (control negativo), medio M199 suplementado con hVEGF<sub>121</sub> 10 ng/ml o medio M199 suplementado con MTV 10 ng/mL. Las líneas de puntos marcan el borde de la herida. El área libre de células se cuantificó utilizando el software Image j. Las barras representan la media ± desviación estándar de los valores obtenidos de 3 réplicas. Las comparaciones se realizaron utilizando prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas de comparación múltiple de Dunn. ns: no significativo; \*: p<0.05. Microfotografía captada con microscopio OLYMPUS IX81.

La actividad angiogénica en los anillos aórticos de ratón fue cuantificada por recuento del número de brotes tras 6 días de tratamiento. Después del día 6, los anillos aórticos cultivados en medio de crecimiento suplementado con 10 ng/mL de hVEGF<sub>121</sub> (control positivo) mostraron un aumento significativo en el número de brotes en comparación con los anillos cultivados en ausencia de factor angiogénico (control negativo) (Figura 20). Los anillos aórticos cultivados en un medio suplementado con 10 ng/mL de la proteína MTV no mostraron diferencias significativas con el control negativo ( $p=0.2825$ ) generando 5 veces menos brotes que el control positivo (Figura 20B). Ambos ensayos confirmaron lo predicho en el diseño *In silico*, ya que no se detectó actividad angiogénica para la proteína MTV y se conservó la propiedad de formación de dímeros.



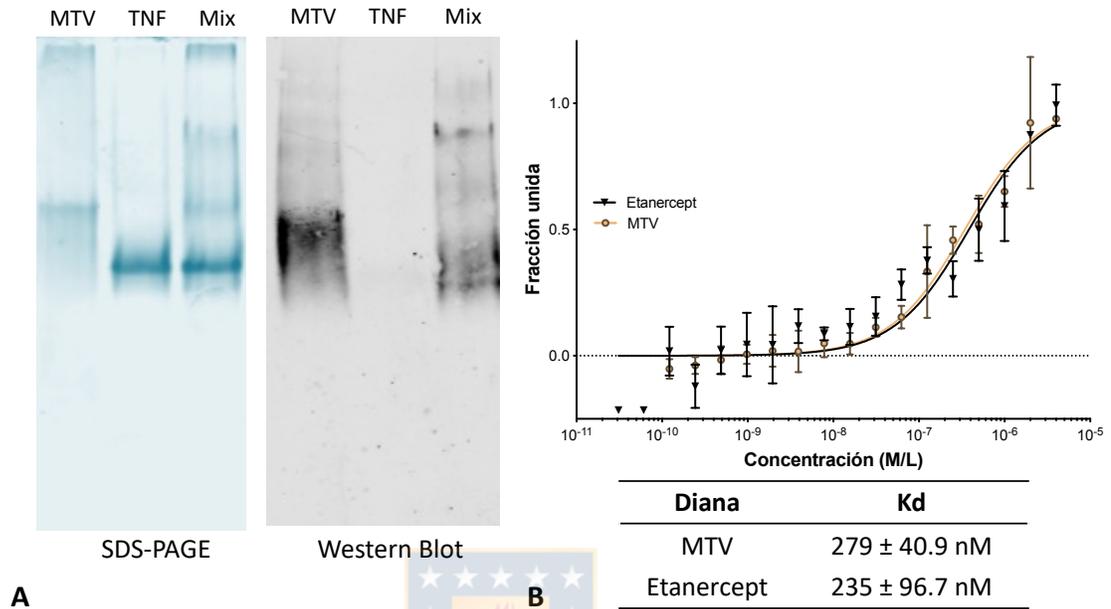
**Figura 20. Actividad angiogénica *in vitro* de la proteína recombinante MTV.**

Ensayo *ex vivo* en anillos aórticos de ratón. Se recogieron imágenes de anillos aórticos embebidos en colágeno tipo I con 6 días de estimulación con: medio M199 (control negativo), medio M199 suplementado con hVEGF<sub>121</sub> 10ng/ml o medio M199 suplementado con MTV 10 ng/mL. Los brotes están señalizados con flechas en las micrografías magnificadas. Las barras representan el número medio de brotes de microvasos ± desviación estándar de los valores obtenidos de 4-6 réplicas. Las comparaciones se realizaron utilizando una prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas de comparación múltiple de Dunn. ns: no significativo; \*: p<0.05. Microfotografía captada con microscopio OLYMPUS IX81.

## 5.2 Caracterización del dominio bloqueador de TNF $\alpha$

### 5.2.1 Caracterización de la unión de la proteína recombinante MTV y rhTNF $\alpha$

Para evaluar la unión de la proteína MTV a TNF $\alpha$  recombinante humano (rhTNF $\alpha$ ) se realizó inicialmente una electroforesis nativa donde se analizaron ambas moléculas por separado y la mezcla de proteínas incubadas a temperatura ambiente por 15 min (Figura 21A). Se identificó en el gel de electroforesis una banda adicional para el caso de la mezcla, que corresponde al complejo MTV-rhTNF $\alpha$ . Para el reconocimiento de la proteína MTV por Western Blot se utilizó Avastin, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF<sup>194</sup>. El Western Blot confirmó la presencia de MTV en la banda correspondiente al complejo (Figura 21A).



**Figura 21. Ensayos de interacción entre las proteínas MTV-rhTNF $\alpha$ .**

**A.** Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 10 % de la proteína MTV, rhTNF $\alpha$  y mezcla de ambas proteínas (Mix). Las muestras de proteínas se visualizaron en el gel con una tinción azul Coomassie y el revelado del Western Blot se realizó con anticuerpos anti-VEGF/anti-human IgG 790nm. **B.** Análisis de las interacciones entre la proteína MTV con rhTNF $\alpha$  utilizando técnica de termoforesis a microescala (MST). La proteína MTV o Etanercept se utilizaron como diana y el rhTNF $\alpha$  como ligando fluorescente etiquetado con la sonda NT-650. Los experimentos de MST se llevaron a cabo a 25°C. Las curvas dosis-respuesta resultantes se ajustaron a un modelo de unión en un sitio único para extraer los valores de Kd. Tabla de valores Kd: Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3-4 experimentos independientes.

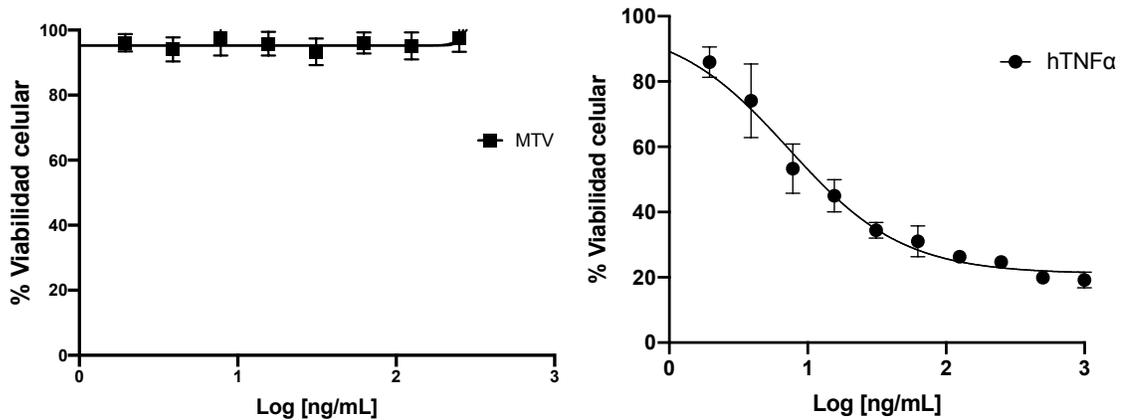
La técnica de termoforesis microescala se utilizó para estudiar la capacidad de la proteína MTV de unirse a su ligando rhTNF $\alpha$  y de esta manera se determinó la constante de disociación (Kd) de la interacción entre ambas proteínas. La MST dió como resultado un valor de Kd de 279  $\pm$  40.9 nM para la interacción rhTNF $\alpha$ -MTV y un valor de Kd de 235  $\pm$  96.7 nM para la interacción rhTNF-Etanercept

(Figura 21B), obteniéndose además curvas casi idénticas. No se encontraron diferencias entre los valores de  $K_d$  obtenidos, lo que confirma una afinidad similar por el rhTNF $\alpha$  de la molécula recombinante MTV en comparación con Etanercept.

### *5.2.2 Evaluación in vitro del efecto de la proteína recombinante MTV en la inhibición de la citotoxicidad inducida por TNF $\alpha$ .*

Con el objetivo de evaluar la capacidad de la proteína MTV de inhibir el efecto citotóxico de TNF $\alpha$  se realizó un ensayo de citotoxicidad con la línea celular L929. El ensayo se basa en evaluar la capacidad de la proteína MTV para bloquear el efecto citotóxico que posee el TNF $\alpha$  sobre las células L929. Primeramente, se confirmó que la proteína MTV no tenía efecto en la viabilidad celular ya que no varió el porcentaje de viabilidad celular al aumentar la concentración de la proteína MTV en comparación al medio sin la molécula añadida (Figura 22). Posteriormente, se determinó la mínima concentración de rhTNF $\alpha$  que redujo la viabilidad del cultivo celular a valores inferiores al 40 %, valor de concentración que es utilizado para evidenciar el efecto de los bloqueadores de TNF $\alpha$ . Al aumentar la concentración de rhTNF $\alpha$  a las que se exponen las células, disminuyó la viabilidad celular para una concentración efectiva ( $EC_{50}$ ) de 7.287 ng/mL. A concentraciones de rhTNF $\alpha$  entre 15.6 y 31.25 ng/mL se obtuvieron valores promedio de viabilidad entre 45 y 34.4 %, por lo que se seleccionó 25 ng/mL de

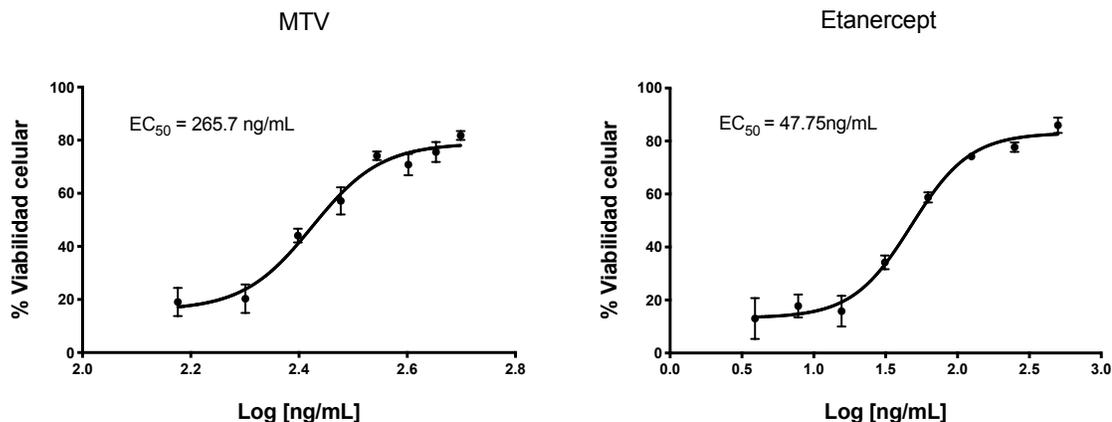
rhTNF $\alpha$ , que corresponde a valores utilizados anteriormente para ensayar agentes bloqueadores de TNF $\alpha$ <sup>82</sup>.



**Figura 22. Efecto de la proteína MTV y rhTNF $\alpha$  en la viabilidad de células L929.**

Las células L929 adherentes confluentes se expusieron durante 20 h a concentraciones crecientes de la proteína MTV o rhTNF $\alpha$ . La viabilidad celular se midió mediante ensayo MTT.

Confirmado que la proteína MTV no afectó la viabilidad celular y empleando rhTNF $\alpha$  a 25 ng/mL para evidenciar su efecto citotóxico, se evaluó la capacidad como TNFI de la proteína MTV y Etanercept (como referencia). Se observó el aumento de la viabilidad celular al aumentar las concentraciones del inhibidor (Figura 23). Se observó la neutralización de la citotoxicidad de rhTNF $\alpha$  hasta un 80 % de viabilidad con ambos antagonistas. La proteína MTV y el Etanercept neutralizaron de manera dosis dependiente el efecto citotóxico de TNF $\alpha$ , con valores de EC<sub>50</sub> de 265.7 ng/mL y 47.75 ng/mL, respectivamente (Figura 23). Los resultados indicaron que la proteína MTV ejerce su actividad biológica inhibiendo el efecto citotóxico de TNF $\alpha$  *in vitro*.



**Figura 23. Neutralización de la citotoxicidad inducida por TNF $\alpha$ .**

Curva de neutralización de la citotoxicidad de rhTNF $\alpha$  en células L929 por Etanercept o la proteína MTV. Las células L929 confluentes se expusieron durante 20 h a concentración creciente de la molécula bloqueadora en presencia de rhTNF $\alpha$  25 ng/mL. La viabilidad celular se midió mediante ensayo MTT.



### 5.3 Caracterización del dominio Caballo de Troya molecular.

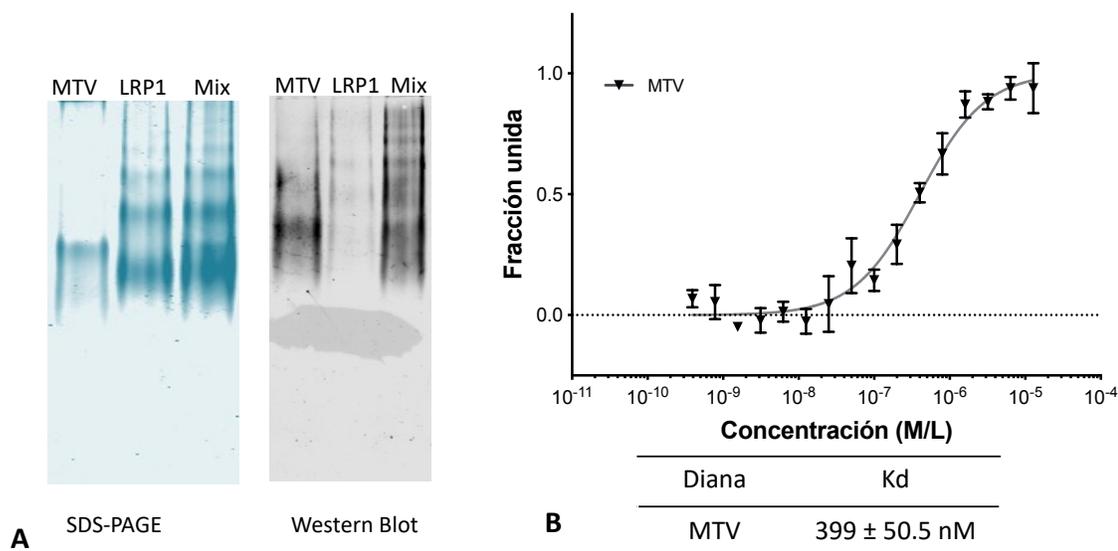
La proteína recombinante MTV posee en su extremo amino terminal el dominio peptídico, Angiopeptido-2, utilizado con éxito para el traspaso de drogas al SNC mediante un mecanismo de transcitosis mediada por LRP1<sup>21, 23</sup>. Otros ligandos que unan LRP1 para traspasar la BHE pueden sustituir al Angiopeptido-2 en la molécula recombinante o incluirse en el diseño de otras drogas.

#### 5.3.1 Caracterización de la unión de la proteína recombinante MTV y el receptor LRP1

Para evaluar la unión de la proteína MTV al receptor LRP1 se realizó inicialmente una electroforesis en condiciones nativas en gel de poliacrilamida al 10 %. Se

analizó cada molécula por separado además de evaluar la mezcla tras 15 min de incubación a temperatura ambiente (Figura 24A). En el gel de electroforesis, el antígeno LRP1 se observa como un conjunto de bandas, posiblemente por la presencia de estructuras multiméricas. Se identificó una banda adicional para el caso de la mezcla, que corresponde al complejo MTV-LRP1. El Western Blot confirmó la presencia de la proteína MTV asociada a los multímeros de LRP1 (Figura 24A). La técnica de MST también se utilizó para estudiar la capacidad de la proteína MTV de unirse al receptor LRP1, obteniéndose un valor de  $K_d$  de  $399 \pm 50.5$  nM para la interacción LRP1-MTV (Figura 24B), lo que indica una afinidad similar a la establecida para un receptor por su ligando<sup>195</sup>. Estos resultados demostraron que se produce la unión entre MTV y LRP1.





