



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS VHH  
DE ALPACA CONTRA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE “CORE” DEL VIRUS  
DE HEPATITIS B

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

DALIA VIOLETA CHURAMPI MANCILLA  
LIMA-PERU

2019



**ASESORA**

**PhD. Rosa Patricia Herrera Velit**

**CO-ASESORES**

**PhD. Espinoza Babilón José Ronald**

**Msc. Eduardo Gushiken Ibañez**

**MIEMBROS DEL JURADO:**

**Dra. Patricia Sheen Cortavarria**

**Dr. Luis de Stefano Beltran**

**Dra. Cristina Guerra Giraldez**

## **DEDICATORIA**

A Violeta la flor más amada de mis jardines terrenales, a Alejandro el más grande y valeroso hidalgo de mi vida, a mi honorable y combatiente hermano Raúl, a mi dignísima hermana Dapne, a mis heroicos abuelos Edilberto y Segundo y a Armando el heraldo máspreciado de mi corazón, gracias por ayudarme en esta gran carrera y apoyarme en cada paso y caída.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mis Padres, hermanos, Armando y amigos gracias por ayudar a edificar todo lo que soy con sus buenos cimientos.

Gracias al centro internacional FOGARTY por haberme dado la oportunidad de estudiar y alcanzar conocimientos superiores en la maestría de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Gracias a mi asesora la dra. Patricia Herrera y al dr. José Espinoza Babilón por todo su apoyo académico en estos 2 años. Gracias al laboratorio de Biotecnología Molecular y Señalización Celular por hacerme sentir como en familia. Gracias inmensas a Pilar por guiarme desde mi ingreso hasta mi sustentación. Gracias Agueda y Milagros por su sincera amistad y por impulsarme a luchar. Gracias dra. Teresa por ayudarme en la primera y más difícil fase experimental de mi proyecto mastral. Gracias Víctor y Jennifer por avanzar conmigo en cada experimento. Gracias Eduardo por asesorarme y ayudarme académicamente en la candidatura y en las últimas etapas de mi proyecto mastral. Gracias Rodri por ayudarme a pensar.

Gracias dra. Ana Colarossi por tratarme como a una hija y hacerme sentir en casa, también por enseñarme y aconsejarme tanto académica como personalmente.

Gracias PAPÁ Alejandro y MAMÁ Violeta por ser el motor de mi existencia, de todo lo que soy y lo que quiero ser, gracias por inspirarme a continuar mi camino con esfuerzo y dedicación, por empaparme con sus grandes valores, amor al prójimo y generosidad. Gracias por apoyarme estos casi 3 años en la maestría, sin su ánimo a proseguir nunca habría podido culminarlo. Gracias RAÚL por ser pieza fundamental en toda mi carrera profesional, por apoyarme hasta que alcancé la victoria. Gracias Dapne por abrirme tu corazón y permitirme acercarme para cuidarnos mutuamente.

Gracias ARMANDO por tu amor incondicional, por sostener mi alma y haber sido la luz cuando todo se había oscurecido, por ser mi parte de mi sueño e impulsarme a alcanzarlo. Por cuidarme y preocuparte por mí más que por ti mismo. Y por no permitir que me rindiera aun cuando todo parecía irreparable. Gracias a la familia Quincho-Rosales por hacerme sentir un miembro más y velar por mi bienestar.

Gracias a DIOS por darme la oportunidad de cumplir más metas de las que me había trazado.

Todos tus intentos son un éxito, algunas veces ganas y otras simplemente aprendes. Nada es en vano. Ismael Cala.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

La beca en la Maestría de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) fue otorgada por fondos de los Proyectos:

- “Generación de una plataforma proteómica de alta procesividad para la identificación de nanocuerpos recombinantes de alpaca generados contra antígenos de relevancia biomédica” (FONDECYT-Contrato 111-2015, Investigador principal: Patricia Herera Velit).
- “Translational Research Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia”-Fogarty International Center – 78390150. Investigador Principal: Dra. Dionicia Gamboa Vilela.

El proyecto en su totalidad se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Molecular y Señalización Celular del Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) bajo la supervisión de los Doctores Patricia Herrera Velit y José Espinoza Babilón.

## INDICE

INDICE.....	
LISTA DE ABREVIATURAS .....	
LISTA DE FIGURAS .....	
LISTA DE TABLAS .....	
RESUMEN .....	
ABSTRACT.....	
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEORICO.....	3
II.1. Hepatitis B.....	3
II.1.1. Etiología, transmisión y manifestaciones clínicas.....	3
II.1.2. Estructura del virus de Hepatitis B (VHB).....	4
II.1.3. Diagnóstico y vacunación de la HB .....	5
II.1.4. Propiedades fisicoquímicas del antígeno Core.....	6
II.1.5. Situación Epidemiología Mundial.....	11
II.1.6. Epidemiología Nacional.....	12
II.2. Anticuerpos .....	14
II.2.1. Comparación estructural de los anticuerpos convencionales y de dominio pesado o VHH.....	15
II.2.2. Características básicas y propiedades de anticuerpos de cadena pesada.....	20
II.2.3. Ventajas de los VHH.....	21
II.2.4. Generación de anticuerpos VHH.....	22
III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.....	29
III.1. JUSTIFICACIÓN .....	29
III.2. OBJETIVOS .....	31
IV. METODOLOGÍA .....	32
IV.1. Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido recombinante.....	33
IV.2. Expresión y producción de la proteína recombinante core (HBcAg).....	34
IV.3. Lisis celular en condiciones nativas.....	35
IV.4. Purificación por cromatografía de afinidad por columnas de níquel.....	35
IV.5. Purificación por cromatografía de intercambio iónico .....	36
IV.6. Inmunización de alpacas con la proteína purificada Core o cAgHb.....	36
IV.7. Evaluación de la respuesta inmune por análisis de suero .....	37
IV.8. Obtención de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	38

IV.9. Aislamiento y cuantificación del ARN total .....	39
IV.10. Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	40
IV.11. PCR del ADNc .....	40
IV.12. Digestión del vector pHEN2 y ligación con los productos de PCR.....	42
IV.13. Preparación y electroporación de células <i>E. coli</i> TG1 competentes .....	44
IV.14. PCR de colonias y Biblioteca genómica de VHH .....	45
IV.15. Presentación de VHH en la superficie de Fagos .....	47
IV.15.1. Recuperación de Fagos .....	47
IV.15.2. Selección de Fagos.....	48
IV.16. ELISA de Fagos.....	51
IV.16.1. Recuperación de fagos .....	51
IV.16.2. ELISA .....	52
IV.17. PCR y secuenciamiento de los anticuerpos VHH seleccionados.....	52
V. RESULTADOS.....	54
V.1. Expresión y purificación de rHBcAg en cepas <i>E. coli</i> BL21 mediante Cromatografía de Afinidad (C.A.) y de Intercambio Iónico (C.I.I.) .....	54
V.2. Respuesta inmunológica en Alpacas .....	55
V.3. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) .....	56
V.4. Integridad del ARN total extraído.....	56
V.5. Síntesis y PCR de ADNc .....	58
V.6. Preparación del plásmido pHEN2 y digestión de los VHHs amplificados .....	59
V.7. Ligación y recombinantes .....	60
V.8. Recuperación y Presentación de Fagos .....	62
V.9. ELISA de Fagos .....	63
V.10. PCR colonias con Fagos recombinantes .....	69
V.11. Análisis de secuencias.....	69
VI. DISCUSIÓN .....	76
VII. CONCLUSIONES .....	92
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Ac: Anticuerpo.
- VHH: De dominio pesado.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ADN: Acido desoxiribonucleico.
- ARNasa: Ribonucleasa de ARN.
- dNTP: deoxinucleótido trifosfato.
- h: Horas.
- HB: Hepatitis B.
- HBcAg: Antígeno de nucleocápside o Core.
- HBsAg: Antígeno de superficie.
- HCAs: Anticuerpos de dominio único o de cadena pesada.
- IFN- $\alpha$ : interferón alfa.
- IPTG: Isopropyl-b-Dthiogalactoside.
- Kan: Kanamicina.
- kV: Kilo voltios.
- L: Litro.
- LB: Luria-Bertani.
- Marco de lectura: FR.
- Medio 2XYT: Medio de extracto de levadura con triptona.
- Medio 2XYT -GA: Medio de cultivo 2XTY suplementado con glucosa al 2% y ampicilina a 100  $\mu\text{g/ml}$ .
- Medio 2XTY-AK: Medio de cultivo 2XTY suplementado con 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de ampicilina y 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de kanamicina).
- min: minutos.
- MIR: Región Mayor Inmunodominante.
- MHC I: Moléculas Complejo Principal de Histocompatibilidad I.
- mL: Mililitros.

- mM: Mili molar.
- Ni-NTA: Matriz de níquel y ácido nitrilo acético.
- nm: nanómetro.
- DO.: Densidad óptica.
- O/N: Overnight.
- PB: pares de bases.
- PBS: Solución salina fosfatada.
- PBS 1X-T: PBS 1X-Tween al 0.05 %.
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- PDB: Protein Data Bank.
- PEG: Polietilenglicol.
- rcAgHb: Proteína recombinante Core del virus de hepatitis B.
- RPM: Revoluciones por minuto.
- RT-PCR (Reverse transcriptase Polymerase chain reaction).
- SAP: Fosfatasa Alcalina.
- Seg: Segundos.
- SDS-PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
- sAgHb: Proteína Superficie del virus de hepatitis B.
- s.p.i: suero pre inmune.
- TBE: Solución de Tris, borato y EDTA.
- UFC: Unidad formadora de colonia.
- UFP; Unidad formadora de placa.
- UV: Ultra Violeta.
- $\mu$ F: Micro Faraday.
- $\mu$ g: Micro gramos.
- VHB: Virus de hepatitis B.
- VHH: Nanoanticuerpos o nanocuerpos.
- VLP: Transportadores de partículas virales.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo del virus de hepatitis B.....	5
Figura 2. Estructura tridimensional del virus de hepatitis B.....	10
Figura 3. Distribución geográfica de la infección crónica por VHB. ....	11
Figura 4. Distribución de la Hepatitis B y Delta en Perú y de la población infectada.....	14
Figura 5. Estructura de una molécula de inmunoglobulina G o anticuerpo.....	15
Figura 6. Diagrama esquemático de los anticuerpos convencionales y de cadena pesada.....	18
Figura 7. Estructura de un VHH. ....	20
Figura 8. Fago M13 expresando en su superficie la proteína pIII y el anticuerpo.....	25
Figura 9. Esquema de la técnica de presentación de fagos. ....	28
Figura 10. Esquema resumido de la metodología para generar anticuerpos VHH contra rHbcAg.....	33
Figura 11. Expresión y purificación de rHbcAg en cepas <i>E. coli</i> BL21.....	54
Figura 12. Respuesta inmune contra rHbcAg.....	55
Figura 13. ARN total extraído de las PBMC.....	57
Figura 14. ADNc de anticuerpos VHH amplificados por PCR. ....	58
Figura 15. Digestión del vector pHEN2 con enzimas de restricción SfiI y NotI.....	59
Figura 16. Estructura del vector fagémido pHEN2.....	60
Figura 17. PCR de las colonias transformadas con el vector pHEN2 recombinante.....	61
Figura 18. Selección de Fagos recombinantes que expresaron el VHH contra rHbcAg mediante ELISA de fagos I. ....	67
Figura 19. Selección de Fagos recombinantes que expresaron el VHH contra rHbcAg mediante ELISA de fagos II. ....	68
Figura 20. Colonias seleccionadas amplificadas por PCR.....	69
Figura 21. Alineación de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos putativos de las 21 sub clonas de fagos en MEGA.....	71
Figura 22. Alineación de las secuencias de aminoácidos con la cadena del VHH de alpaca (BAP82413.1), y con la cadena variable de un anticuerpo convencional (ATL24952.1) y las estructuras CDR y FR.....	74

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Individuos infectados por VHB y dolencias hepáticas .....	12
Tabla 2. Reactivos para PCR del ADNc. ....	41
Tabla 3. Reactivos para PCR .....	46
Tabla 4 . Eluídos luego de la extracción de ARN con Trizol. ....	57
Tabla 5. Selección de fagos específicos contra antígeno Core o rHBcAg.....	63
Tabla 6. Resultados del ELISA de fagos de las colonias 1-48.....	65
Tabla 7. Resultados del ELISA de fagos de las colonias 48-96.....	66
Tabla 8. Identidad de los VHH comparados con la inmunoglobulina de alpaca (ATL24952.1) en la base de datos BLAST del NCBI. ....	72
Tabla 9. Comparación de hidrofobicidad utilizando ExPASy con la inmunoglobulina de alpaca ATL24952.1.....	75

## RESUMEN

La hepatitis B (HB) es una enfermedad viral que provoca aproximadamente la muerte de 620 mil-1 millón de personas al año en todo el mundo. El virus de hepatitis B (VHB) está estructuralmente conformado por una envoltura externa con proteínas llamadas superficie (HBsAg) y una nucleocápside icosaédrica formada a partir de proteínas llamadas core (HBcAg). Aunque en la actualidad no hay un tratamiento adecuado se han desarrollado nuevas terapias entre las que se incluyen anticuerpos neutralizadores de HBsAg en fase clínica I. Respecto a los anticuerpos VHH producidos en camélidos éstos se reportan como agentes neutralizantes contra otros virus humanos tales como hepatitis C, rabia, VIH, polio, influenza, sincitial respiratorio, etc. Los VHH presentan ciertas ventajas sobre los anticuerpos convencionales como una vida media más larga, mayor solubilidad, menor costo de producción y mayor eficacia por su menor tamaño. El objetivo del presente estudio fue generar anticuerpos VHH en alpaca utilizando como antígeno a la proteína recombinante core del VHB.

Como primer paso se indujo la expresión de la proteína recombinante core del VHB (rHBcAg) en cepas de *E. coli* BL21 y se purificó mediante cromatografía de afinidad y de intercambio iónico. Para la generación de VHH se utilizó como modelo a *Vicugna pacos* (alpaca), a la que se le inocularon semanalmente de 100-500 µg de rHBcAg por 2.5 meses hasta que se obtuvo el título adecuado de anticuerpos. La respuesta inmune fue monitoreada mediante el ensayo de ELISA indirecto con suero pre inmune y los sueros obtenidos semanalmente. A partir de sangre periférica se purificaron las células mononucleares y luego se aisló el

ARN, se sintetizó ADNc mediante RT-PCR y luego se realizó una PCR con cebadores específicos para amplificar solamente las secuencias de los VHH. Los amplicones fueron ligados dentro del fagémido pHEN2 que se usó para transformar a cepas de *E. coli* competentes por electroporación.

Se obtuvo una biblioteca inmune genómica de  $4 \times 10^8$  UFC que expresaron las secuencias nucleotídicas de los VHH. Mediante la técnica de presentación de fagos se generó una biblioteca de fagos recombinantes de  $2 \times 10^6$  que expresaron a los anticuerpos VHH específicos contra rHBcAg. Se evaluaron 96 fagos usando como control negativo a BSA, de los cuales se seleccionaron y aislaron 21 fagos específicos (21.88 %) contra rHBcAg. Se analizaron las secuencias mediante herramientas bioinformáticas (MEGA 5).

Luego del análisis de las 21 secuencias nucleotídicas diferentes éstas fueron traducidas *in silico* y se obtuvieron 10 secuencias aminoacídicas putativas de las cuales 7 mostraron menor grado de hidrofobicidad, lo que sería muy ventajoso para su manipulación si fueran utilizados en terapia como agentes neutralizantes o en inmunodiagnóstico. En base a lo encontrado se sugiere continuar con investigaciones sobre las posibles aplicaciones de los VHH.

## ABSTRACT

Hepatitis B (HB) is a viral disease that causes approximately the death of 620 thousand-1 million people per year worldwide. The hepatitis B virus (HBV) is structurally composed of an outer envelope of surface proteins (sAgHb) and an icosahedral nucleocapsid formed by core proteins (cAgHb). Even though currently there is no adequate treatment, possible new potential therapies have been developed, including neutralizing antibodies to HBsAg. Several reports show that single domain antibodies or VHH produced in camelids are able to neutralize other human viruses including hepatitis C, rabies, HIV, polio, influenza, respiratory syncytial, etc. VHHs have certain advantages over conventional antibodies such as a longer half-life, greater solubility, lower production cost and greater efficiency due to their smaller size. The objective of the present study was to generate VHH antibodies in alpaca using the recombinant core protein of HBV as an antigen.

As a first step, the expression of the HBV core recombinant protein (rHBcAg) was induced in strains of *E. coli* BL21 and purified by affinity and ion exchange chromatography. For the generation of VHHs, *Vicugna pacos* (alpaca) was used as a model, which were inoculated weekly with 100-500 µg of rHBcAg for 2.5 months until the appropriate antibody titre was obtained. The immune response was monitored by indirect ELISA test with pre-immune serum and the sera obtained weekly. From peripheral blood, the mononuclear cells were purified and then the RNA was isolated, cDNA was synthesized with an RT-PCR and then a PCR was performed with specific primers to amplify only the sequences of the

VHH antibodies. The amplicons were ligated into the phagemid pHEN2 which was used to transform competent *E. coli* strains by electroporation.

A genomic immune library of  $4 \times 10^8$  CFU was obtained which expressed the nucleotide sequences of the VHH antibodies. Using the phage display technique, a library of  $2 \times 10^6$  recombinant phages was generated that expressed to specific VHH antibodies against rHBcAg. 96 phages were evaluated using BSA as negative control, of which 21 highly specific phages (21.88 %) against rHBcAg were selected and isolated. Sequences were analyzed by bioinformatic tools (MEGA 5).

After the analysis of the 21 different nucleotide sequences they were translated *in silico* and 10 putative amino acid sequences were obtained, of which 7 showed a lower degree of hydrophobicity, which could be very advantageous for its manipulation and possible use in therapy as neutralizing or immunodiagnostic agents. Based on our findings it is suggested to continue with research on the possible applications of VHH.

## I. INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial el virus de la hepatitis B (VHB) es el principal causante de la mayoría de las enfermedades hepáticas humanas provocando desde 620.000-1 millón de muertes anuales en todo el mundo (Cabezas *et al.*, 2006; Freivalds *et al.*, 2011). La hepatitis B (HB) es una enfermedad viral provocada por un virus ADN altamente infeccioso que en estado crónico conlleva a la cirrosis y al cáncer de hígado; por ello es considerada como una de las problemáticas más graves de salud nacional y mundial (Freivalds *et al.*, 2011). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 2 billones de habitantes en el mundo han sido infectados por el VHB, de los cuales 350 millones son portadores crónicos. El Perú es un país con endemividad intermedia para HB, su prevalencia varía de acuerdo a cada región. En la costa es de 1 a 3.5%; en algunos valles de la sierra (Huanta y Abancay) de 7% y en la selva varía de 2.5% en Iquitos y hasta 20% en algunas poblaciones nativas (MINSa, 2014).

La insuficiencia hepática aguda en crónica relacionada con el VHB (ACLF, por sus siglas en inglés) es una enfermedad común. La inflamación ocasionada por la muerte de hepatocitos contribuye a la patogénesis del hígado que puede conllevar a cirrosis y a hepatocarcinoma. Los pacientes con infección crónica se han caracterizado por un rápido deterioro de la enfermedad subyacente. Es muy necesario encontrar una alternativa para reducir los casos de afectados en el sector salud (Zhao *et al.* 2018).

Estructuralmente el virus está formado por una envoltura externa que contiene proteínas de superficie (HBsAg) en una coraza de lipoproteínas y una

nucleocápside interna que está ensamblada a partir de la proteína core (HBcAg) (Cabezas, 2008; Song y Kim, 2016). Aunque HBsAg es usada comúnmente para el inmunodiagnóstico también HBcAg se ha utilizado como un marcador no serológico específico de la etapa infecciosa de HB y también se le atribuye un alto carácter inmunogénico por lo que se perfila como una ideal vacuna o antígeno experimental (Kimura *et al.*, 2003; Song y Kim, 2016).

Los nanoanticuerpos o anticuerpos VHH son proteínas producidas naturalmente por camélidos y algunos condrictios, presentan especificidad contra los antígenos a los que son expuestos al igual que los anticuerpos convencionales pero con algunas diferencias como menor tamaño, solubilidad, mayor afinidad a fármacos, mayor tiempo de vida media, etc. (Kolkman y Law, 2010; Vanlandschoot *et al.*, 2011). Por este motivo son una alternativa capaz de utilizarse en diagnóstico o terapia al neutralizar específicamente agentes patógenos virales.

Para obtener anticuerpos VHH se utilizó a la proteína core de VHB (HBcAg) para inmunizar a alpacas (*Vicugna pacos*) por su capacidad para desencadenar elevadas respuestas inmunes. Se generó una biblioteca de secuencias nucleotídicas de anticuerpos VHH y se expresaron en una biblioteca de fagos recombinantes (Pardon *et al.*, 2014). Esta biblioteca tendría como futura aplicación el poder utilizarse como diagnóstico para carga viral y/o vacuna o tratamiento potencial contra el VHB (Song y Kim, 2016).

## II. MARCO TEORICO

### II.1. Hepatitis B

#### II.1.1. Etiología, transmisión y manifestaciones clínicas

La hepatitis viral es una de las principales afecciones en el mundo que provoca enfermedad aguda, crónica y mortandad. Han sido identificados cinco virus que generan la patología (A, B, C, D, E) con diferentes distribución geográfica en diversas zonas y poblaciones del mundo. Además hay evidencia de la existencia de dos virus más nominados como G y TTV (Cabezas, 2007). La HB humana es una enfermedad provocada por el virus de la hepatitis B (VHB) humana que pertenece a la familia Hepadnaviridae y que infecta productivamente a los hepatocitos, se transmite a través de la ruta parenteral, sexual y vertical (Song y Kim, 2016).

El virus es del tipo ADN y es sumamente infeccioso; hasta 100 veces más que el VIH y se encuentra y transmite por sangre y fluidos corporales (Cabezas, 2007). Es la causa más frecuente de afecciones hepáticas agudas y crónicas gracias a la integración del ADN viral en el genoma del hepatocito (Hai *et al.*, 2014). De la población de afectados, 0.5 % culminan con la fase aguda expresando hepatitis fulminante y mortal aunque también la fase crónica puede tener consecuencias fatales; tal es así que el 25 % de pacientes desarrollaría hepatocarcinoma (Cabezas, 2007). De este grupo, la mortandad de cáncer por VHB es superior al millón de personas anualmente (Seeger y Mason, 2000). Las manifestaciones son muy variables aunque, como en todas las hepatitis virales, el hígado (hepatomegalia) se encuentra inflamado y el hepatocito es la célula infectada (Wilkins *et al.*, 2019).

El cuadro es muy variable y va desde los inaparentes sin ictericia ("anictéricos") hasta los ictericos, con sensación de fatiga, ansiedad, náuseas, fiebre, pérdida del apetito, anorexia, dolor muscular, dolor de estómago, diarrea, dolor de cabeza, coluria, acolia e ictericia (Lai *et al.*, 2003). En cualquier caso, el afectado puede recuperarse o evolucionar a una hepatitis crónica o fulminante y morir (Guirao *et al.*, 2006). La reducción de tamaño considerable del hígado supondría una posible necrosis masiva y una hepatitis fulminante con una mortandad de 70-90 % (Guirao *et al.*, 2006). Existen casos clínicos diversos en la manifestación de síntomas de HB. Por ejemplo la fase de la infección crónica puede ser asintomática por muchos años aun con diagnóstico bioquímico e histológico positivo, y también hay pacientes que son portadores asintomáticos aun con pruebas clínicas y bioquímicas negativas (Walsh y Alexander, 2001).

Finalmente cuando el afectado desarrolla un hepatocarcinoma se presenta pérdida de peso, dolor en hipocondrio derecho, fiebre, sangrado gastrointestinal (en cirróticos). En la literatura se aprecia que los síntomas varían de un individuo a otro por lo que para identificar al tipo de virus se requiere el apoyo de herramientas bioquímicas, inmunológicas y moleculares (Guirao *et al.*, 2006).

#### II.1.2. Estructura del virus de Hepatitis B (VHB)

VHB es un virus ADN pequeño de doble hebra perteneciente a la familia hepadnaviridae. El virión infeccioso es esférico y tiene un diámetro de 42 nm. La envoltura externa es una cubierta de lípidos que contiene proteínas virales llamados antígenos de superficie o surface (HBsAg) que se encargan de la unión e ingreso del virus a células del hospedero durante la infección.

La nucleocápside es de estructura icosaédrica y está conformada por el antígeno nuclear o core (HBcAg) también envuelve al ácido nucleico viral y a la ADN polimerasa (Eren *et al.*, 2018) (Figura 1).

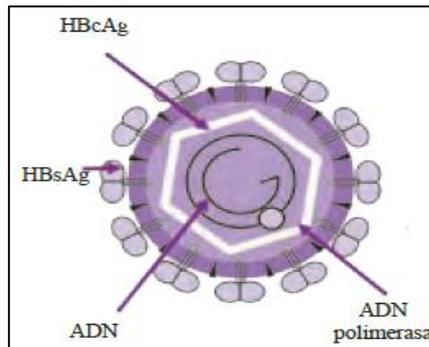


Figura 1. Esquema ilustrativo del virus de hepatitis B (Cabezas, 2008).

El HBcAg es un polipéptido con 183 residuos comprimidos en una región formadora de cápside llamada el dominio de ensamblaje (DE, residuos 1-149) y un dominio básico rico de arginina llamado dominio de unión al ácido nucleico (DUAN, residuos 150-183). Tiene dos codones de iniciación traduccional (core y pre-core) y el marco de lectura C que codifica al HBcAg, dependiendo de dónde empiece la traducción (Cabezas, 2008).

### II.1.3. Diagnóstico y vacunación de la HB

La infección es muy dinámica, tal es así que el virus libera porciones virales detectables y en respuesta el huésped genera anticuerpos muy variantes dentro de las distintas fases de la enfermedad (Wilkins *et al.*, 2019). La proteína core (HBcAg) está presente intracelularmente en el hepatocito por lo que no es un marcador serológico. Sin embargo, induce en el hospedero la síntesis de anticuerpos anti-HBc que permiten detectar la infección en la fase de ventana en la recuperación o en aquellos casos en los que la infección en los pacientes

manifiesta una baja carga viral (Cabezas, 2008). Se menciona también que algunos individuos sin marcadores serológicos, ni anticuerpos contra HBsAg son positivos para anticuerpos IgG contra HBcAg (Song y Kim, 2016).

Se han desarrollado drogas terapéuticas y vacunas para la infección por VHB, basadas en péptidos recombinantes (inmunoterapia) (Bertoletti y Le Bert, 2018), anti-cccADN (Cai *et al.*, 2012), ADN de HB, vectores víricos y células de levadura (Ghasemi *et al.*, 2016). La mayoría tienen el objetivo de incrementar el sistema inmune, es así que se seleccionó a HBcAg que posee una elevada inmunogenicidad incluso superior a HBsAg y se ha planteado la idea de utilizarlo como vacuna (uso principal para el HbsAg) en prevención y como tratamiento de la enfermedad (Al-Mahtab *et al.*, 2013). También se están evaluando terapias con anticuerpos monoclonales contra algunos epítomos del VHB, el objetivo principal es inactivar a las proteínas virales de la envoltura e inhibir la infección. Los resultados han mostrado supresión temporal de la propagación de la HB en murinos (Gao *et al.*, 2017) y en humanos (fase clínica I) (Galun *et al.*, 2002). Aunque al no poder controlar la replicación del VHB ni el daño hepático algunos reportes recomiendan su unión con otros medicamentos para el tratamiento como Entecavir y tenofovir (Said, 2015, Waty *et al.*, 2017) o enfocarse en evitar la formación y el mantenimiento del ADNccc viral tal es el caso de las sulfonamidas (Cai *et al.*, 2012).

