

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***GENERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS ANTITUMORALES  
ESPECÍFICOS DEL ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA)  
PARA EL DESARROLLO DE UNA INMUNOTERAPIA CONTRA  
CÁNCERES DEL APARATO DIGESTIVO***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica Aplicada y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

***Nicolás Andrés Bustamante Zamorano***

Director de Tesis: Dr. Álvaro Fernando Lladser Caldera

**Santiago – CHILE  
Noviembre 2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**NICOLÁS ANDRÉS BUSTAMANTE ZAMORANO**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Álvaro Lladser.** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Carlos Santiviago.** \_\_\_\_\_

**Dr. Flavio Salazar.** \_\_\_\_\_

**Dr. Javier Puente** \_\_\_\_\_

*Dedicada con mucho cariño a Digney Zamorano Donoso,  
cuyo recuerdo me entregó fuerzas en los momentos de frustración.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar debo agradecer a mis padres María Luisa Zamorano Donoso y José Agustín Bustamante Carvajal por dedicar su vida a la tarea de educar a mis hermanos y a mí. No soy capaz de expresar con palabras lo agradecido y orgulloso que me siento por ser su hijo. Nunca podré retribuir todo lo que me han entregado pero espero que este pequeño paso les devuelva un poco de la felicidad que han sabido entregarme con tanto amor.

Agradezco a mi hermana Pía y mi hermano Rodrigo por su apoyo incondicional en todo momento y por saber entregarme la palabra precisa en los momentos de crisis. Probablemente no logren dimensionar la importancia que tuvieron en las decisiones que tomé durante todo este proceso y lo afortunado que me siento por ser su hermano menor.

A mi abuela María Luisa y mi tía Digney porque siempre serán mi fuente de inspiración, mi motivo para no rendirme y mi fuerza para luchar por un mundo mejor. Su ejemplo de fortaleza vivirá por siempre en mi memoria.

A mis grandes amigos Juan Pablo, Gonzalo y Constanza por todo el cariño y apoyo que me entregaron durante este duro proceso y por compartir con real empatía mis alegrías y tristezas. Su amistad incondicional es un pilar fundamental en mi vida y agradezco tener la posibilidad de ser su amigo.

A mis compañeros y amigos de universidad por todos los momentos de alegría que transformaron este difícil proceso en una etapa inolvidable. Especialmente a Pablo Maturana por su gran compañerismo y empatía, no exagero al confesar que sin su ayuda no estaría finalizando esta etapa con éxito.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunoterapia Génica porque lograron que el lugar de trabajo pasara a ser mi segundo hogar. Especialmente a Andrés, Paola, César y Sebastián por toda la ayuda experimental, conocimientos y tiempo que me entregaron.

A mi profesor tutor, el Dr. Álvaro Lladser, por todas las horas que dedicó a corregir mis errores y reforzar mis cualidades como científico y persona. Estoy seguro de que siempre recordaré todo lo que aprendí bajo su tutoría.

A todos quienes estuvieron conmigo en este proceso y a quienes me ayudaron con un pequeño gesto o una simple palabra de aliento les estaré por siempre agradecido.

Fue una etapa difícil y no pude haberla terminado solo, mis más sinceros agradecimientos a todos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ABREVIATURAS.....	4
I. RESUMEN .....	6
II. ABSTRACT .....	8
III. INTRODUCCIÓN.....	10
III. 1. EL CÁNCER EN CHILE Y EL MUNDO .....	10
III. 2. TRATAMIENTO CONTRA CADs .....	12
III. 3. INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL.....	14
III. 4. ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO .....	17
III. 5. BACTERIÓFAGO M13 Y <i>PHAGE DISPLAY</i> .....	20
III. 6. RESUMEN DE LA ESTRATEGIA PROPUESTA.....	25
IV. HIPÓTESIS.....	27
V. OBJETIVO GENERAL .....	27
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
VII. MATERIALES .....	29
VII. 1. Material biológico.....	29
VII. 2. Plásmidos.....	30
VII. 3. Medios de cultivo .....	34
VII. 4. Soluciones y reactivos comerciales .....	35
VII. 5. Reactivos de biología molecular.....	36
VII. 6. Tampones y otras soluciones.....	37
VII. 7. Anticuerpos .....	37
VIII. MÉTODOS.....	38
VIII.1. Transformación de bacterias quimiocompetentes .....	38
VIII.2. Transformación de bacterias mediante electroporación .....	39
VIII.3. Amplificación de plásmidos.....	40
VIII.4. Digestión enzimática de plásmidos .....	41