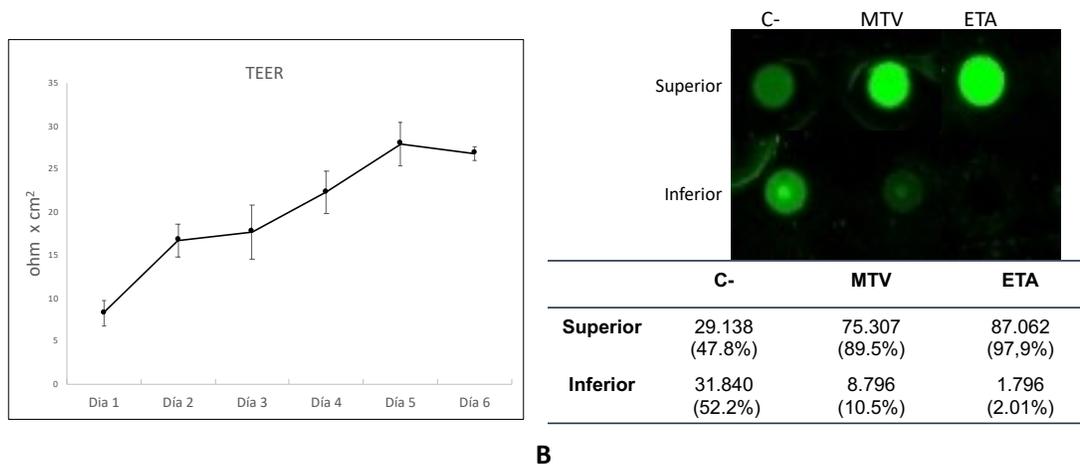
**Figura 24. Interacción MTV-LRP1.**

**A.** Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 10 % de MTV, LRP1 y mezcla de ambas proteínas (Mix). Las muestras de proteínas se visualizaron en el gel con una tinción azul Coomassie y el revelado del Western Blot se realizó con anticuerpos anti-VEGF/anti-human IgG 790 nm. **B.** Análisis de las interacciones entre la proteína MTV con LRP1 utilizando técnica de termoforesis a microescala (MST). La proteína MTV se utilizó como diana y el LRP1 como ligando fluorescente etiquetado fluorescentemente con NT-650. Los experimentos de MST se llevaron a cabo a 25°C. Las curvas dosis-respuesta resultantes se ajustaron a un modelo de unión en un único sitio para extraer los valores de Kd. Tabla de valores Kd: Los datos representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.

### 5.3.2 Transcitosis *in vitro* de la proteína recombinante MTV

Para evaluar capacidad de realizar transcitosis *in vitro* de la proteína recombinante MTV se utilizó como modelo de BHE células bEnd3 crecidas en monocapa en sistema *transwell*. Las células bEnd3 provienen de una línea inmortalizada de células del endotelio del cerebro de ratón que muestran en cultivo características similares a la BHE<sup>196</sup>. La formación de la barrera de células fue monitoreada por medición de la resistencia trans-endotelial (TEER). Seis días

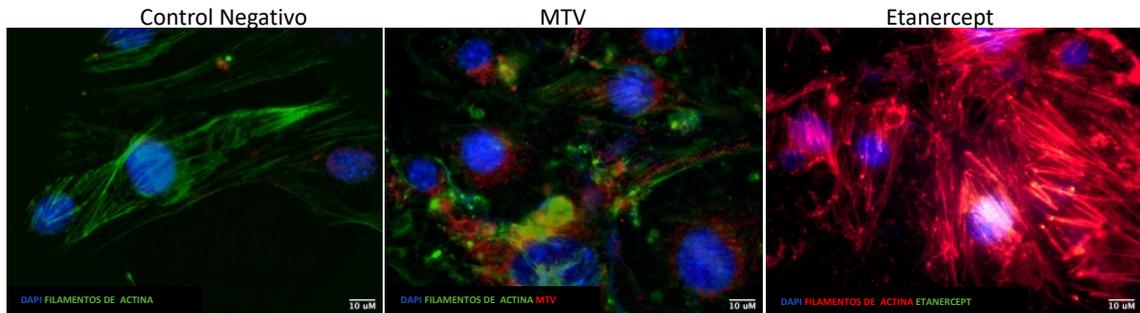
después de sembrar  $2 \times 10^4$  células/pocillo se alcanzó una meseta con  $26.84 \pm 0.83$  ohms  $\times$   $\text{cm}^2$  en el valor de TEER, correspondiente a la formación de una barrera de células (Figura 25A). Tras 2 h de incubar las células en medio sin suero, para aumentar el acceso a los receptores, se añadió 125 ng de proteína MTV en la cámara superior del sistema transwell o 125 ng de ETA. Para probar la capacidad de la molécula de difundir a través del sistema *transwell* se añadió igual cantidad de proteína a una cámara sin células (C-). Luego de 2 h de incubación las soluciones del compartimento superior e inferior fueron colectadas y se determinó la presencia de proteína por *dot blot*, cuantificándose los niveles de fluorescencia. En la cámara sin células la proteína MTV difunde libremente alcanzando valores cercanos al 50% en ambas cámaras. Se logra detectar un 10.5 % de proteína MTV en el compartimento inferior, valor 5 veces superior al que logra detectarse para ETA sugiriendo que la adición del dominio MTH favorece su paso a través de la barrera de células (Figura 25 B).



**Figura 25. Capacidad de la proteína MTV de atravesar la monocapa celular en modelo *in vitro* de BHE.**

**A.** Resistencia transendotelial (TEER) de modelo *in vitro* de BHE con células bEnd3. Insertos de poliéster, 6.5 mm, 0.4  $\mu\text{m}$  de poro se sembraron con bEnd3,  $2 \times 10^4$  células/pocillo y se registró la TEER cada 2 ó 3 días. **B.** Permeabilidad relativa en modelo *in vitro* de BHE. En sistema *transwell* con células bEnd3 formando barrera se adicionaron 125 ng de proteína en el compartimento superior y tras 2 h de incubación evaluó la presencia de presencia de proteína por dot blot. MTV: anti-6xHis Tag/ anti-mouse 790nm. ETA: anti-human 790nm. La cuantificación de la señal a 790nm se realizó mediante el software Image Studio del sistema Licor Odyssey.

La internalización de la proteína MTV las células bEnd3 se determinó mediante inmunocitoquímica y microscopía fluorescente, después de 2h de incubación con una solución conteniendo 500 mM de MTV a 37°C (Figura 26). Por el contrario, el Etanercept, que carece de dominio ligando de LRP1, no se internalizó en las células endoteliales bEnd3. Estos resultados sugieren a que el dominio MTH en la proteína MTV está mediando la entrada a las células.



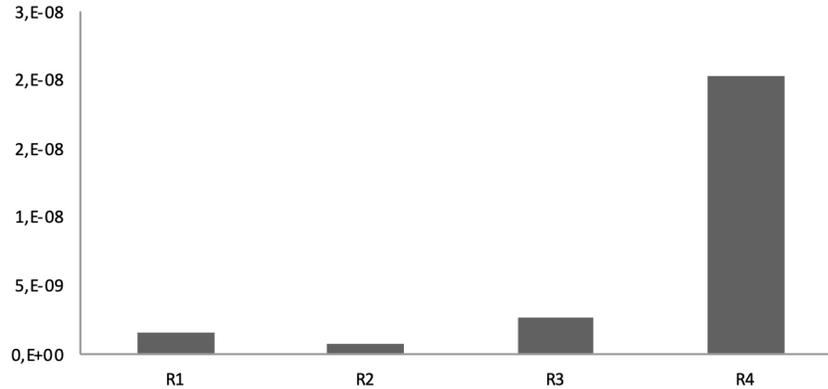
**Figura 26. Internalización *in vitro* de la proteína MTV.**

Microscopía de epifluorescencia de células bEnd3 después de 2 h de incubación con PBS 1X (Control Negativo), proteína MTV 500 mM o ETANERCEPT 500 mM. La proteína MTV se detectó con anti His tag/anti-conejo 546nm (rojo). El Etanercept se detectó con anti human IgG 488nm (verde). Los filamentos de actina se tiñeron con phalloidin 488nm (verde) o phalloidin 594nm (rojo). Los núcleos celulares se detectaron con el reactivo de tinción nuclear DAPI (azul). Microfotografía captada con microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81, magnificación 60X.

### 5.3.3 Obtención de nuevos dominios “caballo de Troya molecular” con capacidad de unir LRP1.

Con el objetivo de obtener nuevas moléculas con capacidad MTH para sustituir el Angiopéptido-2 en la proteína MTV o mediar el paso de otras drogas al SNC a través receptor LRP1 se realizó *biopanning* por tecnología de *Phage display*. Para ello se utilizó una biblioteca de anticuerpo de dominio único (dAbs, *Single domain antibodies*) humano expuestos en la proteína pIII del fago filamentoso M13. El proceso de selección consistió en enfrentar la biblioteca de fagos al antígeno LRP1 durante 4 rondas de selección

### Eluato/NU



Título	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3	Ronda 4
NU (ufc/mL)	1,44 x 10 <sup>11</sup>	8,40 x 10 <sup>10</sup>	8,00 x 10 <sup>11</sup>	1,76 x 10 <sup>11</sup>
Eluato (ufc/mL)	2,21 x 10 <sup>2</sup>	5,80 x 10 <sup>1</sup>	2,15 x 10 <sup>3</sup>	3,58 x 10 <sup>3</sup>
Eluato/NU	1,53 x 10 <sup>-9</sup>	6,90 x 10 <sup>-10</sup>	2,69 x 10 <sup>-9</sup>	2,03 x 10 <sup>-8</sup>

**Figura 27. Rondas de selección anticuerpo de dominio único (dAbs) afines con antígeno LRP1.**

La selección se desarrolló con la biblioteca de dAbs expuestos en la proteína pIII del fago KM13 e incluye cuatro rondas (ronda1-4). La biblioteca se enfrentó a antígeno LRP1 inmovilizado en placa de ELISA. Se muestran los títulos de fagos recuperados en las fracciones de fagos no unidos (NU) y fracción eluida (Eluato) determinado por infección en *E. coli* TG1. Las unidades formadoras de colonias (ufc) son una medida de la infectividad, definida como el número de colonias resistentes a ampicilina que se obtienen después de la infección de la cepa TG1.

La amplificación de fagos que expresan dAbs se llevó a cabo mediante la determinación del enriquecimiento de fagos eluidos en cada ronda de selección, para esto se determinó el título de fagos de las fracciones de fagos no unidos (NU) y eluidos (E). A medida que avanzaron las rondas de selección, se observó un aumento en el título de fagos recuperados en el eluato (Figura 27). Se obtuvo

un enriquecimiento de 13.5 veces en la ronda 4 comparado con la ronda 1, cuando se comparan las fracciones eluidas normalizadas con el NU.

Se aislaron 47 clones de fagos a partir de la fracción eluida en la ronda 4 y se realizó la secuenciación del ADN purificado. Se identificaron 5 secuencias de dAbs mostrados sobre la proteína pIII, una con 36 repeticiones (B7), otra con 8 repeticiones (D12) y otras 3 con una repetición cada una (B11, D7 y D11) (Tabla 3).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas por el programa IMGTV-QUEST<sup>192</sup> para identificar las secuencias correspondientes a regiones variables (VH) y sus correspondientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y regiones marco (*framework*). Las secuencias analizadas tuvieron un 85.76 % de identidad con las cadenas variables del alelo Homsap IGHV3-23, correspondiente al segmento de línea germinal de cadena pesada sobre el cual fue construido la biblioteca<sup>184</sup>

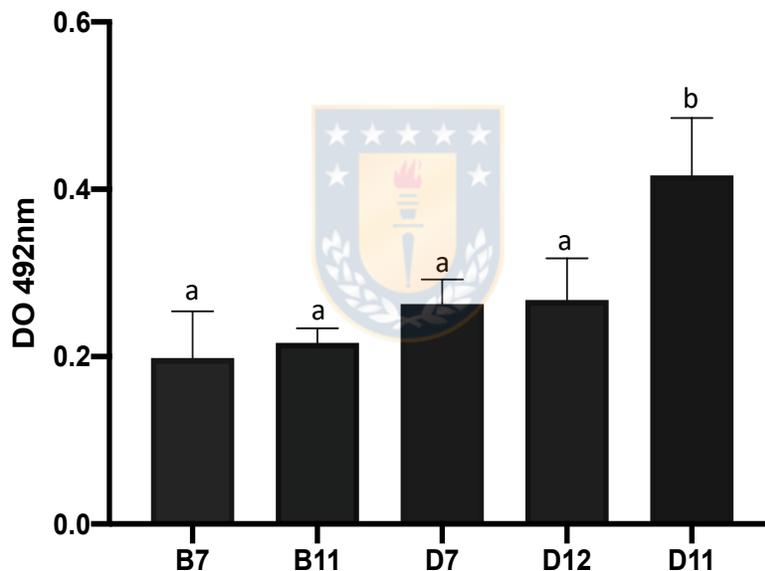
ID	Secuencias de clones seleccionados	n (%)
B11	MAQVLLLESGGGLVQPPGGSIRLSCAAS GVRVSHNV MAMVRQAPGKGLEWVST IKAPDGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLLYLQMN SIRAEDTAVYYC ASHSAESMETKPEDF MGQGTLLVTSSAAA	1 (2.1)
D12	MAQVLLLESGGGLVQPPGGSIRLSCAAS GDTLIHND MAMVRQAPGKGLEWVST IQTQSGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLLYLQMN SIRAEDTAVYYC ASDGDLGPIVCDKAEANIQS MGQGTLLVTSSAAA	8 (17)
D7	MAQVLLLESGGGLVQPPGGSIRLSCAAS GVNESTXN MAMVRQAPGKGLEWVST IRGNNGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLLYLQMN SIRAEDTAVYYC AGCPPEPNTSPSLRS MGQGTLLVTSSAAA	1 (2.1)
B7	MAQVLLLESGGGLVQPPGGSIRLSCAAS GEMIIDQN MAMVRQAPGKGLEWVST IKADDGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLLYLQMN SIRAEDTAVYYC ATSWGELQNDLNY MGQGTLLVTSSAAA	36 (76.7)
D11	MAQVLLLESGGGLVQPPGGSIRLSCAAS GDKISAEV MAMVRQAPGKGLEWVST ISTQNGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLLYLQMN SIRAEDTAVYYC AASRPNCPEVKKY MGQGTLLVTSSAAA	1 (2.1)

**Tabla 3. Anticuerpos de dominio único (dAbs) de unión a LRP1 identificados por Phage Display.**

Secuencias de aa resultantes de la secuenciación del ADN de 47 clones aislados tras cuatro rondas de selección. Análisis de las secuencias variables dABs en la base de datos del servidor IMG-T y subsecuente identificación de las secuencias marcos (framework, FR) y regiones determinantes de la complementariedad (CDR). ID: Identidad del clon, n: número de clones, %: Porcentaje respecto al total de secuencias



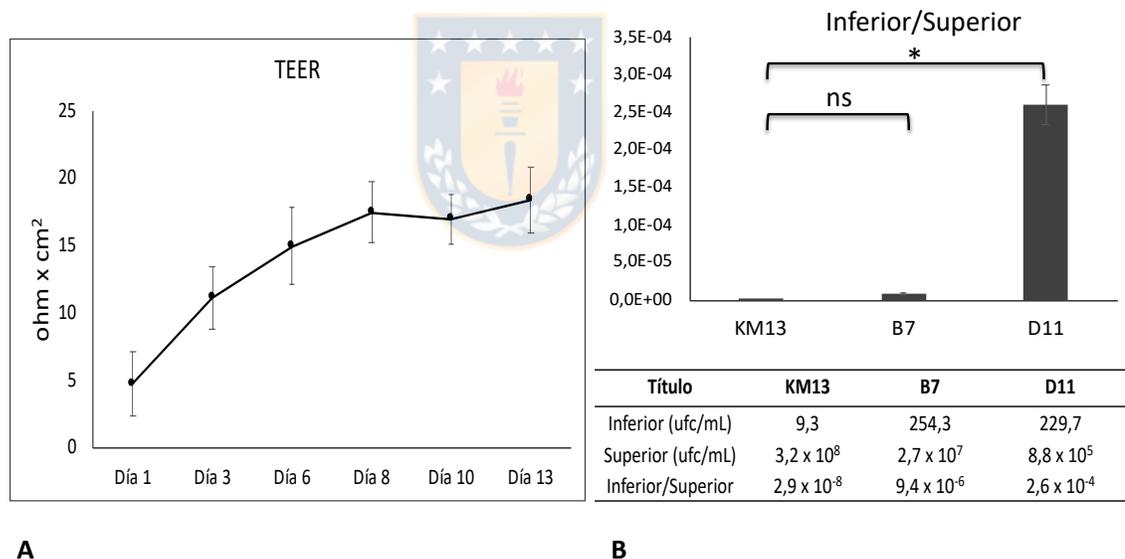
El análisis de la composición de aa de las regiones CDR3 mostró una longitud de entre 13 a 21 aa y los valores teóricos de pH isoelectrico (pI) para esta región indicaron mayor densidad de cargas positivas para los fragmentos dABs D7 y D11. El reconocimiento de LRP1 por los 5 fragmentos dABs identificados se evaluó mediante inmunoensayo tipo ELISA. Se observó que existe un mayor reconocimiento del antígeno LRP1 para el clon D11 ( $p=0.0018$ ; Anova test) (Figura 28).