#### II.1.4. Propiedades fisicoquímicas del antígeno Core

Las primeras investigaciones en proteínas de core del VHB (HBcAg) fueron publicadas por primera vez en 1986 como prometedores transportadores de partículas virales (VLP); es decir porciones virales con ausencia de ácidos

nucleicos. Al carecer de material genético, no son infecciosos pero estimulan una elevada la inmunogenicidad y antigenicidad lo que los perfila como candidatos ideales para portadores de vacunas (Zhang *et al.*, 2007).

El HBcAg consta de una estructura de 180 o 240 subunidades polipeptídicas idénticas, revelada mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 3.3 Å. Su organización es, en casi toda la conformación, de tipo alfa helicoidal y la unión de dos horquillas anfipáticas forman un dímero de cuatro hélices capaces de ensamblarse entre sí. Las hélices sobresalen como picos de 25 Å de largo y 20 Å de ancho y que poseen en la parte media una zona llamada región inmunodominante principal (MIR) (Pumpens y Grens, 2001) (**Figura 2**, imagen obtenida del Protein Data Bank (PDB) con acceso de 6HTX).

Las HBcAg se autoensamblan en partículas de la nucleocápside y durante la infección inducen las respuestas más fuertes en los linfocitos B y T en comparación con los demás polipéptidos que contiene el VHB (Preikschat *et al.*, 1999). Se consideran extremadamente inmunogénicas; sin embargo su acción puede variar por el tamaño y por su secuencia genómica cuando se fusiona con otro péptido y se expresa mediante la tecnología del ADN recombinante (Zhang *et al.*, 2007; Janssens *et al.*, 2009).

Las vacunas basadas en péptidos han incluido la combinación de las proteínas HBcAg con HBsAg del VHB, ya que HBcAg actúa como un inmunogénico adyuvante de linfocitos T. Este método se evaluó en personas voluntarias con el estadio crónico de la enfermedad que recibieron 19 vacunaciones (Fase clínica III) por 20 semanas reduciendo el ADN viral casi tanto como con el fármaco más

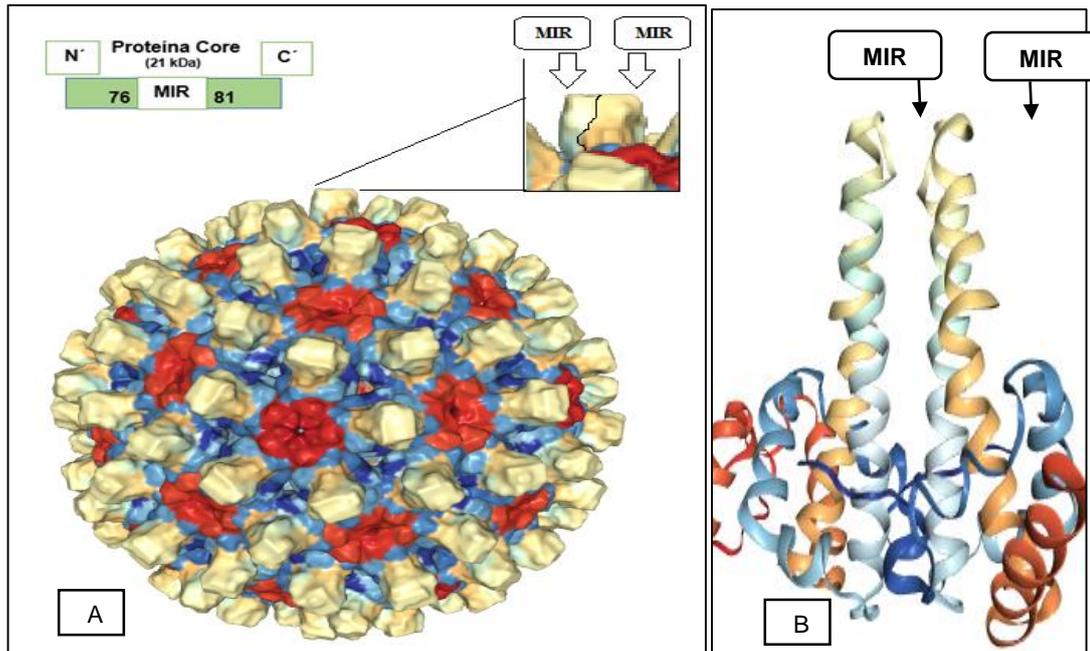
utilizado interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) (Al-Mahtab *et al.*, 2013). Otro ensayo clínico administró HBcAg fusionado con preS2 en 380 pacientes con hepatitis crónica y redujo significativamente la infección, alanina aminotransferasa (enfermedades hepáticas) y los niveles de ADN del VHB (Ghasemi *et al.*, 2016). Enfocándonos en su potencial como vacuna Schodel *et al.* (1992) realizaron análisis de la relación entre la posición de epítomos heterólogos en la secuencia de HBcAg y la inmunogenicidad. Su investigación evidenció que al modificar la secuencia se puede aumentar desde 5-10 veces más la antigenicidad y además se obtiene un mayor título de anticuerpos utilizando HBcAg fusionado y recombinante que en comparación con su forma nativa.

Estudios previos han expresado y producido la HBcAg en procariotas y eucariotas como *E. coli* y *Pichia pastoris*, respectivamente, contenida en la secuencias de sus genomas y comúnmente fusionada con otras proteínas para su posterior purificación. Los análisis y predicción *in silico* permitieron estudiar su hidrofobicidad y ensamblaje para la formación de cápside o VLP. Es así que se mostraron algunos problemas por su tendencia a formar estructuras muy rígidas, lo que dificultaba el proceso de replegamiento o la formación del VLP como portador de vacunas (Karpenko *et al.*, 2000). Al tener un bajo rendimiento en la tasa de ensamblaje de la cápside se genera una reducción en la inmunogenicidad y antigenicidad (Milich y McLachlan., 1988).

Utilizando esta información se expresaron las secuencias recombinantes HBcAg con insertos de péptidos heterólogos y se determinó que, al ser interrumpidos por una secuencia en la región mayor inmunodominante (MIR), se vuelven más estables estructuralmente. También se incrementa la inmunogenicidad de los

péptidos presentados en su superficie aun cuando la respuesta de los mismos por si solos sea muy baja (Francis *et al.* 1990). También se reportó que la adición de enlaces ricos en glicina disminuye la alta rigidez del inserto y facilita la interacción entre el mismo y el HBcAg. Al realizar un cambio de 9 por 15 enlazadores se logró una menor rigidez y se eliminó la tensión estructural. Al parecer el aumento de longitud obliga a los monómeros de HBcAg-MIR a sufrir cambios conformacionales (Karpenko *et al.*, 2000).

Otro análisis refiere también que una mayor distancia entre el extremo N y C de HBcAg y la presencia de residuos de cisteínas en el MIR influyen negativamente en el ensamblaje (Karpenko *et al.*, 2000). La región MIR es un bucle muy expuesto y flexible de la proteína HBcAg que, aparentemente, sería el responsable (entre residuos 76 y 81) (**Figura 2a**) de la inmunogenicidad alta en animales experimentales y en la inducción de la respuesta de las células B en pacientes con VHB. El MIR presenta tolerancia a cambios o deleciones en sus secuencias entre extremos N y C que no influyen en el plegado o ensamblaje (Pumpens y Grens, 2001).



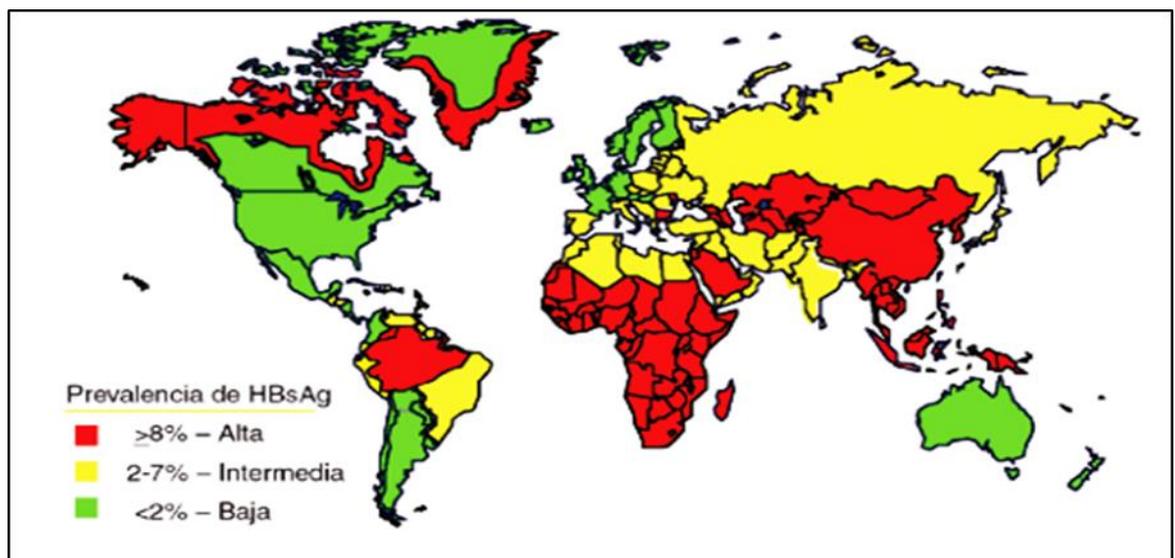
**Figura 2.** Estructura tridimensional del virus de hepatitis B. (A) Se muestra un esquema de la región MIR entre los residuos 76-81 y una vista 3D global (PDB: 6HTX) de la estructura alfa hélice de la nucleocápside ensamblada por la proteína core (21 KDa) que a su vez contiene en sus hélices a la región MIR. (B) La region MIR en medio de las hélices de cada uno de los dímeros.

El extremo C-terminal básica es la que interactúa con el ácido nucleico y es prescindible en el autoensamblaje de la cápside, ya que aun con mutaciones en los extremos C y N sus propiedades estructurales e inmunológicas se mantuvieron intactas (Preikschat *et al.*, 1999; Pumpens y Grens, 2001).

Entonces la HBcAg sufre un correcto plegamiento y un autoensamblaje durante la expresión en bacterias usando su secuencia fusionada con otro péptido, una ventaja importante para la investigación de las propiedades estructurales e inmunológicas en especial si se pretende usar como vacuna (Karpenko *et al.*, 2000).

### II.1.5. Situación Epidemiología Mundial

La OMS estima que aproximadamente dos billones de personas en todo el mundo han sido infectados por el VHB, de los que 350 millones presentan la fase crónica positiva para el antígeno de superficie (HBsAg) positivo (Cabezas, 2007). Por otro lado las tres cuartas partes de la población mundial viven en zonas hiperendémicas y esto ocasiona alrededor de un millón de muertes por la infección. El VHB provoca del 60-80 % de cánceres hepáticos en el mundo y esto implica que es una de las mayores causantes de mortandad del Este y Sudeste de Asia, la cuenca amazónica y África Subsahariana (Cabezas, 2007). La prevalencia de la HB varía según las áreas geográficas (**Figura 3**).



**Figura 3.** Distribución geográfica de la infección crónica por VHB (Cabezas, 2007).

En Sudamérica los portadores de HBsAg se incrementan de sur a norte, con prevalencia elevada en el centro y oeste del Amazonas de Brasil y en zonas adyacentes de Colombia y Venezuela. Como se muestra en la **Tabla 1** hay un elevado número de infectados en Sudamérica.

**Tabla 1.** Individuos infectados por VHB y dolencias hepáticas (Cabezas, 2007)

	Infectados	Hepatitis fulminante	Hepatitis crónica	Cirrosis	Hepato-carcinoma
Latinoamérica	140.000-400.000				
Sudamérica		440-1.000	2.965	12.782-44.737	3.271-11.449

La HB es el tipo de virus más grave respecto a afecciones hepáticas y se estima que aproximadamente 780.000 personas mueren anualmente por las consecuencias de la enfermedad, tales como cirrosis hepática y cáncer de hígado (WHO, 2018). Se mencionan factores que exacerban el riesgo como el consumo del alcohol e infección concomitante con otros virus de hepatitis (Cabezas, 2008).

#### II.1.6. Epidemiología Nacional

El Perú es considerado como un país de endemicidad media para la HB, aunque la infección está en aumento por todos los territorios del país por la alta migración de zonas de alta endemicidad a zonas de baja endemicidad. En el Perú la prevalencia presenta variaciones de acuerdo a la región geográfica estudiada, actualmente existe una alta prevalencia de hepatitis B y Delta en la selva. Es así que en la selva hay una endemicidad entre media y alta con prevalencia desde 2,5% (principalmente en Iquitos) hasta el 83% en la sierra y en la Costa con 1-3.5% (Cabezas, 2007).

Los departamentos de la selva con mayor número de infectados en el año 2017 fueron Loreto (133), Madre de Dios (76), Huánuco (49), Ucayali (38) y San Martín (32). En la sierra la prevalencia es baja en la vertiente occidental de los andes y de media a alta en valles interandinos como Huanta y Abancay, Huánuco y en el Río Pampas (Ayacucho-Apurímac). Los departamentos son Ayacucho (440), Cuzco (223), Junín (119), Arequipa (60) y Apurímac (26). Se resaltó la

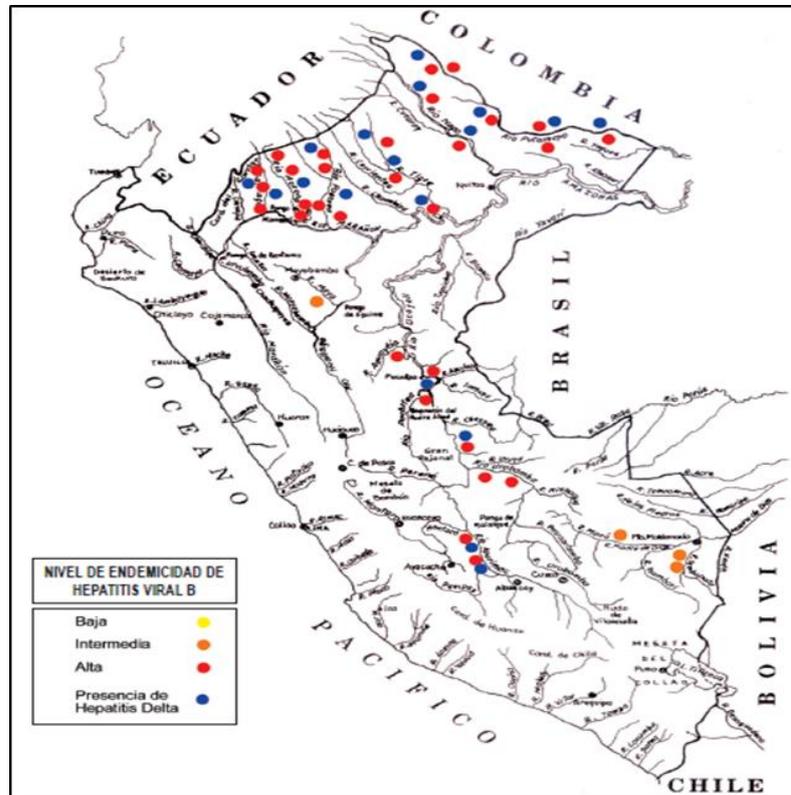
transición de endemicidad baja a intermedia en Ica quizás por la intensa migración desde Ayacucho en las últimas dos décadas. Finalmente en la costa se evidenció un bajo número de infectados (Cabezas, 2008, MINSA, 2017).

En las áreas hiperendémicas de VHB también prevalece el cáncer hepático, como en Quillabamba, Abancay y Huanta donde un 7% de fallecidos corresponden a enfermedades hepáticas por infección del VHB. En Huanta el 50% de afectados con HB mueren por hepatitis fulminante (asociada al virus Delta), el 10% de cáncer de hígado y el 40% por cirrosis hepática. La población más afectada de los que fallecen con la fase fulminante son los menores de 20 años, de los cuales el 18 % presentará cirrosis hepática y el 35 % hepatocarcinoma; de los que más del 60 % fueron hombres (Cabezas, 2007).

Un estudio reciente realizó un análisis molecular a nivel nacional en 65 pacientes con hepatocarcinoma, se monitoreó la infección usando PCR para identificar el ADN viral en tumor o tejido hepático. El ADN viral fue significativamente más abundante en hígados jóvenes sin embargo también se menciona que la concentración de ADN es baja en presencia de mutaciones en las dipirimidinas. Esto se debería a las vías de reparación en el ADN de los tumores de los pacientes más jóvenes con ascendencia indígena. Algo muy peculiar que aparentemente solo ocurriría en Perú (Marchio et al., 2018).

Otro estudio asevera que en las últimas décadas en el Perú se ha disminuido la prevalencia de la HB, por el incremento del cuidado y control en las transfusiones y vacunaciones. Esto ha permitido garantizar lotes de sangre segura y la disminución de los riesgos de contraer la enfermedad (Ramirez y Huichi-Atamari, 2018).

La prevalencia de la HB en el Perú se aprecia en el siguiente mapa (Figura 4) donde se observa que la endemidad más elevada está en la Selva Amazónica.



**Figura 4.** Distribución de la Hepatitis B y Delta en Perú y de la población infectada (Cabezas, 2006).

## II.2. Anticuerpos

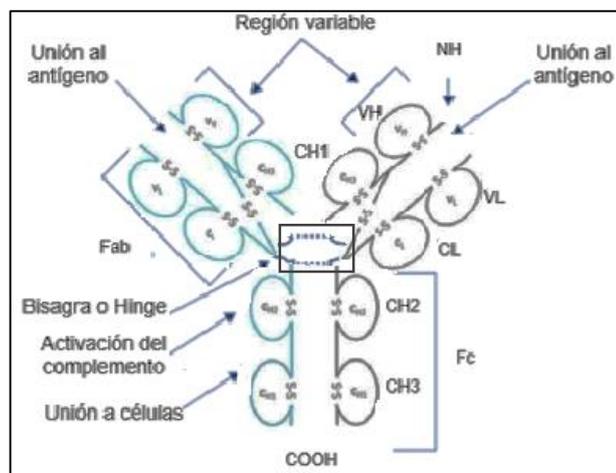
La defensa contra los microorganismos se da a través de las primeras reacciones de la inmunidad innata y las posteriores de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata se encarga de generar la primera línea de defensa y está constituida por unos mecanismos celulares y bioquímicos (barreras físicas, químicas, citoquinas y células como neutrófilos, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (NK), complemento). La otra respuesta inmunitaria es estimulada por la exposición a los microorganismos infecciosos por lo que se le denomina inmunidad adaptativa y presenta una gran especificidad frente a epítopos de diversos antígenos con

capacidad de "recordar" exposiciones previas del mismo antígeno (linfocitos B o T) (Abbas, 2014).

Los linfocitos T se diferencian en citotóxicos, cooperadores y supresores y conforman la respuesta celular. Mientras que los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas y secretan inmunoglobulinas "Ig" que conforman la respuesta humoral y son conocidas comúnmente como anticuerpos "Ac". El repertorio linfocítico de una persona asciende a  $10^9$  anticuerpos diferentes que pueden distinguir entre  $10^7$ - $10^9$  epítomos diferentes (Abbas, 2014).

### II.2.1. Comparación estructural de los anticuerpos convencionales y de dominio pesado o VHH

-Los anticuerpos convencionales (150 kDa) poseen cuatro cadenas polipeptídicas (**Figura 5**). Dos cadenas pesadas idénticas (50 kDa) denominadas H, de heavy en inglés, unidas de forma covalente a un oligosacárido; y dos cadenas ligeras idénticas no glicosiladas (25 kDa) denominadas L, de light en inglés (Wang *et. al.* 2007; Abbas, 2014).



**Figura 5.** Estructura de una molécula de inmunoglobulina G o anticuerpo. CH: dominios de la región constante de la cadena pesada; CL: dominio constante de la cadena ligera; Fab y Fc: fragmentos resultantes de proteólisis; VH: dominio variable de la cadena pesada; VL: dominio variable de la cadena ligera; los puentes disulfuro se muestran como línea punteada (Moritz y Stracke. 2017).

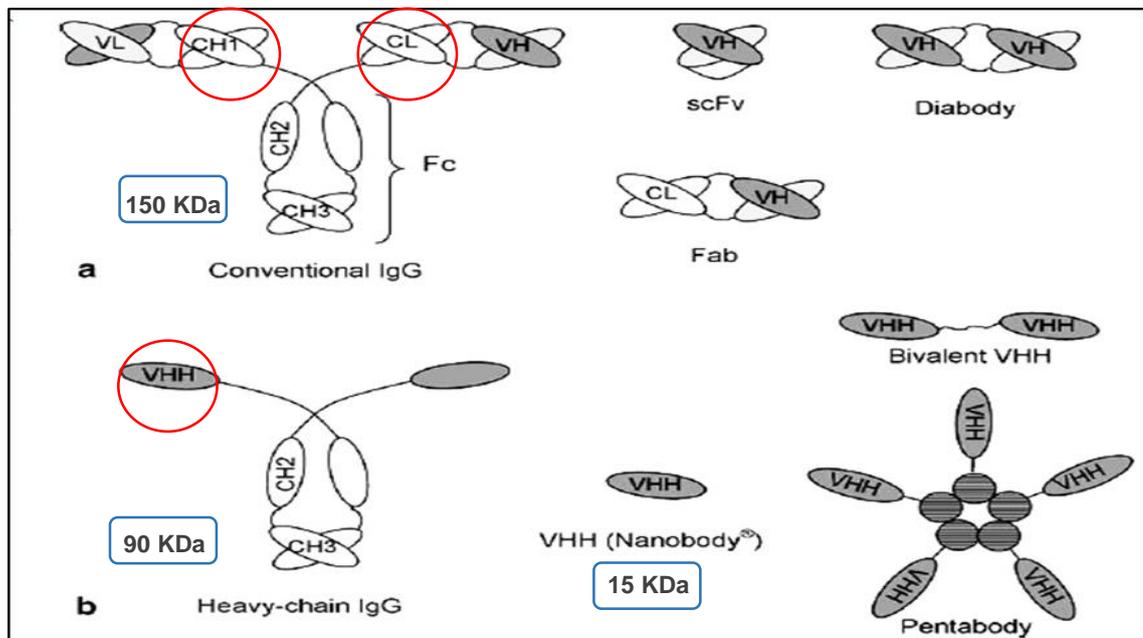
Como se aprecia en la **Figura 5** la IgG presenta tres regiones unidas mediante un fragmento polipeptídico denominado región bisagra o “Hinge” que puede contener desde 10 hasta 35 aminoácidos, de esta forma adquiere una morfología semejante a una Y (De Genst *et al.*, 2006; Wang *et. al.* 2007). La región Fab está formada por la unión de la cadena L con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada H. Los puentes disulfuro que unen a las cadenas H se forman a nivel de la bisagra y le confieren flexibilidad a la estructura, por esta cualidad es que puede acoplarse espacialmente a distintos tipos de antígenos (Wang *et. al.* 2007; Moritz y Stracke, 2017). Hay otras uniones disulfuro formadas entre las cadenas H o L y resultan en dominios proteicos globulares característicos de la superfamilia de inmunoglobulinas. Adicionalmente los anticuerpos que contienen diferentes cadenas pesadas pertenecen a diferentes clases, o isotipos, y se nombran en función de sus cadenas pesadas (IgM, IgD, IgG, IgE e IgA), independientemente de la clase de cadena ligera cada isotipo tiene diferentes propiedades físicas, biológicas y funciones efectoras (Abbas, 2014).

Las cadenas ligeras están conformadas por un dominio variable (V) y uno constante (C), y se las conoce como VL y CL, respectivamente; y las cadenas pesadas presentan un dominio variable (V) y tres constantes (C) denominadas: VH, CH1, CH2 y CH3, respectivamente. Las regiones variables y el primer dominio constante de las cadenas pesadas (VH y CH1) se asocian con las cadenas livianas (VL y CL) y forman dos sitios idénticos de unión al antígeno que son los fragmentos Fab. Al formar una superficie complementaria a la estructura tridimensional del antígeno se denominan las Regiones de Determinación de Complementariedad o simplemente CDR (complementarity determining region en

inglés) (Berger *et al.*, 2002). Tres CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3) son aportadas por la cadena ligera y tres por la cadena pesada e interaccionan directamente con un antígeno específico, de forma más específica son los CDR3 los que interactúan más estrechamente con el antígeno. Por otro lado, las regiones CH2 y CH3 de las cadenas pesadas forman la fracción cristalizable o fragmento Fc que cumple con funciones efectoras, tales como potenciación de la fagocitosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (De Genst *et al.*, 2006) (**Figura 6**).

La mayoría de las diferencias entre las inmunoglobulinas se limita a tres breves segmentos de la región variable (V) de las cadenas pesada y ligera. Se conocen como segmentos hipervariables y son tres bucles que sobresalen y conectan hebras adyacentes que forman los extremos amino de los dominios V de las cadenas pesadas y ligeras (De Genst *et al.*, 2006; Polonelli *et al.*, 2008). Uno de los grandes retos de la ingeniería de anticuerpos fue minimizar el tamaño de las Igs para el desarrollo de fármacos específicos y usar estos fragmentos como dianas terapéuticas. Para reducir el tamaño se intentó utilizar solamente los dominios variables N-terminales emparejados de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) como Fab (VL-CL+VH-CH) o como la fracción variable de una sola cadena (scFv) (VH y VL necesitan un enlazador polipeptídico) (Figura 6a derecha). Sin embargo su producción en células microbianas fue complicada porque se generaban estructuras multivalentes por la necesidad de un dominio asociado (Harmsen y De Haard, 2007). Es así que en 1993 aparecen los anticuerpos de cadena pesada (HCAbs) para brindar una solución alternativa a esta problemática. Un grupo de científicos de Bélgica descubrieron que además de los anticuerpos convencionales los camélidos y tiburones presentaban naturalmente un Ac

adicional conformado solo por cadenas pesadas. Aparentemente, los camélidos habrían atravesado por muchos procesos evolutivos en los que realizaron cambios en la secuencias de los genes de los anticuerpos convencionales hasta producir, luego de millones de años de adaptación, un subtipo de IgG con un peso de 80-90 kDa (Tillib, 2011; Krah *et al.*, 2015). En la familia de camélidos donde están incluidos los géneros *Lama*, *Vicugna* y *Camelus* se descubrió que carecían de cadenas ligeras y del dominio CH1 presente en los Ac convencionales como se aprecia en la Figura 6b izquierda. También se les conoce como anticuerpos de dominio único o de cadena pesada y representan del 30 al 75% de inmunoglobulinas circulantes (Rissiek y Koch-Nolte, 2014).



**Figura 6.** Diagrama esquemático de los anticuerpos convencionales y de cadena pesada. (a) IgG representa anticuerpos convencionales con 2 cadenas ligeras “VL” y 2 pesadas “VH” (150 kDa) (b) Anticuerpo pesado con solo 2 cadenas pesadas (90 KDa) y en la porción terminal la región variable del anticuerpo VHH o nanoanticuerpo (Harmsen y De Haard, 2007).

Lo que más llamó la atención en su estructura fue que poseían un dominio extremo N-terminal llamado VHH, nanoanticuerpo o nanocuerpo (Nc) o anticuerpo VHH. Este posee dimensiones en el rango nanométrico y es funcional sin necesidad de estar emparejado con cadenas ligeras pesando solamente 15 kDa (Harmsen y De Haard, 2007) (**Figura 6b**).