VIII.5.	Purificación de ADN desde gel de agarosa.....	42
VIII.6.	Desfosforilación del vector M13KE .....	42
VIII.7.	Ligación de ácidos nucleicos .....	43
VIII.8.	PCR convencional.....	43
VIII.9.	Producción de bacteriófago M13 silvestre.....	44
VIII.10.	Titulación de bacteriófagos M13 silvestres mediante infección de bacterias <i>E. coli</i> ER2738 .....	45
VIII.11.	Detección de bacteriófagos mediante ELISA indirecto .....	45
VIII.12.	Titulación de bacteriófagos mediante ELISA indirecto .....	46
VIII.13.	Ensayo de especificidad contra CEA purificado .....	46
VIII.14.	Cultivo celular .....	48
VIII.15.	Detección de bacteriófagos unidos a la superficie células tumorales mediante citometría de flujo .....	48
VIII.16.	Detección de la proteína pIII mediante western blot .....	49
VIII.17.	Análisis estadístico .....	50
IX.	RESULTADOS .....	51
	OBJETIVO 1 .....	51
	OBJETIVO 2 .....	60
	OBJETIVO 3 .....	67
X.	DISCUSIÓN.....	74
XI.	CONCLUSIONES.....	84
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación del genoma del fago M13 y su respectivo proteoma.....	22
<b>Figura 2.</b> Ciclo infeccioso del bacteriófago M13.....	22
<b>Figura 3.</b> Etapas de selección en método <i>phage display</i> .....	23
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica de la respuesta inmune esperada al inyectar bacteriófago anti-CEA en un modelo tumoral murino.....	26
<b>Figura 5.</b> Mapa del vector genómico M13KE.....	31
<b>Figura 6.</b> Mapa del vector de clonamiento pUC57.....	32
<b>Figura 7.</b> Mapa del fagomidio pSEX81.....	33
<b>Figura 8.</b> Análisis por PCR del producto de ligación entre el vector M13KE y el fragmento scFv anti-CEA.....	57
<b>Figura 9.</b> Análisis por PCR de posibles clones positivos para ligación M13KE-scFv anti-CEA.....	58
<b>Figura 10.</b> Detección de bacteriófago M13 mediante ensayo de ELISA indirecto....	59
<b>Figura 11.</b> Resumen esquemático de la producción de bacteriófagos anti-CEA.....	64
<b>Figura 12.</b> Curva estándar de M13 silvestre.....	65
<b>Figura 13.</b> Detección de la proteína de fusión scFv - pIII mediante técnica de <i>western blot</i> .....	66
<b>Figura 14.</b> Evaluación de la especificidad del bacteriófago M13 anti-CEA.....	71
<b>Figura 15.</b> El bacteriófago M13 anti-CEA se une específicamente a la proteína CEA purificada.....	72
<b>Figura 16.</b> El bacteriófago M13 anti-CEA se une específicamente a células que expresan CEA en su superficie.....	73

## ABREVIATURAS

<b>Ac</b>	anticuerpo
<b>ATCC</b>	“American Type Culture Collection”
<b>BSA</b>	“Bovine Serum Albumin” (albumina de suero bovina)
<b>CAD</b>	cáncer del aparato digestivo
<b>CEA</b>	“carcinoembryonic antigen” (antígeno carcinoembrionario)
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleótido trifosfato
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	“enzyme-linked immunosorbent assay” (inmunoensayo ligado a enzimas)
<b>FBS</b>	“Fetal Bovine Serum” (suero fetal bovino)
<b>FD</b>	“Fast Digest” (enzimas de digestión rápida)
<b>HF</b>	“High Fidelity” (enzimas de digestión de alta fidelidad)
<b>HRP</b>	“horseradish peroxidase” (peroxidasa de rábano)
<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>MOI</b>	“Multiplicity of Infection” (multiplicidad de infección)
<b>OD</b>	“optical density” (densidad óptica)
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	“phosphate buffered saline” (tampón fosfato salino)
<b>PCR</b>	“polymerase chain reaction” (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PE</b>	“phycoerythrin” (fluoróforo ficoeritrina)
<b>PerCP/Cy5.5</b>	“peridinin-chlorophyll-proteincomplex/Cyanin 5.5” (fluoróforo complejo proteico peridinin-clorofila/cianina 5.5)