**Figura 28. Reconocimiento de fagos mostrando fragmentos dABs por LRP1.**

Pocillos de placa de ELISA se recubrieron con LRP1 (1  $\mu\text{g}$ /pocillo), el bloqueo se realizó con leche 3 %. Luego, se añadieron muestras de fagos amplificados a concentración de  $10^9$  ufc/ml (100  $\mu\text{L}$ /pocillo). La detección se realizó utilizando un anticuerpo anti-M13 conjugado a HRP. Se cuantificó la  $\text{DO}_{492\text{nm}}$ . Los resultados se grafican como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas. Las comparaciones se realizaron utilizando una prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas de comparación múltiple de Dunn. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.5$ ) entre los grupos.

Para evaluar capacidad de realizar transcitosis *in vitro* se seleccionó del clon B7 por contar con más repeticiones dentro de las secuencias seleccionadas (76.7%) y el clon D11, con mayor reconocimiento por LRP1, determinado por ELISA. Como modelo de BHE se utilizaron células bEnd3 crecidas en monocapa en sistema *transwell*. La formación de la barrera de células fue monitoreada por medición de TEER. Trece días después de sembrar  $10^4$  células/pocillo se alcanzó una meseta con  $18.44 \pm 2.4$  ohms  $\times$   $\text{cm}^2$  en el valor de TEER, correspondiente a la formación de una barrera de células (Figura 29A).



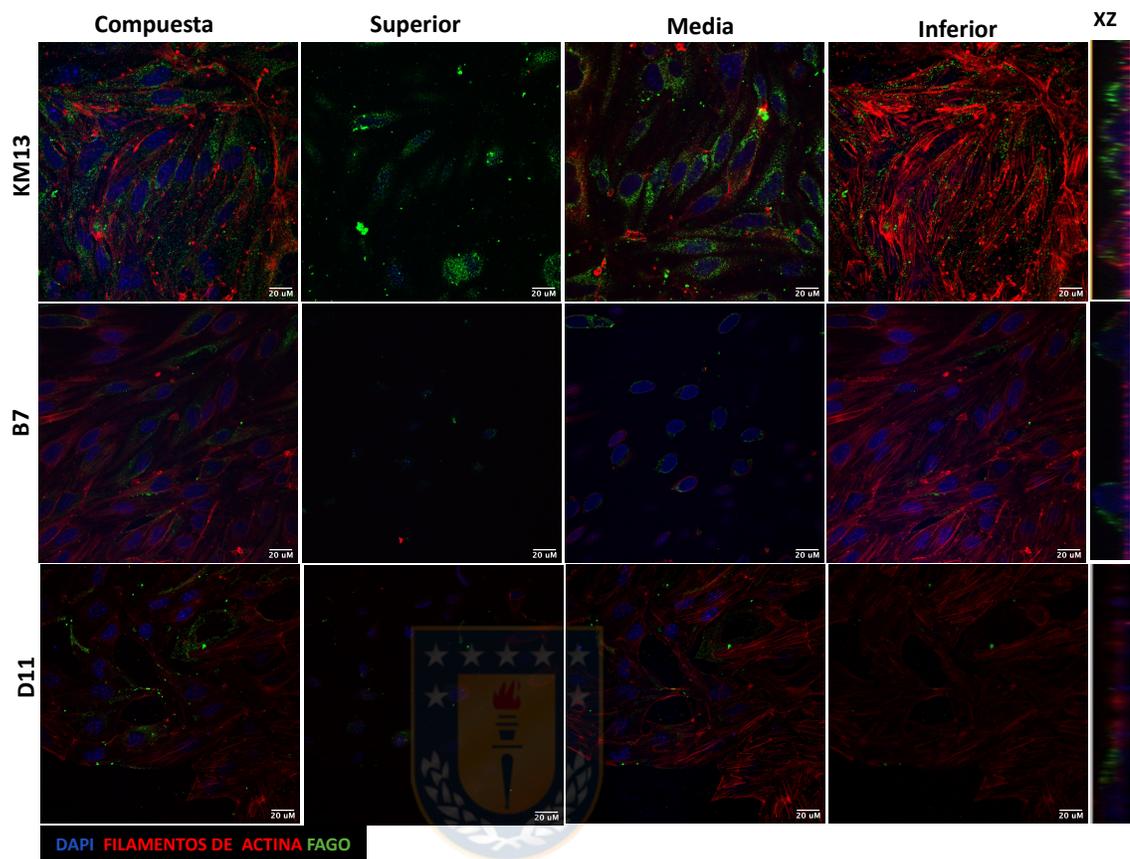
**Figura 29. Transcitosis de los clones de fagos recombinantes expresando fragmentos dABs en modelo *in vitro* de BHE.**

**A.** Resistencia transendotelial (TEER) de modelo *in vitro* de BHE con células bEnd3. Insertos de poliéster, 6.5 mm, 0.4  $\mu\text{m}$  de poro se sembraron con bEnd3,  $10^4$  células/pocillo y se registró la TEER cada 2 ó 3 días. **B.** Permeabilidad relativa de los clones de fragmentos dABs en modelo *in vitro* de BHE. En sistema *transwell* con células bEnd3 formando barrera se adicionaron  $10^{10}$  ufc en el compartimento superior y tras 2 h de incubación se recuperaron los fagos en ambos compartimentos. Se muestra el valor promedio de los títulos obtenidos por infección en *E. coli*

TG1. Los valores de títulos Inferior/Superior se muestran como medida de permeabilidad relativa. Las comparaciones se realizaron utilizando una prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas de comparación múltiple de Dunn. ns: no significativo; \*:  $p < 0.05$ .

Tras 2 h de incubar las células en medio sin suero, para aumentar el acceso a los receptores, se añadió  $10^{10}$  ufc/well de cada clon y como control negativo el bacteriófago no modificado, KM13. Luego de 2 h de incubación las soluciones del compartimento superior e inferior fueron colectadas y los fagos recobrados fueron titulados por infección en *E. Coli* TG1. Los títulos obtenidos en el compartimento inferior para el control negativo, KM13, fueron significativamente menores (prueba de Kruskal-Wallis,  $p = 0.0062$ ), indicando que los fragmentos dABs mostrados sobre la proteína pIII del fagemido son los responsables del paso a través de la barrera de células (Figura 29B). El clon D11 mostró valores de permeabilidad relativa en la monocapa de células, representado como el valor inferior/superior,  $8.9 \times 10^3$  veces mayor que el bacteriófago KM13, lo que indica un incremento en la transcitosis a través de las células bEnd3.

Adicionalmente, se analizó la presencia de fagos en las células bEnd3 crecidas en el *transwell* que se utilizaron en el ensayo por microscopía confocal de fluorescencia (Figura 30).



**Figura 30. Capacidad de clones de fragmentos dAbs de atravesar la monocapa celular en modelo *in vitro* de BHE.**

Microscopía confocal de las células bEnd3 formando barrera en sistema transwell sobre insertos de poliéster, 6.5 mm, 0.4  $\mu\text{m}$  de poro después de 2 h de incubación con fago KM13 o clones expresando fragmentos dAbs B7 o D11 sobre la proteína pIII. Los fagos se detectaron con anti pVIII/anti-ratón 488nm (verde). Los filamentos de actina se tiñeron con phalloidin 544nm (rojo). Los núcleos celulares se detectaron con el reactivo de tinción nuclear DAPI (azul).

Micrografías compuestas captadas con microscopio confocal espectral LSM780 NLO Zeiss, sección superior/media/inferior en el plano Z y vista del plano XZ obtenidos del Z-stack.

Las secuencias de imágenes adquiridas por microscopía confocal en el plano Z (Z-stacks) mostraron si los fagos fueron retenidos por las células endoteliales bEnd3, permaneciendo en las secciones superior y media, o si se internalizaron

mostrando mayor presencia en la sección inferior más cercana al filtro del inserto *transwell*. En el caso del control negativo, KM13, tras 2 h de interacción con la monocapa de células los fagos se retuvieron en la superficie celular (sección superior) con presencia en las secciones media e inferior. Para el caso de los fagos correspondientes a los clones B7 y D11, se observa apenas presencia de fagos en la superficie celular (superior) ni en el interior celular, lo que sugiere que la mayoría se transportaron a través de la monocapa endotelial durante el tiempo de incubación.

Estos resultados en conjunto con la permeabilidad aumentada del clon D11, indican que la modificación en la proteína pIII con este dAbs favorece el proceso de transcitosis en las células endoteliales, bEnd3.

## **VI. DISCUSIÓN**

### **6.1 Diseño de la proteína recombinante MTV**

En investigaciones previas se ha sugerido que los altos niveles de TNF $\alpha$  están involucrados en la fisiopatología de la respuesta neuroinflamatoria asociada con varios trastornos neurológicos<sup>3-11</sup>. Los pacientes con dichos trastornos, que han sido tratados con fármacos inhibidores del TNF $\alpha$  (TNFI) han manifestado mejoras

cognitivas<sup>17</sup>. En estos estudios se administraron biofármacos por vía intracraneal<sup>12</sup>, intratecal<sup>13-15</sup>, o perispinal<sup>16</sup>, ya que estas moléculas no atraviesan la BHE. En consecuencia, esos tratamientos son muy invasivos, y los gastos aumentan debido a la hospitalización y la atención médica<sup>197</sup>.

Los fármacos anti-TNF $\alpha$  deben evolucionar hacia biofármacos más eficientes, que actúen sistémicamente para que los tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas sean más seguros y efectivos, llegando al cerebro sin intervenciones agresivas. Aunque varias investigaciones se han centrado en el bloqueo de la interacción TNF $\alpha$  con sus receptores mediante pequeñas moléculas<sup>198</sup> o la inhibición selectiva del TNF $\alpha$  soluble<sup>199</sup>, pocas han explorado la permeabilidad en la BHE de TNFI<sup>119</sup>. El hecho de que existen escasos estudios sobre fármacos anti-TNF $\alpha$  que atraviesan las barreras cerebrales nos instó a desarrollar un nuevo TNFI con capacidad de penetración en la BHE. En este estudio, describimos el diseño *in silico* y el funcionamiento *in vitro* de la nueva molécula recombinante MTV. Esta proteína conjuga tres motivos: una secuencia de caballo de Troya molecular, un dominio de bloqueo del TNF $\alpha$  y un fragmento de dimerización.

Las citoquinas pueden ser bloqueadas por el uso de sus receptores solubles; sin embargo, el uso de este enfoque es limitado porque los receptores solubles monoméricos generalmente tienen una baja afinidad o funcionan como

agonistas<sup>200</sup>. Previamente se desarrollaron bloqueadores de alta afinidad llamados trampas de citoquinas, *cytokine traps*, mediante fusiones de la región constante de IgG1, como dimerizante, y los dominios extracelulares de los receptores de las citoquinas<sup>200</sup>. La tecnología *cytokine traps* se ha adaptado a las citoquinas con receptor hetero-multimérico, como los correspondientes a IL-1, IL-4, IL-6 y IL-13<sup>201</sup>. El mismo enfoque se utilizó para desarrollar el Etanercept (ENBREL®), bloqueador de TNFA aprobado por la FDA para el tratamiento de artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y psoriasis<sup>84</sup>. En el desarrollo del Etanercept se obtuvo un homodímero de TNFR2 mediante la fusión del ectodominio TNFR2 con la región Fc (fragmento cristizable) de la IgG1 humana<sup>202-203</sup>. La efectividad como TNFI fue evaluada para la molécula dimérica TNFR-Fc comparada con TNFR monomérico utilizando ensayo *in vitro* de inhibición del efecto citotóxico del TNF $\alpha$  en la línea celular de fibroblastos L929 e *in vivo*, evaluando su eficacia como antagonista del TNF $\alpha$  en el shock séptico inducido por polisacárido<sup>204</sup>. La molécula dimérica es un inhibidor del TNF $\alpha$ , entre 50 y 1000, más potente que el TNFR monomérico. Este antecedente apoya el uso del TNFR2 en forma dimérica para un bloqueo efectivo de TNF $\alpha$ .

La región constante de la IgG puede interactuar con los receptores Fc (FcR) para desencadenar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o

citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)<sup>205</sup>. En el desarrollo de anticuerpos como MTH en la BHE, se requiere una función efectora baja, especialmente cuando la diana terapéutica es una citoquina. Cuando Couch y col. analizaron la seguridad anticuerpos anti receptor de Transferrina (TfR) como MTH para el paso de la BHE a concentraciones terapéuticas, los ratones mostraron reacciones clínicas agudas y una reducción de los glóbulos rojos inmaduros. Estos efectos fueron eliminados por modificación de la región Fc para anular su interacción con las células del sistema inmune<sup>205</sup>. Por su parte Boado y col. eliminaron esta función no deseada utilizando la región Fc del isotipo IgG1 de ratón, que tiene una baja función efectora<sup>206</sup>. Adicionalmente, biofármacos modificados con región Fc pueden ser eliminados del cerebro hacia la sangre del SNC a través del receptor FcRn que se expresa en la cara apical de las células del endotelio vascular de la BHE<sup>207</sup>, disminuyendo sus concentraciones en el órgano diana. Tomando en cuenta estos antecedentes se decidió ensayar otro dominio de dimerización diferente de Fc para el diseño de la molécula recombinante descrita en este trabajo.

En nuestro diseño de un TNFI dimérico, el ectodominio del TNFR2 se fusionó con VEGF como dominio de dimerización, debido a su estabilidad estructural. La estructura dimérica del VEGF está estabilizada por un motivo nudo de Cisteína y una región central hidrofóbica. Adicionalmente, los monómeros están unidos

covalentemente por dos enlaces disulfuro simétricos entre las cadenas de Cys51 y Cys60<sup>97</sup>. La utilización del dominio VEGF como dimerizante hace necesario eliminar la funcionalidad biológica del dominio, sin afectar la funcionalidad estructural. Para suprimir la actividad proliferativa y angiogénica indeseada del VEGF, se llevaron a cabo mutaciones sistemáticas *in silico*. En el análisis se detectaron *hot spots*, correspondiente a aquellos residuos de aminoácidos involucrados en la unión del VEGF a sus receptores, FLTR-1 y KDR. El análisis *in silico* confirmó aquellos residuos ya identificados por ensayo experimental (R82A/K84A/H86A)<sup>102</sup> (Figura 12 y Tabla 2) y se detectaron dos nuevos residuos (Y21P/Y25G). Estos hallazgos se suman a las pruebas proporcionadas por Muller y col.<sup>97, 99</sup> que localizaron residuos de Y21 y Y25 adyacentes al sitio de unión del VEGFR y sus mutantes de alanina bloqueando estéricamente el acceso del VEGF a la superficie de unión con su receptor. De forma complementaria, un trabajo reciente usando *in silico screen* sugirió que los residuos Y21 y Y25 interactúan con una cavidad secundaria, esencialmente hidrofóbica y plana del VEGFR, afectando potencialmente su actividad angiogénica<sup>208</sup>, hecho consistente con la ausencia de actividad angiogénica del dominio VEGF mutado que se estudió en este trabajo (Figura 19 y Figura 20). El dominio VEGF propuesto, que incluye las mutaciones ya reportadas y las determinadas en este

estudio, podría utilizarse en otros diseños para obtener proteínas recombinantes diméricas.