Los VHH son el equivalente estructural y funcional del Fab (fragmento de unión a antígeno) en los anticuerpos convencionales (Muyldermans, 2013).

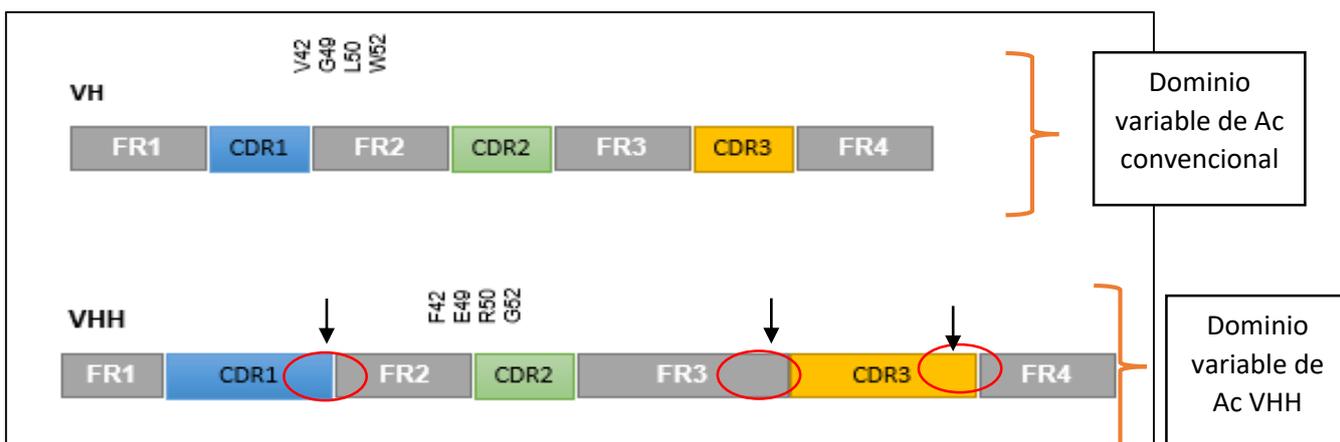
Se ha propuesto hipótesis sobre el posible origen de las IgG2 e IgG3 (anticuerpos VHH o de cadena pesada) y una de las más aceptadas explica que se formaron por una posible pérdida del exón CH1 de un camélido ancestral que junto con compensaciones de sustituciones aminoacídicas mejoraron las propiedades hidrodinámicas de los anticuerpos VHH en comparación con los convencionales (Maass *et al.*, 2007). Las secuencias que codifican al dominio CH1 probablemente fueron eliminadas en el empalme del ARNm por una mutación puntual, es decir que habría un conjunto de genes mutados cuya función es ser utilizadas por los HCAs para perder el CH1 y otro grupo para formar anticuerpos convencionales (Tillib, 2011). En ausencia de la cadena ligera esta alteración generó región bisagra larga o “Hinge largo” (IgG2) de 500 pb y la región bisagra corta o “Hinge corto” (IgG3) de 400 pb exclusivas de HCAs de camélidos (Maass *et al.*, 2007, Barreto *et al.*, 2018).

Estos anticuerpos VHH también han sido encontrados en peces cartilagosos y en los mismos muestran un tamaño muy reducido (12 kDa) con una elevada estabilidad química para unirse a los antígenos, por lo que ha generado expectativas respecto a su potencial terapéutico. Sin embargo, mayormente se usan camélidos por su facilidad de manejo e inmunización al ser animales grandes terrestres. Las metodologías para aislar VHH específicos contra algún antígeno de interés son las bibliotecas inmunes y no inmunes expuestas en fagos, bacterias, levaduras o ribosomas (Harmsen y De Haard, 2007; Muyldermans, 2013).

## II.2.2. Características básicas y propiedades de anticuerpos de cadena pesada

Al realizar análisis de las secuencias y estructuras cristalinas de los HCAbs se reveló que al igual que los dominios VH convencionales, los anticuerpos VHH contienen cuatro regiones framework (FRs) como estructura central y tres regiones CDRs (unión al antígeno) (Muyldermans, 2013) (**Figura 6**). Los FRs de los VHH muestran una homología muy alta con los anticuerpos humanos en más del 80% y en el FR2 se mencionan constantes sustituciones de aminoácidos en cuatro posiciones (según Kabat: 37, 44, 45 y 47) (Kabat y Wu, 1991; Harmsen y De Haard, 2007; Mitchell y Colwell, 2018). La región del FR2 está altamente conservada en los dominios VH y formar una interfase con los dominios VL, además en los Ac convencionales esta enriquecida con residuos aminoácidos hidrófobos (Harmsen y De Haard, 2007).

Los anticuerpos VHH o HCAbs tienen aminoácidos hidrofílicos lo que provocaría que los dominios VH sean más solubles en comparación con los presentes en Ac convencionales (Tillib, 2011; Salema y Fernández, 2013; Sabir *et al.*, 2014).



**Figura 7.** Estructura de un VHH. Se aprecia que los VHH están compuestos, al igual que los AC convencionales, de 3 regiones variables (CDR1-3) y 4 constantes (FR1-4).

Otro rasgo característico de los VHH se encuentra en los CDRs: en primer lugar, la porción N-terminal de CDR1 es muy variable. También, se ha visto que muchos dromedarios tienen un CDR3 más largo que los presentes en humanos y ratones; y que es el responsable de generar más bucles de plegamiento unidos por un enlace disulfuro adicional con una cisteína (Harmsen y De Haard, 2007; Sabir *et al.*, 2014). Este cambio brinda mayor estabilidad estructural a la región CDR3, lo cual, probablemente compensa la pérdida de la cadena ligera (Nuttall *et al.*, 2004).

Los HCAs a menudo contienen un residuo aminoacídico hidrofílico (principalmente arginina) en la posición del residuo 108 lo que le da un menor grado de hidrofobicidad (Tanha *et al.*, 2002). Probablemente esta es una sustitución propia de los mismos ya que los Acs convencionales contienen un residuo hidrofóbico muy conservado (triptófano) en esta posición que empareja con la VL (Harmsen y De Haard, 2007). Esto permitió inferir que los dominios VHH funcionales derivan de la recombinación de segmentos de genes convencionales VH con segmentos de genes de cadena constante pesada (CH) en la maduración de células B. El aumento de hidrofiliidad de los VHH se ha mencionado por los cambios mencionados en la cadena de VH que forman un soporte hidrofílico (Muyldermans, 2013; Harmsen y De Haard, 2007).

### II.2.3. Ventajas de los VHH

Respecto a aplicación biotecnológica, una gran ventaja es su alto nivel de producción microbiana en las bibliotecas de anticuerpos VHH generadas de camélidos inmunizados que suelen conservar la diversidad funcional completa. Esto es debido a que no necesitan recombinar las cadenas ligeras (VL) con

pesadas (VH) y se contrasta con la baja diversidad obtenida de las bibliotecas de Acs convencionales. Entonces se pueden aislar VHH de alta afinidad respecto al antígeno seleccionando directamente a un grupo de clones de bibliotecas inmunes con metodologías de exposición de “Selección de Fagos” (Harmsen y De Haard, 2007).

Otra ventaja es que permanecen funcionales después de ser sometidos a altas temperaturas. Esta alta estabilidad termodinámica aparente es atribuida a su repliegamiento eficiente luego de alguna desnaturalización química o térmica y por su resistencia contra la desnaturalización. También puede deberse a una mayor hidrofiliidad en el dominio ligero variable (VL) porque se encontró que un fragmento VH humano que había sido “camelizado” con aminoácidos hidrofílicos presentes en los VHH era más estable que el fragmento VH original; y por el contrario, la “decamelización” de un VHH para asemejarse al dominio VH humano reducía su estabilidad. Adicionalmente, los VHH pueden reconocer sitios antigénicos que no pueden ser reconocidos fácilmente por los anticuerpos convencionales y por su pequeño tamaño atraviesan el filtro renal lo que permite que se distribuya en la sangre y penetren el tejido rápidamente (Harmsen y De Haard, 2007).

#### II.2.4. Generación de anticuerpos VHH

La mayoría de los Acs completos funcionales solo pueden producirse eficientemente en células de mamíferos, principalmente cuando se necesita glicosilaciones para aplicaciones terapéuticas. En cambio los fragmentos de anticuerpos de cadena pesada son producidos convenientemente en bacterias o levaduras. Esta estrategia disminuye el tiempo del método de producción ya que

solo requiere procesos de fermentación simple y se pueden realizar a gran escala lo que disminuye los costos hasta de \$ 1 por gramo de proteína (Harmsen y De Haard, 2007). La mayoría de los sistemas microbianos a gran escala usan a *E. coli*, levaduras y hongos filamentosos y el nivel de producción puede variar en los clones en un factor de 100 (Frenken *et al.* 2000).

Hay factores que pueden influenciar en la generación de VHH. La adición de una glicosilación en el extremo N por ejemplo eleva la producción en levaduras y la ausencia de cisteínas en extremo C terminal la reduce en VHH de tiburón (Simmons, 2006). La alta capacidad de replegamiento de los VHH han permitido producirlo en *E. coli* (Olichon *et al.* 2007) y el reemplazo de residuos hidrófobos en los dominios variables de la cadena pesada aumenta la producción (Nieba, 1997, Harmsen y De Haard, 2007). Además de la naturaleza de los VHH, también influye el tipo de célula donde se expresa al VHH en la producción (procariota, eucariota), la suplementación con sorbitol, casamino ácidos (mezcla de aminoácidos esenciales) o etilendiamina en *P. pastoris* han elevado la producción (Thomassen *et al.* 2005, Rahbarizadeh *et al.* 2006).

#### II.2.4.1. Biblioteca genómica

Los anticuerpos VHH se expresan fácilmente en bacterias y son susceptibles a la tecnología de ADN recombinante. Se consideran como los fragmentos de unión a antígeno intactos más pequeños disponibles. La razón de usar este tipo de biblioteca es que ofrece mayor diversidad lo que permite identificar cualquier antígeno potencial y permite recuperar bibliotecas representativas adecuadas para el estándar inmune. Además la producción se da en bacterias por lo que es menos costoso que los cultivos de células de mamíferos.

Las bibliotecas obtenidas en *E. coli* con el ADNc a partir de  $10^9$  linfocitos son suficientes para recuperar secuencias de anticuerpos con afinidad comparable a los Ac monoclonales (Muyldermans *et al.*, 2009 en Sabir *et al.*, 2014).

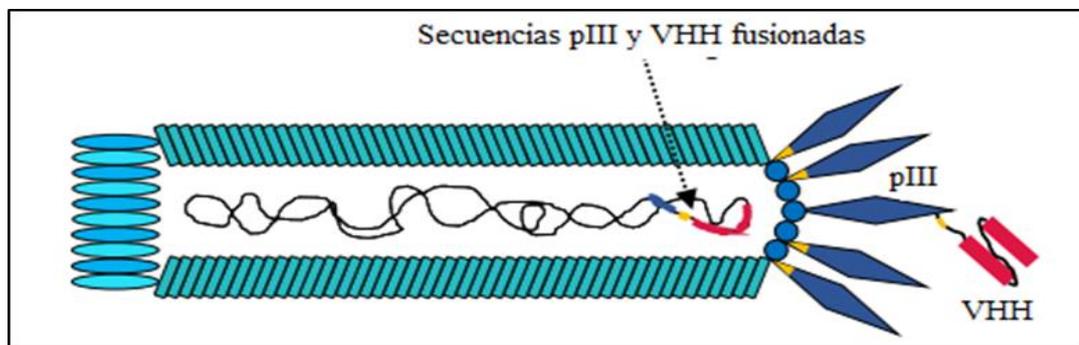
El número de clones recombinantes necesarios para lograr cobertura del repertorio de anticuerpos de cualquier biblioteca inmune de 42% es como mínimo  $10^7$  clones, y hasta  $10^{13}$  para abarcar la diversidad clonal completa (Greiff *et al.* 2017). De esta manera se asegura la obtención de un promedio de anticuerpos VHH representativos y con diversidad suficiente (Miyazaki *et al.*, 2015). Estas grandes bibliotecas genómicas diversas nos permiten aumentar la posibilidad de identificar, por lo menos, un anticuerpo con las características requeridas de especificidad. En términos prácticos la diversidad y la utilidad teórica de los anticuerpos generados aumentan con el número de animales inmunizados y de linfocitos recolectados ya que esto amplía la diversidad genética de la biblioteca (Kastelic *et al.*, 2009; Olichon y de Marco, 2012).

Los métodos estándar para construcción de la biblioteca de VHH fueron diseñados para evitar la contaminación con VH de Ac convencionales. Los pasos fundamentales y críticos para generar una biblioteca genómica son los siguientes: (1) La síntesis de ADNc a partir del ARNm; (2) PCR con cebadores específicos para discriminar a los VHH de los Ac convencionales; (3) la ligación del VHH al vector recombinante y la obtención de, por lo menos  $10^6$  clonas recombinantes que expresen el fragmento VHH de 500-700 pb (Kastelic *et al.*, 2009; Olichon y de Marco, 2012).

#### II.2.4.2. Técnica de Presentación de fagos

La presentación de fagos o también conocida como “Phage Display” fue descrita por Smith en 1985, quien incorporó con éxito, ADN foráneo en el cromosoma del fago M13, de manera que los péptidos expresados por este ADN se fusionaron con la proteína de la cubierta del pIII del fago (Ledsgaard *et al.*, 2018).

La tecnología de presentación de fagos es un método robusto, fácil de realizar y económico mediante la cual se seleccionan antígenos específicos de grandes bibliotecas combinatorias. Estas contienen miles de millones de fragmentos de anticuerpos y utilizan a los fagos que fusionan al anticuerpo con el **gen III** para luego ser expresados en la superficie del exterior del virión como **pIII** (**Figura 8**) (Jara-Acevedo, 2016). La presentación de fagos se basa en la manipulación genética de genes de proteínas de superficie de fagos filamentosos como M13. El ADN extraño se introduce en el genoma del fago filamentosos (**gen III**) y el péptido extraño codificado como una proteína fusionada a otra proteína de recubrimiento de superficie (Rajput, 2014). Los anticuerpos son expresados para proseguir con la selección de los fagos que reconocen al antígeno de forma específica (Qi *et al.*, 2012; Ledsgaard *et al.*, 2018).



**Figura 8.** Fago M13 expresando en su superficie la proteína pIII y el anticuerpo (Ledsgaard *et al.*, 2018).

El método aprovecha la posibilidad de vincular una proteína (fenotipo) a su gen (genotipo) a través de un fago y se viene utilizando desde 1990 con anticuerpos, incluidos fragmentos de dominio pesado (VH), VHH de dominio pesado de camélidos y tiburones, fragmentos de unión a antígeno (Fab), etc. La tecnología permite una rápida identificación de la proteína y aprovecha la infectividad del fago con la capacidad de unión antígeno-anticuerpo (Jara-Acevedo, 2016; Ledsgaard *et al.*, 2018).

Es posible entonces generar grandes bibliotecas combinatorias con millones de anticuerpos con las propiedades de especificidad y afinidad necesarias para aglomerar antígenos utilizando la técnica de despliegue de fagos con el bacteriófago filamentoso M13 que infecta *E. coli* (Smith y Petrenko, 1997; Ledsgaard *et al.*, 2018).

La infección del fago se da a través de la unión de la proteína **pIII** al receptor pili F de la bacteria seguido del ingreso del mismo al citoplasma de la bacteria. Cuando el genoma M13 del fago inicia su replicación acumulando componentes de particulares virales en las células huésped y culmina en el ensamblaje de las partículas del fago y su posterior liberación no lítica (no líticos) (Sidhu, 2001).

Por ejemplo el fago M13 es no lítico, ya que puede permanecer en la célula al finalizar el ciclo viral secretando viriones por exocitosis con una porción de envoltura de la membrana celular que los protege. Inicialmente los fagos se usaron como vectores de presentación; luego los fagémidos se reconocieron como los vectores más populares, ya que contienen doble origen de replicación para *E. coli*, un gen que codifica para una proteína de la cápside viral, múltiples sitios de

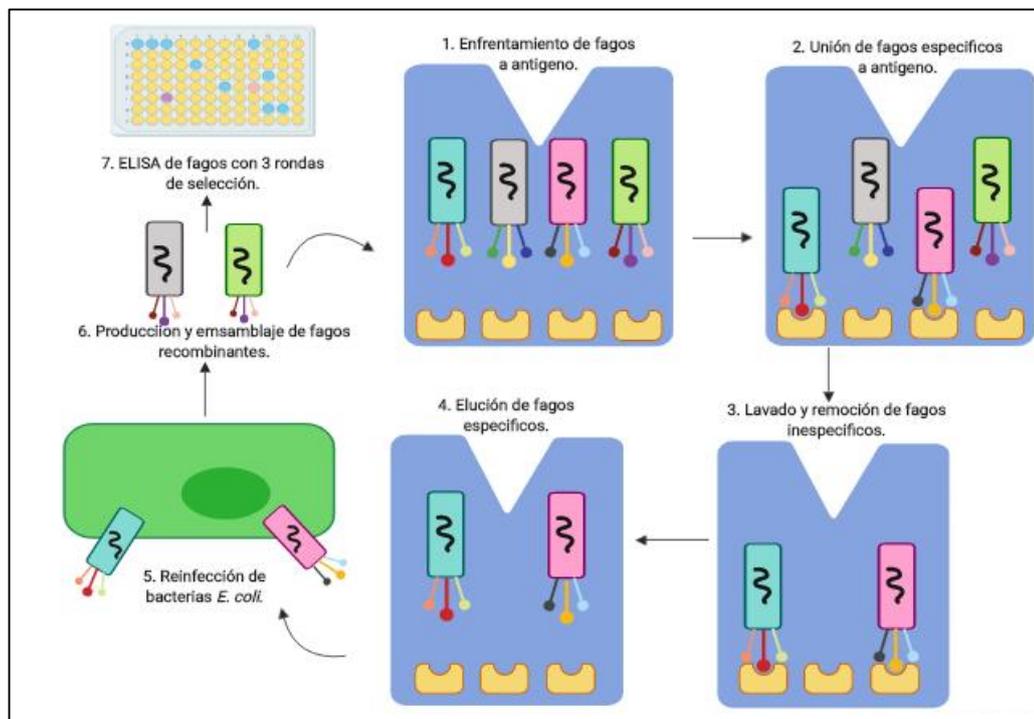
clonaje y un gen de resistencia a antibióticos (Qi *et al.*, 2012; Ledsgaard *et al.*, 2018).

Los fagémidos carecen del contenido genético necesario para ensamblar las partículas virales completas y solo lo adquieren en la infección por el fago auxiliador (VCS-M13), el cual posee un origen de replicación alterado que no le permite replicarse eficientemente generando que las partículas virales resultantes se incorporen preferentemente al del fagémido. Las bacterias que sean transformadas por un fagémido y que luego son infectadas con un fago auxiliador producen fagos híbridos durante el ensamblaje con la proteína pIII nativa fusionado a la proteína de interés (Poul y Marks, 1999; Qi *et al.*, 2012).

Se expresará una proteína híbrida en la superficie del fago maduro fusionada al anticuerpo además de la secuencia genética contenida en el la bacteria. La partícula fágica posee un vínculo entre genotipo (ADN en el fago) y el fenotipo (proteína expuesta en el fago). Luego se someten a los fagos a rondas de interacción de los anticuerpos con la proteína blanco fijada a una superficie (**Figura 9.1**). Luego de la exposición viene un proceso de selección y enriquecimiento, los fagos que expresaron anticuerpos específicos se adhieren al blanco y aun cuando son lavados se quedan retenidos (**Figura 9.2**). Los fagos unidos se utilizan para reinfectar bacterias (**Figura 9.5**) y producir más partículas virales con los anticuerpos (Hertveldt, 2009; Clementi *et al.*, 2012; Ledsgaard *et al.*, 2018).

Esto permite que el sistema de selección de ligandos posea una elevada afinidad o especificidad. Los fagos seleccionados pueden ser purificados y su ADN puede ser secuenciado para inferir la secuencia aminoacídica del péptido expuesto (Sidhu, 2001). Finalmente, el ELISA de fagos se usa para la selección de una población de fagos específicos en el reconocimiento (**Figura 9.7**) (Winter *et al.*, 1994).

La técnica de despliegue en fagos se ejemplifica resumidamente en la **Figura 9**.



**Figura 9.** Esquema de la técnica de presentación de fagos 1: Enfrentamiento de los fagos recombinantes a la proteína fijada a la superficie del pocillo, 2: Unión de fagos recombinantes. 3: Lavado y remoción de los fagos inespecíficos, 4: Elución y aislamiento de fagos específicos, 5: Reinfeción de bacterias, 6: Producción de fagos recombinantes, 7: Selección de los fagos más específicos para el ELISA de fagos.

### III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

#### III.1. JUSTIFICACIÓN

El virus de la hepatitis B (VHB) infecta a más de 300 millones de personas en todo el mundo y es la causa más común de enfermedades hepáticas y cáncer de hígado. La infección causa un amplio espectro de afecciones que van desde aguda (insuficiencia hepática fulminante) hasta hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Liang, 2009).

La infección aguda por VHB puede ser asintomática o estar presente como aguda sintomática, en la mayoría de casos hay recuperación completa pero el 5% -10% son incapaces de eliminar el virus y se infectan crónicamente (Liang, 2009). Lamentablemente aún no existe un tratamiento completamente eficaz si la infección se torna crónica por lo que es muy necesaria una alternativa terapéutica (Cabezas, 2008). Aparte del tratamiento otra limitante es el diagnóstico dirigido específicamente solo a la proteína de superficie (HBs) y existen afectados que no presentan títulos altos de anticuerpos contra este antígeno aunque si con HBcAc (Kimura *et al.*, 2003). Debido a que la proteína core (HBcAc) de la nucleocápside nos indica el estadio de replicación activa del virus (cuando está en la etapa de ensamblaje) también podría utilizarse como indicador de pacientes en estado contagioso (Kimura *et al.*, 2003).

Actualmente se han propuesto terapias utilizando anticuerpos para neutralizar el VHB sin aumentar anticuerpos propios de la infección (Kolkman y Law, 2010). Hasta ahora estos tratamientos presentan las limitantes típicas del uso de anticuerpos; es así que como una alternativa se propone el uso de anticuerpos

VHH, que mantienen una vida media más prolongada y que por su menor tamaño tienen mayores facilidades en la producción recombinante (bacterias) y en su estabilidad estructural (Kolkman y Law, 2010). Se considera muy necesario este tipo de investigaciones por la relevancia e impacto que tendría en el sector de salud pública nacional e internacional ya que a pesar de que han pasado décadas aún no se logra obtener una terapia adecuada para los afectados y/o un diagnóstico completamente efectivo (Ministerio de Salud, 2017). Los beneficiados serían los afectados distribuidos en 20 regiones del país que sufren los síntomas de esta penosa enfermedad (Cabezas, 2008). Actualmente, los anticuerpos VHH están siendo investigados para aplicación terapéutica ya que son capaces de neutralizar la infección de diversos virus (influenza, virus sincitial respiratorio, rabia, poliomeilitis, fiebre aftosa, rotavirus, retrovirus endógeno porcino y VIH), ya sea inhibiendo la replicación viral, evitando el ensamblaje o la liberación de las partículas virales (Vanlandschoot *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2017).

El objetivo del presente estudio fue generar VHH en alpaca (*Vicugna pacos*) utilizando como antígeno a la proteína recombinante Core del VHB para un futuro uso en diagnóstico y/o terapia de la enfermedad.

## III.2. OBJETIVOS

### III.2.1. OBJETIVO GENERAL

Generar anticuerpos VHH de alpaca utilizando como antígeno a la proteína recombinante core del virus de hepatitis B.

### III.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

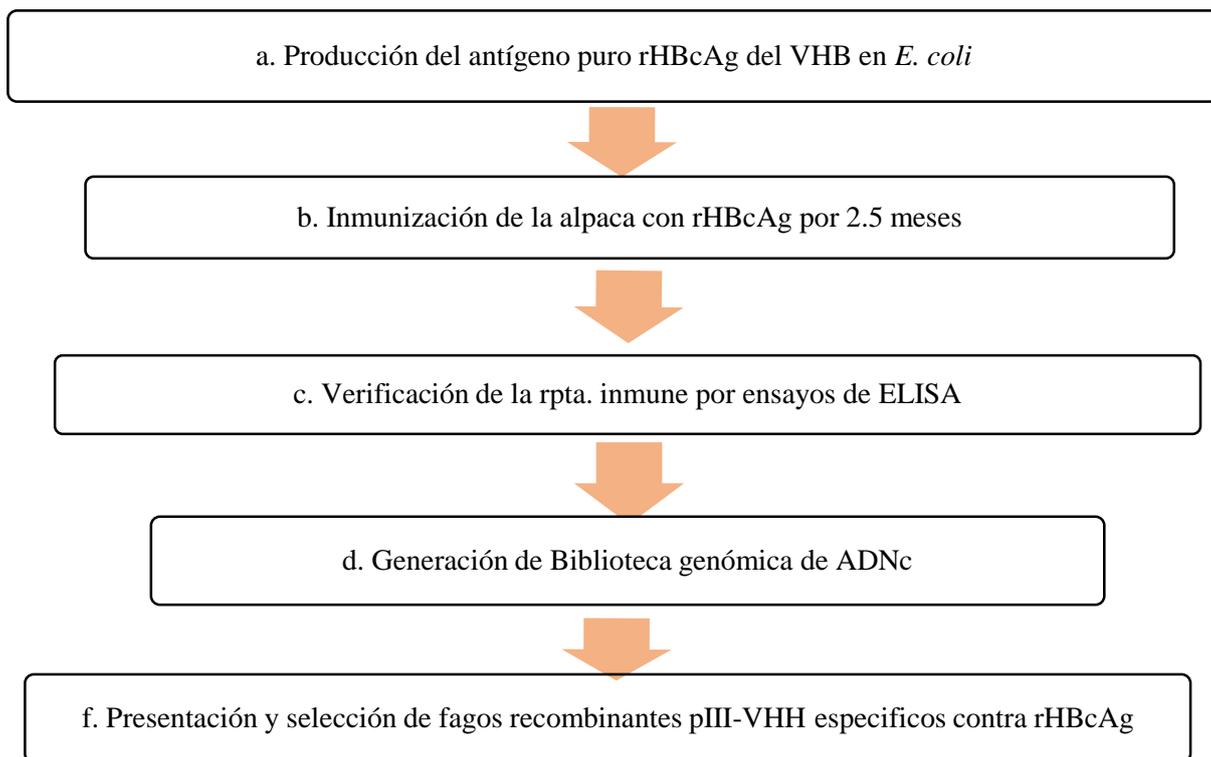
- Producir a la proteína recombinante core del VHB en *E. coli* BL21.
- Inducir una respuesta inmunológica en la alpaca al inocular la proteína recombinante core del VHB.
- Generar una biblioteca inmune de las secuencias de ADNc de los anticuerpos VH en *E. coli* BL21.
- Producir fagos que expresen anticuerpos VHH específicos contra la proteína rHBcAg del VHB.
- Secuenciar a los anticuerpos VHH expresados en los fagos específicos contra core.
- Analizar las secuencias nucleotídicas de anticuerpos VHH mediante herramientas bioinformáticas.