<b>SAP</b>	“Shrimp Alkaline Phosphatase” (fosfatasa alcalina de camarón)
<b>scFv</b>	“single-chain variable fragment” (fragmento variable de cadena simple)
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio.
<b>TBS</b>	“tris-buffered saline” (tampón salino con tris-HCl)
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<b>Ufp</b>	unidades formadoras de placa
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## **I. RESUMEN**

Los cánceres del aparato digestivo (CAD) son, en su conjunto, la principal causa de defunciones por cáncer a nivel mundial. Pese al gran desarrollo de diversas terapias, el tratamiento contra este tipo de cáncer continúa siendo poco eficaz y conlleva un amplio número de efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida del paciente. Esto hace necesario investigar y desarrollar nuevas terapias que combatan de forma específica y eficaz el desarrollo de tumores. En la actualidad, la inmunoterapia es una de las estrategias terapéuticas más promisorias. El sistema inmune posee el potencial de reconocer y eliminar específicamente a las células tumorales mediante el reconocimiento de proteínas expresadas diferencialmente en estas células, denominadas antígenos tumorales. Sin embargo, el tumor genera un microambiente que inhibe la respuesta inmune antitumoral, por lo que el desarrollo de terapias capaces de interrumpir esta inhibición puede permitir que el sistema inmune elimine eficientemente las células tumorales. Actualmente existen dos tratamientos de este tipo aprobados para su uso en humanos.

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una proteína de superficie altamente expresada en una gran variedad de CADs y por ende, un blanco atractivo para el desarrollo de inmunoterapias específicas contra este conjunto de cánceres. En este trabajo se generó un bacteriófago filamentoso M13 específico contra CEA para ser usado en una futura inmunoterapia como un agente inmunogénico que se una a CEA en la superficie de las células

tumorales. Así, el fago, a través de su ADN genómico de hebra simple, activará a las células del sistema inmune innato infiltrantes del tumor y promoverá un microambiente proinflamatorio capaz de revertir la inmunosupresión del tumor y permitir que la respuesta inmune adaptativa elimine a las células tumorales de forma específica.

El bacteriófago anti-CEA se generó en cultivos de *E. coli* transformadas con fagomio e infectadas con un fago auxiliar. El fagomidio pSEX81 permitió expresar un fragmento variable de anticuerpo de cadena simple (scFv) específico contra CEA fusionado a la proteína pIII. El fago auxiliar (denominado hiperfago) permitió expresar las proteínas que conformarán la nueva partícula viral. La presencia de la proteína de fusión scFv-pIII en el bacteriófago M13 anti-CEA se confirmó mediante *western blot* usando un anticuerpo específico contra la proteína pIII. La especificidad del fago anti-CEA contra el antígeno CEA purificado se confirmó mediante ensayos de ELISA. Por otra parte, se comprobó *in vitro* que el bacteriófago anti-CEA se une a la proteína CEA expresada en la superficie de líneas celulares tumorales de origen humano y murino mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que este fago se unirá al antígeno tumoral CEA *in vivo*, convirtiéndolo en una potencial inmunoterapia contra CADs.

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Inmunoterapia Génica, perteneciente a la Fundación Ciencia & Vida, bajo el financiamiento del proyecto CORFO Innova L2 I+D Aplicada N°12IDL2-13348.

## **II. ABSTRACT**

Gastrointestinal cancers are the leading cause of cancer-related deaths worldwide. Despite the great development of cancer therapies, the treatment of this type of cancer remains ineffective and involves a large number of side effects that negatively impact the life quality of patients. In order to solve these problems, development of new therapies able to specifically and effectively eradicate tumors is needed. Currently, immunotherapy is one of the most promising therapeutic strategies. The immune system has the potential to specifically eliminate tumor cells by recognizing tumor antigens, which are proteins differentially up-regulated in these cells. However, tumors create an immunosuppressive microenvironment that inhibits the immune responses against the tumor, therefore development of therapies capable of disrupting this inhibition may allow the immune system to eliminate tumor cells efficiently. Currently, two drugs following this principle have been approved for human use. Carcinoembryonic antigen (CEA) is a surface protein highly expressed in a variety of gastrointestinal cancers, thus it is an attractive target for the development of immunotherapies targeting this type of cancers. In this thesis, a M13 filamentous bacteriophage able to bind CEA at the surface of tumor cells was generated as an immunogenic agent for a future immunotherapy. This CEA-specific M13 filamentous bacteriophage, through its genomic single-stranded DNA, is expected to activate tumor-infiltrating innate immune cells promoting a proinflammatory microenvironment capable of disrupting tumor-induced immunosuppression and allowing adaptive immune responses to