## **6.2 Expresión, purificación y caracterización molecular de la proteína MTV.**

El dominio de dimerización del VEGF mutado se incluyó en el extremo carboxilo terminal del diseño de la proteína MTV (Figura 11). Para la producción de la proteína MTV se utilizó la línea celular CHO ya que genera modificaciones post-traduccionales características de células superiores necesarias para obtener las proteínas con estructura y funcionamiento similares a las nativas. Se confirmó la glicosilación de la proteína MTV secretada (Figura 17). Un perfil de glicosilación adecuado en MTV puede aumentar la estabilidad de la proteína recombinante, su vida media en la circulación sanguínea y disminuir su inmunogenicidad <sup>209</sup>.

En condiciones no reductoras se observaron monómeros de la proteína recombinante (Figura 18), un resultado no esperado dado la estabilidad del enlace en la molécula de VEGF. De las mutaciones incluidas en el dominio VEGF, para Y21P se estableció un cambio del aminoácido aromático Tirosina por uno cíclico, Prolina, en una hélice alfa de la estructura<sup>97</sup>. La prolina es el único aminoácido natural en el que el nitrógeno de la cadena lateral está unido al nitrógeno de la cadena principal, formando un anillo de pirrolidina de cinco

miembros, una característica que restringe notablemente el rango angular  $\phi$  en la formación de enlaces peptídicos<sup>210</sup>. Tomando en cuenta esta característica, se ha utilizado la sustitución de prolinas en varias proteínas con el objetivo de aumentar su estabilidad<sup>211-212</sup>, sin embargo por otro lado se conoce que prolinas situadas internamente en las  $\alpha$ -hélices o láminas  $\beta$  rompen las estructuras secundarias, desestabilizando así la proteína. La inclusión de la Prolina en el residuo 21, ubicado en una hélice alfa de la proteína recombinante MTV, pudiera ser responsable de que no toda la proteína se hay plegado formando dímeros.

En este trabajo se obtuvo una línea celular CHO transformada para la producción estable de la proteína MTV. La línea celular CHO es el sistema de mamíferos utilizado en la fabricación de más del 70 % de las proteínas recombinantes aprobadas actualmente como biofármacos<sup>213</sup>. En el proceso de purificación solo se incluyó un paso cromatográfico de separación por afinidad a iones metálicos, obteniéndose la proteína recombinante con un 86 % de pureza. El contaminante principal se detectó con una migración electroforética alrededor de los 63 kDa, por lo que un paso adicional que involucre exclusión molecular<sup>214</sup> podría utilizarse para alcanzar niveles superiores de pureza.

### **6.3 Caracterización del dominio bloqueador de TNF $\alpha$ en la proteína MTV.**

El motivo correspondiente al ectodominio del TNFR2 media la unión entre la proteína MTV y TNF $\alpha$ . La formación del complejo MTV-rhTNF $\alpha$  se confirmó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida por la presencia de la banda adicional correspondiente al complejo en condiciones nativas (Figura 21A). La afinidad de esta interacción fue entonces cuantificada mediante la técnica de termoforesis en microescala (MST). Esta metodología se basa en el movimiento de las moléculas en gradientes de temperatura microscópicos generados en una solución. Utilizando un enfoque de titulación, la MST permite cuantificar las interacciones de alta afinidad a través de la constante de disociación ( $K_d$ ) en el equilibrio de unión<sup>215</sup>. Dado que se utilizó un pH neutro para el etiquetado, se garantizó la incorporación de la etiqueta fluorescente sólo en el extremo amino terminal en la molécula de TNF $\alpha$ . La modificación de las aminas primarias, presentes en los residuos de aminoácidos básicos como la Lisina, podría interferir con la unión proteína-ligando. Se utilizó el Etanercept como referencia de la unión de TNF $\alpha$ , ya que es una proteína dimérica que además posee el mismo dominio de unión al TNF $\alpha$ , el dominio extracelular del TNFR2.

El valor obtenido de  $K_d$  para la unión MTV-rhTNF $\alpha$  ( $279 \pm 40.9$  nM) estuvo en el mismo rango y orden (nano-Molar) del valor de  $K_d$  para la interacción Etanercept-rhTNF $\alpha$  ( $235 \pm 96.7$  nM) (Figura 21B). En contraste, estudios previos de las interacciones entre TNF $\alpha$  y el ectodominio TNFR2 reportaron valores de  $K_d$  en el

rango pico-Molar a nano-Molar<sup>75, 81, 76-77, 216, 136</sup>. Aunque esto parece contradecir nuestra observación de valores de  $K_d$  superiores, la técnica de MST permitió cubrir un amplio rango de concentraciones (pM a  $\mu$ M) que no se han evaluado con anterioridad y los valores de  $K_d$  observados podrían corresponder a la formación de complejos con estequiometría superior a 1:1<sup>82</sup>. Para el caso de la proteína MTV debe tomarse en consideración que en su estructura existen dos elementos que pudiesen estar afectando la unión a TNF $\alpha$ : el Angiopeptido-2 en el extremo amino terminal, justo antes del TNFR2 y el dominio de dimerización VEGF mutado. Este último, posee un armazón compacto y estable proporcionado por el nudo de Cisteína<sup>98</sup> que contrasta con la flexibilidad que aporta la región bisagra presente en la región Fc de Etanercept. Adicionalmente se pudo comprobar que, en condiciones nativas, no toda la proteína formó dímeros. Esas diferencias estructurales y la posibilidad de una estequiometría diferente para MTV: TNF $\alpha$  pudiesen explicar los valores de  $K_d$  obtenidos.

La similitud entre las curvas obtenidas en la termoforesis sugiere que el MTV puede unirse a rhTNF $\alpha$  en la misma proporción de Etanercept, por lo que fue necesario un ensayo *in vitro* para evaluar su capacidad de neutralizar el efecto citotóxico de TNF $\alpha$  en el cultivo de células L929. El Etanercept mostró mayor potencia para bloquear el efecto citotóxico del rhTNF $\alpha$ , que se reflejó en un valor de  $EC_{50}$  más bajo. Sin embargo, ambas moléculas lograron restablecer la

viabilidad celular al mismo nivel (Figura 23). Una limitación técnica de esta medición fue que se utilizó una solución de proteína MTV con una pureza del 86 %, y a pesar de que los contaminantes no interfirieron con la viabilidad celular (Figura 22) es posible que estén interfiriendo con la capacidad de MTV para neutralización del TNF $\alpha$ . La presencia de monómeros en condiciones no reductoras pudiese estar hablando de una capacidad de neutralización disminuida, que ya ha sido previamente reportada <sup>84</sup>.

#### **6.4 Caracterización del dominio MTH en la proteína MTV**

El Angiopéptido-2 es el caballo de Troya molecular (MTH) peptídico más estudiado, cuya capacidad de penetración de BHE ha sido utilizada ampliamente para la administración de drogas en el SNC <sup>217, 141, 218-219</sup>. Este péptido penetrante de BHE activa la transcitosis en las células endoteliales de BHE como un ligando de LRP1 <sup>21</sup>, que se expresa ampliamente en todo el sistema nervioso central <sup>22</sup>. La unión de la proteína MTV y LRP1 se confirmó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas por la aparición de la banda adicional correspondiente al complejo (Figura 24A), comprobándose además su unión a los multímeros de LRP1 mediante reconocimiento por Western Blot. La afinidad de esta unión fue determinada por MST con valor de Kd en el orden nano-molar, lo que confirma una afinidad moderada de unión del Angiopep-2 al receptor LRP1 en el contexto de una proteína de fusión. Aunque se ha demostrado que el

transporte y la acumulación de Angiopep-2 en las células endoteliales del cerebro están mediados por LRP1<sup>21</sup>, nuestros estudios muestran una medición directa de la afinidad de la unión de Angiopep-2 y la molécula LRP1.

El ANG4043 es un conjugado entre el Angiopeptido-2 y mAb anti-HER2, con actividad potencial antiproliferativa contra las células de carcinoma ductal de mama HER2-positivo BT-474. En el contexto molecular de ANG4043, el Angiopeptido-2 mostró valores de Kd de 1.0 y 1.3 mM en su unión al cluster II y cluster IV del LRP1, respectivamente<sup>220</sup>, que representa una afinidad menor comparado con la proteína recombinante MTV. La afinidad moderada de la proteína MTV por el receptor LRP1 puede ser ventajosa para la transcitosis mediada por el receptor. Yu y cols.<sup>221</sup> reportaron que un anticuerpo con alta afinidad (Kd, 20 nM) por los receptores de transferrina permaneció asociado a la BHE, mientras que una variante de menor afinidad (600 nM) se disoció y alcanzó mayores concentraciones parenquimatosas.

Para evaluar la capacidad de transcitosis e internalización de la proteína MTV *in vitro*, realizamos ensayos en células bEnd3. La internalización de la proteína MTV se confirmó por microscopía de fluorescencia (Figura 26). Esta evidencia, junto con los resultados del ensayo de termoforesis a microescala, sugiere que la internalización de la proteína MTV en las células estaría mediada por el receptor LRP1. Esto concuerda con el hecho de que el dominio Angiopep-2 de la proteína

MTV funciona como lanzadera para su internalización en células endoteliales a través del receptor LRP1.

### **6.5 Identificación y caracterización de dAbs con capacidad de mediar transcitosis en modelo *in vitro* de BHE, vía LRP1.**

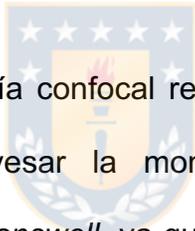
El LRP1 se expresa en una amplia gama de tejidos, así como en neuronas, astrocitos<sup>222</sup> y células del endotelio vascular de cerebro<sup>22</sup>. En las células endoteliales de la BHE, LRP1 es endocitado continuamente desde la membrana y reciclado de nuevo en un proceso rápido que no implica degradación inducida por el pH, lo que favorece el transporte de sus ligandos al SNC<sup>223</sup>. La transcitosis mediada por receptor LRP1 se convierte en una alternativa atractiva para el paso de la BHE y subsecuente administración de fármacos en el SNC. Nuevos ligandos de LRP1 pudieran facilitar la entrega de fármacos en el SNC, tras conjugarse covalentemente de forma similar a ANG1005<sup>25</sup>, que es el ejemplo más avanzado basado en transcitosis mediada por receptor (RMT). En este estudio, nos propusimos identificar nuevos ligandos de LRP1 para continuar desarrollando la tecnología de administración de fármacos al cerebro basada en este receptor.

Utilizando la tecnología de *Phage display*, tras 4 rondas de selección, se identificaron 5 secuencias diferentes de dAbs (Tabla 3) que reconocen al antígeno LRP1. El reconocimiento de los clones aislados por el antígeno LRP1

fue comprobado por ELISA y se evaluó adicionalmente la capacidad de los clones de realizar transcitosis en modelo *in vitro* de BHE. El modelo utilizado en este trabajo se basó en el crecimiento en monocapa de células del endotelio vascular en sistema transwell, y la formación de la barrera se monitorea por el aumento de la resistencia transendotelial (TEER). El sistema *transwell* con células bEnd3 alcanzó una TEER de 18.44 ohms x cm<sup>2</sup>, valor similar a lo reportado para esta misma línea celular por otros autores<sup>224-225</sup>. En sistemas que incluyen co-cultivos de células bEnd3 con pericitos y/o astrocitos se logran alcanzar mayores niveles de TEER que los reportados en este trabajo. Sin embargo, el número significativamente bajo de fagos que no expresan dAbs (KM13) y logran atravesar la barrera de células establecida (Figura 29), apoyan la validez de este sistema para comparar la capacidad de realizar transcitosis de los diferentes clones evaluados. Estos resultados están en concordancia con trabajos anteriores que consideran que la monocapa de células bEnd3 funciona como modelo *in vitro* para investigar el transporte de moléculas relativamente grandes<sup>224</sup>.

El clon D11, a pesar de tener una menor representación en las secuencias aisladas, realiza transcitosis en modelo *in vitro* de BHE significativamente mayor que el bacteriófago de origen (KM13) y que el clon B7. Este resultado puede estar asociado al sitio de reconocimiento en el LRP1 y a una mayor potencia de D11 para inducir internalización del receptor en el lado apical de las células

endoteliales, seguida de transcitosis y liberación en el lado basal. La longitud y composición de las secuencias CDR obtenidas son muy variables, especialmente en la CDR3. El análisis de la composición de aminoácidos para las regiones CDR3 de las secuencias dAbs obtenidas muestra la presencia de los residuos básicos Arginina (R) y Lisina (K) en la secuencia D11, no así para B7. Estudios previos explican el papel de los residuos básicos en el reconocimiento de diferentes ligandos por el LRP1<sup>226-227</sup>. Sin embargo, serían necesarios estudios adicionales para corroborar la importancia de estos residuos en el reconocimiento de D11 por LRP1.



Los ensayos con microscopía confocal refuerzan el criterio de que los clones seleccionados logran atravesar la monocapa de células para llegar al compartimento inferior del *transwell*, ya que tras el tiempo de incubación de 2h apenas se detectan fagos en el interior de las células. Aunque el control negativo KM13 se detectó en la superficie e interior de la célula, evidenciado en las diferentes secciones derivadas del Z-stack, no logra activar mecanismos de transcitosis (Figura 30). Estos resultados son congruentes con hallazgos previos que han demostrado que fagos no recombinantes entran en contacto con capas de células superiores y pueden interactuar con la membrana celular y adherirse a ella. Esta adherencia conduce a una internalización de los fagos asociados a la membrana a través de una macropinocitosis no específica<sup>228</sup>, lo que permite la

acumulación constante de fagos dentro de la célula hasta 18 h<sup>229</sup>. Sin embargo, para el caso de los clones evaluados, el tiempo de incubación permitió que los fagos atravesaran la barrera de células, muy probablemente por transcitosis mediada por el receptor LRP1, para aparecer en el compartimento inferior.

En la búsqueda ligandos del LRP1 para el paso de drogas al SNC se identificó el Angiopep-2<sup>23</sup> y se demostró que además que atraviesa la BHE. Este péptido conjugado con paclitaxel (ANG1005) está ahora en estudio de fase II para el tratamiento de las metástasis cerebrales recurrentes de pacientes con cáncer de mama previamente tratadas <sup>25</sup>. Utilizando metodología de *phage display*, fue seleccionado un nuevo péptido, L57 (TWPKHFDKHTFYLSILKLGKH-OH), que se une al cluster IV (Ser3332-Asp3779) del LRP1<sup>230</sup>. Estudios posteriores demostraron la internalización de L57 en cultivo de células endoteliales de la microvasculatura de cerebro<sup>25</sup>. No existen estudios previos que hayan obtenido dAbs como ligando de LRP1 y que haya confirmado, además, su capacidad de atravesar modelos *in vitro* de BHE.