#### IV. METODOLOGÍA

La metodología engloba cinco pasos fundamentales (**Figura 10**):

Se inició al producir la proteína recombinante del VHB, se debió purificar para evitar cualquier reacción inespecífica de los anticuerpos contra otro epítipo. Seguido de la inoculación de la proteína pura a la alpaca cada semana por 2 meses y medio hasta que se incrementó el título de anticuerpos, que fue monitoreado mediante ensayo de ELISA. Antes de inocular se aisló el suero pre inmune para compararlo con los sueros cada semana y evidenciar un aumento de la señal de los anticuerpos (lo recomendable es que sobrepase 3 veces al suero pre inmune).

Luego de obtener la señal adecuada de anticuerpos se procedió a aislar la sangre periférica de la alpaca por venopunción y se extrajo ARN total que se utilizó para obtener ADNc, que se usó en una amplificación (PCR) con cebadores específicos solo de anticuerpos VHH. De esta forma se generó la Biblioteca genómica de ADNc. Los amplicones con la secuencia VHH fueron insertados en el fagémido pHEN2 y se utilizó para la transformación de *E. coli* competentes. Las cepas bacterianas *E. coli* recombinantes se infectaron con fago ayudador VCS-M13 para expresar sus genes y poder ensamblar las partículas virales que incluyeron en su superficie la proteína pIII, propia del fago, fusionada al VHH de interés. Finalmente se realizó la producción de fagos y se realizó un ELISA de verificación a 3 dosis del antígeno (1, 0.8 y 0.5 µg) para seleccionar a los fagos que expresaron VHH específicos contra rHBcAg.



**Figura 10.** Esquema resumido de la metodología para generar anticuerpos VHH contra rHBcAg.

#### IV.1. Transformación de *E. coli* con el plásmido recombinante

Se utilizó el plásmido pET28 (Bioclone Inc, San Diego CA) con número de acceso EF456735 en GenBank, se puede acceder a través de National Center for Biotechnology Information (NCBI). El plásmido contenía la secuencia nucleotídica de la proteína rHBcAg del VHB asociada a una cola de residuos de polihistidina para una posterior purificación por cromatografía de afinidad con una columna Ni-NTA (Matriz de níquel y ácido nitrilo acético) (descripción más detallada en el manual de QIA expressionist (QIAGEN, 2003) en base al protocolo de Crowe *et al.*, 1995.

Se utilizaron bacterias *E. coli* que fueron transformadas con el plásmido pET28 mediante electroporación (Biorad) bajo las condiciones de 2.5 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Luego se sembraron las bacterias transformadas en placas de agar Luria-Bertani (LB) suplementado con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina (Kan) por 16 horas (h) a 37 °C. Se usó una sola colonia para inocular en 1L de medio LB suplementado con 50  $\mu$ g/ml de Kan y se incubó a 37 °C O/N (toda la noche).

#### IV.2. Expresión y producción de la proteína recombinante core (HBcAg)

Se centrifugó 2 ml del cultivo incubado toda la noche a 5000 RPM por 5 minutos (min), y el precipitado se resuspendió en 2 mL de medio LB/Kan. Se utilizó 1 ml del cultivo y se inoculó en 50 mL de caldo LB/Kan en un frasco erlenmeyer de 50 ml, a 37 °C y se cultivó hasta alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm de 0.4-0.5 (aproximadamente 2-3 horas). Cuando se alcanzó la fase exponencial se colectó 1 mL del y se centrifugó a 13 000 RPM por 1 min, luego se eliminó el sobrenadante y se almacenó el precipitado a -20 °C hasta su posterior uso en electroforesis SDS-PAGE.

Al resto del cultivo se le adicionó IPTG (isopropyl- $\beta$ -Dthiogalactoside) a 1 mM para permitir la expresión del gen para core y se incubó en movimiento (250 RPM) por 5 h a 37 °C. Se colectó 1 mL de cultivo y se centrifugó a 13.000 RPM por 1 min, luego se descartó el sobrenadante y se almacenó el precipitado a -20 °C hasta su posterior uso en SDS-PAGE. El cultivo restante se centrifugó a 10.000 RPM por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se almacenó el precipitado a -20 °C hasta su posterior purificación. La expresión e inducción de la proteína recombinante fueron evaluadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 12.5% con colorante azul de Coomassie.

#### IV.3. Lisis celular en condiciones nativas

Antes de la purificación se realizó la lisis de las bacterias que expresaron la proteína recombinante core (rHBcAg). Para ello se resuspendió el precipitado celular en solución de lisis (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8). El resuspendido se sometió a tratamiento con lisozima (pH 7, 10 mM) por 30 min, luego a cambios drásticos de temperatura (37 a -80 ° C) y sonicación bajo las condiciones de 1 pulso/segundo/3 min por 3 ciclos. Se centrifugó a 10.000 RPM por 30 min y finalmente se almacenó el sobrenadante a - 80 °C hasta su posterior uso. La presencia de la proteína de interés expresada en el sobrenadante se evaluó con electroforesis SDS-PAGE al 12.5% con colorante azul de Coomassie.

#### IV.4. Purificación por cromatografía de afinidad por columnas de níquel

Para purificar a la proteína rHBcAg de toda la totalidad proteica expresada se realizó una cromatografía de afinidad (C.A.) con una columna de níquel de NI-NTA (descripción más detallada en el manual de QIA expressionist (QIAGEN, 2003), optimizado en base al protocolo de Crowe *et al.*, 1995 y Bornhorst y Falke, 2000; además incluido por Block *et al.*, 2009).

Su matriz fue reducida al 50 % con solución de lisis (500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8) y luego se mezcló 1 ml de la matriz al 50 % con 4 ml del sobrenadante del lisado celular. Se sometió a movimiento por 1 h a 4 °C (250 rpm) y luego se añadió a la columna hasta separarse en dos fases (10 min).

Se colectaron 5ml del Flow trough (FT) conteniendo proteínas no unidas a la columna, se lavó con 4 ml solución de lavado (500 mM NaCl, 20 mM imidazol,

pH 8) por veintidós veces. Luego del lavado se eluyó el contenido con solución de elución (500 mM NaCl, 50 mM imidazol, pH 8) por veinte veces. Las fracciones obtenidas del FT, de los lavados y eluidos fueron leídas directamente en el espectrofotómetro a 280 nm. La purificación se evaluó con electroforesis SDS-PAGE al 12.5% y tinción con colorante azul de Coomassie.

#### IV.5. Purificación por cromatografía de intercambio iónico

Se realizó un paso más de purificación con la resina CM-Sephadex que nos permitió una purificación completa de la rHBcAg, en base a su punto isoeléctrico teórico ( $p_i$  4.6). Se utilizó solución de glicina (10 mM) a pH 10 y pH 5 como disolvente. La resina fue colocada en la columna y fue lavada con 5 ml de la solución de glicina a pH 10 por 5 veces para equilibrar el pH de la resina, seguidamente se adicionó 2 ml del purificado eluido y se colocó sobre la columna hasta separarse en dos fases (10 min). Se recogieron las fracciones eluidas usando la solución de glicina pH 10 y fueron leídas en el espectrofotómetro a 280 nm.

#### IV.6. Inmunización de alpacas con la proteína purificada Core o cAgHb

Todos los experimentos descritos fueron aprobados por el Comité de Ética de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Antes de la primera inmunización se recolectó suero pre inmune mediante la toma de una muestra de 12 ml de sangre periférica endovenosa obtenida por sistema al vacío el cual fue almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las inmunizaciones con el antígeno se realizaron cada semana por 2 meses y medio de acuerdo a Pardon, 2014. Antes de cada inoculación se procedió a mezclar el inmunógeno (proteína recombinante Core "rHBcAg") con un mismo volumen de adyuvante completo (primera dosis) o incompleto (dosis restantes) de Freund para formar un emulsión homogénea. Se

mezcló de forma regular y constante sobre hielo usando manguerillas y jeringas de vidrio por 1 hora. Se rasuró la zona antes de inocular, se limpió con alcohol de 70° y luego se inyectó en el lomo de la alpaca 1ml (200 µg de rHBcAg) de la emulsión vía subcutánea (primera dosis). Las inmunizaciones posteriores tuvieron diferente concentración: de la segunda-octava dosis se usaron con 100 µg y de la novena a la doceava dosis se subió a 500 µg.

#### IV.7. Evaluación de la respuesta inmune por análisis de suero

La presencia de anticuerpos anti-HBcAg en las muestras serológicas de la alpaca inmunizada fue determinada mediante el ensayo de ELISA indirecto. Para estandarizar el método se utilizaron variantes de antígeno, suero y conjugado (marcado con peroxidasa) hasta obtener la señal adecuada sobre el control (suero pre inmune). Lo recomendable es obtener un incremento del título de anticuerpos en el suero que sobrepase en señal al pre inmune por sobre 3 veces mediante ensayo de ELISA.

La fijación del antígeno en la placa se realizó diluyendo el rHBcAg en Solución de Fijación (Carbonato/bicarbonato, pH 9.6) para una concentración de 800ng/300 µL. Seguidamente se añadió 300 µL en cada pocillo de la placa de ELISA y se incubó a 4°C durante 16 h. Luego de la incubación se lavaron 5 veces los pozos con Solución de Lavado (S.L.) (Solución salina fosfatada 1X (PBS 1X)-Tween20 al 0.05 %, pH 7.4) y se incubó 5 min en cada lavado. Se utilizaron 100 µL de Solución de Bloqueo (BSA al 5 % en S.L.) en cada pocillo y se incubó a 37 °C por 1 hora. Posteriormente se lavaron los pocillos 5 veces con S.L. y se añadieron 100 µL de suero diluido a 1/500 en Solución de Bloqueo a cada pocillo. Se incubó a 37 °C por 1 hora y luego se volvió a lavar 5 veces con S.L. De inmediato se

añadieron 100  $\mu$ L de conjugado de peroxidasa al 1/2000 en Solución de Bloqueo por 1 hora a 37 °C. Nuevamente se lavaron los pocillos 5 veces y se añadieron 100  $\mu$ L del sustrato TMB atemperado por 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se inactivó la reacción usando 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2N y se leyó la absorbancia de la placa a 450 nm en el lector de ELISA. Cada experimento se realizó por triplicado.

#### IV.8. Obtención de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Luego de 12 inmunizaciones y con la respuesta inmune en su máxima señal se extrajeron 65 ml de sangre periférica de la alpaca en tubos de EDTA por venopunción por sistema al vacío. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante la gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque de acuerdo a la metodología de Castillo *et al.*, 2011 y Gushiken, 2016.

La sangre extraída fue transportada a una cabina de flujo laminar, luego se diluyó con un mismo volumen de Solución de Hank's estéril y se homogenizó delicadamente. Los 40 ml de sangre diluida fueron adicionados con mucho cuidado sobre un volumen de 20 ml de Ficoll-Hypaque y se centrifugó a 700 G por 30 min. Luego de la centrifugación se obtuvieron 3 fases separadas, la porción intermedia entre las 2 fases superiores fue aislada y se lavó con PBS 1X, se centrifugó a 1200 G por 15 min, se repitió el lavado y se centrifugó a 700 G por 15 min. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado blanquecino en 1ml de PBS 1X. Se cuantificó en la cámara de Neubauer con azul de tripano.

#### IV.9. Aislamiento y cuantificación del ARN total

El ARN fue extraído de las PBMC, se diluyó en 11 ml de Trizol y se mezcló delicadamente hasta obtener una solución homogénea y translúcida. Se utilizó el Pure Link RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a la recomendación del fabricante. Seguidamente se añadieron 3 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente en vórtex, se dejó incubando por 5 min a Ta. Se centrifugó a 12 000 G por 20 min a 4 °C y se obtuvieron 3 fases.

La fase acuosa superior fue transferida a un tubo de centrifuga de 15 ml para añadirle el mismo volumen de etanol al 70 % y se mezcló por inversión. Posteriormente se utilizaron 700 µL de la mezcla y se añadieron a una columna del kit, luego se centrifugó a 12 000 G por 15 seg y se descartó la solución del tubo colector. Se repitió este paso añadiendo 700 µL hasta utilizar todo el volumen. Luego se lavó la columna con Solución de lavado I, se centrifugó a 12 000 G por 15 seg y se descartó la solución del tubo colector. Se repitió el lavado con Solución de lavado II (etanol), se centrifugó a 12 000 G por 15 seg y se descartó la solución del tubo colector. Luego de descartar el tubo colector y traspasar la columna a un microtubo, se eluyó la columna con 50 µL de agua libre de RNAsas. Finalmente se cuantificó por espectrofotometría usando el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior uso. Se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en Solución de Tris, Borato y EDTA (TBE) que se tiñó con SYBR-Green (6X). El marcador molecular  $\lambda$ /HindIII se sometió a 65°C por 5 min.

#### IV.10. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se usó el kit Superscript III Reverse Transcriptase de Invitrogen de acuerdo a la recomendación del fabricante. Se utilizaron 2 µg de ARN en un RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction). Fue necesario usar secuencias cortas de Timina (Oligo-dT) para amplificar solamente el ARN mensajero que posee secuencias de Adenina (Poli-A). Luego en la mezcla se utilizó la enzima transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen) y se colocó en el termociclador nuevamente para la síntesis de ADNc. Finalmente el producto se almacenó a 4 °C y luego a - 20 °C hasta su utilización.

#### IV.11. PCR del ADNc

Se realizó una amplificación por PCR solo de las secuencias de los VHH utilizando cebadores específicos que ya fueron utilizados por otros autores (Maass *et al.*, 2007; Pardon *et al.*, 2014). Los cebadores utilizados fueron (**Tabla 2**):

Un cebador delantero VHH-Sfi (5'-TCGCGGCCAGCCGGCCATGGCKCAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGG-3') específico para FR1 y dos cebadores reversos específicos de las cadenas pesadas de los anticuerpos para la región "bisagra corta" VHH-R1Not (5'-TTGCGGCCGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3') y para la región "bisagra larga" VHH-R2Not (5'-TTGCGGCCGCTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3') (Maass *et al.*, 2007; Pardon *et al.*, 2014).

**Tabla 2.** Reactivos para PCR del ADNc.

Reactivos	1 reacción	10 reacciones
Buffer 10 X	1 $\mu$ L	30 $\mu$ L
dNTPs (0.31 mM/ $\mu$ l)	0.8 $\mu$ L	8 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (6.25 mM/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
Primer VHH-R1Not (80 $\mu$ M/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
Primer VHH-R2Not (80 $\mu$ M/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	5.26 $\mu$ L	52.6 $\mu$ L
Taq Platinum (5U/ $\mu$ l)	0.04 $\mu$ L	0.4 $\mu$ L
ADN	2 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Total	10 $\mu$ L	100 $\mu$ L

Como se muestra en la **Tabla 2** por reacción se utilizaron 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 20  $\mu$ M de cada cebador delantero y reverso, 0.2 unidades de enzima Taq Platinum Polymerase (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó bajo las condiciones de: Un ciclo inicial de denaturación (94 °C por 2 min), 30 ciclos de amplificación (94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg) y finalmente un ciclo de extensión (72 °C por 10 min). Los productos obtenidos fueron evaluados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % TBE 1X (80 V, 1h y 15min) teñida con bromuro de etidio al 2 % y lo restante fue almacenado a 4 °C hasta su posterior uso. Los productos se sometieron a limpieza usando el QiaQuick Gel Extraction Kit y luego se cuantificó en el equipo Nanodrop a longitud de onda de 260 nm. Luego fueron sometidos a consecutivas digestiones enzimáticas y cuantificación en Nanodrop en cada paso. Inicialmente fueron digeridos con la enzima SfiI dejándolos en incubación a 50 °C por 16 h. Luego se volvió a purificar con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System La segunda digestión utilizó a la enzima NotI y se incubó a 37 °C por 16 horas. Luego del tiempo la enzima se inactivó a 65 °C por 15 min y se purificó con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

#### IV.12. Digestión del vector pHEN2 y ligación con los productos de PCR

Los productos de PCR fueron clonados dentro del vector pHEN2 que es un fagémido que posee la secuencia de la fosfatasa alcalina entre los sitios de restricción SfiI y NotI. El vector pHEN2 Fue donado por el Dr. Daniel Baty por medio del Dr. Kastelic (Protein Biotechnology Group, Babraham Bioscience Technologies, UK).

El vector pHEN2 fue previamente digerido con las enzimas de restricción para los sitios SfiI y NotI presentes en la secuencia de pHEN2 para poder liberar el fragmento en el que se incluirán a los VHH amplificados. Luego se realizó una limpieza con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Con este purificado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % a 50 V por 6 horas para poder separar los fragmentos del vector digeridos. Luego de la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de y luego se reveló en el transiluminador con radiación ultra violeta (UV) y se utilizó un bisturí para cortar el fragmento mayor liberado por el vector pHEN2. A partir del gel se purificó el producto con QiaQuick Gel Extraction Kit y se cuantificó en Nanodrop. Finalmente se realizó una última digestión incubándolo con 2.6 µg de fosfatasa alcalina (SAP) a 37 °C durante 16 h y luego se inactivó a 65 °C por 15 min y se limpió nuevamente con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

Los productos fueron insertados mediante ligación en el vector pHEN2. Se utilizó la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (New England BioLabs). Y se realizó de acuerdo a la relación molar 1:8 de inserto/vector. Para aproximar la masa del inserto se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Masa del inserto} = \frac{8 \times \text{Tamaño del inserto (pb)} \times \text{Masa del vector (ng)}}{\text{Tamaño del vector (pb)}}$$

El tamaño del inserto es de aproximadamente 500 pb; el vector pHEN2 es teóricamente 5877 pb y se utilizaron 100 ng de vector por cada reacción de ligación. Se necesitaron 86.95 ng de inserto. Con estos datos se calcularon los volúmenes de los componentes requeridos. Se determinó también la tasa de error con autoligados (ligación sin inserto) y un control usando el genoma del bacteriófago Lambda digerido con la enzima HindIII ( $\lambda$ /HindIII). Las reacciones de ligación se incubaron durante 17 h a 16 °C y luego se inactivaron a 65 °C durante 15 min. Luego se corrió una electroforesis del control de ligación junto al marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII en gel de agarosa 1 % TBE 1X (80 V, 1 h) que fue teñido con bromuro de etidio al 2%.

Se purificó el ADN de las reacciones de ligación y auto-ligación por precipitación etanólica. Se añadió H<sub>2</sub>O grado molecular a cada reacción hasta completar 100  $\mu$ L y se mezclaron con 300  $\mu$ L de etanol absoluto. Seguidamente se añadieron 10  $\mu$ L de acetato de sodio 3M, 10  $\mu$ g de glucógeno y se homogenizó. Se incubó a -80 °C por 1 hora y culminado el tiempo de inmediato se centrifugó a 16.000 G por 20 min a 4 °C. Luego se descartó el sobrenadante y se añadieron 400  $\mu$ L de etanol al 70 % y se centrifugó a 16.000 G por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó desecando el precipitado a Ta toda la noche. Finalmente se resuspendió el precipitado en 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O grado molecular libre de ARNasas y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

#### IV.13. Preparación y electroporación de células *E. coli* TG1 competentes

- El siguiente protocolo se realizó con variantes a la metodología de Warren (2011) con glicerol, centrifugaciones y lavados continuos con agua destilada a bajas temperaturas. Cepas de *E. coli* TG1-DH5 $\alpha$  se sembraron en placas M9 o medio mínimo (Sambrook y Russel, 2001) por agotamiento y se incubó a 37 °C por 24 h. De las colonias que crecieron, se aisló una y se sembró en 5 ml de 2XTY o medio de extracto de levadura con triptona a 37 °C por 16 h. Se utilizaron 300  $\mu$ L del cultivo y se diluyeron en 300 ml de 2XTY en un matraz de 2L y se incubó a 37 °C hasta alcanzar OD600nm de 0.9. El cultivo se repartió en 6 tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugó a 6000 G por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de cada tubo se resuspendió suavemente en 50 ml de agua ultra pura helada y se incubó por 30 min en hielo. Se centrifugaron a 6000 G por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de cada uno de los 6 tubos se resuspendió suavemente en 25 ml de agua ultra pura helada, se repartieron en 3 tubos con 50 ml y se incubó por 30 min en hielo. Se centrifugaron a 6000 G por 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante, el precipitado de cada tubo se resuspendió suavemente en 13 ml de agua ultra pura helada y luego se repartió en 1 tubo con 40 ml y se incubó por 30 min en hielo. Se centrifugaron a 6000 G por 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió suavemente en 2 ml de glicerol y se repartió en alícuotas de 60  $\mu$ L y almacenó a -80 °C durante por lo menos 10 h.
- Para la electroporación se mezclaron células competentes de *E. coli* TG1-DH5 $\alpha$  con el plásmido pHEN2 ligado con inserto y se incubó en hielo por 1 min. Luego la mezcla se traspasó a una cubeta de policarbonato helada con ranura de 1

mm<sup>2</sup> y se le sometió a un pulso de 2,5 kV, 25 μF y 200 Ω (Electroporador BIORAD). De inmediato se resuspendió la mezcla en 1 mL de medio SOC o caldo superóptimo atemperado e incubó a 37 °C por 1 h a 250 RPM. Luego se usó el cultivo para realizar diluciones seriadas en medio 2XTY (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup>) y se sembraron 10 μL de cada dilución en placas con medio 2XYT-GA (medio suplementado con glucosa al 2% y ampicilina 100 μg/ml). El volumen restante se sembró en placas de medio 2XYT-GA de 100 mm<sup>2</sup> y se incubaron a 37 °C por 16 h.

#### IV.14. PCR de colonias y Biblioteca genómica de VHH

Las placas con diluciones se usaron para estimar el número de recombinantes utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de recombinantes} = \frac{\text{UFC} \times \text{Volumen total} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen sembrado}}$$

Donde UFC son las unidades formadoras de colonia.

- Las colonias contienen el vector pHEN2 más el inserto (20 Ligandos) y también se incluyeron 5 autoligandos y el plásmido pHEN2 integro. A. 20 colonias elegidas al azar de la dilución 10<sup>-4</sup> se las sometió al siguiente tratamiento: Fueron picadas y se diluyeron en 100 μL de agua ultra pura, se hirvieron por 10 min, se centrifugaron por 5 min a 13000 RPM y se usó el ADN en el sobrenadante (1-2 μL). Las condiciones del PCR con los cebadores M13 y AHis se muestran en la Tabla 3:

**Tabla 3.** Reactivos para PCR de 20 colonias.

Reactivos	1 reacción	30 reacciones
Buffer 10 X	1 µL	30 µL
dNTPs (10 mM)	0.2 µL	6 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.2 µL	36 µL
Primer M13 (20 µM)	0.25 µL	7.5 µL
Primer AHis (20 µM)	0.25 µL	7.5 µL
H <sub>2</sub> O	6.06 µL	181.8 µL
Taq Platinum	0.04 µL	1.2 µL
ADN	1 µL	30 µL
Total	10 µL	300 µL

Las condiciones fueron: un ciclo inicial de denaturación (94 °C por 2 min), 30 ciclos de amplificación (94 °C por 45 seg, 64 °C por 1min 30 seg y 72 °C por 2 min) y finalmente un ciclo de extensión (72 °C por 10 min). Los productos obtenidos fueron evaluados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % TBE 1X (80 V, 1h y 15min) y teñido con bromuro de etidio al 2 % para identificar los fragmentos de VHH para la región “bisagra corta y larga” (400-600 pb). Cuando se corroboró la presencia de las bandas para VHH se procedió a recuperar la biblioteca.

- B. Las colonias que crecieron en las placas grandes de 100 mm<sup>2</sup> fueron utilizadas para generar la biblioteca genómica de VHH anti-HBcAg (biblioteca inmune). Se realizó un raspado y se diluyeron las colonias con 2ml de medio 2XT-GA y se almacenó en un tubo. Antes de criopreservarlo se preparó una alícuota de 1ml diluido a 1/100 para leerlo en el espectrofotómetro a 600 nm y aproximar el tamaño de la biblioteca en número de células por 1 ml de acuerdo a la siguiente formula (Según Pardon *et al.*, 2014).

$$\text{Número de células} = \text{OD cultivo} \times 8 \times 10^8 \times \text{Factor de dilución}$$

Si OD<sub>600nm</sub> es 1 entonces hay  $8 \times 10^8$  células / ml. Seguidamente se añadió glicerol hasta una concentración final de 15% y se almacenó a -80 °C (criopreservada).

#### IV.15. Presentación de VHH en la superficie de Fagos

Se procedió de acuerdo a la metodología de Pardon *et al.* (2014) con algunas modificaciones.

##### IV.15.1. Recuperación de Fagos

- Se utilizó la biblioteca genómica de VHH criopreservada, se descongeló una alícuota y se diluyeron 100 µL en 80 ml de medio 2XTY-GA y se incubó a 37 °C a 250 RPM hasta llegar a OD<sub>600nm</sub> = 0.5. Se usaron 5 mL del cultivo a OD 0.5 y se mezcló con  $1.2 \times 10^{10}$  UFP (unidad formadora de placa) de fago ayudador VCS-M13 suavemente por inversión y se incubó por 30 min a 37 °C en reposo. El fago ayudador permite que el fagémido pHEN2 pueda ensamblar las partículas virales y las secuencias de VHH en la superficie de los fagos seleccionados.

Seguidamente se centrifugó a 2800 G por 10 min a Ta y se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 50 mL de medio 2XTY-AK (suplementado con 100 µg/µL de ampicilina y 100 µg/µL de kanamicina) y se incubó por 16 h a 30 °C a 200 RPM. Se centrifugó a 3200 G por 15 min a 4 °C y se salvó el sobrenadante con los fagos (40 ml) y se mezcló con 5ml de PEG (polietilenglicol) por inversión y se incubó en hielo por 1h. Se centrifugó a 3200 G por 15 min a 4 °C y se resuspendió en 1 ml de PBS. Almacenar máximo por 1 semana a 4 °C.

- Cuantificación o titulación de Fagos

Se utilizó *E. coli* TG1 que no fueron sometidas a ninguna transformación o electroporación, es decir sin resistencia a ampicilina o kanamicina. Se sembraron estas células por agotamiento en placas M9 y se incubó a 37 °C por 16 h. Se aisló una colonia y se sembró en 5 ml de medio 2XTY por 16 h a 37 °C a 250 RPM. Del cultivo se utilizó 10-20 µL y se sembraron en 10 ml de medio 2XTY hasta alcanzar un OD<sub>600nm</sub> de 0.5-0.6. Paralelamente se prepararon las diluciones de la solución de fagos recuperados ( $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$ ).

Estas diluciones de fagos (100 µL) se incubaron con 100 µL de células *E. coli* TG1 a OD 0.5 por 15 min a Ta y 10 µL de c/u se sembraron en placas 2XTY-GA por 16 h a 37 °C y se cuantificaron usando el Número de Recombinantes (más de 1012 UFC).

#### IV.15.2. Selección de Fagos

Se realizaron 3 rondas con 3 diferentes cantidades de proteína antigénica cAgHb: 1 µg, 0.8 µg y 0.5 µg.

- Día 1:

-Se fijó el antígeno (1 µg) cAgHb diluyéndolo en 300 µL de PBS 1X a 4 °C por 16 h en pocillos de placa Maxisorb.

-Paralelamente se picó una colonia de una placa M9 con *E. coli* TG1 que no hubiera sido sometidas a ninguna transformación o electroporación y se sembró en medio 2XTY por 16 h a 37 °C a 250 RPM.