efficiently eliminate tumor cells. Furthermore, this strategy will promote the presentation of tumor antigens and the generation of tumor-specific adaptive immune responses. The CEA-specific bacteriophage was generated in *E. coli* cultures transformed with a phagemid and infected with a helper phage. The phagemid vector pSEX81 was used for generating the CEA-specific single chain variable fragment (scFv) fused to the pIII protein on the surface of M13 bacteriophages. The helper phage (or hyperphage) allowed the expression of the other viral proteins needed to form the bacteriophage particles. The presence of scFv-pIII fusion protein in CEA-specific bacteriophage preparations was confirmed by western blot analysis using an M13 pIII-specific antibody. The capability of the bacteriophage to specifically bind purified CEA *in vitro* was confirmed by ELISA. Moreover, it was demonstrated that the CEA-specific bacteriophage binds CEA expressed on the surface of mouse and human tumor cell lines. The results obtained in this thesis suggest that this CEA-specific bacteriophage will bind to CEA-expressing tumors *in vivo*, and it represents a potential immunotherapy against gastrointestinal cancer.

The *in vitro* observed specificity of the anti-CEA M13 bacteriophage suggests that this phage will bind to this tumor antigen *in vivo*, making it a powerful tool for potential gastrointestinal cancer targeted immunotherapies.

This thesis work was performed at "Laboratorio de Inmunoterapia Génica", belonging to "Fundación Ciencia & Vida", under funding project "CORFO Innova L2 I+D Aplicada No. 12IDL2-13348".

### **III. INTRODUCCIÓN**

#### **III. 1. EL CÁNCER EN CHILE Y EL MUNDO**

El cáncer se caracteriza por la proliferación descontrolada de células que invaden progresivamente el órgano de origen y posteriormente se diseminan a tejidos distantes. Generalmente provoca la muerte si no es detectado y tratado a tiempo, por lo que es uno de los mayores problemas que enfrenta la salud humana actualmente. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012 fallecieron aproximadamente 8,2 millones de personas en todo el mundo producto de esta enfermedad. Dentro de este total de muertes por cáncer, 723 mil fueron causadas por cáncer gástrico, 694 mil por cáncer colorrectal y 400 mil por cáncer de esófago [1], convirtiendo de esta manera a los cánceres del aparato digestivo (CADs) en los principales causantes de muerte por cáncer en el mundo. En nuestro país el cáncer es la segunda causa de muerte, siendo responsable del 25,9% del total de defunciones en el año 2011 [2].

Dentro de los CADs más frecuentes a nivel mundial se encuentra al cáncer colorrectal (CCR), calculándose que en el año 2012 fueron diagnosticados 746 mil nuevos casos en hombres y 614 mil nuevos casos en mujeres, ocupando el tercer y segundo lugar, respectivamente, en las listas de cánceres más comunes para cada género [3]. En Chile el CCR fue responsable

de 1.718 defunciones en el año 2008, correspondiendo a la tercera causa de muerte por CADs. Además, ese mismo año fueron diagnosticados 2.737 nuevos casos, llegando a ser el quinto tipo de cáncer más común en nuestro país [2].

Por otra parte, el cáncer gástrico (CG) corresponde a la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo, con un total de 723 mil muertes que corresponden al 8,8% del total de vidas perdidas por causa de tumores malignos, lo que lo convierte en la principal causa de muerte por CAD [3]. En Chile el CG es la primera causa de muerte por cáncer, con 3.229 víctimas en el año 2008 y el tercer tipo de cáncer más común, con 3.762 nuevos casos diagnosticados en ese mismo año [2].

Se agrega a esta lista el cáncer de vesícula biliar (CVB), quinto cáncer más común del aparato digestivo a nivel mundial y responsable de 100 mil muertes en el año 2008 [4]. Si bien a nivel mundial este tipo de cáncer tiene una menor incidencia comparado con otros cánceres del tracto intestinal, en Chile el CVB presenta la mayor tasa de incidencia del mundo (> 30 por 100.000). En el año 2008, en nuestro país fueron diagnosticados 2.152 nuevos casos de CVB, transformando a este tipo de cáncer en el sexto más frecuente a nivel nacional. Ese mismo año fallecieron 1.858 personas a causa de esta enfermedad [2].