Los compuestos terapéuticos atraviesan la BHE tras su asociación/conjugación con ligandos específicos formando MTH<sup>18</sup>. La administración de mayores cantidades de fármacos al SNC pudiera lograrse con su encapsulación en nanopartículas <sup>231</sup> modificadas en su superficie con ligandos capaces de desencadenar la RMT en las células de la BHE. Las nanopartículas más

utilizadas para mejorar el transporte de fármacos al cerebro son los liposomas, las nanopartículas poliméricas, las micelas, las nanopartículas de oro, las nanopartículas magnéticas, etc<sup>232</sup> y poseen un tamaño entre 1 y 100 nm<sup>233</sup>. La modificación de fago filamentoso con dAbs fusionados a la proteína pIII permitió el paso, a través de la monocapa de células, de una partícula viral que normalmente mide 900 nm de longitud y 6-7 nm de diámetro<sup>234</sup>. Cabría esperar, por tanto, la utilización con éxito de los dAbs acá obtenidos para funcionalizar nanopartículas conteniendo agentes terapéuticos para su paso a través de la BHE.

El pequeño tamaño (14 kDa) de los sdAb, su resistencia a las proteasas, y el reconocimiento específico del antígeno son ventajosos para la administración en la BHE en comparación con los péptidos o los anticuerpos convencionales<sup>235</sup>. A diferencia de los anticuerpos monoclonales convencionales, los dAbs pueden además producirse en grandes cantidades utilizando sistemas de expresión microbianos estándar. Los dAbs son extremadamente resistentes a la desnaturalización/degradación térmica, fáciles de manipular con solubilidad acuosa, con una accesibilidad superior a la hendidura crítica, y pueden unir antígenos en los niveles nM o sub-nM. Estos fragmentos de anticuerpos también presentan una penetración tisular, una distribución corporal y un aclaramiento sanguíneo superiores<sup>180</sup>.

Los primeros anticuerpos de dominio único reportados por su capacidad de realizar transcitosis mediada por el receptor a través de la BHE son FC5 y FC44<sup>236</sup>. Estas dos moléculas identificadas en 2002 se obtuvieron a partir de una biblioteca de fagos expresando región VHH (*Variable región of the Heavy-chain only antibodies-HCAbs*) de llama tras biopanning en células endoteliales humanas en sistema *transwell*. Adicionalmente se ha cuantificado su captación en el cerebro y se ha demostrado que es más de 10 veces superior a la de los controles<sup>237</sup>. Estos antecedentes sustentan la propuesta de utilizar los dAbs obtenidos como vectores potenciales para el paso de agentes terapéuticos a través de la BHE.



Los fagos, por si mismos, se consideran nano vectores. La partícula fágica posee varios rasgos benéficos potenciales, como la falta de tropismo natural por las células eucariotas, alta estabilidad y procedimientos sencillos de producción y manipulación<sup>238</sup>. Entre sus aplicaciones terapéuticas está su uso como vehículos de entrega de vacunas de proteínas<sup>239</sup> y de ADN<sup>240-241</sup>; como vectores de entrega de terapia génica<sup>242-243</sup>; como alternativas a los antibióticos<sup>244</sup>. Los fagos obtenidos en este trabajo, con capacidad potencial de atravesar la BHE, abren un amplio espectro de posibilidades para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

## VII. CONCLUSIONES

Mediante abordaje *in silico* se diseñó un nuevo TNFI dimérico, la proteína de fusión MTV, con una capacidad potencial para cruzar la BHE a través de la transcitosis mediada por LRP1. En la proteína de fusión se incluyó el Angiopeptido-2 como dominio MTH, un nuevo dominio de dimerización sin actividad biológica, VEGF mutado, para obtener un TNFI de alta afinidad y un dominio bloqueador de TNF $\alpha$ , TNFR2. La proteína MTV se une a rhTNF $\alpha$  con la misma afinidad que el Etanercept, y es capaz de inhibir el efecto citotóxico del rhTNF $\alpha$  en cultivo celular. La reingeniería de este eficaz TNFI biológico para su paso a través de la BHE se utilizó para obtener un fármaco candidato para el tratamiento de enfermedades del SNC después de la administración sistémica.

Adicionalmente, por tecnología de *phage display* se obtuvieron dAbs dirigidos a LRP1, que atraviesan modelos *in vitro* de BHE. Estos anticuerpos de dominio único pudieran utilizarse para modificar el dominio caballo de Troya molecular de la proteína MTV, como otros biofármacos o formulaciones que estén dirigidos al SNC. Es necesario evaluar la eficacia de la proteína MTV como TNFI y la capacidad de D11-dAbs para acceder al SNC tras administración sistemática en modelos murinos de enfermedades cerebrales agudas y crónicas.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Complementar estudios de microscopia confocal con marcadores de superficie celular para demostrar la internalización de las moléculas estudiadas.
- Futuras investigaciones en modelos murinos de enfermedades cerebrales agudas y crónicas son necesarias para evaluar la eficacia de la proteína MTV como TNFI y la capacidad de D11-dAbs para acceder al SNC tras administración sistémica.



## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1975**, *72* (9), 3666-70.
- [2]. Cabal-Hierro, L.; Lazo, P. S., Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cellular signalling* **2012**, *24* (6), 1297-305.
- [3]. Feuerstein, G. Z.; Liu, T.; Barone, F. C., Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews* **1994**, *6* (4), 341-60.
- [4]. Liu, T.; Clark, R. K.; McDonnell, P. C.; Young, P. R.; White, R. F.; Barone, F. C.; Feuerstein, G. Z., Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* **1994**, *25* (7), 1481-8.
- [5]. Goodman, J. C.; Robertson, C. S.; Grossman, R. G.; Narayan, R. K., Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *J Neuroimmunol* **1990**, *30* (2-3), 213-7.
- [6]. Raine, C. S.; Bonetti, B.; Cannella, B., Multiple sclerosis: expression of molecules of the tumor necrosis factor ligand and receptor families in relationship to the demyelinated plaque. *Rev Neurol (Paris)* **1998**, *154* (8-9), 577-85.
- [7]. Tarkowski, E.; Andreasen, N.; Tarkowski, A.; Blennow, K., Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **2003**, *74* (9), 1200-5.
- [8]. Alvarez, A.; Cacabelos, R.; Sanpedro, C.; Garcia-Fantini, M.; Aleixandre, M., Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **2007**, *28* (4), 533-6.
- [9]. Boka, G.; Anglade, P.; Wallach, D.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Hirsch, E. C., Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **1994**, *172* (1-2), 151-4.
- [10]. Mogi, M.; Togari, A.; Kondo, T.; Mizuno, Y.; Komure, O.; Kuno, S.; Ichinose, H.; Nagatsu, T., Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm (Vienna)* **2000**, *107* (3), 335-41.
- [11]. Bessler, H.; Djaldetti, R.; Salman, H.; Bergman, M.; Djaldetti, M., IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* **1999**, *53* (3), 141-5.
- [12]. McAlpine, F. E.; Lee, J. K.; Harms, A. S.; Ruhn, K. A.; Blurton-Jones, M.; Hong, J.; Das, P.; Golde, T. E.; LaFerla, F. M.; Oddo, S.; Blesch, A.; Tansey, M. G.,

Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiol Dis* **2009**, *34* (1), 163-77.

[13]. Shi, J. Q.; Shen, W.; Chen, J.; Wang, B. R.; Zhong, L. L.; Zhu, Y. W.; Zhu, H. Q.; Zhang, Q. Q.; Zhang, Y. D.; Xu, J., Anti-TNF-alpha reduces amyloid plaques and tau phosphorylation and induces CD11c-positive dendritic-like cell in the APP/PS1 transgenic mouse brains. *Brain Res* **2011**, *1368*, 239-47.

[14]. Shi, J. Q.; Wang, B. R.; Jiang, W. W.; Chen, J.; Zhu, Y. W.; Zhong, L. L.; Zhang, Y. D.; Xu, J., Cognitive improvement with intrathecal administration of infliximab in a woman with Alzheimer's disease. *Journal of the American Geriatrics Society* **2011**, *59* (6), 1142-4.

[15]. Kim, D. H.; Choi, S. M.; Jho, J.; Park, M. S.; Kang, J.; Park, S. J.; Ryu, J. H.; Jo, J.; Kim, H. H.; Kim, B. C., Infliximab ameliorates AD-associated object recognition memory impairment. *Behav Brain Res* **2016**, *311*, 384-391.

[16]. Tobinick, E., Perispinal etanercept for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **2007**, *4* (5), 550-2.

[17]. Tobinick, E., Deciphering the physiology underlying the rapid clinical effects of perispinal etanercept in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **2012**, *9* (1), 99-109.

[18]. Pardridge, W. M.; Boado, R. J., Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier. *Methods Enzymol* **2012**, *503*, 269-92.

[19]. Shibata, M.; Yamada, S.; Kumar, S. R.; Calero, M.; Bading, J.; Frangione, B.; Holtzman, D. M.; Miller, C. A.; Strickland, D. K.; Ghiso, J.; Zlokovic, B. V., Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* **2000**, *106* (12), 1489-99.

[20]. Deane, R.; Sagare, A.; Hamm, K.; Parisi, M.; Lane, S.; Finn, M. B.; Holtzman, D. M.; Zlokovic, B. V., apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* **2008**, *118* (12), 4002-13.

[21]. Demeule, M.; Currie, J. C.; Bertrand, Y.; Che, C.; Nguyen, T.; Regina, A.; Gabathuler, R.; Castaigne, J. P.; Beliveau, R., Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J Neurochem* **2008**, *106* (4), 1534-44.

[22]. Zhang, W.; Liu, Q. Y.; Haqqani, A. S.; Leclerc, S.; Liu, Z.; Fauteux, F.; Baumann, E.; Delaney, C. E.; Ly, D.; Star, A. T.; Brunette, E.; Sodja, C.; Hewitt, M.; Sandhu, J. K.; Stanimirovic, D. B., Differential expression of receptors mediating receptor-mediated transcytosis (RMT) in brain microvessels, brain parenchyma and peripheral tissues of the mouse and the human. *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17* (1), 47.

[23]. Demeule, M.; Regina, A.; Che, C.; Poirier, J.; Nguyen, T.; Gabathuler, R.; Castaigne, J. P.; Beliveau, R., Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther* **2008**, *324* (3), 1064-72.

[24]. Ke, W.; Shao, K.; Huang, R.; Han, L.; Liu, Y.; Li, J.; Kuang, Y.; Ye, L.; Lou, J.; Jiang, C., Gene delivery targeted to the brain using an Angiopep-conjugated

polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer. *Biomaterials* **2009**, *30* (36), 6976-85.

[25]. O'Sullivan, C. C.; Lindenberg, M.; Bryla, C.; Patronas, N.; Peer, C. J.; Amiri-Kordestani, L.; Davarpanah, N.; Gonzalez, E. M.; Burotto, M.; Choyke, P.; Steinberg, S. M.; Liewehr, D. J.; Figg, W. D.; Fojo, T.; Balasubramaniam, S.; Bates, S. E., ANG1005 for breast cancer brain metastases: correlation between (18)F-FLT-PET after first cycle and MRI in response assessment. *Breast Cancer Res Treat* **2016**, *160* (1), 51-59.

[26]. Friedmann, E.; Hauben, E.; Maylandt, K.; Schleege, S.; Vreugde, S.; Lichtenthaler, S. F.; Kuhn, P. H.; Stauffer, D.; Rovelli, G.; Martoglio, B., SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol* **2006**, *8* (8), 843-8.

[27]. Tzoran, I.; Rebibo-Sabbah, A.; Brenner, B.; Aharon, A., Disease dynamics in patients with acute myeloid leukemia: new biomarkers. *Experimental hematology* **2015**, *43* (11), 936-43.

[28]. Bradley, J. R., TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology* **2008**, *214* (2), 149-60.

[29]. Tang, P.; Hung, M. C.; Klostergaard, J., Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* **1996**, *35* (25), 8216-25.

[30]. Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F.; Castner, B. J.; Stocking, K. L.; Reddy, P.; Srinivasan, S.; Nelson, N.; Boiani, N.; Schooley, K. A.; Gerhart, M.; Davis, R.; Fitzner, J. N.; Johnson, R. S.; Paxton, R. J.; March, C. J.; Cerretti, D. P., A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **1997**, *385* (6618), 729-33.

[31]. Mitoma, H.; Horiuchi, T.; Hatta, N.; Tsukamoto, H.; Harashima, S.; Kikuchi, Y.; Otsuka, J.; Okamura, S.; Fujita, S.; Harada, M., Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha. *Gastroenterology* **2005**, *128* (2), 376-92.

[32]. Domonkos, A.; Udvardy, A.; Laszlo, L.; Nagy, T.; Duda, E., Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *Eur Cytokine Netw* **2001**, *12* (3), 411-9.

[33]. Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P., Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation* **2003**, *10* (1), 45-65.

[34]. Mukai, Y.; Nakamura, T.; Yoshikawa, M.; Yoshioka, Y.; Tsunoda, S.; Nakagawa, S.; Yamagata, Y.; Tsutsumi, Y., Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal* **2010**, *3* (148), ra83.

[35]. Banner, D. W.; D'Arcy, A.; Janes, W.; Gentz, R.; Schoenfeld, H. J.; Broger, C.; Loetscher, H.; Lesslauer, W., Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **1993**, *73* (3), 431-45.

- [36]. Locksley, R. M.; Killeen, N.; Lenardo, M. J., The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **2001**, *104* (4), 487-501.
- [37]. Tartaglia, L. A.; Ayres, T. M.; Wong, G. H.; Goeddel, D. V., A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **1993**, *74* (5), 845-53.
- [38]. Kalliolias, G. D.; Ivashkiv, L. B., TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* **2016**, *12* (1), 49-62.
- [39]. Grell, M.; Douni, E.; Wajant, H.; Lohden, M.; Clauss, M.; Maxeiner, B.; Georgopoulos, S.; Lesslauer, W.; Kollias, G.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P., The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **1995**, *83* (5), 793-802.
- [40]. Waters, J. P.; Poher, J. S.; Bradley, J. R., Tumour necrosis factor in infectious disease. *The Journal of pathology* **2013**, *230* (2), 132-47.
- [41]. Denes, A.; Thornton, P.; Rothwell, N. J.; Allan, S. M., Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun* **2010**, *24* (5), 708-23.
- [42]. Wang, J.; Yang, Z.; Liu, C.; Zhao, Y.; Chen, Y., Activated microglia provide a neuroprotective role by balancing glial cell-line derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor-alpha secretion after subacute cerebral ischemia. *Int J Mol Med* **2013**, *31* (1), 172-8.
- [43]. Song, J. H.; Lee, J. W.; Shim, B.; Lee, C. Y.; Choi, S.; Kang, C.; Sohn, N. W.; Shin, J. W., Glycyrrhizin alleviates neuroinflammation and memory deficit induced by systemic lipopolysaccharide treatment in mice. *Molecules* **2013**, *18* (12), 15788-803.
- [44]. Raffaele, S.; Lombardi, M.; Verderio, C.; Fumagalli, M., TNF Production and Release from Microglia via Extracellular Vesicles: Impact on Brain Functions. *Cells* **2020**, *9* (10),
- [45]. Frankola, K. A.; Greig, N. H.; Luo, W.; Tweedie, D., Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS & neurological disorders drug targets* **2011**, *10* (3), 391-403.
- [46]. Hofman, F. M.; Hinton, D. R.; Johnson, K.; Merrill, J. E., Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *The Journal of experimental medicine* **1989**, *170* (2), 607-12.
- [47]. Selmaj, K.; Raine, C. S.; Cannella, B.; Brosnan, C. F., Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *The Journal of clinical investigation* **1991**, *87* (3), 949-54.
- [48]. Sharief, M. K.; Hentges, R., Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **1991**, *325* (7), 467-72.
- [49]. Rieckmann, P.; Albrecht, M.; Kitze, B.; Weber, T.; Tumani, H.; Broocks, A.; Luer, W.; Helwig, A.; Poser, S., Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression

- in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Annals of neurology* **1995**, *37* (1), 82-8.
- [50]. Kempuraj, D.; Thangavel, R.; Natteru, P. A.; Selvakumar, G. P.; Saeed, D.; Zahoor, H.; Zaheer, S.; Iyer, S. S.; Zaheer, A., Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *Journal of neurology, neurosurgery and spine* **2016**, *1* (1),
- [51]. Yang, L.; Lindholm, K.; Konishi, Y.; Li, R.; Shen, Y., Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2002**, *22* (8), 3025-32.
- [52]. Chitnis, T.; Weiner, H. L., CNS inflammation and neurodegeneration. *J Clin Invest* **2017**, *127* (10), 3577-3587.
- [53]. Doll, D. N.; Rellick, S. L.; Barr, T. L.; Ren, X.; Simpkins, J. W., Rapid mitochondrial dysfunction mediates TNF-alpha-induced neurotoxicity. *Journal of neurochemistry* **2015**, *132* (4), 443-51.
- [54]. Olmos, G.; Llado, J., Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of inflammation* **2014**, *2014*, 861231.
- [55]. Sitcheran, R.; Gupta, P.; Fisher, P. B.; Baldwin, A. S., Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression. *The EMBO journal* **2005**, *24* (3), 510-20.
- [56]. Takeuchi, H.; Jin, S.; Wang, J.; Zhang, G.; Kawanokuchi, J.; Kuno, R.; Sonobe, Y.; Mizuno, T.; Suzumura, A., Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281* (30), 21362-8.
- [57]. Ye, L.; Huang, Y.; Zhao, L.; Li, Y.; Sun, L.; Zhou, Y.; Qian, G.; Zheng, J. C., IL-1beta and TNF-alpha induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *Journal of neurochemistry* **2013**, *125* (6), 897-908.
- [58]. Ferguson, A. R.; Christensen, R. N.; Gensel, J. C.; Miller, B. A.; Sun, F.; Beattie, E. C.; Bresnahan, J. C.; Beattie, M. S., Cell death after spinal cord injury is exacerbated by rapid TNF alpha-induced trafficking of GluR2-lacking AMPARs to the plasma membrane. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2008**, *28* (44), 11391-400.
- [59]. Beattie, E. C.; Stellwagen, D.; Morishita, W.; Bresnahan, J. C.; Ha, B. K.; Von Zastrow, M.; Beattie, M. S.; Malenka, R. C., Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* **2002**, *295* (5563), 2282-5.
- [60]. Stellwagen, D.; Malenka, R. C., Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature* **2006**, *440* (7087), 1054-9.
- [61]. Tancredi, V.; D'Arcangelo, G.; Grassi, F.; Tarroni, P.; Palmieri, G.; Santoni, A.; Eusebi, F., Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neuroscience letters* **1992**, *146* (2), 176-8.