- Día 2:

-Se retiró el contenido de cada pocillo con micropipeta y se lavó con 300  $\mu$ L PBS 1X-Tween al 0.05 % (PBS 1X-T) 5 veces por 5 min. Se descartó el lavado y se bloqueó con 100  $\mu$ L de BSA al 3 % en PBS 1X-T en cada pocillo de la placa y se incubó a 37 °C por 1 h. A la par se bloqueó en un microtubo la solución de fagos obtenidos en la recuperación (150  $\mu$ L) con 150  $\mu$ L de BSA al 6 % en PBS 1X-T a Ta y se agitó suavemente por 1 h. Se retiró el bloqueo de la placa y se añadieron 100  $\mu$ L de solución de fagos bloqueadas y se incubó a Ta por 1 h. Se lavaron los pocillos de la placa 10 veces con 300  $\mu$ L de PBS 1X-Tween al 0.1 % y 2 veces con 300  $\mu$ L de PBS 1X (suavemente y despacio). Se eluyó añadiendo 100  $\mu$ L de Trietilamina (TEA) a 100 mM y se incubó por 10 min a Ta. Se retiró el eluido y se mezcló en un microtubo con 200  $\mu$ L de Solución Tris a pH 7.4 para neutralización. Se añadió nuevamente 100  $\mu$ L de Trietilamina (TEA) a 100 mM y se incubó por 10 min a Ta. Se retiró el eluido y se mezcló en otro microtubo con 200  $\mu$ L de Solución Tris a pH 7.4 para neutralización. Se juntan las eluciones hasta obtener 600  $\mu$ L de eluido.

-Células *E. coli* TG1: Paralelamente se utilizaron 300  $\mu$ L del cultivo del día anterior y se diluyó en 30 ml de 2XTY e incubó a 37 °C a 250 RPM hasta OD 0,5. Posteriormente se usaron 10 ml del cultivo a OD<sub>600nm</sub> 0,5 y se incubó con 200  $\mu$ L de eluido por 1 h a 37 °C (30 min agitación suave y 30 min en reposo). Se centrifugó a 1350 G por 10 min y se resuspendió en 1 ml de medio 2XTY. Se prepararon diluciones (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>) en medio 2XTY-GA para sembrar 50  $\mu$ L en placas 2XTY-GA. Lo restante del resuspendido se sembró en una placa 2XTY-GA con 100 mm<sup>2</sup> y se incubó a 37 °C por 16 h.

- Día 3:

-Se recuperaron las colonias crecidas en la placa grande haciendo un raspado y diluyéndolas con 2ml de medio 2XT-GA. Se guardaron 50  $\mu$ L del cultivo y lo restante se criopreservó con glicerol a concentración final de 15 % (Sub-Biblioteca 1).

Se diluyeron 50  $\mu$ L de esta raspado en 50 ml de 2XTY-GA y se incubó a 37 °C a 250 RPM hasta alcanzar OD<sub>600nm</sub> 0.5. Del cultivo se usaron 5 ml a OD 0.5 y se mezcló con  $1.2 \times 10^{10}$  UFP (unidad formadora de placa) de fago ayudador VCS-M13 suavemente por inversión y se incubó por 30 minutos a 37 °C en reposo. Se centrifugó a 1000 G por 10 min a Ta y el precipitado se resuspendió en 50 ml de 2XTY-AK por 16 h 30 °C a 250 RPM.

-A la par se sembró una colonia de *E. coli* TG1 de la placa M9 no sometida a ninguna transformación o electroporación y se sembró en 5 ml de medio 2XTY por 16 h a 37 °C a 250 RPM.

- Día 4:

-El cultivo se centrifugó a 1750 G por 30 min a Ta, se salvó el sobrenadante con Solución de Fagos y se precipitó con PEG. Se usaron 40 ml del sobrenadante con 10 ml de PEG y se mezcló por inversión suavemente. Se incubó en hielo por 1h, se centrifugó a 1750 G por 30 min a 4 °C y se resuspendió en 1 ml de PBS 1X. El resuspendido contiene los Fagos y se utilizó para preparar diluciones ( $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$ ) en PBS 1X. Lo restante se almacenó a 4 °C para las siguientes 2 rondas.

- Células *E. coli* TG1: Se utilizó 10-20  $\mu$ L del cultivo del día anterior y se sembraron en 10 ml de medio 2XTY hasta alcanzar un OD<sub>600nm</sub> de 0.5. Se

usaron 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones recién preparadas del resuspendido de los fagos ( $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$ ) y se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  del cultivo a OD 0.5 por 15 min a Ta. Se usaron 10  $\mu\text{L}$  de cada incubación y se sembraron en placas 2XTY-GA por 16 h a 37 °C, se cuantificaron usando el Número de Recombinantes ( $10^6$ - $10^8$  UFC) y se recuperó una sub-biblioteca por cada ronda como en V.14. (B). Se repitió el procedimiento de V.15.2. para la segunda (0.8  $\mu\text{g}$ ) y tercera ronda (0.5  $\mu\text{g}$ ).

#### IV.16. ELISA de Fagos

##### IV.16.1. Recuperación de fagos

De la placa dilución  $10^{-9}$  obtenida en el día 4 de la tercera ronda se picaron aleatoriamente con un mondadientes 96 colonias y se sembraron en 100  $\mu\text{L}$  de medio 2XTY-GA de 96 pocillos de una placa de cultivo 1 (PC1) fondo plano. Se selló con una lámina porosa e incubó por 16 h a 30 °C a 125 RPM. Al día siguiente se preparó otra placa de cultivo 2 (PC2) con 96 pocillos de fondo cóncavo y se añadieron 248  $\mu\text{L}$  de 2XTY-GA a cada pocillo. Luego se diluyeron 2  $\mu\text{L}$  de la PC1 en el medio 2XTY-GA de la segunda PC2. A la PC1 se añadió glicerol hasta una concentración de 15 %, se selló con parafilm y se criopreservó a -80 °C. Se incubó la PC2 por 2 h y 30 min a 37 °C a 250 RPM hasta OD 0.5 y luego se añadió fago ayudador VCS-M13 con  $1.2 \times 10^{10}$  UFP (unidad formadora de placa) y se mezcló suavemente por inversión e incubó por 30 min a 37 °C en reposo. La placa PC2 se centrifugó a 1000 G por 10 min a Ta, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 150  $\mu\text{L}$  de 2XTY-AK. Se incubó por 16 h a 30 °C a 125 RPM. La PC2 se centrifugó a 1000 G por 10 min a Ta y se usó el sobrenadante que contiene los Fagos para el ensayo de ELISA.

#### IV.16.2. ELISA

Se fijaron 800 ng del antígeno HBcAg en 95 pocillos (uno fue destinado para el control interno) con 300  $\mu$ L de Solución de Fijación a 37 °C por 1 h. También se fijó otra placa control con 800 ng de la proteína no relacionada BSA en 95 pocillos con 300  $\mu$ L de Solución de Fijación a 37 °C por 1 h. Se dejó un pocillo en cada placa para tener un control interno en el que no se añadió ninguna solución de Fagos.

Se lavaron de forma seguida 5 veces ambas placas con 300  $\mu$ L PBS-T 0.05 % (sin incubación). Se añadió 50  $\mu$ L de solución de bloqueo de Leche al 4 % en PBS-T 0.05 % a cada pocillo y luego se añadieron 50  $\mu$ L de fagos del sobrenadante de cada pocillo de la PC2. Se incubó por 1 h a 37 °C y se lavaron nuevamente 5 veces con 300  $\mu$ L PBS-T 0.05 %. Se añadió 200  $\mu$ L del anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a HRP diluido a 1:5000 en Leche al 2 % y se incubó por 1 h a 37 °C. Se lavaron nuevamente 5 veces con 300  $\mu$ L PBS-T 0.05 % y se añadió 100  $\mu$ L de una solución de sustrato TMB atemperado a cada pocillo y se incubó por 10 min en oscuridad a Ta. Finalmente se inactivó la reacción usando 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico a 2 N y se leyó la absorbancia de la placa a 500 nm en el lector de ELISA. De las ELISA positivos se eligieron a las que tengan señal positiva (HBcAg) 2 veces mayor que el negativo (BSA) y se realizó un PCR de las elegidas utilizando 2  $\mu$ L de la placa madre PC1.

#### IV.17. PCR y secuenciamiento de los anticuerpos VHH seleccionados

Tras el ensayo de ELISA de confirmación, 2  $\mu$ L de cada subclona o colonia positiva procedente de la placa PC1 se incubó en 5 ml de medio 2XTY-GA a 37

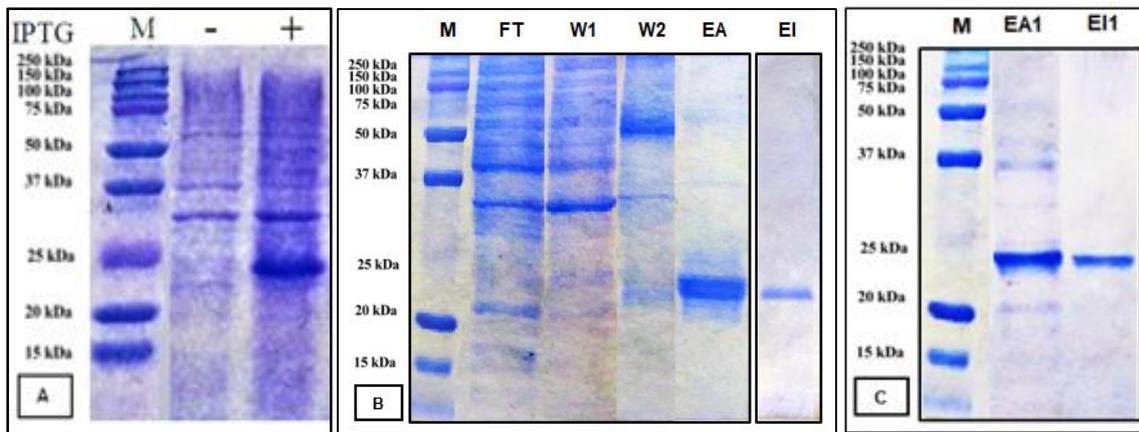
°C por 16 h a 250 RPM. Luego del tiempo de incubación se utilizaron 100 µL del cultivo del día anterior y se hirvió por 10 min. Se centrifugó a 800 G por 5 min y se utilizaron 1-2 µL del sobrenadante para la reacción de PCR utilizando los cebadores M13 y Ahis a condiciones de un ciclo inicial de denaturación (94 °C por 2 min), 30 ciclos de amplificación (94 °C por 45 seg, 64 °C por 1min 30 seg y 72 °C por 2 min) y finalmente un ciclo de extensión (72 °C por 10 min). Los productos obtenidos fueron evaluados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % TBE 1X (80 V, 1h y 15min) para identificar los fragmentos de VHH para la región “bisagra corta y larga” (600-800 pb). Las bandas que se encontraran degradadas o que no correspondían fueron descartadas.

Se seleccionaron las secuencias que hayan mostrado alguna banda correspondiente a las bisagras, 21 secuencias nucleotídicas de los VHH fueron enviadas a la empresa MACROGEN para ser secuenciadas por el método de Sanger y ser analizadas bioinformáticamente. El programa MEGA (<https://www.megasoftware.net/>) nos permitió traducir los secuenciamientos y expresarlos en aminoácidos para luego alinearlos y determinar sitios conservados y variables y/o VHHs que se hayan repetido. También se analizaron las secuencias traducidas a aminoácidos en el BLASTP para compararlas con la base de datos del NCBI y corroborar su semejanza con secuencias de cadenas pesadas de alpaca.

## V. RESULTADOS

### V.1. Expresión y purificación de rHBcAg en cepas *E. coli* BL21 mediante Cromatografía de Afinidad (C.A.) y de Intercambio Iónico (C.I.I.)

Como se mencionó en Metodología IV.4 y 5., la proteína recombinante rHBcAg posee un peso molecular teórico de 21 kDa. Sin embargo, con la adición de una etiqueta de poli-histidina debería mostrar un peso molecular entre 20-25 kDa. Se utilizaron cepas recombinantes de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pET28a y se indujo y sobreexpresó la rHBcAg con IPTG. La inducción de la proteína fue evaluada con electroforesis SDS-PAGE 12.5 % (Fig. 11a). La purificación parcial y gradual por C.A. por columnas de Níquel-Nitrocelulosa (Ni-NTA) (Fig. 11b) y una purificación total de los eluidos obtenidos por C.A. por C.I.I. por resinas de Carboximetil-Sephadex (Fig. 11c).

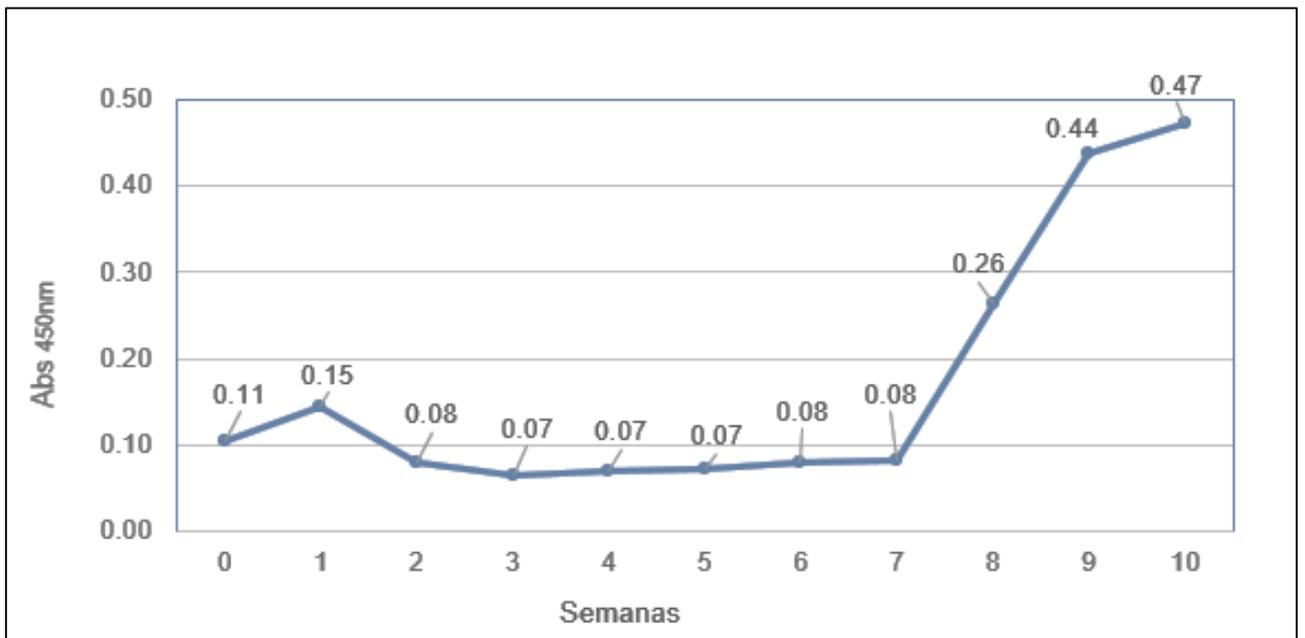


**Figura 11.** Expresión y purificación de rHBcAg en cepas *E. coli* BL21. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE de las muestras obtenidas al purificar la rHBcAg (A) M: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards -Bio-Rad) con los tamaños indicados a la izquierda; lisados celulares de *E. coli* BL21 sin IPTG (-) y con IPTG por 5 horas (+). (B) Purificación por C. A. con columnas de Ni-NTA con los carriles M, FT. (Flow Trough o Solución con proteínas mayoritarias), W1. (Primer lavado en la columna Ni-NTA), W2. (Segundo lavado en la columna Ni-NTA), EA. (Proteínas eluidas parcialmente con C.A. en la columna Ni-NTA). Y el carril EI. (EA. Repurificadas con C.I.I.). (C) Purificación por Cromatografía de Intercambio Iónico (C.I.I.) con los carriles M, EA1 (Proteínas eluidas parcialmente con C.A.) y EI1 (Proteínas eluidas totalmente con C.I.I.).

La concentración del eluido por Cromatografía de Afinidad fue de 1 mg/ml y del eluido por Intercambio Iónico fue de 0,9 mg/ml. La muestra colocada en la electroforesis SDS-PAGE al 12.5 % fue de 10  $\mu$ L con 9  $\mu$ g de proteína purificada Core, rHBcAg. Se aprecia la banda purificada de rHBcAg entre 20-25 kDa (Figura 11c).

## V.2. Respuesta inmunológica en Alpacas

El seguimiento de la respuesta inmune de las alpacas inmunizadas con rHBcAg se realizó de manera semanal mediante ELISA, tal como se describe en V.6.



**Figura 12.** Respuesta inmune contra rHBcAg. Se evaluaron 10  $\mu$ L de suero de alpaca mediante ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra la proteína rHBcAg. Antes de iniciar con las inoculaciones se analizó el suero pre inmune de la semana 0 con D.O. de 0.11 abs y se utilizó como base para monitorear el aumento de la señal con cada inoculación (de la semana 1-10) hasta alcanzar la máxima D.O. que fue de 0.47 abs en la semana 10. Los datos de D.O. obtenidos se leyeron a 450 nm.

Como se aprecia en la **Figura 12** se tomaron muestras de suero de la alpaca cada semana por 2.5 meses y se evaluaron usando dilución a 1/500 por ensayos de ELISA indirecto a 450 nm para detectar el aumento de los títulos de anticuerpos

contra la proteína antigénica rHBcAg. Se utilizó de referencia inicial al suero pre inmune de la semana 0 con una D.O. de 0.11.

Como se aprecia luego de la primera inoculación de la semana 1 (200 µg) la señal se elevó levemente con una D.O. de 0.15 abs respecto al pre inmune. Las siguientes inoculaciones (semana 2-7) se realizaron usando una dosis de 100 µg y como se observa la señal se mantuvo igual o menor a 0.08 abs. Se incrementó la dosis del antígeno hasta 500 µg a partir de la semana 8 con lo que se logró elevar la señal por sobre el suero pre inmune. Esta respuesta correspondería a las IgG que mostraron un aumento de la D.O. en la semana 8 (0.26 abs) por sobre el doble del suero pre inmune y luego se continuo con la misma dosis para las semanas 9 (0.44 abs) y 10 (0.47). En la semana 10 se obtuvo la máxima D.O. que fue de 0.47 y era 4.5 veces mayor que la D.O. de la señal del suero pre inmune de 0.11 abs. Al alcanzar un aumento de señal de más de 4 veces respecto al suero pre inmune se procedió a extraer sangre periférica para la generación de la biblioteca de nanocuerpos específicos contra el rHBcAg.

### **V.3. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)**

Según el protocolo IV.8. se purificaron las PBMC cuando se alcanzó el pico más elevado de la respuesta inmune. Se obtuvieron  $1.0 \times 10^8$  células/ml de Trizol que fueron utilizadas para la extracción de ARN total.

### **V.4. Integridad del ARN total extraído**

El ARN total extraído de cuatro alícuotas de acuerdo a cada concentración y volumen fue de 14.01 µg. Los resultados de la medición de la concentración de

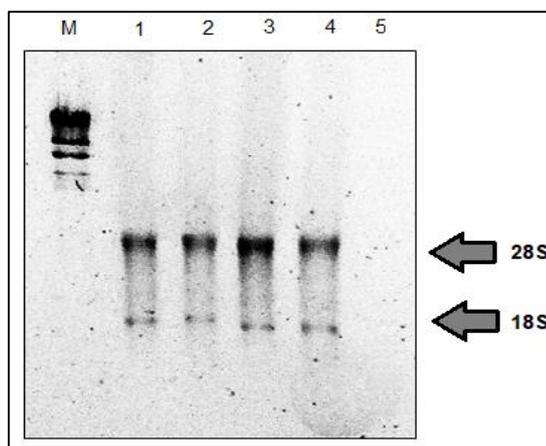
ARN en el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) mediante espectrofotometría brindaron los siguientes valores (**Tabla 4**):

**Tabla 4 .** Eluídos luego de la extracción de ARN con Trizol.

Alícuotas de ARN	A1	A2	A3	A4
Concentración (ng/μL)	193.1	186.8	149	<b>171.5</b>
Contaminantes proteicos (260nm/280nm)	1.95	1.85	1.88	<b>2.12</b>
Contaminantes orgánicos (260nm/230nm)	1.9	2.1	1.9	<b>1.9</b>

Como se observa se cuantificaron los eluídos y se eligió la concentración de 171.5 ng/μL (A4) por tener el máximo de A260nm/A280nm, lo que nos indicaría que para A4 el ARN se encuentra puro y con un nivel bajo de contaminantes proteicos.

La calidad del ARN de acuerdo a la metodología descrita fue monitoreada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En la **Figura 13** se aprecian 2 bandas intensas separadas en el gel cada uno correspondiente al ARN ribosomal de la subunidad mayor (28 S) y menor (18 S).

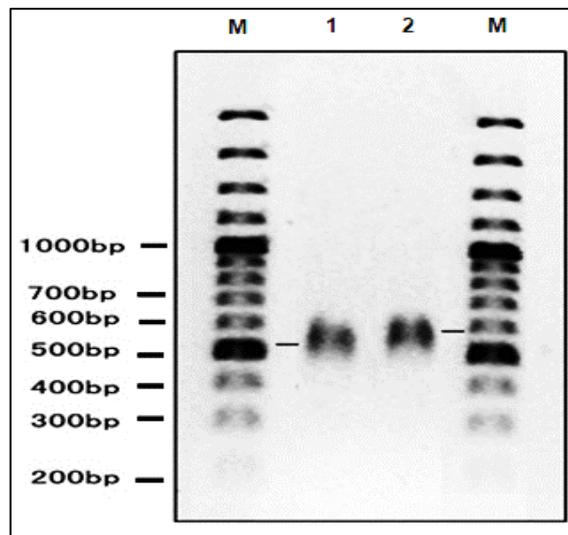


**Figura 13.** ARN total extraído de las PBMC. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los carriles contienen M: 10 μL de marcador λ/HindIII, 1 y 2 con alícuotas de 5 μL y 3 y 4 con alícuotas de 10 μL de ARN a 171.5 ng/μL; carril 5: control negativo solo con agua libre de ARNasas.

La alícuota **A4** usada en todos los carriles mostró dos bandas que es el resultado esperado, esto nos indicaría que el ARN se encuentra puro. Se asumió que el ARNm fue extraído óptimamente y se encuentra integro.

### V.5. Síntesis y PCR de ADNc

La síntesis se realizó con 1.7 µg de ARN extraído para cada reacción y luego se utilizó el ADNc para amplificar mediante PCR. Se sometió a electroforesis gel de agarosa al 1.5 % en TBE 1X como se aprecia en la **Figura 14**.



**Figura 14.** ADNc de anticuerpos VHH amplificados por PCR. Los amplicones fueron analizados por electroforesis al 1.5 % de TBE 1X Los carriles son M: marcador lambda/HindIII a 150 ng, Carril 1: ADNc del VHH amplificado por PCR para cebador específico de bisagra corta (~400 pb). Carril 2: ADNc del VHH amplificado por PCR para cebador específico de bisagra larga (~500 pb).

Se asumió que el aislamiento de anticuerpos VHH fue exitoso ya que los cebadores usados en el PCR son específicos de IgG de cadena pesada y cada uno pudo amplificar a las IgG2 e IgG3. La electroforesis mostró la presencia de una banda entre 450-500 pb (carril 1) correspondiente a la region bisagra larga de la IgG2 y otra banda entre 550-600 pb (carril 2) correspondiente a bisagra corta de la IgG3.

## V.6. Preparación del plásmido pHEN2 y digestión de los VHHs amplificados

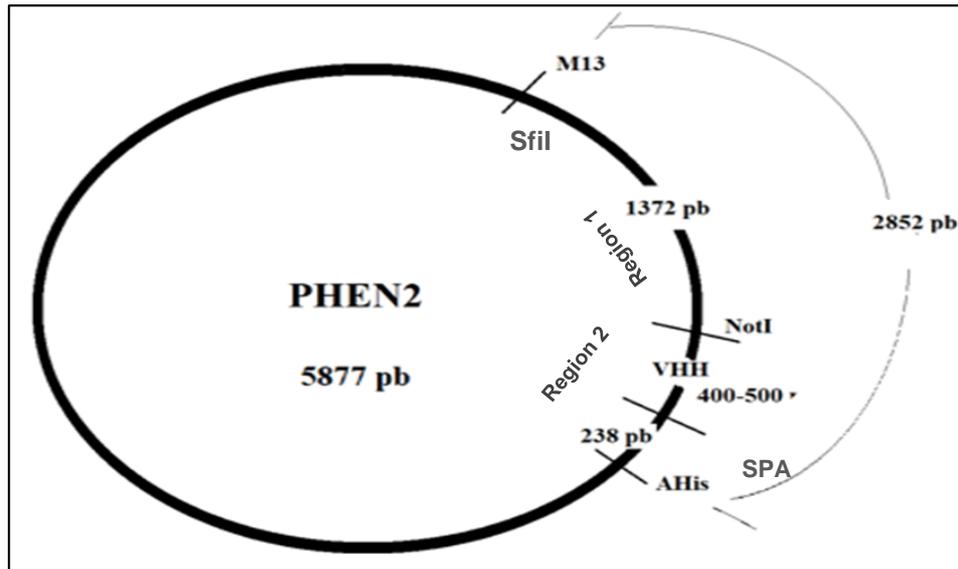
Como se observa en la **Figura 15** el vector pHEN2 sufrió dos digestiones enzimáticas que permitieron liberar fragmentos de diferentes tamaños.



**Figura 15.** Digestión del vector pHEN2 con enzimas de restricción SfiI y NotI. Se realizó una Electroforesis al 0.8 % de TBE 1X durante 6 h a 50 V para poder aislar el fragmento que se liberó luego de la doble digestión del vector pHEN2. Se utilizaron 10 µg de pHEN2 en la 1era digestión con SfiI y luego se digirió con NotI para separarlo en 2 fragmentos. Carril1: Vector pHEN2 integro, carriles 2, 4, 6 y 8: pHEN2 digerido por SfiI (1era digestión), y 3, 5, 7 Y 9: pHEN2 digerido por SfiI y NotI (2da digestión), banda superior con pesos teórico de 4499 pb y la banda inferior de 1378 pb.

En la **Figura 15** se observa que en el carril 1 el vector pHEN2 circular no digerido presenta un peso aproximado de 2852 pb y en los carriles 3, 5, 7 y 9 se aprecia el vector pHEN2 que con la digestión doble se ha separado en dos bandas: de peso 4499 pb y otro fragmento más pequeño de peso de 1378 pb.

El gel fue cortado para aislar el fragmento de la banda superior del vector digerido doblemente y luego se limpió y cuantifico. Se obtuvieron 2.52 µg de vector pHEN2 digerido. Luego de la siguiente digestión con SPA (Shrimp Alkaline Phosphatase), limpieza y cuantificación se obtuvieron 2.22 µg de vector pHEN2 purificado. Fue utilizado para la ligación con el VHH amplificado. En la **Figura 16** se aprecia al vector pHEN2:



**Figura 16.** Estructura del vector fagémido pHEN2 (Qi *et al.*, 2012). El vector circular pesa aproximadamente 5877 pb y posee 3 sitios de restricción SfiI, NotI y SPA y en el intermedio se aprecia el lugar donde se ligará al VHH amplificado.