Indudablemente, la búsqueda de nuevas terapias antitumorales que combatan de forma eficaz al conjunto de CADs se ha vuelto una necesidad creciente a nivel mundial y por supuesto en nuestro país.

### **III. 2. TRATAMIENTO CONTRA CADs**

La medicina ha intentado por muchos años encontrar un método para eliminar de forma eficaz los tumores malignos. Sin embargo, las terapias utilizadas actualmente (cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, criocirugía y/o ablación por radiofrecuencia) no son eficaces en la erradicación de CADs, considerando que aunque el tumor puede ser removido completamente, la tasa de supervivencia a 5 años continúa presentándose en aproximadamente un 70% de los casos para tratamientos contra cánceres en estadios muy tempranos y hasta en un 1% de los casos en estadios tardíos (porcentajes dependientes del tejido de origen). Además, se debe considerar que estos tratamientos generan efectos secundarios no deseados (como vómitos, diarrea y caída del cabello, entre otros) que aumentan la tasa de abandono de la terapia por parte del paciente.

El tratamiento a utilizar depende directamente del tipo de CAD que padece el paciente, la localización, el tamaño y número del o los tumores y la condición clínica del individuo. Si existe la posibilidad de erradicar

completamente el cáncer, el tratamiento se llevará a cabo a pesar de los efectos secundarios que se generen, priorizando la opción de salvar la vida del paciente por sobre el daño colateral que involucre el tratamiento. Por el contrario, si el cáncer no puede ser erradicado, el paciente recibirá un tratamiento paliativo que intentará entregar un apoyo psicológico, emocional y nutricional, además de disminuir el dolor a través de medicamentos o terapias. Este tratamiento paliativo busca ayudar a preservar la calidad de vida del paciente [5, 6].

Dentro de las principales dificultades del tratamiento de los CADs se encuentra la difícil detección de la enfermedad en sus primeras etapas, debido a la ausencia o la interpretación equivocada de los síntomas asociados. Así, la detección se realiza generalmente en un estado avanzado de la enfermedad, cuando las terapias convencionales son menos eficaces debido principalmente a la capacidad de las células cancerígenas de resistir las terapias e invadir otros tejidos para desarrollar nuevos focos tumorales, incluso en órganos distantes (metástasis), lo que provoca que la tarea de erradicar completamente el cáncer sea aún más compleja.

### **III. 3. INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL**

La búsqueda de terapias más eficaces y con menos efectos secundarios ha promovido el estudio y desarrollo de inmunoterapias antitumorales, ya que prometen ser más específicas y efectivas, generando menos efectos secundarios no deseados en el paciente. Este tipo de terapias se diferencia de las terapias convencionales en que utilizan la capacidad intrínseca del sistema inmune del paciente para combatir el cáncer. La inmunoterapia antitumoral se basa en la capacidad que poseen los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa para destruir células tumorales [7].

El principal mecanismo de inmunidad adaptativa antitumoral corresponde a la destrucción de células cancerígenas efectuada por los linfocitos T CD8+. Este tipo de linfocitos, previamente activados por una célula presentadora de antígeno profesional, es capaz de reconocer y destruir mediante diferentes mecanismos citotóxicos a las células que expongan en su superficie el antígeno tumoral presentado por moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) [8]. Ha sido demostrado que en el organismo existe una frecuente generación de células malignas, las que son eliminadas constantemente por el sistema inmune controlando la formación de masas tumorales, proceso denominado inmunovigilancia [9, 10]. Los linfocitos T CD4+ secretan citoquinas que participan en la activación de linfocitos T CD8+ y favorecen o aumentan la expresión de MHC de clase I en la superficie de

células tumorales, incrementando la eficacia en el reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8+. La respuesta inmune mediada por linfocitos T efectores específicos es clave al momento de evitar el inicio o la progresión del cáncer. De hecho, la infiltración intratumoral de linfocitos T citotóxicos se asocia a menudo con parámetros clínicos favorables, tales como una reducción en la recurrencia de la enfermedad y mayor supervivencia en pacientes con distintos tipos de cáncer [11].