- [62]. Albeni, B. C.; Mattson, M. P., Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* **2000**, *35* (2), 151-9.
- [63]. Wall, A. M.; Mukandala, G.; Greig, N. H.; O'Connor, J. J., Tumor necrosis factor-alpha potentiates long-term potentiation in the rat dentate gyrus after acute hypoxia. *J Neurosci Res* **2015**, *93* (5), 815-29.
- [64]. Liu, Y.; Zhou, L. J.; Wang, J.; Li, D.; Ren, W. J.; Peng, J.; Wei, X.; Xu, T.; Xin, W. J.; Pang, R. P.; Li, Y. Y.; Qin, Z. H.; Murugan, M.; Mattson, M. P.; Wu, L. J.; Liu, X. G., TNF-alpha Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci* **2017**, *37* (4), 871-881.
- [65]. Elliott, M. J.; Maini, R. N.; Feldmann, M.; Long-Fox, A.; Charles, P.; Bijl, H.; Woody, J. N., Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* **1994**, *344* (8930), 1125-7.
- [66]. Jin, J.; Chang, Y.; Wei, W., Clinical application and evaluation of anti-TNF-alpha agents for the treatment of rheumatoid arthritis. *Acta Pharmacol Sin* **2010**, *31* (9), 1133-40.
- [67]. Monaco, C.; Nanchahal, J.; Taylor, P.; Feldmann, M., Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol* **2015**, *27* (1), 55-62.
- [68]. Boehncke, W. H.; Schon, M. P., Psoriasis. *Lancet* **2015**, *386* (9997), 983-94.
- [69]. Campanati, A.; Paolinelli, M.; Diotallevi, F.; Martina, E.; Molinelli, E.; Offidani, A., Pharmacodynamics OF TNF alpha inhibitors for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2019**, *15* (11), 913-925.
- [70]. Greb, J. E.; Goldminz, A. M.; Elder, J. T.; Lebwohl, M. G.; Gladman, D. D.; Wu, J. J.; Mehta, N. N.; Finlay, A. Y.; Gottlieb, A. B., Psoriasis. *Nat Rev Dis Primers* **2016**, *2*, 16082.
- [71]. Cheifetz, A. S., Management of active Crohn disease. *JAMA* **2013**, *309* (20), 2150-8.
- [72]. Dulai, P. S.; Siegel, C. A.; Colombel, J. F.; Sandborn, W. J.; Peyrin-Biroulet, L., Systematic review: Monotherapy with antitumour necrosis factor alpha agents versus combination therapy with an immunosuppressive for IBD. *Gut* **2014**, *63* (12), 1843-53.
- [73]. Meroni, P. L.; Valesini, G., Tumour necrosis factor alpha antagonists in the treatment of rheumatoid arthritis: an immunological perspective. *BioDrugs* **2014**, *28 Suppl 1*, S5-13.
- [74]. Mitoma, H.; Horiuchi, T.; Tsukamoto, H.; Ueda, N., Molecular mechanisms of action of anti-TNF-alpha agents - Comparison among therapeutic TNF-alpha antagonists. *Cytokine* **2018**, *101*, 56-63.
- [75]. Kaymakcalan, Z.; Sakorafas, P.; Bose, S.; Scesney, S.; Xiong, L.; Hanzatian, D. K.; Salfeld, J.; Sasso, E. H., Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. *Clin Immunol* **2009**, *131* (2), 308-16.

- [76]. Shealy, D. J.; Cai, A.; Staquet, K.; Baker, A.; Lacy, E. R.; Johns, L.; Vafa, O.; Gunn, G., 3rd; Tam, S.; Sague, S.; Wang, D.; Brigham-Burke, M.; Dalmonte, P.; Emmell, E.; Pikounis, B.; Bugelski, P. J.; Zhou, H.; Scallon, B. J.; Giles-Komar, J., Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor alpha. *MAbs* **2010**, *2* (4), 428-39.
- [77]. van Schie, K. A.; Ooijevaar-de Heer, P.; Dijk, L.; Kruithof, S.; Wolbink, G.; Rispen, T., Therapeutic TNF Inhibitors can Differentially Stabilize Trimeric TNF by Inhibiting Monomer Exchange. *Sci Rep* **2016**, *6*, 32747.
- [78]. Ueda, N.; Tsukamoto, H.; Mitoma, H.; Ayano, M.; Tanaka, A.; Ohta, S.; Inoue, Y.; Arinobu, Y.; Niino, H.; Akashi, K.; Horiuchi, T., The cytotoxic effects of certolizumab pegol and golimumab mediated by transmembrane tumor necrosis factor alpha. *Inflamm Bowel Dis* **2013**, *19* (6), 1224-31.
- [79]. Szondy, Z.; Pallai, A., Transmembrane TNF-alpha reverse signaling leading to TGF-beta production is selectively activated by TNF targeting molecules: Therapeutic implications. *Pharmacol Res* **2017**, *115*, 124-132.
- [80]. Pallai, A.; Kiss, B.; Vereb, G.; Armaka, M.; Kollias, G.; Szekanecz, Z.; Szondy, Z., Transmembrane TNF-alpha Reverse Signaling Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Cytokine Formation in Macrophages by Inducing TGF-beta: Therapeutic Implications. *J Immunol* **2016**, *196* (3), 1146-57.
- [81]. Scallon, B.; Cai, A.; Solowski, N.; Rosenberg, A.; Song, X. Y.; Shealy, D.; Wagner, C., Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, *301* (2), 418-26.
- [82]. Contreras, M. A.; Macaya, L.; Neira, P.; Camacho, F.; Gonzalez, A.; Acosta, J.; Montesino, R.; Toledo, J. R.; Sanchez, O., New insights on the interaction mechanism of rhTNFalpha with its antagonists Adalimumab and Etanercept. *Biochem J* **2020**, *477* (17), 3299-3311.
- [83]. Kohno, T.; Tam, L. T.; Stevens, S. R.; Louie, J. S., Binding characteristics of tumor necrosis factor receptor-Fc fusion proteins vs anti-tumor necrosis factor mAbs. *J Investig Dermatol Symp Proc* **2007**, *12* (1), 5-8.
- [84]. Goffe, B.; Cather, J. C., Etanercept: An overview. *J Am Acad Dermatol* **2003**, *49* (2 Suppl), S105-11.
- [85]. Longo, F. M.; Massa, S. M., Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12* (7), 507-25.
- [86]. Lima Giacobbo, B.; Doorduyn, J.; Klein, H. C.; Dierckx, R.; Bromberg, E.; de Vries, E. F. J., Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol* **2019**, *56* (5), 3295-3312.
- [87]. Gill, S. S.; Patel, N. K.; Hotton, G. R.; O'Sullivan, K.; McCarter, R.; Bunnage, M.; Brooks, D. J.; Svendsen, C. N.; Heywood, P., Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* **2003**, *9* (5), 589-95.

- [88]. Slevin, J. T.; Gerhardt, G. A.; Smith, C. D.; Gash, D. M.; Kryscio, R.; Young, B., Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminial infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg* **2005**, *102* (2), 216-22.
- [89]. Thom, G.; Hatcher, J.; Hearn, A.; Paterson, J.; Rodrigo, N.; Beljean, A.; Gurrell, I.; Webster, C., Isolation of blood-brain barrier-crossing antibodies from a phage display library by competitive elution and their ability to penetrate the central nervous system. *MAbs* **2018**, *10* (2), 304-314.
- [90]. Brines, M., What evidence supports use of erythropoietin as a novel neurotherapeutic? *Oncology (Williston Park)* **2002**, *16* (9 Suppl 10), 79-89.
- [91]. Hernandez, C. C.; Burgos, C. F.; Gajardo, A. H.; Silva-Grecchi, T.; Gavilan, J.; Toledo, J. R.; Fuentealba, J., Neuroprotective effects of erythropoietin on neurodegenerative and ischemic brain diseases: the role of erythropoietin receptor. *Neural Regen Res* **2017**, *12* (9), 1381-1389.
- [92]. Kim, D. H.; Choi, S. M.; Jho, J.; Park, M. S.; Kang, J.; Park, S. J.; Ryu, J. H.; Jo, J.; Kim, H. H.; Kim, B. C., Infliximab ameliorates AD-associated object recognition memory impairment. *Behavioural brain research* **2016**, *311*, 384-91.
- [93]. Tobinick, E., Tumour necrosis factor modulation for treatment of Alzheimer's disease: rationale and current evidence. *CNS drugs* **2009**, *23* (9), 713-25.
- [94]. Tobinick, E., Perispinal etanercept advances as a neurotherapeutic. *Expert Rev Neurother* **2018**, *18* (6), 453-455.
- [95]. Tobinick, E.; Gross, H.; Weinberger, A.; Cohen, H., TNF-alpha modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study. *MedGenMed* **2006**, *8* (2), 25.
- [96]. Leung, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **1989**, *246* (4935), 1306-9.
- [97]. Muller, Y. A.; Christinger, H. W.; Keyt, B. A.; de Vos, A. M., The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* **1997**, *5* (10), 1325-38.
- [98]. Iyer, S.; Acharya, K. R., Tying the knot: the cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines. *FEBS J* **2011**, *278* (22), 4304-22.
- [99]. Muller, Y. A.; Li, B.; Christinger, H. W.; Wells, J. A.; Cunningham, B. C.; de Vos, A. M., Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (14), 7192-7.
- [100]. Seetharam, L.; Gotoh, N.; Maru, Y.; Neufeld, G.; Yamaguchi, S.; Shibuya, M., A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* **1995**, *10* (1), 135-47.

- [101]. Brozzo, M. S.; Bjelic, S.; Kisko, K.; Schleier, T.; Leppanen, V. M.; Alitalo, K.; Winkler, F. K.; Ballmer-Hofer, K., Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. *Blood* **2012**, *119* (7), 1781-8.
- [102]. Keyt, B. A.; Nguyen, H. V.; Berleau, L. T.; Duarte, C. M.; Park, J.; Chen, H.; Ferrara, N., Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **1996**, *271* (10), 5638-46.
- [103]. Hawkins, B. T.; Davis, T. P., The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **2005**, *57* (2), 173-85.
- [104]. Abbott, N. J.; Patabendige, A. A.; Dolman, D. E.; Yusof, S. R.; Begley, D. J., Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* **2010**, *37* (1), 13-25.
- [105]. Jones, A. R.; Shusta, E. V., Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res* **2007**, *24* (9), 1759-71.
- [106]. Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M., The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* **2004**, *16* (1), 1-13.
- [107]. Miller, G., Drug targeting. Breaking down barriers. *Science* **2002**, *297* (5584), 1116-8.
- [108]. Poduslo, J. F.; Curran, G. L.; Berg, C. T., Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91* (12), 5705-9.
- [109]. Goulatis, L. I.; Shusta, E. V., Protein engineering approaches for regulating blood-brain barrier transcytosis. *Curr Opin Struct Biol* **2017**, *45*, 109-115.
- [110]. Abdul Razzak, R.; Florence, G. J.; Gunn-Moore, F. J., Approaches to CNS Drug Delivery with a Focus on Transporter-Mediated Transcytosis. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (12),
- [111]. Geier, E. G.; Schlessinger, A.; Fan, H.; Gable, J. E.; Irwin, J. J.; Sali, A.; Giacomini, K. M., Structure-based ligand discovery for the Large-neutral Amino Acid Transporter 1, LAT-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (14), 5480-5.
- [112]. Lu, W., Adsorptive-mediated brain delivery systems. *Curr Pharm Biotechnol* **2012**, *13* (12), 2340-8.
- [113]. Herve, F.; Ghinea, N.; Scherrmann, J. M., CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J* **2008**, *10* (3), 455-72.
- [114]. Cao, G.; Pei, W.; Ge, H.; Liang, Q.; Luo, Y.; Sharp, F. R.; Lu, A.; Ran, R.; Graham, S. H.; Chen, J., In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* **2002**, *22* (13), 5423-31.
- [115]. Kilic, E.; Kilic, U.; Hermann, D. M., TAT-GDNF in neurodegeneration and ischemic stroke. *CNS Drug Rev* **2005**, *11* (4), 369-78.
- [116]. Afergan, E.; Epstein, H.; Dahan, R.; Koroukhov, N.; Rohekar, K.; Danenberg, H. D.; Golomb, G., Delivery of serotonin to the brain by monocytes following phagocytosis of liposomes. *J Control Release* **2008**, *132* (2), 84-90.

- [117]. Jain, S.; Mishra, V.; Singh, P.; Dubey, P. K.; Saraf, D. K.; Vyas, S. P., RGD-anchored magnetic liposomes for monocytes/neutrophils-mediated brain targeting. *Int J Pharm* **2003**, *261* (1-2), 43-55.
- [118]. Boado, R. J.; Lu, J. Z.; Hui, E. K.; Pardridge, W. M., Insulin receptor antibody-sulfamidase fusion protein penetrates the primate blood-brain barrier and reduces glycosaminoglycans in Sanfilippo type A cells. *Mol Pharm* **2014**, *11* (8), 2928-34.
- [119]. Chang, R.; Knox, J.; Chang, J.; Derbedrossian, A.; Vasilevko, V.; Cribbs, D.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M.; Sumbria, R. K., Blood-Brain Barrier Penetrating Biologic TNF-alpha Inhibitor for Alzheimer's Disease. *Mol Pharm* **2017**, *14* (7), 2340-2349.
- [120]. Pardridge, W. M., Blood-brain barrier drug delivery of IgG fusion proteins with a transferrin receptor monoclonal antibody. *Expert Opin Drug Deliv* **2015**, *12* (2), 207-22.
- [121]. Pardridge, W. M., Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1* (2), 131-9.
- [122]. Begley, D. J.; Brightman, M. W., Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res* **2003**, *61*, 39-78.
- [123]. Oller-Salvia, B.; Sanchez-Navarro, M.; Giralt, E.; Teixido, M., Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chemical Society reviews* **2016**, *45* (17), 4690-707.
- [124]. Pardridge, W. M.; Kang, Y. S.; Buciak, J. L.; Yang, J., Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood-brain barrier in vivo in the primate. *Pharmaceutical research* **1995**, *12* (6), 807-16.
- [125]. Pardridge, W. M.; Kang, Y. S.; Buciak, J. L., Transport of human recombinant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through the rat blood-brain barrier in vivo using vector-mediated peptide drug delivery. *Pharmaceutical research* **1994**, *11* (5), 738-46.
- [126]. Pardridge, W. M.; Buciak, J. L.; Friden, P. M., Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **1991**, *259* (1), 66-70.
- [127]. Wu, D.; Yang, J.; Pardridge, W. M., Drug targeting of a peptide radiopharmaceutical through the primate blood-brain barrier in vivo with a monoclonal antibody to the human insulin receptor. *The Journal of clinical investigation* **1997**, *100* (7), 1804-12.
- [128]. Boado, R. J.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Pardridge, W. M., Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnology and bioengineering* **2007**, *96* (2), 381-91.
- [129]. Ulbrich, K.; Hekmatara, T.; Herbert, E.; Kreuter, J., Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official*

*journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2009**, 71 (2), 251-6.