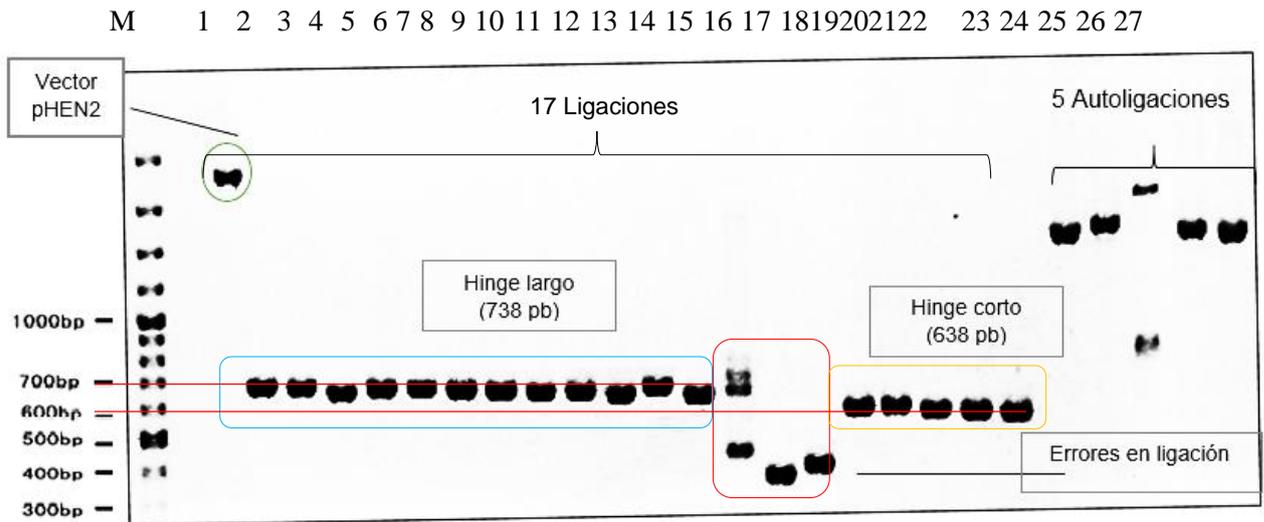
Los VHHs amplificados también fueron digeridos con las enzimas SfiI y NotI. Luego de la digestión y la limpieza se logró obtener un lote con 0.207 µg del VHH amplificado que se usó como inserto en la ligación con el vector pHEN2 previamente digerido.

### V.7. Ligación y recombinantes

Se utilizó la metodología de IV.12. para realizar la ligación a menor escala del inserto (86.95 ng) con el vector pHEN2 (100 ng) ambos digeridos y purificados. El vector con el inserto “VHH” integrado es llamado vector recombinante y se usó para transformar bacterias *E. coli* TG1 (metodología IV.13). Posteriormente se realizó otra ligación a mayor escala con mayor cantidad de inserto (260 ng) y vector pHEN2 (300 ng) para obtener la mayor cantidad de bacterias transformadas para la Biblioteca Genómica 1 (BG1).

-El número total de UFC de la BG1 criopreservada fue de  $8 \times 10^7$  con una concentración de células de  $1.2 \times 10^{10}$  células/ml.

De una de las placas usadas para realizar el conteo de las UFC se escogieron de forma aleatoria 20 colonias recombinantes y 5 colonias autoligadas (sin inserto) para realizar un PCR de confirmación el cual fue comprobado mediante electroforesis de agarosa al 1.5 % (**Figura 17**).



**Figura 17.** PCR de las colonias transformadas con el vector pHEN2 recombinante. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR-colonia para confirmar la presencia del inserto clonado en 20 colonias recombinantes y 5 colonias autoligadas. 1: Marcador 100 pb; 2: fagémido pHEN2; Recombinantes: colonias 1-22; Autoligadas: 23- 27.

Como se observa en la **Figura 17**, de las 20 colonias analizadas por PCR hubo ligación en 17 ya que mostraron un fragmento entre 500-700 pb, tamaño esperado utilizando los cebadores específicos para bisagra corta (638 pb) y largo (738 pb) como se muestra a continuación (Ver **Figura 16**).

- Ligación 1: 400 pb (VHH Bisagra corta) + 238 pb (Región 2) = 638 pb
- Ligación 2: 500 pb (VHH Bisagra larga) + 238 pb (Región 2) = 738 pb

Por otro lado, se observaron errores en la ligación en los carriles 15, 16 y 17 donde dos insertos no se ligaron y donde una muestra estaba degradada. En los autoligados hay 4 bandas (carriles: 23, 24, 26 y 27) entre 1400-1500 pb (Región

1+2 sin VHH aprox. 1472 pb) que es lo esperado y una muestra autoligada degradada (carril 25).

De estas colonias recombinantes se recuperó otra Biblioteca Genómica recombinante 2 (**BGr2**) con un número de recombinantes de  $4.4 \times 10^7$  UFC y con una densidad celular de  $8 \times 10^{10}$  células/ml. A partir de estos resultados se continuó con el proceso de amplificación con biblioteca de fagos para expresar el VHH en forma de proteína en la región terminal del virus fago ayudador VCS-M13.

#### **V.8. Recuperación y Presentación de Fagos**

- Se usó la BGr2 para enfrentarlos al fago ayudador VCS-M13 como se menciona en el protocolo de IV.15.1., luego se determinó el número de fagos recuperados que infectaron a las colonias y que expresaban el anticuerpo VHH. Se recomienda trabajar preferentemente con un promedio superior a  $10^{12}$ . Se contabilizó la solución de fagos inicial y se obtuvieron de  $2.18 \times 10^{14}$ .
- Para seleccionar los Fagos que hayan expresado el VHH específico contra rHBcAg se realizaron 3 procesos de selección en la que cada ronda utilizaba una placa con pocillos donde se fijaron 3 diferentes cantidades de antígeno rHBcAg (IV.15.2.). Antes de iniciar y tras cada paso, se tituló la cantidad de fagos recuperados como se muestra en la **Tabla 5**. Se inició con  $2.18 \times 10^{14}$  fagos recuperados.

**Tabla 5.** Selección de fagos específicos contra antígeno Core o rHBcAg.

Numero de Fagos	Ronda 1 (1 µg antígeno)		Ronda 2 (0.8 µg antígeno)		Ronda 3 (0.5 µg antígeno)	
	Fagos iniciales	Fagos seleccionados	Fagos iniciales	Fagos seleccionados	Fagos iniciales	Fagos seleccionados
	2.18 x 10 <sup>14</sup>	4.28 x 10 <sup>5</sup>	3.66 x 10 <sup>13</sup>	1.35 x 10 <sup>6</sup>	1.11 x 10 <sup>13</sup>	2.32 x 10 <sup>6</sup>

La **Tabla 5** nos muestra cómo se utilizaban fagos que expresaban el VHH específico y cómo con cada ronda se enriqueció la población de fagos recombinantes que exponían VHH y cómo aumentaron un orden de magnitud de la primera a la segunda ronda (10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup>) manteniéndose luego constante. Se utilizó el protocolo de V.14. (B) con las colonias infectadas que crecieron en las placas 2XTY-GA obtenidas de la última ronda de selección para generar la sub-biblioteca III con 2.32 x 10<sup>6</sup> UFC.

#### **V.9. ELISA de Fagos**

Se utilizó la sub-biblioteca III (*E. coli* infectadas con los fagos) para plaquear a diferentes diluciones (10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup> y 10<sup>-11</sup>) o también se podía haber utilizado una placa obtenida de la tercera ronda de selección.

Se utilizaron 96 colonias obtenidas de la tercera ronda de selección escogidas aleatoriamente para realizar el ELISA de fagos y se utilizó una proteína no relacionada suero bovino albumina (BSA) como control negativo. Este protocolo se realizó en 2 placas con pocillos para la siembra de 48 colonias, con el objetivo de ampliar el análisis de búsqueda de acuerdo a V.16.1. De esta manera, se descartaron las colonias inespecíficas.

De las 96 colonias analizadas se encontró que 44 colonias fueron positivas contra Core o rHBcAg y negativas para el control BSA con una diferencia superior o

igual a 3 en absorbancia. Las **Tablas 6 y 7** y **Figuras 18 y 19** muestran los datos de DO obtenidas en el ELISA de fagos en las placas I y II.

En la Placa I se observó que la colonia con mayor diferencia en señal es la 26 con 5.03 veces más que el negativo (**Fig. 18**) y en la Placa II hay colonias con una diferencia mucho mayor en señal como la 79, 94 y 78 con 59.92, 50.75 y 36.41 veces más que el negativo respectivamente; también la colonia 55 fue positiva al haber obtenido una señal con 6.47 veces más por sobre el negativo (**Fig. 19**).

En la **Tabla 6** se pueden apreciar los datos de la D.O. obtenidas en el ELISA de fagos luego de que los VHHs expresados en 48 subclones de fagos reconocieran a rHBcAg. Ambas D.O. fueron leídas a 450 nm y se consideraron a las subclones positivas cuando presenten una diferencia en la D.O. de 3 o más respecto del control negativo.

**Tabla 6.** Resultados del ELISA de fagos de las colonias 1-48.

	rHBcAg	BSA	OR		rHBcAg	BSA	OR
1	0.079	0.056	1.41	25	3.345	2.247	1.49
2	1.281	0.349	3.67	26	1.237	0.246	5.03
3	3.303	3.327	0.99	27	3.56	3.345	1.06
4	0.441	0.093	4.74	28	0.134	0.06	2.23
5	3.526	3.053	1.15	29	0.062	0.046	1.35
6	0.314	0.075	4.19	30	1.585	0.409	3.88
7	3.457	2.757	1.25	31	1.764	2.173	0.81
8	3.324	1.522	2.18	32	3.45	2.101	1.64
9	3.593	3.468	1.04	33	3.704	3.508	1.06
10	0.147	0.069	2.13	34	3.542	3.244	1.09
11	0.543	0.154	3.53	35	3.528	2.76	1.28
12	1.474	0.37	3.98	36	3.525	3.154	1.12
13	1.49	1.16	1.28	37	3.187	2.71	1.18
14	0.127	0.073	1.74	38	0.11	0.051	2.16
15	2.038	0.483	4.22	39	3.378	2.061	1.64
16	1.118	0.258	4.33	40	3.51	2.785	1.26
17	3.581	3.1	1.16	41	1.354	1.493	0.91
18	0.918	0.234	3.92	42	0.12	0.068	1.76
19	3.457	3.062	1.13	43	3.328	2.454	1.36
20	3.603	2.796	1.29	44	3.291	1.666	1.98
21	3.437	2.468	1.39	45	3.862	1.226	3.15
22	0.849	0.222	3.82	46	3.438	2.796	1.23
23	3.324	1.756	1.89	47	3.407	2.303	1.48
24	0.05	0.046	1.09	48	1.846	0.611	3.02
Blanco	0.056	0.078					

Valores de absorbancia a 450 nm de las clonas correspondientes a la placa 1. Se resaltan las clonas con valores superiores por sobre 3 veces los controles negativos.

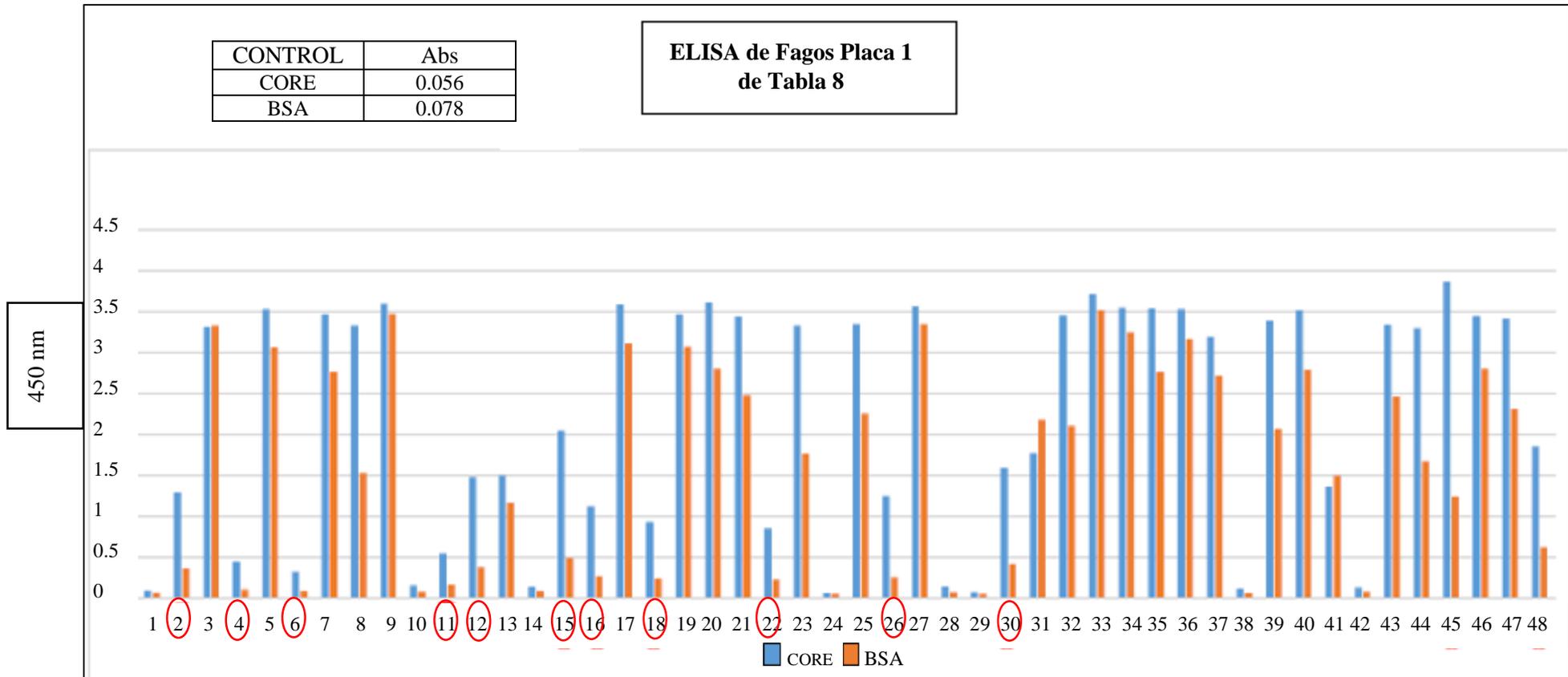
Los resultados del ELISA de fagos de la **Tabla 6** se muestran en la **Figura 18** esquematizadas para poder visualizar con mayor facilidad las diferencias significativas de rHBcAg respecto a BSA en algunas subclones (envueltas con círculos rojos). En la **Tabla 7** se pueden apreciar los datos de la D.O. obtenidas en el ELISA de fagos luego de que los VHHs expresados en 48 subclones de fagos reconociera a la proteína recombinante rHBcAg.

**Tabla 7.** Resultados del ELISA de fagos de las colonias 48-96.

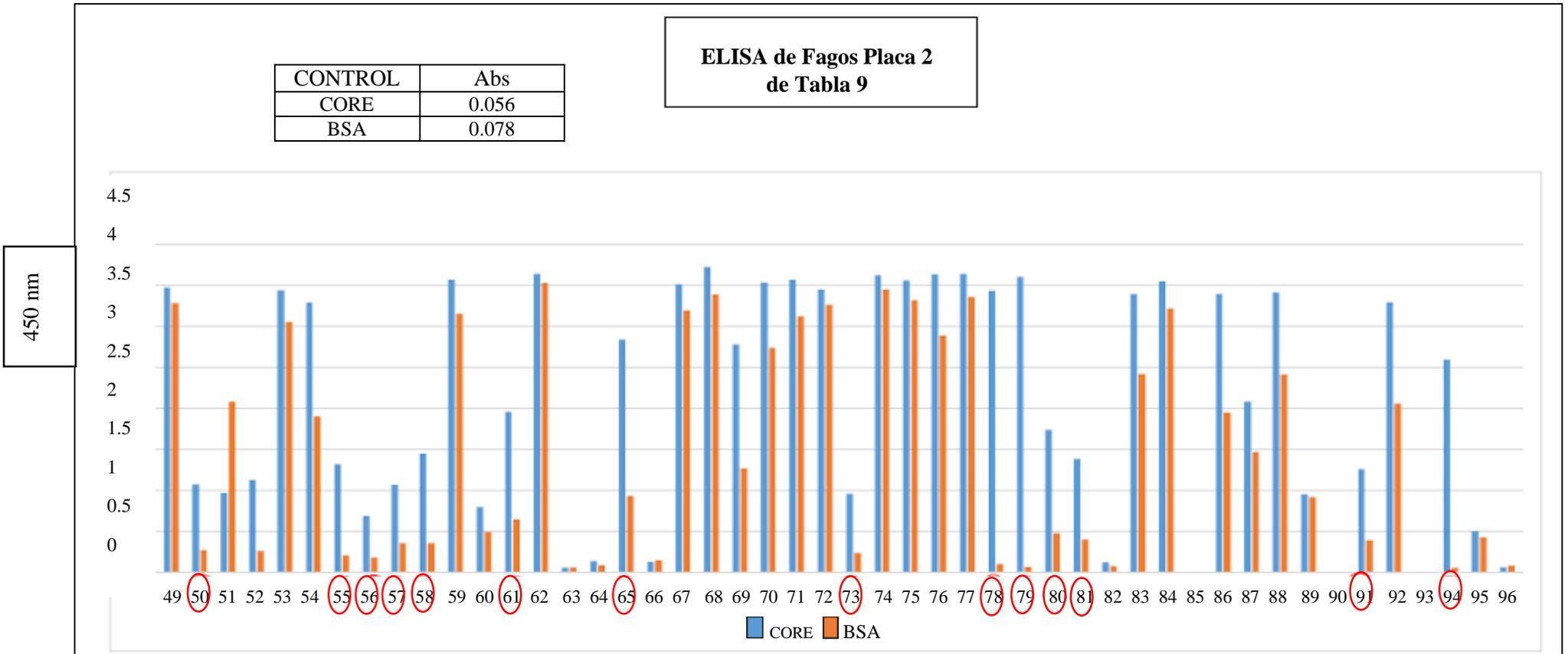
	rHBcAg	BSA	OR		Core	rHBcAg	OR
49	3.463	3.277	1.06	73	0.95	0.232	4.09
50	1.065	0.264	4.03	74	3.618	3.438	1.05
51	0.962	2.075	0.46	75	3.549	3.312	1.07
52	1.122	0.255	4.40	76	3.624	2.88	1.26
53	3.429	3.046	1.13	77	3.63	3.349	1.08
54	3.278	1.897	1.73	78	3.423	0.094	36.41
55	1.313	0.203	6.47	79	3.595	0.06	59.92
56	0.684	0.175	3.91	80	1.73	0.469	3.69
57	1.061	0.35	3.03	81	1.374	0.395	3.48
58	1.442	0.349	4.13	82	0.117	0.072	1.63
59	3.56	3.149	1.13	83	3.387	2.414	1.40
60	0.79	0.487	1.62	84	3.54	3.208	1.10
61	1.948	0.641	3.04	85	0	0	
62	3.633	3.519	1.03	86	3.384	1.944	1.74
63	0.052	0.054	0.96	87	2.078	1.462	1.42
64	0.132	0.083	1.59	88	3.406	2.408	1.41
65	2.832	0.928	3.05	89	0.945	0.911	1.04
66	0.12	0.143	0.84	90	0	0	0.00
67	3.503	3.182	1.10	91	1.252	0.389	3.22
68	3.717	3.379	1.10	92	3.286	2.052	1.60
69	2.769	1.259	2.20	93	0	0	0.00
70	3.523	2.732	1.29	94	2.588	0.051	50.75
71	3.56	3.116	1.14	95	0.493	0.42	1.17
72	3.437	3.253	1.06	96	0.056	0.078	0.72
Blanco	0.056	0.078					

Valores de absorbancia a 450 nm de las clonas correspondientes a la placa 2. Se resaltan las clonas con valores superiores por sobre 3 veces los controles negativos.

Los resultados del ELISA de fagos de la **Tabla 7** se muestran en la **Figura 19** esquematizadas para poder visualizar con mayor facilidad las diferencias significativas de rHBcAg respecto a BSA en algunas subclones: marcadas con círculos rojos son las clonas positivas



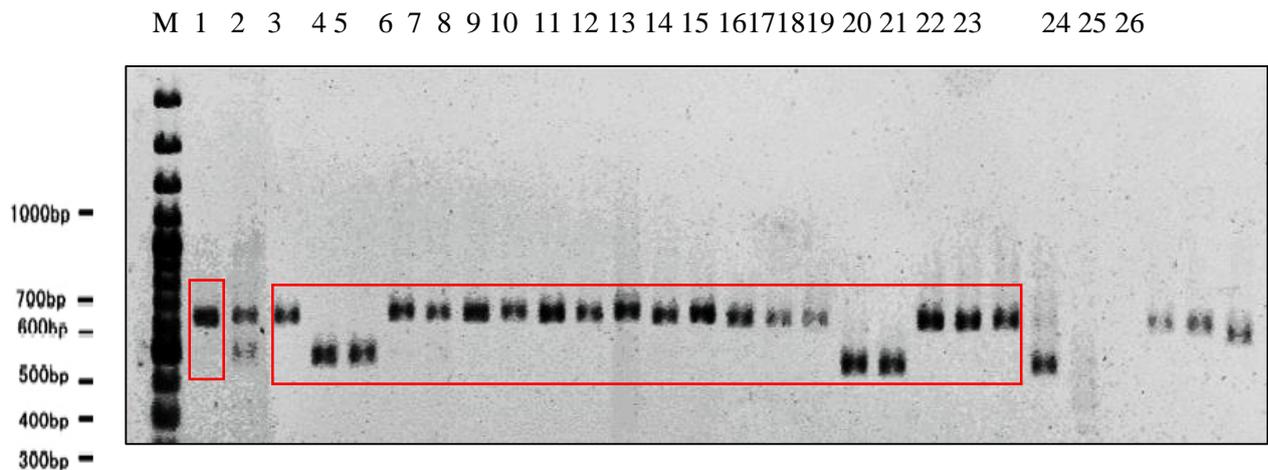
**Figura 18.** Selección de Fagos recombinantes que expresaron el VHH contra rHBcAg mediante ELISA de fagos I. Comparación de DO. de los resultados del ensayo de ELISA (450 nm) de fagos evaluados para 1-48 colonias (Placa I) contra core (barra azul) y BSA (barra roja). Se usó como antígeno a rHBcAg y como control negativo, BSA. Se marca con círculos rojos los fagos que reaccionaron con Core y mostraron una absorbancia 3 veces mayor o más con respecto al control negativo BSA. Se aprecia en la **Tabla 6**.



**Figura 19.** Selección de Fagos recombinantes que expresaron el VHH contra rHBcAg mediante ELISA de fagos II. Comparación de DO. de los resultados del ensayo de ELISA (450 nm) de fagos evaluados para 49-96 colonias (Placa II) contra core (barra azul) y BSA (barra roja). Se usó como antígeno a rHBcAg del VHB y como control negativo se utilizó la proteína BSA. Se marca con círculos rojos los fagos que reaccionaron con Core y mostraron una absorbancia 3 veces mayor o más con respecto al control negativo BSA. Se aprecia en la **Tabla 7**.

## V.10. PCR colonias con Fagos recombinantes

De las 44 colonias recombinantes evaluadas por ELISA de fagos se seleccionaron 27 para analizar por electroforesis en agarosa al 1.5 % en TBE 1X para identificar las bandas de los VHH que deberían contener en su plásmido (**Figura 20**). Luego, de acuerdo al protocolo V.14. (A) se sometieron a PCR.



**Figura 20.** Colonias seleccionadas amplificadas por PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR de las 21 colonias positivas de ELISA de fagos para confirmar la presencia del inserto VHH. Solo se eligieron las colonias con bandas integras en el recuadro rojo. M: Marcador 100 pb; 1-27: recombinantes.

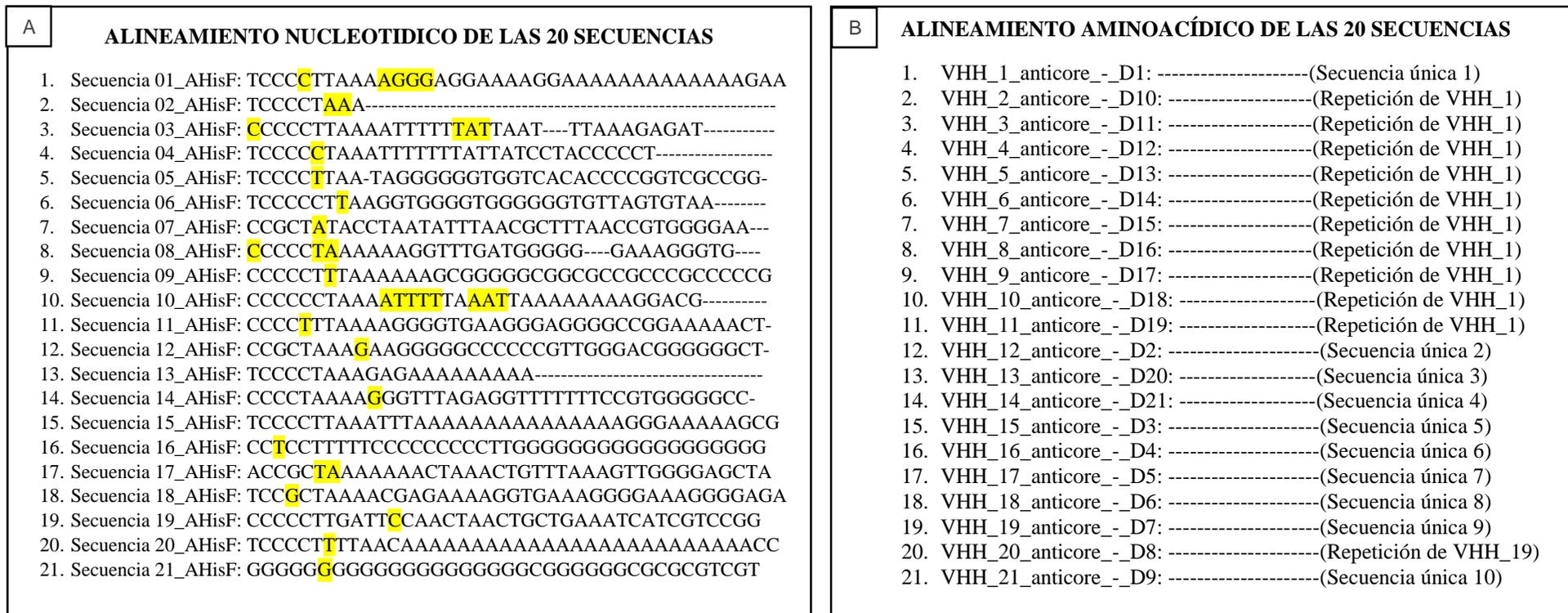
Como se observa que la **Figura 20** están presentes las bandas entre 500-700 pb que es lo que corresponde al inserto de VHH. Las colonias seleccionadas por motivos de calidad de banda (IV.17) fueron solamente 21 (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22) y se mandaron a secuenciar a MACROGEN.

## V.11. Análisis de secuencias

Las 21 subclones seleccionadas a las que se realizaron PCR se analizaron con el software Mega. Como se muestra en la **Figura 21** se alinearon las secuencias nucleotídicas obtenidas de los 21 sub clonas seleccionadas.

En la **Figura 21A** se observó que las 21 secuencias tuvieron por lo menos un residuo diferente en la alineación aunque también se evidenciaron sitios conservados. Se realizó una búsqueda en la base de datos del BLASTn del NCBI y las 21 subclones tuvieron coincidencias en la base de datos en su mayoría con secuencias nucleotídicas de cadenas pesadas de inmunoglobulinas G y M de alpaca.