Sin embargo, existen mecanismos mediante los cuales las células tumorales evaden al sistema inmune. En primer lugar, por provenir del mismo organismo, este tipo de células presenta antígenos que son reconocidos como propios y no activan eficientemente al sistema inmune. Este proceso se denomina tolerancia inmunológica y se debe a la eliminación de linfocitos T autorreactivos que ocurre durante su generación en el timo (tolerancia central) y en los órganos linfoides periféricos, bazo y nódulos linfáticos (tolerancia periférica). Además, las células tumorales tienen la capacidad de disminuir la expresión de moléculas de MHC y de antígenos inmunogénicos que potencialmente pueden ser reconocidos por el sistema inmune. Las células tumorales también pueden secretar citoquinas que inhiben la función y la infiltración hacia el microambiente tumoral de los linfocitos T efectores o que inducen la llegada de células reguladoras o supresoras de la respuesta antitumoral. Como resultado, el microambiente tumoral induce tolerancia inmunológica e impide la acción de los linfocitos T efectores [10].

La inmunoterapia antitumoral busca activar al sistema inmune contra las células cancerígenas ya sea al inducir o reforzar la respuesta inmune antitumoral o al bloquear la inmunosupresión tumoral. La inmunoterapia activa busca producir que el propio sistema inmune del paciente active una respuesta de linfocitos T específicos contra antígenos tumorales y que, de esta forma, elimine a las células cancerígenas. En cambio, la inmunoterapia pasiva se basa en la administración de moléculas o células efectoras, activadas *in vitro*, que poseen especificidad contra las células tumorales. Estas nuevas aproximaciones terapéuticas se basan principalmente en la activación de linfocitos T específicos contra el tumor y en la antagonización de las vías reguladoras que causan la supresión de la actividad de los linfocitos T sobre el tumor [12].

En el año 2010 la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) aprobó en Estados Unidos la primera inmunoterapia específica comercializable, “Provenge” de Dendron Corporation. Esta terapia utiliza células presentadoras de antígeno propias del paciente en combinación con un antígeno expresado en células cancerígenas de próstata. Así, estas células presentarán el antígeno tumoral a los linfocitos T del paciente, iniciando una respuesta inmune antitumoral específica contra las células tumorales. A nivel nacional, el grupo de científicos de Oncobiomed y la Universidad de Chile han implementado actualmente “TAPcells”, la primera inmunoterapia específica nacional que se encuentra en fase de ensayos clínicos. Esta terapia está diseñada para el

tratamiento de pacientes con melanoma con un fundamento similar a la inmunoterapia “Provenge”.

Uno de los antígenos tumorales ampliamente estudiados es el antígeno carcinoembrionario (CEA), el cual se expresa en un alto porcentaje en los CADs y, por lo tanto, representa un blanco atractivo para desarrollar inmunoterapias contra CADs y otros tumores sólidos que expresen este antígeno [13].

### **III. 4. ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO**

En 1965 Gold y Freedman detectaron una molécula desconocida en distintas muestras de tejido de cáncer de colon humano y la denominaron antígeno carcinoembrionario (CEA, del inglés “carcinoembryonic antigen”) [14]. Algunos años después, el mismo grupo de investigación descubrió que el CEA podía ser detectado en el suero de pacientes con cáncer colorrectal [15]. Al comparar la concentración del CEA en el suero de pacientes con individuos sanos se observó que en estos últimos era considerablemente menor (incluso indetectable), por lo que surgió gran interés desde el área clínica para utilizarlo en el monitoreo, diagnóstico y pronóstico de carcinomas. Así, la investigación demostró que este antígeno es un excelente marcador para el monitoreo postoperatorio de ciertos cánceres [16]. Este marcador sigue siendo utilizado

en la actualidad y se ha demostrado que la concentración del CEA en el suero del paciente se correlaciona directamente con la reaparición y progresión del cáncer. Algunos estudios han demostrado que pacientes con altas concentraciones de proteína CEA preoperatorias tienen un peor pronóstico en comparación a pacientes con bajas concentraciones [17-22].

Desde el punto de vista bioquímico, el CEA, CD66e o CEAcam5 es una proteína de membrana abundantemente glicosilada que pesa aproximadamente 200 kDa. Se expresa principalmente en células tumorales de cáncer gástrico, colorrectal, pancreático, pulmonar y de mamas. El CEA pasa rápidamente desde la sangre al hígado, donde es degradado por sus lisosomas [23]. Un estudio mediante RT-PCR comprobó que de un total de 88 pacientes con cáncer colorrectal, el 95,5% fue positivo para la expresión de CEA [24]. Otro estudio mostró su expresión mediante inmunohistoquímica en un 89% de muestras de tejido cancerígeno de vesícula biliar [25]. Por otra parte, un estudio clínico demostró mediante RT-PCR que 45 de 123 pacientes con cáncer gástrico (36,6%) eran positivos para la expresión de CEA, lo que se correlacionaba con una mayor reincidencia postoperatoria de la enfermedad [26].