[130]. Niewoehner, J.; Bohrmann, B.; Collin, L.; Urich, E.; Sade, H.; Maier, P.; Rueger, P.; Stracke, J. O.; Lau, W.; Tissot, A. C.; Loetscher, H.; Ghosh, A.; Freskgard, P. O., Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* **2014**, 81 (1), 49-60.

[131]. Hui, E. K.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M., Tumor necrosis factor receptor-IgG fusion protein for targeted drug delivery across the human blood-brain barrier. *Molecular pharmaceutics* **2009**, 6 (5), 1536-43.

[132]. Zhou, Q. H.; Boado, R. J.; Hui, E. K.; Lu, J. Z.; Pardridge, W. M., Brain-penetrating tumor necrosis factor decoy receptor in the mouse. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2011**, 39 (1), 71-6.

[133]. Pardridge, W. M., Biologic TNFalpha-inhibitors that cross the human blood-brain barrier. *Bioengineered bugs* **2010**, 1 (4), 231-4.

[134]. Sumbria, R. K.; Zhou, Q. H.; Hui, E. K.; Lu, J. Z.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M., Pharmacokinetics and brain uptake of an IgG-TNF decoy receptor fusion protein following intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous administration in mice. *Molecular pharmaceutics* **2013**, 10 (4), 1425-31.

[135]. Sumbria, R. K.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M., Brain protection from stroke with intravenous TNFalpha decoy receptor-Trojan horse fusion protein. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2012**, 32 (10), 1933-8.

[136]. Zhou, Q. H.; Sumbria, R.; Hui, E. K.; Lu, J. Z.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M., Neuroprotection with a brain-penetrating biologic tumor necrosis factor inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* **2011**, 339 (2), 618-23.

[137]. Chang, R.; Knox, J.; Chang, J.; Derbedrossian, A.; Vasilevko, V.; Cribbs, D.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M.; Sumbria, R. K., Blood-Brain Barrier Penetrating Biologic TNF-alpha Inhibitor for Alzheimer's Disease. *Molecular pharmaceutics* **2017**,

[138]. Deane, R.; Wu, Z.; Sagare, A.; Davis, J.; Du Yan, S.; Hamm, K.; Xu, F.; Parisi, M.; LaRue, B.; Hu, H. W.; Spijkers, P.; Guo, H.; Song, X.; Lenting, P. J.; Van Nostrand, W. E.; Zlokovic, B. V., LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* **2004**, 43 (3), 333-44.

[139]. Pan, W.; Kastin, A. J.; Zankel, T. C.; van Kerkhof, P.; Terasaki, T.; Bu, G., Efficient transfer of receptor-associated protein (RAP) across the blood-brain barrier. *J Cell Sci* **2004**, 117 (Pt 21), 5071-8.

[140]. Benchenane, K.; Berezowski, V.; Ali, C.; Fernandez-Monreal, M.; Lopez-Atalaya, J. P.; Brillault, J.; Chuquet, J.; Nouvelot, A.; MacKenzie, E. T.; Bu, G.; Cecchelli, R.; Touzani, O.; Vivien, D., Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* **2005**, 111 (17), 2241-9.

- [141]. Wang, X.; Xiong, Z.; Liu, Z.; Huang, X.; Jiang, X., Angiopep-2/IP10-EGFRvIIIscFv modified nanoparticles and CTL synergistically inhibit malignant glioblastoma. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 12827.
- [142]. Smith, G. P., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **1985**, *228* (4705), 1315-7.
- [143]. Saw, P. E.; Song, E. W., Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. *Protein Cell* **2019**, *10* (11), 787-807.
- [144]. Omidfar, K.; Daneshpour, M., Advances in phage display technology for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **2015**, *10* (6), 651-69.
- [145]. Zambrano-Mila, M. S.; Blacio, K. E. S.; Vispo, N. S., Peptide Phage Display: Molecular Principles and Biomedical Applications. *Ther Innov Regul Sci* **2020**, *54* (2), 308-317.
- [146]. Mimmi, S.; Maisano, D.; Quinto, I.; Iaccino, E., Phage Display: An Overview in Context to Drug Discovery. *Trends Pharmacol Sci* **2019**, *40* (2), 87-91.
- [147]. Pande, J.; Szcwzyk, M. M.; Grover, A. K., Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv* **2010**, *28* (6), 849-58.
- [148]. Caberoy, N. B.; Zhou, Y.; Jiang, X.; Alvarado, G.; Li, W., Efficient identification of tubby-binding proteins by an improved system of T7 phage display. *J Mol Recognit* **2010**, *23* (1), 74-83.
- [149]. Fuh, G.; Pisabarro, M. T.; Li, Y.; Quan, C.; Lasky, L. A.; Sidhu, S. S., Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display. *J Biol Chem* **2000**, *275* (28), 21486-91.
- [150]. Hertveldt, K.; Belien, T.; Volckaert, G., General M13 phage display: M13 phage display in identification and characterization of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* **2009**, *502*, 321-39.
- [151]. Hekim, C.; Leinonen, J.; Narvanen, A.; Koistinen, H.; Zhu, L.; Koivunen, E.; Vaisanen, V.; Stenman, U. H., Novel peptide inhibitors of human kallikrein 2. *J Biol Chem* **2006**, *281* (18), 12555-60.
- [152]. Perea, S. E.; Reyes, O.; Puchades, Y.; Mendoza, O.; Vispo, N. S.; Torrens, I.; Santos, A.; Silva, R.; Acevedo, B.; Lopez, E.; Falcon, V.; Alonso, D. F., Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res* **2004**, *64* (19), 7127-9.
- [153]. Santiago Vispo, N.; Camacho, F.; Pupo Antúnez, M.; Toledo, R.; Sánchez Ramos, O., Display technology on filamentous phage in the search for anti-infective biological agents. *Bionatura* **2016**, *1* (1), 22-29.
- [154]. Bratkovic, T., Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cell Mol Life Sci* **2010**, *67* (5), 749-67.
- [155]. Bottger, V.; Bottger, A., Epitope mapping using phage display peptide libraries. *Methods Mol Biol* **2009**, *524*, 181-201.

- [156]. Wang, L. F.; Yu, M., Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Curr Drug Targets* **2004**, *5* (1), 1-15.
- [157]. Perez, A.; Mier, E. S.; Vispo, N. S.; Vazquez, A. M.; Perez Rodriguez, R., A monoclonal antibody against NeuGc-containing gangliosides contains a regulatory idiotope involved in the interaction with B and T cells. *Mol Immunol* **2002**, *39* (1-2), 103-12.
- [158]. Vispo, N. S.; Arana, M. J.; China, G.; Ojalvo, A. G.; Cesareni, G., Characterization of epitopes on human interleukin-2 using phage displayed-peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *Hybridoma* **1999**, *18* (3), 251-5.
- [159]. Menendez, T.; Santiago-Vispo, N. F.; Cruz-Leal, Y.; Coizeau, E.; Garay, H.; Reyes, O.; Batista, Y.; Cobas, K.; Carmenate, T.; China, G.; Guillen, G., Identification and characterization of phage-displayed peptide mimetics of *Neisseria meningitidis* serogroup B capsular polysaccharide. *Int J Med Microbiol* **2011**, *301* (1), 16-25.
- [160]. Rojas, G.; Pupo, A.; Del Rosario Aleman, M.; Vispo, N. S., Preferential selection of Cys-constrained peptides from a random phage-displayed library by anti-glucitollysine antibodies. *J Pept Sci* **2008**, *14* (11), 1216-21.
- [161]. Cramer, R.; Suter, M., Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* **1993**, *137* (1), 69-75.
- [162]. Hertveldt, K.; Robben, J.; Volckaert, G., Whole genome phage display selects for proline-rich Boi polypeptides against Bem1p. *Biotechnol Lett* **2006**, *28* (16), 1233-9.
- [163]. Hust, M.; Frenzel, A.; Meyer, T.; Schirrmann, T.; Dubel, S., Construction of human naive antibody gene libraries. *Methods Mol Biol* **2012**, *907*, 85-107.
- [164]. Brunet, E.; Chauvin, C.; Choumet, V.; Jestin, J. L., A novel strategy for the functional cloning of enzymes using filamentous phage display: the case of nucleotidyl transferases. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30* (9), e40.
- [165]. Prieto, Y.; Sanchez, O., Self-complementary sequences induce the formation of double-stranded filamentous phages. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1770* (8), 1081-4.
- [166]. Fernandez, L. A.; Muyldermans, S., Recent developments in engineering and delivery of protein and antibody therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* **2011**, *22* (6), 839-42.
- [167]. Saerens, D.; Frederix, F.; Reekmans, G.; Conrath, K.; Jans, K.; Brys, L.; Huang, L.; Bosmans, E.; Maes, G.; Borghs, G.; Muyldermans, S., Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. *Anal Chem* **2005**, *77* (23), 7547-55.
- [168]. Market, E.; Papavasiliou, F. N., V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol* **2003**, *1* (1), E16.

- [169]. Hassanzadeh-Ghassabeh, G.; Devoogdt, N.; De Pauw, P.; Vincke, C.; Muyldermans, S., Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)* **2013**, *8* (6), 1013-26.
- [170]. Holt, L. J.; Herring, C.; Jespers, L. S.; Woolven, B. P.; Tomlinson, I. M., Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol* **2003**, *21* (11), 484-90.
- [171]. Nelson, A. L., Antibody fragments: hope and hype. *MAbs* **2010**, *2* (1), 77-83.
- [172]. Zhang, J.; Tanha, J.; Hiramata, T.; Khieu, N. H.; To, R.; Tong-Sevinc, H.; Stone, E.; Brisson, J. R.; MacKenzie, C. R., Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *J Mol Biol* **2004**, *335* (1), 49-56.
- [173]. Xia, J.; Zhang, Y.; Qian, J.; Zhu, X.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Zhao, G., Isolation, identification and expression of specific human CD133 antibodies. *Sci Rep* **2013**, *3*, 3320.
- [174]. Doshi, R.; Chen, B. R.; Vibat, C. R.; Huang, N.; Lee, C. W.; Chang, G., In vitro nanobody discovery for integral membrane protein targets. *Sci Rep* **2014**, *4*, 6760.
- [175]. Ebrahimzadeh, W.; Mousavi Gargari, S.; Rajabibazl, M.; Safaee Ardekani, L.; Zare, H.; Bakherad, H., Isolation and characterization of protective anti-LPS nanobody against *V. cholerae* O1 recognizing Inaba and Ogawa serotypes. *Appl Microbiol Biotechnol* **2013**, *97* (10), 4457-66.
- [176]. Hamers-Casterman, C.; Atarhouch, T.; Muyldermans, S.; Robinson, G.; Hamers, C.; Songa, E. B.; Bendahman, N.; Hamers, R., Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **1993**, *363* (6428), 446-8.
- [177]. Greenberg, A. S.; Avila, D.; Hughes, M.; Hughes, A.; McKinney, E. C.; Flajnik, M. F., A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* **1995**, *374* (6518), 168-73.
- [178]. Van de Broek, B.; Devoogdt, N.; D'Hollander, A.; Gijs, H. L.; Jans, K.; Lagae, L.; Muyldermans, S.; Maes, G.; Borghs, G., Specific cell targeting with nanobody conjugated branched gold nanoparticles for photothermal therapy. *ACS Nano* **2011**, *5* (6), 4319-28.
- [179]. Ward, E. S.; Gussow, D.; Griffiths, A. D.; Jones, P. T.; Winter, G., Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* **1989**, *341* (6242), 544-6.
- [180]. Belanger, K.; Iqbal, U.; Tanha, J.; MacKenzie, R.; Moreno, M.; Stanimirovic, D., Single-Domain Antibodies as Therapeutic and Imaging Agents for the Treatment of CNS Diseases. *Antibodies (Basel)* **2019**, *8* (2),
- [181]. van der Linden, R. H.; Frenken, L. G.; de Geus, B.; Harmsen, M. M.; Ruuls, R. C.; Stok, W.; de Ron, L.; Wilson, S.; Davis, P.; Verrips, C. T., Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1431* (1), 37-46.
- [182]. Stewart, C. S.; MacKenzie, C. R.; Hall, J. C., Isolation, characterization and pentamerization of alpha-cobrotoxin specific single-domain antibodies from a naive

- phage display library: preliminary findings for antivenom development. *Toxicon* **2007**, *49* (5), 699-709.
- [183]. McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G.; Chiswell, D. J., Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **1990**, *348* (6301), 552-4.
- [184]. Lee, C. M.; Iorno, N.; Sierro, F.; Christ, D., Selection of human antibody fragments by phage display. *Nat Protoc* **2007**, *2* (11), 3001-8.
- [185]. Bravo, F. E.; Parra, N. C.; Camacho, F.; Acosta, J.; Gonzalez, A.; Toledo, J. R.; Sanchez, O., Fluorescence-assisted sequential insertion of transgenes (FASIT): an approach for increasing specific productivity in mammalian cells. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 12840.
- [186]. Kristensen, P.; Winter, G., Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold Des* **1998**, *3* (5), 321-8.
- [187]. Hoogenboom, H. R.; Griffiths, A. D.; Johnson, K. S.; Chiswell, D. J.; Hudson, P.; Winter, G., Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* **1991**, *19* (15), 4133-7.
- [188]. Parra, N. C.; Mansilla, R.; Aedo, G.; Vispo, N. S.; Gonzalez-Horta, E. E.; Gonzalez-Chavarria, I.; Castillo, C.; Camacho, F.; Sanchez, O., Expression and Characterization of Human Vascular Endothelial Growth Factor Produced in SiHa Cells Transduced with Adenoviral Vector. *Protein J* **2019**, *38* (6), 693-703.
- [189]. Liang, C. C.; Park, A. Y.; Guan, J. L., In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* **2007**, *2* (2), 329-33.
- [190]. Nicosia, R. F.; Ottinetti, A., Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* **1990**, *63* (1), 115-22.
- [191]. Thorn, K. S.; Bogan, A. A., ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions. *Bioinformatics* **2001**, *17* (3), 284-5.
- [192]. Brochet, X.; Lefranc, M. P.; Giudicelli, V., IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (Web Server issue), W503-8.
- [193]. Chen, X.; Zaro, J. L.; Shen, W. C., Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, *65* (10), 1357-69.
- [194]. Presta, L. G.; Chen, H.; O'Connor, S. J.; Chisholm, V.; Meng, Y. G.; Krummen, L.; Winkler, M.; Ferrara, N., Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* **1997**, *57* (20), 4593-9.

