

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIANGIOGÉNICO DE ANTICUERPOS vNAR CONTRA VEGF, AISLADOS DE BIBLIOTECAS SINTÉTICAS DE ANTICUERPOS DE TIBURÓN

Olivia Cabanillas-Bernal¹, Teresa Escalante² y Alexei F. Licea-Navarro¹. ¹ Departamento de Innovación Biomédica, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Carretera Ensenada-Tijuana No 3918, Zona Playitas, Ensenada C.P. 22860, Baja California, México. ² Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, C.P. 11501-2060 San José, Costa Rica.
ocabanil@cicese.edu.mx

Palabras clave: vNAR; anticuerpos; bibliotecas sintéticas; VEGF

Introducción. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es la molécula proangiogénica mejor caracterizada en la angiogénesis del desarrollo y angiogénesis tumoral (1). La inhibición de VEGF ha mostrado suprimir la angiogénesis patológica en una amplia variedad de modelos (2). Esto ha potenciado el interés de desarrollar fármacos inhibidores de VEGF.

Los anticuerpos de dominio sencillo de tiburón (vNAR) han sido propuestos como opción potencial para uso terapéutico y de diagnóstico debido a sus ventajas sobre los anticuerpos convencionales, que incluyen, tamaño pequeño, estabilidad térmica y química, buena penetración en tejidos, entre otras (3). Recientemente, se han dirigido diferentes esfuerzos a tratar de eludir las limitaciones de desarrollar anticuerpos en animales. Esto ha resultado en el desarrollo de bibliotecas sintéticas de anticuerpos, las cuales permiten una rápida y fácil selección de anticuerpos contra cualquier antígeno (4), como VEGF. Objetivo: Aislar anticuerpos a partir de bibliotecas sintéticas de anticuerpos vNAR de tiburón, capaces de neutralizar a VEGF y de inhibir la angiogénesis *in vitro*.

Metodología. En este estudio, se realizó una selección de anticuerpos a partir de tres bibliotecas sintéticas de anticuerpos vNAR, contra VEGF, utilizando la tecnología de despliegue en fagos, durante cuatro rondas de selección. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos aislados para reconocer a VEGF en ensayo ELISA. Adicionalmente, se evaluó el efecto antiangiogénico de los anticuerpos aislados en un modelo tridimensional de esferoides de células endoteliales (EC), los cuales fueron estimulados con VEGF y tratados con los diferentes anticuerpos. Se cuantificó la longitud acumulativa de las ramificaciones después de 24 h de tratamiento. Se utilizaron como control positivo V13 y V13_P98Y, dos anticuerpos anti-VEGF, con efecto antiangiogénico previamente reportado (5,6).

Resultados. Se aislaron dos anticuerpos contra VEGF nombrados VS0-4 y VS1-20. Los dos anticuerpos fueron exitosamente expresados como proteína soluble en *Escherichia coli*. Los niveles de expresión de las proteínas recombinantes fueron de alrededor de 0.2 mg/mL. Ambos anticuerpos mostraron habilidad para reconocer a VEGF soluble en ELISA. La figura 1 muestra los resultados del ensayo de inhibición de angiogénesis *in vitro*. VEGF (5 ng/mL) estimula la formación de brotes de angiogénesis originados de esferoides de EC (hasta tres veces más longitud acumulativa de las ramificaciones que el control sin estímulo con VEGF (Figura 1 A,B,G)). Cuando los esferoides estimulados con VEGF se trataron con los anticuerpos anti-

VEGF: VS1-20, VS0-4, V13_P98Y y V13, se observó una inhibición significativa ($P < 0.001$) de las ramificaciones de los esferoides, en comparaciones a los esferoides que solo fueron tratados con VEGF (Figura 1C-G). El tratamiento con VS1-20 presentó la mayor inhibición de brotes de angiogénesis de los esferoides (hasta un 74% menos de longitud acumulativa de las ramificaciones que el control con el estímulo de VEGF).

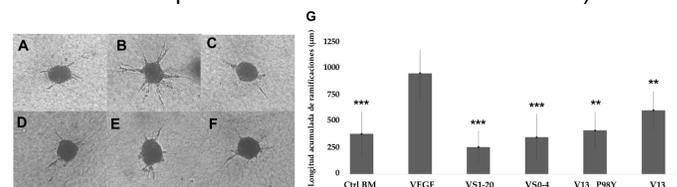


Fig. 1. Ensayo de inhibición de angiogénesis 3-Dimensional *in vitro* basado en esferoides de EC. (A) Control BM; (B) EC + VEGF; (C) EC + VEGF + VS1-20; (D) EC + VEGF + VS0-4; (E) EC + VEGF + V13_P98Y; (F) EC + VEGF + V13; (G) La longitud acumulativa de los brotes tipo capilares se midió digitalmente después de 24 h de incubación. Los brotes de angiogénesis se inhibieron principalmente cuando los esferoides se trataron con anticuerpos VS1-20 y VS0-4 aislados de las bibliotecas sintéticas ($P < 0.001$), en comparación con los tratamientos control con V13_P98Y y V13 ($P < 0.01$). BM (medio basal).

Conclusiones: El uso de bibliotecas sintéticas de anticuerpos permite aislar de manera rápida y simple anticuerpos como se mostró contra VEGF.

Los anticuerpos VS0-4 y VS1-20 presentan capacidad para reconocer al antígeno soluble, son capaces de inhibir la angiogénesis *in vitro*, en un modelo de esferoides tridimensionales y pueden rivalizar a anticuerpos aislados de bibliotecas inmunes o mejorados por modelado *in silico*, para los cuales se ha reportado previamente un efecto antiangiogénico *in vitro* e *in vivo* (5,6).

Agradecimientos. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada (No. 262463) a Olivia Cabanillas-Bernal. A la Universidad de Costa Rica por permitir una estancia académica para la capacitación en la técnica de esferoides tridimensionales de células endoteliales. Proyecto 3804, Problemas Nacionales 2016.

Bibliografía.

- Ferrara N & Kerbel RS (2005) *Nature*. 438:967-974.
- Ferrara N (2004) *Endocr Rev*. 25(4):581-611.
- Shao C, Secombes CJ & Porter AJ (2007) *Mol. Immunol*. 44:656-665.
- Miersch S & Sidhu SS (2012) *Methods*, 57:486-498.
- Camacho-Villegas TA, et al. (2018) *Mar Drugs*, 16:113.
- Millán-Gómez D, et al. (2018) *Oncotarget*. 9(46):28016-28029.