En resumen, la expresión de CEA en pacientes con cáncer se relaciona directamente con la gravedad de la enfermedad (mayor daño tisular por tumores y/o mayor metástasis), siendo casi nula en tejidos sanos. Por lo tanto,

una terapia que permita reconocer células que posean esta proteína en su superficie con el fin de activar una respuesta inmune innata y adaptativa contra estas células tumorales, podría convertirse en un tratamiento realmente eficaz y seguro. Una estrategia que potencialmente puede cumplir este objetivo consiste en el uso de un agente inmunogénico capaz de reconocer y unirse al CEA de forma específica. De esta forma, el agente inmunogénico unido a la superficie de las células tumorales atraerá a las células del sistema inmune innato, activándolas y provocando la presentación de antígenos tumorales, iniciando así una respuesta adaptativa citotóxica que posteriormente generará memoria y protección antitumoral a largo plazo.

El éxito de las inmunoterapias antitumorales no sólo depende de la inducción de una respuesta inmune específica contra un antígeno tumoral determinado, sino que también de la eliminación de la actividad inmunosupresora en el tumor [27, 28]. Se puede restablecer la inmunidad antitumoral ya sea al eliminar o inhibir la actividad de poblaciones celulares inmunosupresoras [27, 28]. Ciertos estímulos inflamatorios dados, pueden bloquear la actividad inhibitoria de las diferentes poblaciones inmunosupresoras e incluso reprogramarlas para adquirir un fenotipo que estimule la respuesta efectora, por la activación de la inmunidad innata [29, 30]. Agentes que induzcan la activación del sistema inmune innato para así reprogramar o disminuir la supresión antitumoral representan una novedosa evidencia para la generación de inmunoterapias antitumorales. Un buen

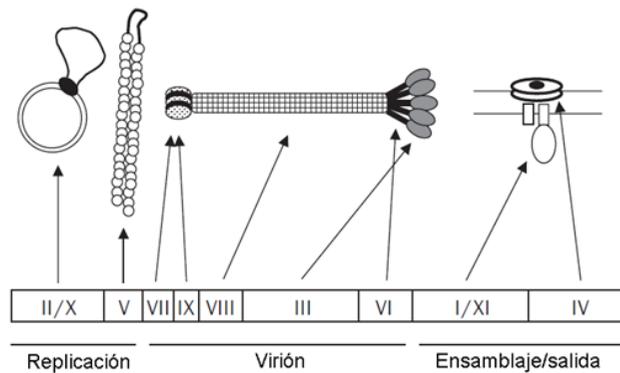
candidato para ser usado como agente inmunogénico es el bacteriófago M13, un virus ampliamente utilizado para expresar fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv) en su superficie. Este bacteriófago inmunogénico pero es inocuo para la salud humana, por lo tanto representa una alternativa segura para el desarrollo de una nueva inmunoterapia antitumoral.

### **III. 5. BACTERIÓFAGO M13 Y *PHAGE DISPLAY***

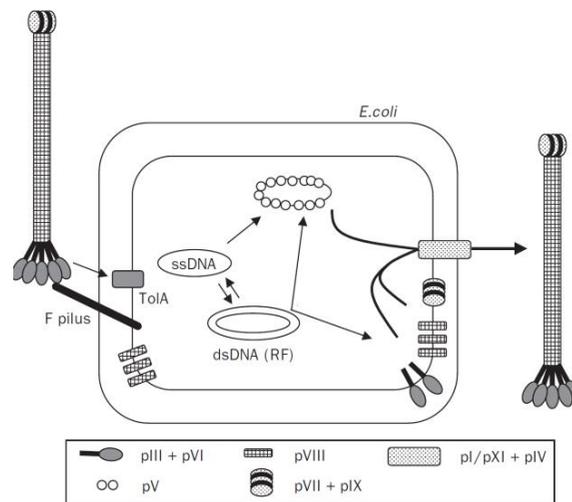
El bacteriófago filamentoso M13 infecta únicamente bacterias Gram negativo que expresan pilus F, por lo que es incapaz de infectar células eucariontes y se considera inocuo para el organismo humano. Su genoma es circular, de hebra simple y codifica once proteínas (denominadas desde pI a pXI, ver Figura 1) que se encargan de la replicación, formación y migración de la partícula viral [31]. Al igual que cualquier otro virus de tipo lisogénico, el fago M13 no provoca la muerte de la bacteria hospedera; sin embargo, se distingue del resto del grupo porque continúa su ciclo replicativo mientras está al interior de la bacteria, sin pasar al estado silente característico de este tipo de virus. Esto quiere decir que, luego de infectar la célula, el bacteriófago comienza a replicar su genoma, expresar proteínas y formar estructuras virales que saldrán continuamente de la bacteria sin provocar la lisis celular [32]. Como se muestra en la Figura 2, el bacteriófago requiere de la presencia del factor F en la