- [195]. Kastritis, P. L.; Moal, I. H.; Hwang, H.; Weng, Z.; Bates, P. A.; Bonvin, A. M.; Janin, J., A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity. *Protein Sci* **2011**, *20* (3), 482-91.
- [196]. Brown, R. C.; Morris, A. P.; O'Neil, R. G., Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res* **2007**, *1130* (1), 17-30.
- [197]. Lopetuso, L. R.; Gerardi, V.; Papa, V.; Scaldaferrri, F.; Rapaccini, G. L.; Gasbarrini, A.; Papa, A., Can We Predict the Efficacy of Anti-TNF-alpha Agents? *Int J Mol Sci* **2017**, *18* (9),
- [198]. O'Connell, J.; Porter, J.; Kroeplien, B.; Norman, T.; Rapecki, S.; Davis, R.; McMillan, D.; Arakaki, T.; Burgin, A.; Fox Iii, D.; Ceska, T.; Lecomte, F.; Maloney, A.; Vugler, A.; Carrington, B.; Cossins, B. P.; Bourne, T.; Lawson, A., Small molecules that inhibit TNF signalling by stabilising an asymmetric form of the trimer. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 5795.
- [199]. Fischer, R.; Kontermann, R. E.; Maier, O., Targeting sTNF/TNFR1 Signaling as a New Therapeutic Strategy. *Antibodies* **2015**, *4* (1), 48-70.
- [200]. Economides, A. N.; Carpenter, L. R.; Rudge, J. S.; Wong, V.; Koehler-Stec, E. M.; Hartnett, C.; Pyles, E. A.; Xu, X.; Daly, T. J.; Young, M. R.; Fandl, J. P.; Lee, F.; Carver, S.; McNay, J.; Bailey, K.; Ramakanth, S.; Hutabarat, R.; Huang, T. T.; Radziejewski, C.; Yancopoulos, G. D.; Stahl, N., Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med* **2003**, *9* (1), 47-52.
- [201]. Dembic, Z., Chapter 1 - Introduction—Common Features About Cytokines. In *The Cytokines of the Immune System*, Dembic, Z., Ed. Academic Press: Cambridge, Massachusetts, 2015; pp 1-16.
- [202]. Moreland, L. W.; Baumgartner, S. W.; Schiff, M. H.; Tindall, E. A.; Fleischmann, R. M.; Weaver, A. L.; Ettliger, R. E.; Cohen, S.; Koopman, W. J.; Mohler, K.; Widmer, M. B.; Blosch, C. M., Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* **1997**, *337* (3), 141-7.
- [203]. Murray, K. M.; Dahl, S. L., Recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75) Fc fusion protein (TNFR:Fc) in rheumatoid arthritis. *Ann Pharmacother* **1997**, *31* (11), 1335-8.
- [204]. Mohler, K. M.; Torrance, D. S.; Smith, C. A.; Goodwin, R. G.; Stremmler, K. E.; Fung, V. P.; Madani, H.; Widmer, M. B., Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* **1993**, *151* (3), 1548-61.
- [205]. Couch, J. A.; Yu, Y. J.; Zhang, Y.; Tarrant, J. M.; Fuji, R. N.; Meilandt, W. J.; Solanoy, H.; Tong, R. K.; Hoyte, K.; Luk, W.; Lu, Y.; Gadkar, K.; Prabhu, S.; Ordonia, B. A.; Nguyen, Q.; Lin, Y.; Lin, Z.; Balazs, M.; Scarce-Levie, K.; Ernst, J. A.; Dennis,

- M. S.; Watts, R. J., Addressing safety liabilities of TfR bispecific antibodies that cross the blood-brain barrier. *Sci Transl Med* **2013**, *5* (183), 183ra57, 1-12.
- [206]. Boado, R. J.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Pardridge, W. M., Engineering and expression of a chimeric transferrin receptor monoclonal antibody for blood-brain barrier delivery in the mouse. *Biotechnol Bioeng* **2009**, *102* (4), 1251-8.
- [207]. Zhang, Y.; Pardridge, W. M., Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* **2001**, *114* (1-2), 168-72.
- [208]. Gautier, B.; Miteva, M. A.; Goncalves, V.; Huguenot, F.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Seijo, B.; Gaucher, J. F.; Broutin, I.; Garbay, C.; Lesnard, A.; Rault, S.; Inguibert, N.; Villoutreix, B. O.; Vidal, M., Targeting the proangiogenic VEGF-VEGFR protein-protein interface with drug-like compounds by in silico and in vitro screening. *Chem Biol* **2011**, *18* (12), 1631-9.
- [209]. Lalonde, M. E.; Durocher, Y., Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol* **2017**, *251*, 128-140.
- [210]. Schimmel, P. R.; Flory, P. J., Conformational energies and configurational statistics of copolypeptides containing L-proline. *J Mol Biol* **1968**, *34* (1), 105-20.
- [211]. Matthews, B. W.; Nicholson, H.; Becktel, W. J., Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84* (19), 6663-7.
- [212]. Choi, E. J.; Mayo, S. L., Generation and analysis of proline mutants in protein G. *Protein Eng Des Sel* **2006**, *19* (6), 285-9.
- [213]. Butler, M.; Spearman, M., The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr Opin Biotechnol* **2014**, *30*, 107-12.
- [214]. Burgess, R. R., A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. *Protein Expr Purif* **2018**, *150*, 81-85.
- [215]. Jerabek-Willemsen, M.; Wienken, C. J.; Braun, D.; Baaske, P.; Duhr, S., Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* **2011**, *9* (4), 342-53.
- [216]. Yang, T.; Wang, Z.; Wu, F.; Tan, J.; Shen, Y.; Li, E.; Dai, J.; Shen, R.; Li, G.; Wu, J.; Wang, L.; Wang, H.; Liu, Y., A variant of TNFR2-Fc fusion protein exhibits improved efficacy in treating experimental rheumatoid arthritis. *PLoS Comput Biol* **2010**, *6* (2), e1000669.
- [217]. Hoyos-Ceballos, G. P.; Ruozi, B.; Ottonelli, I.; Da Ros, F.; Vandelli, M. A.; Forni, F.; Daini, E.; Vilella, A.; Zoli, M.; Tosi, G.; Duskey, J. T.; Lopez-Osorio, B. L., PLGA-PEG-ANG-2 Nanoparticles for Blood-Brain Barrier Crossing: Proof-of-Concept Study. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (1),
- [218]. Li, Y.; Zheng, X.; Gong, M.; Zhang, J., Delivery of a peptide-drug conjugate targeting the blood brain barrier improved the efficacy of paclitaxel against glioma. *Oncotarget* **2016**, *7* (48), 79401-79407.

- [219]. Endo-Takahashi, Y.; Ooaku, K.; Ishida, K.; Suzuki, R.; Maruyama, K.; Negishi, Y., Preparation of Angiopep-2 Peptide-Modified Bubble Liposomes for Delivery to the Brain. *Biol Pharm Bull* **2016**, *39* (6), 977-83.
- [220]. Regina, A.; Demeule, M.; Tripathy, S.; Lord-Dufour, S.; Currie, J. C.; Iddir, M.; Annabi, B.; Castaigne, J. P.; Lachowicz, J. E., ANG4043, a novel brain-penetrant peptide-mAb conjugate, is efficacious against HER2-positive intracranial tumors in mice. *Mol Cancer Ther* **2015**, *14* (1), 129-40.
- [221]. Yu, Y. J.; Zhang, Y.; Kenrick, M.; Hoyte, K.; Luk, W.; Lu, Y.; Atwal, J.; Elliott, J. M.; Prabhu, S.; Watts, R. J.; Dennis, M. S., Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Sci Transl Med* **2011**, *3* (84), 84ra44.
- [222]. Wilhelmus, M. M.; Otte-Holler, I.; van Triel, J. J.; Veerhuis, R.; Maat-Schieman, M. L.; Bu, G.; de Waal, R. M.; Verbeek, M. M., Lipoprotein receptor-related protein-1 mediates amyloid-beta-mediated cell death of cerebrovascular cells. *Am J Pathol* **2007**, *171* (6), 1989-99.
- [223]. Tian, X.; Nyberg, S.; P, S. S.; Madsen, J.; Daneshpour, N.; Armes, S. P.; Berwick, J.; Azzouz, M.; Shaw, P.; Abbott, N. J.; Battaglia, G., LRP-1-mediated intracellular antibody delivery to the Central Nervous System. *Sci Rep* **2015**, *5*, 11990.
- [224]. Yuan, W.; Li, G.; Gil, E. S.; Lowe, T. L.; Fu, B. M., Effect of surface charge of immortalized mouse cerebral endothelial cell monolayer on transport of charged solutes. *Ann Biomed Eng* **2010**, *38* (4), 1463-72.
- [225]. Booth, R.; Kim, H., Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (muBBB). *Lab Chip* **2012**, *12* (10), 1784-92.
- [226]. Lillis, A. P.; Van Duyn, L. B.; Murphy-Ullrich, J. E.; Strickland, D. K., LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* **2008**, *88* (3), 887-918.
- [227]. Gonias, S. L.; Campana, W. M., LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. *Am J Pathol* **2014**, *184* (1), 18-27.
- [228]. Nguyen, S.; Baker, K.; Padman, B. S.; Patwa, R.; Dunstan, R. A.; Weston, T. A.; Schlosser, K.; Bailey, B.; Lithgow, T.; Lazarou, M.; Luque, A.; Rohwer, F.; Blumberg, R. S.; Barr, J. J., Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers. *mBio* **2017**, *8* (6),
- [229]. Bichet, M. C.; Chin, W. H.; Richards, W.; Lin, Y. W.; Avellaneda-Franco, L.; Hernandez, C. A.; Oddo, A.; Chernyavskiy, O.; Hilsenstein, V.; Neild, A.; Li, J.; Voelcker, N. H.; Patwa, R.; Barr, J. J., Bacteriophage uptake by mammalian cell layers represents a potential sink that may impact phage therapy. *iScience* **2021**, *24* (4), 102287.
- [230]. Sakamoto, K.; Shinohara, T.; Adachi, Y.; Asami, T.; Ohtaki, T., A novel LRP1-binding peptide L57 that crosses the blood brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* **2017**, *500*, 135-139.

- [231]. Sanchez-Lopez, E.; Ettcheto, M.; Egea, M. A.; Espina, M.; Cano, A.; Calpena, A. C.; Camins, A.; Carmona, N.; Silva, A. M.; Souto, E. B.; Garcia, M. L., Memantine loaded PLGA PEGylated nanoparticles for Alzheimer's disease: in vitro and in vivo characterization. *J Nanobiotechnology* **2018**, *16* (1), 32.
- [232]. Bi, C.; Wang, A.; Chu, Y.; Liu, S.; Mu, H.; Liu, W.; Wu, Z.; Sun, K.; Li, Y., Intranasal delivery of rotigotine to the brain with lactoferrin-modified PEG-PLGA nanoparticles for Parkinson's disease treatment. *Int J Nanomedicine* **2016**, *11*, 6547-6559.
- [233]. Hu, K.; Shi, Y.; Jiang, W.; Han, J.; Huang, S.; Jiang, X., Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease. *Int J Pharm* **2011**, *415* (1-2), 273-83.
- [234]. Marvin, D. A.; Symmons, M. F.; Straus, S. K., Structure and assembly of filamentous bacteriophages. *Prog Biophys Mol Biol* **2014**, *114* (2), 80-122.
- [235]. Muyldermans, S., Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol* **2001**, *74* (4), 277-302.
- [236]. Muruganandam, A.; Tanha, J.; Narang, S.; Stanimirovic, D., Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J* **2002**, *16* (2), 240-2.
- [237]. Haqqani, A. S.; Caram-Salas, N.; Ding, W.; Brunette, E.; Delaney, C. E.; Baumann, E.; Boileau, E.; Stanimirovic, D., Multiplexed evaluation of serum and CSF pharmacokinetics of brain-targeting single-domain antibodies using a NanoLC-SRM-ILIS method. *Mol Pharm* **2013**, *10* (5), 1542-56.
- [238]. Larocca, D.; Burg, M. A.; Jensen-Pergakes, K.; Ravey, E. P.; Gonzalez, A. M.; Baird, A., Evolving phage vectors for cell targeted gene delivery. *Curr Pharm Biotechnol* **2002**, *3* (1), 45-57.
- [239]. Tao, P.; Zhu, J.; Mahalingam, M.; Batra, H.; Rao, V. B., Bacteriophage T4 nanoparticles for vaccine delivery against infectious diseases. *Adv Drug Deliv Rev* **2019**, *145*, 57-72.
- [240]. Clark, J. R.; March, J. B., Bacteriophage-mediated nucleic acid immunisation. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2004**, *40* (1), 21-6.
- [241]. Jepson, C. D.; March, J. B., Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine* **2004**, *22* (19), 2413-9.
- [242]. Baird, A., Gene transfer into Mammalian cells using targeted filamentous bacteriophage. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**, *2011* (8), 950-7.
- [243]. Hajitou, A.; Trepel, M.; Lilley, C. E.; Soghomonyan, S.; Alauddin, M. M.; Marini, F. C., 3rd; Restel, B. H.; Ozawa, M. G.; Moya, C. A.; Rangel, R.; Sun, Y.; Zaoui, K.; Schmidt, M.; von Kalle, C.; Weitzman, M. D.; Gelovani, J. G.; Pasqualini, R.; Arap, W., A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging. *Cell* **2006**, *125* (2), 385-98.

[244]. Viertel, T. M.; Ritter, K.; Horz, H. P., Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J Antimicrob Chemother* **2014**, *69* (9), 2326-36.



## **XI. Anexos**

### **10.1 Informe del comité de bioética y bioseguridad**



Concepción, 22 de mayo de 2018

### INFORME COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD

Comité de Ética y Bioseguridad Secretaría de Investigación Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción  ❖ Dra. Mafalda Maldonado V. ❖ Dra. Verónica Madrid V. ❖ Dra. Adriana Ribeiro ❖ Dr. Fernando Sepúlveda B. ❖ Dr. Gonzalo Yévenes C. ❖ Sr. Joaquín Rojas F.	PROYECTO	TESIS DOCTORAL
	TÍTULO	“Desarrollo y caracterización de un inhibidor biológico de TNF? capaz de mediar transcitosis en la barrera hematoencefálica “
	INVESTIGADOR PRINCIPAL	-Srta. Viana Manrique Suárez

A solicitud de la Srta. Viana Manrique Suárez, se recibe documento (adjunto) con precisiones a la metodología incluida en la postulación al Proyecto de TESIS DOCTORAL antes mencionado, solicitando que este Comité emita una carta de aprobación.

Estas precisiones, así como la metodología del Proyecto, han sido analizadas de acuerdo a las recomendaciones de GUIDE for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Science National Research Council), los principios elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, Organización Mundial de la Salud (1985), el texto "Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal", editado por CONICYT en 2009, y el "Manual de Bioseguridad" editado por CONICYT en 2008.

De acuerdo a lo señalado en el documento, las precisiones a la metodología son consecuentes con el principio de las "3 Rs" empleado para la investigación con animales. En particular:

1. Dado que no existe un modelo alternativo para realizar el estudio, el Investigador necesita emplear animales: Raton (*Mus Musculus*) cepa NU/J y CF-1, correspondiendo a especies apropiadas para realizar la investigación, lo que representa una buena aproximación al requisito de REEMPLAZAR.
2. En términos de REDUCIR, se utilizará un número de animales dentro de los rangos admisibles.
3. El uso de analgesia y eutanasia son apropiados para la especie en términos de REFINAR. Además, el Proyecto incluye el uso de un protocolo de supervisión de animales de experimentación.
4. En consecuencia, los protocolos existentes son adecuados.
5. El estudio propuesto permitirá realizar avances en los conocimientos en beneficio humano y animal.
6. El personal involucrado es idóneo en el manejo y uso de las muestras animales.

7. Los estudios serán desarrollados en el LABORATORIO DE BIOFÁRMACOS RECOMBINANTES, donde se encuentran disponibles tanto las facilidades como el equipamiento necesarios para realizar los estudios con animales incluidos en el Proyecto.

8. Cabe mencionar que nuestra Facultad cuenta con los servicios de la Unidad de Seguridad MATPEL ([www2.udec.cl/matpel](http://www2.udec.cl/matpel)), quienes colectan y procesan en forma rutinaria los residuos biológicos y químicos generados por nuestros investigadores, de acuerdo a las indicaciones del "Manual de Bioseguridad" de CONICYT.

En consecuencia, el comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción valida los estudios señalados.

Sin otro particular, les saluda muy atentamente,



**Dra. Mafalda Maldonado Villagrán**  
Presidenta Comité de Bioética y Bioseguridad  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