Se realizó una traducción *in silico* y se obtuvieron 21 secuencias aminoacídicas putativas, con las que también se realizó una búsqueda en el BLASTp y se obtuvieron resultados similares. Coincidencias con las cadenas proteicas de dominio pesado de las inmunoglobulinas G de alpacas. Luego de la alineación en el MEGA (**Figura 21B**) se identificaron 11 secuencias aminoacídicas que coincidieron en la totalidad de residuos (repeticiones) y 10 secuencias diferentes entre sí “únicas”. Lo que nos indica que la biblioteca cuenta con diversidad de anticuerpos VHH específicos contra rHBcAg.



**Figura 21.** Alineación de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos putativos de las 21 sub clonas de fagos en MEGA. (A) Alineación de las 21 secuencias nucleotídicas (Secuencia 01-21) en donde todas tienen por lo menos un residuo diferente (resaltados de amarillo). (B) Alineación de las 21 secuencias aminoacídicas traducidas *in silico* (VHH-1-VHH-21) donde se evidencian 11 repeticiones de VHH\_1 y VHH\_19. Por lo que solo habría 10 secuencias diferentes entre sí “únicas”.

Utilizando las 10 secuencias aminoacídicas putativas que diferían entre si se realizó otra búsqueda en el BLAST y con los datos de identidad se seleccionó una secuencia de cadena pesada variable de una inmunoglobulina convencional de alpaca ATL24952.1 (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Identidad de los VHH comparados con la inmunoglobulina de alpaca (ATL24952.1) en la base de datos BLAST del NCBI.

Anticuerpos cadena pesada seleccionados	Identidad
VHH-1	78%
VHH-2	92%
VHH-3	-
VHH-4	78%
VHH-5	77%
VHH-6	68%
VHH-7	-
VHH-8	75%
VHH-9	76%
VHH-10	75%

En la **Tabla 8** se mostraron los datos de identidad obtenidos en la base de datos BLASTp tal como se aprecia en la mayoría de los VHH hubo coincidencias con 68 o más % de identidad con el dominio variable de IgG de alpaca (ATL24952.1). En VHH-3 y VHH-7 probablemente hubo inconvenientes debido a que en el alineamiento presentaron muchos gaps o secuencias interrumpidas.

En la **Figura 22** se aprecia el alineamiento de los VHHs con la inmunoglobulina de alpaca dominio pesado y las diferencias en algunos residuos aminoacídicos que probablemente determinan la hidrofobicidad. Los VHH deberían mostrar

secuencias con diferentes aminoácidos en algunas regiones de la secuencia de la IgG convencional como son el CDR1, FR2 y CDR3.

Para evidenciar estos cambios se realizó un alineamiento en MEGA de los 10 VHH (1-10) con la IgG cadena pesada de alpaca (NCBI: BAP82413.1), con la cadena variable de un anticuerpo convencional de alpaca (NCBI: ATL24952.1) y con una secuencia que solo contenían los FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

En la **Figura 22** se observa el alineamiento de las secuencias, de los VHH cadena pesada, variable y de los FRs (1-4) y CDRs (1-3). En el alineamiento se evidenciaron coincidencias y abundantes cambios en residuos aminoacídicos en los CDR1, FR2 y FR3 que son las zonas de la region hipervariables más propensas a sufrir cambios; los residuos cambiaron a Y (tirosina), E (glutamina), R (arginina), S (serina), T (treonina) y G (glicina) en los 10 VHHs. En su mayoría son aminoácidos hidrofílicos característicos de los VHH de alpacas.

**ALINEAMIENTO AMINOACÍDICO DE 10 VHHs CON LA CADENA VARIABLE DE UN ANTICUERPO CONVENCIONAL Y LA CADENA PESADA DE UN VHH DE ALPACA**

1. BAP82413.1: Cadena pesada de un anticuerpo VHH de alpaca.
2. ATL24952.1: Cadena variable de un anticuerpo convencional de alpaca.
3. Solo FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4 y CDR4:
4. VHH\_1\_anticore\_-\_D1: -----(Secuencia única 1)
5. VHH\_12\_anticore\_-\_D10: -----(Secuencia única 2)
6. VHH\_13\_anticore\_-\_D11: -----(Secuencia única 3)
7. VHH\_14\_anticore\_-\_D12: -----(Secuencia única 4)
8. VHH\_15\_anticore\_-\_D13: -----(Secuencia única 5)
9. VHH\_16\_anticore\_-\_D14: -----(Secuencia única 6)
10. VHH\_17\_anticore\_-\_D15: -----(Secuencia única 7)
11. VHH\_18\_anticore\_-\_D16: -----(Secuencia única 8)
12. VHH\_19\_anticore\_-\_D17: -----(Secuencia única 9)
13. VHH\_21\_anticore\_-\_D18: -----(Secuencia única 10)

**Figura 22.** Alineación de las secuencias de aminoácidos con la cadena pesada del VHH de alpaca (BAP82413.1), y con la cadena variable de un anticuerpo convencional (ATL24952.1) y las estructuras CDR y FR. Las zonas FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 presentan variaciones en los residuos (de hidrofóbico a hidrofílicos).

Finalmente se realizó un análisis en el ExPASy para comparar la hidrofobicidad teórica que presentan los VHH respecto a la IgG convencional como se observa en la **Tabla 9**. En ella se observó que de 10 secuencias VHH analizadas, 7 mostraron menor hidrofobicidad que el anticuerpo convencional (VHH\_4-VHH\_10). Las secuencias aminoacídicas presentaron similitudes en los residuos de la mayoría de secuencias pero se distinguen en algunos aminoácidos de probables sitios conservados en los anticuerpos convencionales con residuos hidrofóbico y que se modifican a hidrofílicos.

**Tabla 9.** Comparación de hidrofobicidad utilizando ExPASy con la inmunoglobulina de alpaca ATL24952.1.

Anticuerpos cadena pesada seleccionados (76-92 %)	Hidrofobicidad máxima
ATL24952.1	1.73
VHH-1	2.44
VHH-2	2.44
VHH-3	2.08
VHH-4	1.356
VHH-5	1.356
VHH-6	1.33
VHH-7	1.33
VHH-8	1.33
VHH-9	1.33
VHH-10	1.33

## VI. DISCUSIÓN

Los anticuerpos VHH o VHH son los fragmentos de anticuerpos funcionales más pequeños conocidos en la naturaleza y se consideran uno de los descubrimientos más importantes para la ingeniería molecular y biotecnología de proteínas recombinantes. (Salema y Fernández, 2017).

Su producción en sistema microbiano es una herramienta muy utilizada para expresar proteínas recombinantes, ya que la mayoría de anticuerpos completos funcionales solo se puede producir eficientemente en células de mamíferos. Afortunadamente los VHH se producen preferiblemente en sistemas microbianos como *E. coli*, levaduras y hongos filamentosos. Solo requiere un corto tiempo de desarrollo y condiciones simples de fermentación lo que reduce significativamente los costos (De Marco, 2015). Se puede producir grandes cantidades de Ac funcionales y también fusionados con otros péptidos. Se menciona que también hay rendimientos bajos por el deterioro de la secreción, en presencia de vías reductoras aunque dependen de otros factores tales como los cambios que pueden producirse al fusionar el VHH con otro péptido en su secuencia para generar recombinantes y también del hospedero donde se produce (De Marco, 2015).

Los trabajos en la Unidad de Biotecnología Molecular (Gushiken 2016, Rubio 2018) han optado por trabajar con *E. coli* por sus numerosas ventajas. Aunque los VHH se producen bien en microorganismos cuando se producen en hongos filamentosos hay degradación por sus niveles de proteasas, en levaduras tienden a glicosilarse y esto afecta el sitio de unión a antígeno además contienen oligosacáridos lo que les produce inmunogenicidad y vida media sérica corta (Van

der Vaart *et al.*, 2006). En *E. coli* se expresan en secreciones del periplasma (condiciones oxidantes) donde hay actividades de chaperonas e isomerasas que forman los enlaces disulfuro estabilizantes (De Marco, 2015).

En los resultados mencionados se logró expresar VHH y proteína rHBcAg recombinante de forma soluble en *E. coli* con una etiqueta de polihistidina que luego fue purificada por cromatografía de afinidad tal y como lo mencionan Salema y Fernández, 2017 y De Marco, 2015 que utilizaron *E. coli* para expresión de proteínas recombinantes.

Para la generación de VHHs contra el antígeno proteico purificado rHBcAg fue necesario realizar la inmunización de una alpaca y realizar un seguimiento por 12 semanas de la respuesta inmune mediante la detección de anticuerpos IgG en el suero obtenido cada semana. Se inició la inmunización de alpacas con 200 µg y luego se disminuyó a 100 µg, luego se incrementó a 500 µg lo que desencadenó el aumento de la señal significativamente para las semanas 8-10, de 2.35 veces a la semana 8 y 4 veces a la semana 9 y 4.5 veces a la semana 10 comparado con el suero pre inmune. Según Jinqing *et al.*, 2011 y Zhu *et al.*, 2016 solo se consideran diferencias significativas las señales de DO que superan en dos veces o más al control negativo. Los resultados obtenidos en este proceso (**Fig. 12**) mostraron que luego de 12 semanas se consiguieron niveles significativamente altos de anticuerpos contra el rHBcAg por sobre 4.5 el suero pre inmune.

Respecto al tiempo de inoculación a diferencia de Pardon *et al.* 2014 se necesitó aumentar el número de inoculaciones de 6 a 12 y subir la dosis del antígeno de 100-200 a 500 µg ante la caída de la señal. Aunque se reporta una alta

inmunogenicidad y estabilidad de rHBcAg, el aumento de la señal también depende de la cantidad del antígeno inoculado, del modelo animal usado y del tiempo de vida sérica. Factores que probablemente influenciaron antes de obtener la señal alta y estable además de los procedimientos de purificación que pudieron haber alterado sus propiedades fisicoquímicas (Billaud *et al.* 2005; Schumacher *et al.*, 2018).

Existen pocas investigaciones que utilizan la rHBcAg como antígeno, según Rauf *et al.*, 2016, las inoculaciones de rHBcAg en conejos fueron con dosis de 50-200 µg para producir una señal recomendada en 4 semanas. Billaud *et al.*, 2005 usó 10 µg en ratón; y Pereira *et al.*, 2014 usaron 200 µg en llamas. Es definitivo que a mayor tamaño del animal se debe usar una mayor dosis. Otro aspecto importante es en el título de anticuerpos obtenidos. Es así que Pereira *et al.*, 2014 utilizando 200 µg de rHBcAg en conejos obtuvo un aumento de señal de 8 veces respecto al suero pre-inmune en 35 días. Las diferencias en los resultados obtenidos por Pereira *et al.*, 2014 y los de la presente investigación pueden deberse al método de purificación. Ya que el presente estudio utilizó el mismo antígeno pero 2 procesos de purificación por cromatografía, esto pudo haber disminuido la capacidad inmunogénica proteica de la rHBcAg al modificar su estructura nativa.

Existen otros reportes con otros tipos de antígeno puro o de mezclas enfocados en camélidos que nos permiten distinguir las diversas respuestas inmunológicas. Forsman *et al.*, 2008 uso de 50-100 µg de gp-120 puro cada semana por 40 días hasta obtener una señal estable; Kastelic, 2009 utilizó 1.5 mg de fluidos de cáncer gástrico en llamas y obtuvo una señal significativa en 3 semanas; Pardon, 2014 utilizó una mezcla de 1-5 antígenos para inmunizar a una llama por 6 semanas y

Baral, 2011 uso linajes cancerosos para inocular a una llama 5 veces por 2 meses hasta obtener una señal alta (1.6 veces el negativo). Se observan distintos valores de dosis y tiempo pero la mayoría utiliza más de 100 µg sea puro o mezclado.

Refiriéndonos solo a alpacas Bever *et al.*, 2014 usó mezclas de hemocianina con 200 µg por 2 semanas hasta obtener una señal positiva. En la Unidad de Biotecnología Molecular (UBM)- UPOCH se viene trabajando con la producción de anticuerpos VHH en alpacas para diversos antígenos, es así que Gushiken, 2016 utilizó una mezcla de CD105 con 350-500 µg de alpaca por 10 semanas hasta obtener 8 veces la señal del negativo, Barreto *et al.* 2018 utilizó una mezcla de excretado-secretado de *Fasciola hepatica* a dosis de 400-700 µg por 2 meses hasta alcanzar una señal (0.6 abs) sobre pre inmune (0.05 abs) y Rubio, 2018 que utilizó una proteína comercial pura de la envoltura del VHB (surface protein o HBsAg) a dosis de 150 µg por 6 semanas hasta obtener una señal 20 veces superior (1.937abs) al pre inmune (0.09). En los experimentos de la presente investigación se utilizaron 500 µg de rHBcAg para obtener una señal significativa en las 3 últimas semanas aunque las variantes en tiempo y dosis mencionadas en las otras referencias comprobarían que las respuestas pueden ser muy variables de acuerdo a las condiciones de inmunización, naturaleza del antígeno, tipo de antígeno (purificado o complejo) y del modelo animal inmunizado. Si nos referimos solo a alpacas se observan dosis desde 150 hasta 500 µg lo que nos podría indicar que hay necesidad de utilizar una dosis regular para las alpacas que no baje de los 200 µg de antígeno sea purificado o mezcla. Este el primer reporte utilizando la proteína rHBcAg en alpacas y se observaron algunas diferencias en tiempo y dosis de las mencionadas por otros.

El obtener una respuesta estable y alta nos permitió inferir que los anticuerpos fueron producidos en respuesta al ingreso del antígeno por ello se prosiguió con la extracción de PBMC, obteniéndose una cantidad suficiente para aislar el ARN y poder sintetizar el ADN por medio de una RT-PCR. (Pereira *et al.*, 2014). Una vez sintetizado el ADNc se realizó un PCR utilizando cebadores específicos para obtener los anticuerpos VHH.

Los amplicones obtenidos luego del PCR utilizando cebadores específicos mostraron dos bandas nítidas correspondientes a los anticuerpos VHH de bisagra corta (400 pb) y larga (500 pb) lo que nos permite inferir que se amplificaron eficientemente y no hubo degradación nucleotídica. Los resultados de la presente investigación coinciden con lo mencionado por Richard, 2013; Miyazaki *et al.*, 2015 y Pereira *et al.*, 2014 que utilizan las mismas enzimas para el RT-PCR y los mismos cebadores específicos de VHHs en el PCR y que obtienen al igual que los resultados de la presente investigación 2 bandas diferenciables entre 400 y 600 pb. También coincide con lo mencionado por Fu *et al.*, 2013 y Griffin, 2014 que realizaron el PCR con los mismos cebadores, aunque con diferentes sitios de enzimas de restricción, y lograron identificar dos fragmentos entre 500-700 pb correspondiente a los VHHs.

También Gushiken, 2016 y Rubio, 2018 que utilizaron los mismos cebadores específicos y obtuvieron las mismas bandas entre 400-600 pb luego de la amplificación. Barreto, 2018 no utilizó los mismos cebadores que el presente trabajo pero eran específicos de anticuerpo cadena pesada y sus resultados mostraron al igual que en la presente investigación las mismas bandas de 400 y 500 pb.

Esta metodología se reporta como una de las más eficientes para obtener gran cantidad de VHHs concentrados mediante PCR basado en una muestra representativa de ADNc y es recomendada porque la región bisagra está muy conservada en camélidos y debería alcanzar para sintetizar la mayoría del ARNm de los VHHs. En alpaca corresponden al 30 % en los IgG3 y 70 % en los IgG2 del ARNm (Maass *et al.*, 2007; Sabir *et al.*, 2014).

Los pasos siguientes de la metodología de la presente investigación implicaron la clonación de los fragmentos de VHH aislados y amplificados dentro de los fagémidos como el pHEN2 luego de someterlo a digestión enzimática. Hasta ahora, una variedad de fagos como  $\lambda$ , T4, T7 y M13 se han descrito para mostrar fragmentos de anticuerpos. El M13 es el más usado porque no destruye las células bacterianas (Rami *et al.*, 2017), además también es porque genera títulos de hasta  $10^{13}$  por ml de bacterias (Rajput *et al.*, 2014). Estos vectores ayudan a que los anticuerpos mantengan su función en la superficie del fago (Rami *et al.*, 2017).

Algunos de los sistemas de vectores para presentación de fagos más ampliamente utilizados son pSEX81, pCANTA, pCOMB3 o derivados. Su uso depende de las ventajas y beneficios que otorguen a la expresión y producción. El pSEX81 es de los más usados ya que se diseñó para la inserción de regiones de Ac y posee sitios de restricción para Nco I y Hind III que permiten la inserción de dominios variables (Rajput *et al.*, 2014). El pKSTV-02 utiliza los sitios de restricción Not I y Spe I y mostró eficiencia para la electroporación (Miyazaki, 2015). Los vectores de pMES4 o pMESy4 tienen de ventajas que sus sitios de restricción de PstI, Eco91I y XbaI, reduce los errores de autoligación (Pardon, 2014). El vector

pSEX81 también proporciona un promotor fuerte inducible por IPTG y un marcador de resistencia a la ampicilina para la selección (Sabir, 2014).

El presente estudio utilizó al fagémido pHEN2 que al igual que los anteriores presenta un promotor inducible por IPTG, marcador de resistencia a ampicilina (amp) y sitios de restricción con las enzimas SfiI y NotI. Una de sus principales ventajas es su alta eficiencia de transformación por electroporación de hasta  $10^9$  UFC/ml, también el sitio de restricción SPA de las fosfatasas tiende a reducir los errores de autoligación y ayuda a mantener su actividad biológica en la superficie del fago (Weichel *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2012).

El pHEN2 también es muy utilizado para incluir insertos derivados de Ac para ligarlos y expresarlos en cepas bacterianas (Fu *et al.*, 2013) aprovechando que en su estructura hay zonas para digestión enzimática que coinciden con los segmentos que poseen el amplificado o inserto (Weichel *et al.*, 2008).

La ligación de pHEN2 y VHH se dio de manera exitosa. Hay que mencionar que fueron necesarios los cortes específicos en los sitios de restricción que permitieron el apareamiento de bases entre el inserto y vector. Esta ligación fue evaluada mediante el cálculo del promedio de transformación eficiente que ocurren por electroporación en cepas *E. coli* competentes al incluir el ligando y que pueda expresar el gen de su resistencia antibiótica a ampicilina (Weichel *et al.*, 2008). El presente estudio resultó en una biblioteca genómica de  $8 \times 10^7$  UFC en base al conteo en las placas 2XTY-GA a diferentes diluciones de cultivo con las cepas que debieron haber adquirido resistencia a ampicilina. También hubo presencia de autoligados que resultaron en un promedio por debajo de 4 órdenes (500-1000

colonias) respecto a la biblioteca genómica, mientras la tasa de autoligados esté por debajo en 3 órdenes que los transformantes el error se considera poco significativa.

Investigaciones de la UBM-UPCH también utilizaron el vector pHEN2 para la ligación, es así que Gushiken, 2016 obtuvo  $1.4 \times 10^8$  UFC y Rubio, 2018  $1.7 \times 10^{10}$  UFC. Al igual que los resultados de la presente investigación, el número de transformantes está por sobre  $5 \times 10^5$  UFC. El tamaño se encuentra en el rango recomendable ya que para considerar eficiente una electroporación debe haber crecido por lo menos  $5 \times 10^5$  bacterias transformantes por cada 100 ng de vector digerido. Si resulta menor se recomienda repetir el procedimiento (Pardon *et al.*, 2014).

Los resultados coinciden con Richard, 2013 que, al hacer la ligación del vector y el inserto, obtuvo aproximadamente en densidad celular  $1.43 \times 10^9$  células/mL. Y también coincidió cercanamente con Miyazaki *et al.*, 2015 que estimó un promedio de  $8.4 \times 10^7$  UFC, el mismo orden de UFC que obtuvimos en la biblioteca. Finalmente también hay similitudes con lo mencionado por Pardon *et al.*, 2014 que obtuvo una biblioteca de aproximadamente  $10^7$  UFC luego de la transformación de bacterias por el ligando.

La ligación del inserto VHH fue determinado utilizando colonias recombinantes que fueron amplificadas por PCR de colonias. Se utilizaron los cebadores universales por lo tanto, un producto amplificado debería indicarnos que un inserto VHH se clonó en el vector pHEN2. Al igual que Gushiken, 2016 y Rubio, 2018 se identificaron 2 bandas una superior e inferior (Figura 20) que nos indica

la presencia de los VHH de bisagra corta y larga (600-800 pb) que se ligaron al vector. De 20 colonias 17 mostraron la region bisagra VHH, es decir del total 85 % resultaron transformantes.

Los fagos recombinantes se produjeron siguiendo la metodología que utiliza la infección de la biblioteca genómica de *E. coli* con VHHs y el fago auxiliar VCS-M13. La bacteria *E. coli* contienen al fagémido pHEN2 y el genoma del fago contiene una secuencia pIII que está unida a la secuencia del inserto VHH el cual no se expresa hasta que sea infectado por el fago auxiliar. Esta fusión permite que el fagémido de *E. coli* pueda expresar, en la replicación regulada por el promotor lacZ, y en el ensamblaje de fagos, la fusión de la proteína VHH-pIII. Si se desea expresar la proteína se debe eliminar del medio al represor catabólico glucosa (Qi *et al.*, 2012).

Una vez ensamblados varios fagos con la secuencia de VHH unido a la pIII expresado en proteínas en la superficie se puede empezar a subseleccionar los VHHs que presenten especificidad por el antígeno rHBcAg. Los resultados obtenido en la presente investigación nos permitieron obtener un promedio de fagos  $2.18 \times 10^{14}$  y se recomienda trabajar con un promedio superior a  $10^{12}$  (Pardon *et al.*, 2014). Si bien el promedio fue elevado, se menciona que probablemente solo una pequeña población expresaría los VHH en su superficie, por lo que se debe enfrentar a 3 diferentes rondas de selección con diferentes cantidades de antígeno rHBcAg para enriquecer la población de fagos que presentan los VHHs (Clementi *et al.*, 2012; Gushiken, 2016).

Los procesos de selección de fagos se diseñan para fragmentos específicos funcionales que reconocen a un antígeno. La tecnología de fagos nos permitió una rápida identificación de los VHH con capacidad de unión al rHBcAg (Jara-Acevedo, 2016). Los resultados de la presente investigación luego de la primera ronda con 1  $\mu\text{g}$  fue de  $4.28 \times 10^5$ ; luego en la siguiente ronda se elevó a  $1.35 \times 10^6$  y finalmente en la tercera ronda se obtuvo  $2.32 \times 10^6$ .

Entonces con este aumento de  $10^5$  hacia  $10^6$  fagos se alcanzó el rango recomendado (Tabla 5). Con las *E. coli* transformantes obtenidas por la infección de la tercera ronda de exposición al fago se aislaron 96 colonias y se realizó un ELISA de fagos. Esto nos permitió elegir los fagos que expresan los VHHs y que son específicos al antígeno rHBcAg (Banerjee, 2016).

Los resultados de la presente investigación mostraron que de 96 colonias analizadas, fueron considerados 21 subclones fueron positivas (21.88 %) (Específico a rHBcAg) con una diferencia de señal de D.O. comparado con el control negativo (BSA) por encima de 3 veces (Figuras 18 y 19). Esto coincide con lo obtenido por Miyazaki *et al.*, 2015 donde también, por técnicas de selección y ELISA de fagos, elige 13 clonas positivas (62 %) de 21 colonias resultaron específicas con una diferencia de DO de 1.5-1.7 por sobre el negativo del BSA. Richard, 2013 también obtuvo 27 clonas positivas (58.7 %) de 46 colonias con  $5 \times 10^9$  y el considera positivas por sobre 0.3 de abs.

Hay otras investigaciones como la de Bever *et al.* 2014 que de 15 clonas obtuvieron 11 repeticiones (73 % repeticiones) y 4 secuencias diferentes (27 %); Li, 2017 uso un virus integro para estimular el sistema y obtuvo 9 (9.4 %) clonas

positivas de 96; Baral, 2011 encontró 18 (37.5 %) clonas positivas de 48 aunque al alinearlas se reveló que todas eran repeticiones. Tu, 2016 identificó 2 (2 %) clonas de 96 en total. Kastelic, 2009 encontró 34 (18 %) clonas positivas respecto al total de 188. Rubio, 2018 obtuvo 44 (23 %) clonas específicas de 188 y Gushiken identificaron 2 clonas (4.34 %) de 46 colonias. Se obtienen resultados variantes pero como en nuestro caso se obtiene un promedio similar al valor más alto comparado al de las referencias (Kastelic, 2009 y Rubio, 2018). En los resultados de la presente investigación se obtuvo el 21.88 % de transformantes positivos sin embargo 11 secuencias aminoacídicas eran repeticiones (52.4 %).

Se obtuvo una cantidad relativamente alta de fagos positivos específicos contra rHBcAg (21.88 %, 21 de cada 96 subclones analizadas) lo que difiere de otros reportes que mencionan que en general, las clonas seleccionadas son proporcionales al tamaño de la biblioteca (Jara-Acevedo, 2016). La Sub-biblioteca III obtenida con  $2.32 \times 10^6$  de la ronda 3 estuvo en el rango inferior al recomendado ( $> a 10^9$  por Gushiken, 2016) aunque no hay referencias bibliográficas para tamaños de bibliotecas recomendados contra rHBcAg.

Sin embargo, nuestros resultados nos indicarían que no siempre un mayor tamaño de biblioteca guardaría una correlación directa con los VHH específicos, ya que Rubio, 2018 logró obtener  $1.86 \times 10^9$  y encontró 25 clonas positivas lo que nos permite especular que aun con una biblioteca por debajo del rango recomendado se pueden obtener clonas positivas.

Como lo obtenido por Gushiken, 2016 y Tu, 2016 que obtuvieron un promedio por debajo del recomendado con  $2 \times 10^7$  fagos y aun así obtuvieron clonas

positivas. Y como lo obtenido en la presente investigación que con  $2.32 \times 10^6$  se obtuvieron se obtuvieron 21 clonas específicas.

Jara-Acevedo, 2016 menciona que el ELISA de fagos permite generar una gran diversidad de anticuerpos y aumentar la afinidad en la selección, sin embargo, en los resultados del alineamiento de 21 secuencias aminoacídicas (Figura 21B) inferidas por los nucleótidos obtenidos en el secuenciamiento se observaron que habían secuencias repetidas (10 de 21) es decir que también varios fagos habían retenido al mismo VHH.

Después de tres rondas de selección, los 21 clones seleccionados se mandaron a secuenciar y se analizó. De la Figura 21A todas las secuencias tiene por lo menos un residuo diferente, es decir las 21 secuencias nucleotídicas son diferentes. Seguidamente se tradujeron para obtener las secuencias aminoacídica putativas, de las 21 secuencias 11 estaban repetidas y 10 eran diferentes entre sí (por lo menos en un aminoácido). La mayor tasa de cambios de aminoácidos se produce en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 y 3) y en la región marco (FR2) donde hubo cambios en los residuos aminoacídicos (Figura 22), ya que al ser más largos esta propensos a mas mutaciones para formas lo bucles (Nuttall *et al.*, 2004).

Los cambios deberían ser de aminoácidos hidrofóbicos a hidrofílicos, ya que los camélidos han adquirido naturalmente importantes adaptaciones para permanecer solubles y funcionales en ausencia del dominio variable de cadena ligera asociado (Salema y Fernández, 2017).

Las sustituciones de conservados en VH clásicos son de (Muyldermans, 2013):

- Aminoácidos hidrofóbicos como V37 (valina), G44 (glicina), L45 (leucina) y F47 (fenilalanina)/W47 (triptófano).
- Aminoácidos más hidrófilos como Y37 (tirosina)/ F37 (fenilalanina); E44 (ácido glutámico) / Q44 (glutamina); R45 (arginina)/ C45 (cisteína); G47 (glicina)/ R47 (arginina)/ L47 (leucina)/ S47 (serina);

Según la Figura 22 se evidenciaron cambios de aminoácidos hidrofóbicos a hidrofílicos como Y (tirosina), E (glutamina), R (arginina), S (serina), T (treonina) y G (glicina) en los 10 VHHs, en su mayoría los cambios fueron a residuos hidrofílicos característicos de la tasa de cambio mencionada en VHH de alpacas.

La Figura 21B nos permitió seleccionar los 10 anticuerpos VHH diferentes y compararlos con la base de datos del BLAST y se pudo elegir una inmunoglobulina de alpaca (ATL24952.1) con la que compartían grado de identidad (Tabla 8). La IgG será usada como patrón para evaluar la hidrofobicidad en el servidor en línea ExPASy, los anticuerpos VHH en la mayoría mostraron menor escala hidrofóbica (Tabla 9) lo que coincide con lo señalado por Nuttall *et al.*, 2004 y Sabir, 2014 que mencionaron que los VHHs presentan diferentes aminoácidos respecto a los anticuerpos convencionales y que son estos residuos los que incrementan la solubilidad y estabilidad de los mismos disminuyendo su hidrofobicidad. Además, los lazos que forman entre los dominios CDR1 y CDR3 y FR1 y FR3 también influenciarían en los posibles cambios en la solubilidad ya que esas uniones permiten que tenga menos tensión estructural (Salema y Fernández, 2017). Estos cambios en los anticuerpos VHH son los que les

confieren un comportamiento monomérico estricto, propiedades de plegamiento reversible, resistencia a la proteólisis y la degradación térmica en comparación con el VH de los anticuerpos convencionales (Salema y Fernández, 2017).

Adicionalmente hay diferencias en la longitud media del tercer bucle hipervariable en comparación con la VH humana y el aumento va desde 13 hasta 18 aminoácidos en camélidos. Esto explicaría la gran variabilidad de VHH que pueden formarse potencialmente a exposición de diferentes antígenos y con diferentes afinidades (Kolkman y Law, 2010).

También se resalta la factibilidad con la que se formarían en un sistema microbiano por su fácil manipulación, elevada diversidad, solubilidad y alta estabilidad fisicoquímica. Otro dato adicional es que al carecer de cadena ligera la recombinación somática no requiere tantas variantes ni modificaciones lo que le permitiría realizar más cambios en menor tiempo en comparación con los convencionales (Frenken *et al.* 2000; Harmsen y De Haard, 2007).

Actualmente se está investigando terapias basadas en nanocuerpos argumentando que presentan un grado muy alto de homología con las secuencias de cadena pesada de los anticuerpos humanos, este aspecto evitaría que se genere una reacción de nuestro sistema inmune en contra de los mismos (Kolkman y Law, 2010). El objetivo principal es utilizarlas como dianas terapéuticas capaces de neutralizar infección de diversos virus tales como el virus de influenza, rabia, del polio, sincitial respiratorio, fiebre aftosa, rotavirus, retrovirus endógeno porcino y VIH; como mecanismo inhibe la replicación viral, evitando el ensamblaje o la liberación de las partículas virales (Vanlandschoot *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2017).

Li, 2017 ha producido anticuerpos contra una proteína del virus de la diarrea; Kastelic, 2009 ha producido VHH contra células cancerosas de distintos linajes de cáncer gástrico. Y Bever *et al.*, 2014 incluyó un antígeno químico utilizado para monitoreo ambiental de contaminación del personal. Fu *et al.*, 2013, produjo VHH contra circovirus porcino muy específico. Y en varias referencias se menciona la alteración de la actividad de estos antígenos cuando los anticuerpos VHH interactúan con los mismos.

Enfocándonos en las hepatitis virales los resultados de Kucinskaite-Kodze *et al.*, 2016 lograron sintetizar 9 anticuerpos monoclonales recombinantes contra proteína de superficie (rHBsAg) de hepatitis B que se mostraron sumamente específicos contra el epitopo. Aunque mencionaron una amplia reactividad cruzada con otras cepas de hepatitis este tipo de estudios son la base para una posible aplicación biofarmacéutica.

Sin embargo, los anticuerpos terapéuticos contra virus presentan dificultades en los elevados costos de producción, el gran tamaño de los mismos que implica baja accesibilidad, penetración y eficacia terapéutica. Por ellos los anticuerpos VHH con un menor tamaño y variantes serían las alternativas más prometedoras hasta ahora (Wu *et al.*, 2017).

Desmyter *et al.*, 2013, a diferencia de los demás investigadores, no solo evaluaron la afinidad, especificidad y poder neutralizador, sino que se evaluó la capacidad infectiva de los bacteriófagos lactocócicos contra cepas bacterianas de *Lactococcus lactis* expuesta a VHH y determinaron cómo inhibían la infección viral permitiendo el crecimiento exponencial bacteriano.

Hultberg *et al.*, 2011 aislaron anticuerpos VHH de llama derivados de una biblioteca de fagos contra antígenos de 3 tipos de virus humanos: virus sincitial humano o VSR (proteína de fusión), virus de la rabia (glicoproteína) e influenza H5N1 (hemaglutinina). Del VSR se obtuvieron 149 clones VHH específicos de 188 (79 %), 30 % para influenza y 50 % para rabia. Se evaluó la neutralización viral *in vitro* con linajes celulares de murinos y aves expuestos a los VHH específicos, los resultados mostraron que los VHH mostraron una efectividad equivalente o mayor a anticuerpos monoclonales usados en terapia y que disminuyeron por 100 veces la infectividad viral

También Terry *et al.*, 2016 menciona el uso de anticuerpos VHH como terapia aplicada en mamíferos *in vivo* en ratones. En este estudio se inoculan los VHH unidos a una vacuna para el tratamiento de la rabia. Los resultados mostraron que la acción conjunta de ambas moléculas eliminó la infección letal en ratones y sobrevivieron, lo que nos mostraría un panorama muy satisfactorio a futuro para terapias utilizando VHH.

Esta sería otra ventaja de los anticuerpos VHH ya que por su solubilidad y alta afinidad de unirse a una amplia gama de determinantes antigénicos o fármacos (Manglik, 2017) son adecuado vehículos con proteínas de fusión. Todos estos trabajos sugieren fuertemente que los VHH contra antígenos del VHB podrían tener utilidad como medicamento biodirigido destinados al bloqueo del virus; ya sea a través de impedir su entrada o en volverlos inactivos por otros mecanismos.

## VII. CONCLUSIONES

- La proteína rHBcAg se produjo y purificó en *E. coli*.
- Se obtuvo una biblioteca genómica de ADNc de *E. coli* con las secuencias de los VHHs de un tamaño de  $4.4 \times 10^7$ .
- Se obtuvo la Subbiblioteca III de fagos productores del VHH específicos a rHBcAg con un tamaño de  $2.32 \times 10^6$ .
- Se produjeron 21 Fagos (21.78 %) que contenían los anticuerpos VHH sumamente específicos con la proteína rHBcAg de un total de 96.
- Se generaron 21 secuencias nucleotídicas de anticuerpos VHH diferentes.
- Se generaron *in silico* 10 secuencias aminoacídicas putativas (47.62 %) diferentes de los anticuerpos VHH del total de 21 secuencias.
- El análisis de las secuencias aminoacídicas de VHH mostró que de las 10 secuencias 7 mostraron una reducción teórica de la hidrofobicidad comparadas con anticuerpos convencionales.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abbas A, Lichtman A., Pillai S. Cellular and molecular immunology E-book. 8va edition. Elsevier Health Sciences. 2014.
2. Al-Mahtab M., Akbar S., Aguilar J., Uddin M., Khan M., Rahman S. Therapeutic potential of a combined hepatitis B virus surface and core antigen vaccine in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology international*. 2013; 7(4): 981-989.
3. Banerjee E. Development of a Novel Format of Stable Single Chain Antibodies against Alkaline Phosphatase as Therapeutic Agents against Immune Diseases. *J Nanomedine Biotherapeutic Discov*. 2016; 6 (2): 144.
4. Baral T., Murad Y., Nguyen T., Iqbal U., Zhang J. Isolation of functional single domain antibody by whole cell immunization: Implications for cancer treatment. *Journal of immunological methods*. 2011; 371(1-2): 70-80.
5. Barreto T., Alfonso Y., Lafaye P., García Lazaro M., Agueda L., Herrera-Velit P., Espinoza J. Anticuerpos de cadena única de alpaca para la detección de antígenos de *Fasciola hepática*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2018; 35: 573-580.
6. Berger, M., Shankar, V., Vafai, A. Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *The American journal of the medical sciences*. 2002; 324(1): 14-30.
7. Bertoletti A. y Le Bert N. Immunotherapy for chronic hepatitis B virus infection. *Gut and liver*. 2018; 12(5): 497.

8. Bever C., Majkova Z., Radhakrishnan R., *et al.* Development and Utilization of Camelid VHH Antibodies from Alpaca for 2,2',4,4'-Tetrabrominated Diphenyl Ether Detection. *Anal Chem.* 2014; 86 (15): 7875-82.
9. Billaud J., Peterson D., Schödel F., *et al.* Comparative antigenicity and immunogenicity of hepadnavirus core proteins. *J Virol.* 2005; 79(21): 13641-55.
10. Block H., Maertens B., Spriestersbach A., Brinker N., Kubicek J., Fabis R., Schäfer F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. In *Methods in enzymology.* Academic Press. 2009; (463): 439-473.
11. Bornhorst J., Falke J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. Academic Press. In *Methods in enzymology.* 2000; (326): 245-254.
12. Cabezas C., Suárez M., Romero G., Carrillo C., García P., Reátegui J., *et al.* Hiperendemicidad de Hepatitis viral B y Delta en pueblos indígenas de la Amazonía Peruana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica.* 2006; 23(2): 114-22.
13. Cabezas C. Hepatitis viral B y Delta en el Perú: epidemiología y bases para su control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública;* 2007. 24(4): 378-397.
14. Cabezas C. Situación y control de la hepatitis B y Delta en el Perú. *Acta Médica Peruana.* 2008; 25 (2): 96-112.
15. Cai D., Mills C., Yu W., Yan R., Aldrich C., Saputelli J., Cuconati A. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific

- inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012; 56(8): 4277-4288.
16. Castillo E., Guevara Fujita M., Fujita R. Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis. 2011. *Rev. peru. biol.* 18(2): 261 – 263.
17. Clementi N., Mancini N., Solforosi L., Castelli M., Clementi M., Burioni R. Phage display-based strategies for cloning and optimization of monoclonal antibodies directed against human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012; 13(7): 8273-8292.
18. Crowe J., Masone B., Ribbe J. One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Molecular biotechnology*. 1995. 4(3): 247-258.
19. De Genst, E., Saerens, D., Muyldermans, S., Conrath, K. Antibody repertoire development in camelids. *Developmental & Comparative Immunology*. 2006; 30(1-2): 187-198.
20. De Marco A. Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs. *Microb Cell Fact*. 2015; 14:125.
21. Desmyter A, Farenc C, Mahony J, *et al.* Desmyter A, Farenc C, Mahony J, *et al.* Viral infection modulation and neutralization by camelid nanobodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(15): E1371–E1379.
22. Eren E., Watts N., Dearborn A., Palmer I., Kaufman J., Steven A., Wingfield P. Structures of hepatitis b virus core-and e-antigen immune

- complexes suggest multi-point inhibition. *Structure*. 2018; 26(10): 1314-1326.
23. Forsman A, Beirnaert E, Aasa-Chapman MM, *et al.* Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120. *J Virol*. 2008; 82 (24):12069-81.
24. Francis M., Hastings G., Brown A. Immunological properties of hepatitis B core antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 87:2545–2549.
25. Freivalds J, Dislers A, Ose V, Pumpens P, Tars K, Kazaks A. Highly efficient production of phosphorylated hepatitis B core particles in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*. 2011; 75(2): 218-24.
26. Frenken L., Van Der Linden R., Hermans P., Bos J., Ruuls R., de Geus B., *et al.* Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*. 2000; 78(1):11-21.
27. Fu X., Gao X., He S., Design and selection of a camelid single-chain antibody yeast two-hybrid library produced de novo for the cap protein of porcine circovirus type 2 (PCV2). *PLoS One*. 2013; 8(3): e56222.
28. Galun E., Eren R., Safadi R., Ashour Y., Terrault N., Keeffe E., Lubin I. Clinical evaluation (phase I) of a combination of two human monoclonal antibodies to HBV: safety and antiviral properties. *Hepatology*. 2002; 35(3): 673-679.

29. Gao Y., Zhang T., Yuan Q., Xia N. Antibody-mediated immunotherapy against chronic hepatitis B virus infection. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2017; 13(8): 1768-1773.
30. Ghasemi F., Rostami S., Ghayour-Mobarhan M., Meshkat Z. Current progress in the development of therapeutic vaccines for chronic hepatitis B virus infection. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2016; 19(7): 692.
31. Greiff V., Menzel U., Miho E., Weber C., Riedel R., Cook S, *et al.* Systems Analysis Reveals High Genetic and Antigen-Driven Predetermination of Antibody Repertoires throughout B Cell Development. *Cell Rep*. 2017; 19(7): 1467-78.
32. Griffin L. Analysis of heavy and light chain sequences of conventional camelid antibodies from *Camelus dromedarius* and *Camelus bactrianus* species. *Journal of Immunological Methods*. 2014;v. 405: 35-46.
33. Guirao A., Yuste S., Regueiro B. Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2006; 24(4): 264-276.
34. Gushiken E. Generación de anticuerpos de dominio único específicos para CD105 humano. Tesis para optar al grado de maestro en Ciencias. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2016.
35. Hai H., Tamori A., Kawada N. Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(20):6236-43.

36. Harmsen M., De Haard H. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied microbiology and biotechnology*. 2007; 77(1): 13-22.
37. Hertveldt K., Beliën T., Volckaert G. General M13 phage display: M13 phage display in identification and characterization of protein–protein interactions. In *Bacteriophages*. Human Press. 2009: 321-339.
38. Hultberg A., Temperton N., Rosseels V., Koenders M., Gonzalez-Pajuelo M., Schepens B., *et al.* Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. *PLoS One*. 2011; 6(4):e17665.
39. Janeway C., Travers P., Walport M., *et al.* *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
40. Janssens M., Geysen, D., Broos, K., Goeyse, I., Robbens, J., Petegem, F., Timmermans, J., Guisez, Y. Folding properties of the hepatitis B core as a carrier protein for vaccination research. *Amino Acids*. 2009; 38, 1617-1626.
41. Jara-Acevedo R., Díez P., González-González M., Dégano R.M., Ibarrola N., Gongora, R., *et al.* Methods for Selecting Phage Display Antibody Libraries. *Current Pharmaceutical Design*, 2016, 22, 1-10.
42. Jinqing J., Haitang Z., Junwei L., Junmin L. Development and Optimization of an Indirect Competitive ELISA for Detection of Norfloxacin Residue in Chicken Liver. *Procedia Environmental Sciences* 8 (2011) 128 – 133

43. Kabat E., Wu, T. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *The Journal of Immunology*. 1991; 147(5): 1709-1719.
44. Karpenko L., Ivanisenko V., Pika I., Chikaev N., Eroshkin A., Veremeiko T. *et al.* Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino acids*. 2000; 18(4): 329-337.
45. Kastelic D., Frkovic-Grazio S., Baty D., Truan G., Komel R., Pompon D. A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. *Journal of immunological methods*. 2009; 350(1-2): 54-62.
46. Kimura T., Rokuhara A., Matsumoto A., Yagi S., Tanaka E., Kiyosawa K., Maki N. New Enzyme Immunoassay for Detection of Hepatitis B Virus Core Antigen (HBcAg) and Relation between Levels of HBcAg and HBV DNA. *Journal of clinical microbiology*. 2003; 41(5): 1901–1906.
47. Kolkman, J., Law, D. Nanobodies—from llamas to therapeutic proteins. *Drug discovery today: technologies*. 2010; 7(2): e139-e146.
48. Krah S., Schröter C., Zielonka S., Empting M., Valldorf B., Kolmar H. Single-domain antibodies for biomedical applications. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2016; 38(1): 21-28.
49. Lai C., Ratziu V., Yuen M., Poynard T. Viral hepatitis B. *The Lancet*. 2003; 362(9401): 2089-2094.

50. Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., McCafferty J., Laustsen A. Basics of antibody phage display technology. *Toxins*. 2018; 10(6), 236.
51. Li T., Huang M., Xiao H., *et al.* Selection and characterization of specific nanobody against bovine virus diarrhea virus (BVDV) E2 protein. *PLoS One*. 2017; 12 (6): e0178469.
52. Liang, T. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*. 2009; 49(S5): S13-S21.
53. Maass D., Sepulveda J., Pernthaner A., Shoemaker C. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *Journal of immunological methods*. 2007; 324 (1-2): 13-25.
54. Manglik A., Kobilka B. K., Steyaert J. Nanobodies to study G protein-coupled receptor structure and function. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2017; 57: 19-37.
55. Milich D., McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science*, 1986; 234 (4782): 1398-1401.
56. Ministerio de Salud (MINSA). Plan de comunicaciones hepatitis B. 2014. <https://docplayer.es/9186566-Plan-de-comunicaciones-prevencion-y-control-de-la-hepatitis-b-2014-pongamos-fin-al-silencio-de-la-hepatitis-b.html>.
57. Ministerio de Salud (MINSA). Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de enfermedades. Mapa de distribución de Hepatitis B por distritos Peru-2017. 2017.

<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2017/SE11/hepatitisb.pdf>.

58. Mitchell L., Colwell L. Analysis of nanobody paratopes reveals greater diversity than classical antibodies. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2018; 31(7-8): 267-275.
59. Miyazaki N., Kiyose N., Akazawa Y., Takashima M., Isolation and characterization of antigen-specific alpaca (*Lama pacos*) VHH antibodies by biopanning followed by high-throughput sequencing. *J. Biochem*. 2015; 158(3): 205–215.
60. Moritz B. y Stracke J. Assessment of disulfide and hinge modifications in monoclonal antibodies. *Electrophoresis*. 2017; 38(6): 769-785.
61. Muyldermans T., Baral V., Cortez Retamozzo P., De Baetselier E., De Genst J., Kinne, H., *et al.* Camelid immunoglobulins and nanobody technology, *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2009; 128: 178–183.
62. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual review of biochemistry*. 2013; 82:775-797.
63. Nieba L., Honegger A., Krebber C., Plückthun A. Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein engineering*. 1997; 10(4): 435-444.
64. Nuttall S., Humberstone K., Krishnan U., Carmichael J., Doughty L *et al.* Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting *Plasmodium falciparum* AMA1. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2004; 55 (1): 187-197.

65. Olichon A., Schweizer D., Muyldermans S., Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC biotechnology*. 2007; 7(1):7.
66. Olichon A. de Marco A. Preparation of a Naïve Library of Camelid Single Domain Antibodies. *Methods in Molecular Biology*. 2012: 65-78.
67. Pardon E., Laeremans T., Triest S., Rasmussen S., WohlkOnig A., Ruf A., Steyaert, J. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature protocols*. 2014; 9 (3), 674.
68. Pereira S., Moreira-Dill L., Morais M., *et al.* Novel camelid antibody fragments targeting recombinant nucleoprotein of *Araucaria hantavirus*: a prototype for an early diagnosis of Hantavirus Pulmonary Syndrome. *PLoS One*. 2014; 9(9): e108067.
69. Polonelli L., Pontón J., Elguezabal N., Moragues M. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS One*. 2008; 3(6): e2371.
70. Poul M., Marks J. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. *Journal of molecular biology*. 1999; 288(2): 203-211.
71. Preikschat P. Borisova G. Borschukova O. Dislers A. Mezule G. Grens E. *et al.* Expression, assembly competence and antigenic properties of hepatitis B virus core gene deletion variants from infected liver cells. *J Gen Virol*. 1999; 80(7):1777-88.

72. Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*. 2001; 44(2-3): 98-114.
73. Qi H., Lu H., Qiu H, Petrenko V., *et al.* Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *Journal of molecular biology*. 2012; 417(3): 129-143.
74. Qiagen I., Valencia C. *The QIA Expressionist: A Handbook for High-level Expression and Purification of 6X His-tagged Proteins*. Qiagen Inc, Chatsworth, CA. Fifth edition. 2003.
75. Rahbarizadeh F., Rasae M. J., Forouzandeh-Moghadam M., Allameh A.A. High expression and purification of the recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 2005; 44(1): 32-38.
76. Rajput R., Khanna M., Pradhan, H. Phage-display technology for the production of recombinant monoclonal antibodies. *Mater Methods*. 2014; 4(873.10): 13070.
77. Rami A., Behdani M., Yardehnavi N., Habibi-Anbouhi M., Kazemi-Lomedasht F. An overview on application of phage display technique in immunological studies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017; 7(7): 599-602.
78. Ramirez-Soto M. y Huichi-Atamari M. Prevalence of hepatitis B and human T-lymphotropic virus infection among blood donors at a hospital in the south-central highlands of Peru. *Transfusion Medicine*. 2018. 28(3): 263-265.

79. Rauf A., Nadeem M., Khan J., Muhammad K., Highly Immunogenic Recombinant HBV Core Protein from Pakistani Isolates: A Potential Candidate Vaccine for Hepatitis B in Pakistan. *Pakistan J. Zool.* 2016; 48(6), 1623-1626
80. Richard G., Meyers A., McLean M., *et al.* In Vivo Neutralization of  $\alpha$ -Cobratoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (VHHs) and a VHH-Fc Antibody. *PLOS ONE.* 2013; 8(7): e69495.
81. Rissiek B., Koch-Nolte F. Magnus T. Nanobodies as modulators of inflammation: potential applications for acute brain injury. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2014; 8 (344): 1-7.
82. Rubio V. Identificación de nanocuerpos recombinantes de alpaca contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Tesis para optar al grado de maestro en Ciencias. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2018.
83. Sabir J.S., Atef A., El-Domyati F.M., Edris S., Hajra N., Alzohairy A.M., Bahieldin A. Construction of naive camelids VHH repertoire in phage display-based library. *Comptes rendus biologiques.* 2014; 337: 244-9.
84. Said Z., Abdelwahab K. Induced immunity against hepatitis B virus. *World journal of hepatology.* 2015; 7(12), 1660-1670.
85. Salema V., Fernández L. High yield purification of nanobodies from the periplasm of *E. coli* as fusions with the maltose binding protein. *Protein expression and Purification.* 2013; 91(1), 42-48.
86. Salema V., Fernández L. *Escherichia coli* surface display for the selection of nanobodies. *Microbial biotechnology.* 2017; 10 (6): 1468-1484.

87. Sambrook J., Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
88. Schodel F., Moriarty A., Peterson D., *et al.* The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. *J Virol.* 1992; 66 (1):106-14.
89. Schumacher J, Bacic T, Staritzbichler R, *et al.* Enhanced stability of a chimeric hepatitis B core antigen virus-like-particle (HBcAg-VLP) by a C-terminal linker-hexahistidine-peptide. *J Nanobiotechnology.* 2018; 16(1): 39.
90. Seeger C., Mason W. Hepatitis B virus biology. *Microbiology and molecular biology reviews.* 2000; 64(1): 51-68.
91. Simmons D., Abregu F., Krishnan U., Proll D., Streltsov V. *et al.* Dimerisation strategies for shark IgNAR single domain antibody fragments. *Journal of immunological methods.* 2006; 315(1-2), 171-184.
92. Smith G., Petrenko V. Phage Display. *Chem. Rev.* 1997; 97: 391-410.
93. Smith G. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985, 228, 1315–1317.
94. Song J., Kim D. Diagnosis of hepatitis B. *Annals of Translational Medicine.* 2016; 4(18): 1-6.
95. Sidhu S. Engineering M13 for phage display. *Biomolecular engineering.* 2001; 18(2): 57-63.
96. Tanha J., Dubuc G., Hiramata T., Narang S. A., MacKenzie C. Selection by phage display of llama conventional VH fragments with heavy chain

- antibody VHH properties. *Journal of immunological methods*. 2002; 263 (1-2): 97-109.
97. Terryn S., Francart A., Rommelaere H., Stortelers C., Van Gucht S. Post-exposure treatment with anti-rabies VHH and vaccine significantly improves protection of mice from lethal rabies infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016; 10(8): e0004902.
98. Thomassen Y., Meijer W., Sierkstra L. Large-scale production of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*. 2002; 30(3): 273-278.
99. Tillib S. "Camel nanoantibody" is an efficient tool for research, diagnostics and therapy. *Mol Biol (Mosk)*. 2011; 45 (1):77-85.
100. Tu Z., Chen Q., Li Y., Xiong Y., Xu Y., *et al*. Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Analytical Biochemistry*. 2016; 493: 1–7.
101. Van der Vaart J., Pant N., Wolvers D., Bezemer S., *et al*. Reduction in morbidity of rotavirus induced diarrhoea in mice by yeast produced monovalent llama-derived antibody fragments. *Vaccine*. 2006; 24(19): 4130-4137.
102. Vanlandschoot, P., Stortelers, C., Beirnaert, E., Ibañez, L. I., Schepens, B., Depla, E., Saelens X. Nanobodies: new ammunition to battle viruses. *Antiviral research*. 2011; 92(3), 389-407.
103. Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K., *et al*. MINIREVIEW: Antibody structure, instability, and formulation. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2007; 96(1), 1-26.

104. Walsh K., Alexander, G. Update on chronic viral hepatitis. Postgraduate medical journal. 2001; 77(910): 498-505.
105. Warren D. Preparation of highly efficient electrocompetent *Escherichia coli* using glycerol/mannitol density step centrifugation. Analytical biochemistry. 2011; 413(2): 206-207.
106. Waty R., Mustopa A, Suharsono S, Murtiyaningsih H. Soluble expression and purification of hepatitis B core antigen (HBcAg) subgenotype B3 in *Escherichia coli* using thioredoxin fusion tag. Asian Pacific Journal of Tropical Disease; 2017. 7 (8): 496-501.
107. Weichel M., Jaussi R., Rhyner C., Cramer R. Display of *E. coli* Alkaline Phosphatase pIII or pVIII Fusions on Phagemid Surfaces Reveals Monovalent Decoration with Active Molecules. Open Biochem J. 2008; 2: 38-43.
108. WHO (World Health Organization). Hepatitis B. Immunization, Vaccines and Biologicals. 2018. <https://www.who.int/immunization/diseases/hepatitisB/en/>.
109. Wilkins, T., Sams, R., Carpenter, M. Hepatitis B: Screening, Prevention, Diagnosis, and Treatment. American family physician. 2019; 99(5): 314-323.
110. Winter G., Griffiths A., Hawkins R., Hoogenboom H. Making antibodies by phage display technology. Annual review of immunology. 1994; 12(1): 433-455.
111. Wu Y., Jiang S., Ying, T. Single-domain antibodies as therapeutics against human viral diseases. Frontiers in immunology. 2017; 8:1802.

112. Zhang Y., Guo Y., Wang K., Lu K., Li K., Zhu Y., Sun S. Enhanced immunogenicity of modified hepatitis B virus core particle fused with multiepitopes of foot-and-mouth disease virus. *Scand J Immunol.* 2007; 65(4): 320-8.
113. Zhao R., Shi Y., Zhao H., Wu, Sheng, J. F. Acute-on-chronic liver failure in chronic hepatitis B: an update. *Expert review of gastroenterology & hepatology.* 2018; 12(4): 341-350.
114. Zhu L., He J., Cao X., Huang K., Luo Y., Xu W. Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus Cereus* in food. *Scientific Reports.* 2016;6:16092