bacteria para unirse específicamente al pilus F a través de la proteína pIII y así iniciar el proceso de infección.

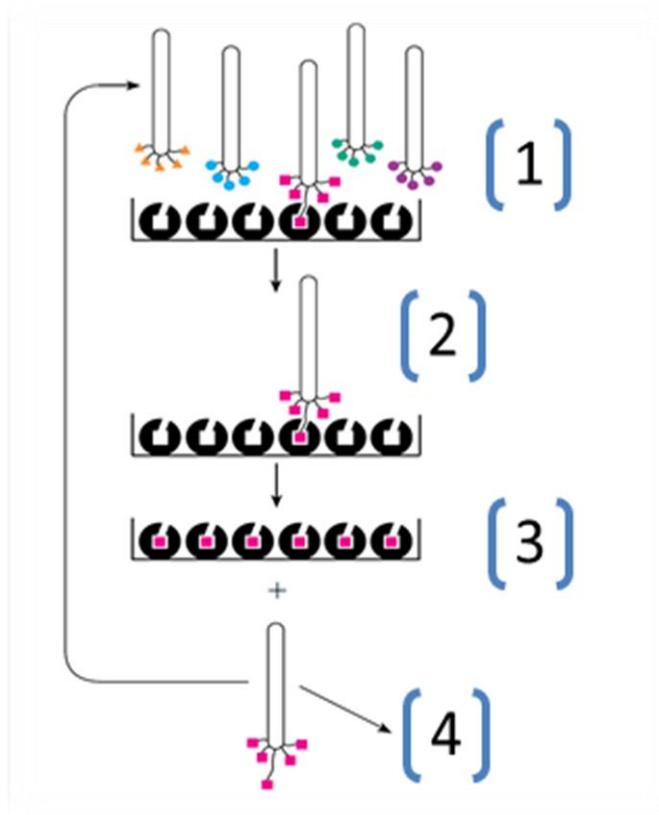
Por otra parte, el método de selección conocido como *phage display* se basa en la expresión y presentación de una gran variedad de péptidos en la superficie de bacteriófagos filamentosos, con el fin de encontrar y caracterizar un péptido específico para un antígeno determinado. Las proteínas del fago M13 más utilizadas para expresar estas variables peptídicas corresponden a pIII y pVIII. Sin embargo, se ha descrito que la proteína pIII favorece la expresión de péptidos de mayor tamaño [33]. El conjunto de bacteriófagos unidos a distintos péptidos es conocido como biblioteca de bacteriófagos. Esta biblioteca está compuesta por bacteriófagos que expresan millones de secuencias peptídicas distintas, por lo que es muy probable encontrar una secuencia que se una específicamente a una proteína de interés. Así, desde una biblioteca de bacteriófagos se busca encontrar, mediante ensayos de selección por especificidad (Figura 3), una partícula viral que exprese un péptido que se una específicamente al antígeno en estudio. El paso final para la obtención de un péptido específico se hace purificando el bacteriófago y posteriormente obteniendo la secuencia nucleotídica codificante del péptido específico [34-36].



**Figura 1. Representación del genoma del fago M13 y su respectivo proteoma.** Los genes se encuentran agrupados según la función que cumple su producto peptídico. Las proteínas pII, pX y pV participan en la replicación del genoma viral efectuada por enzimas bacterianas. Las proteínas de membrana pI y pXI junto con el canal multimérico pIV participan en la salida del fago M13 desde la célula bacteriana. pVII, pIX, pVIII, pVI y pIII conforman la cápside del virus. *Imagen modificada desde "Introduction to phage biology and phage display", Russel M, et al (2004).*



**Figura 2. Ciclo infeccioso del bacteriófago M13.** La proteína viral pIII reconoce y se une al pilus F de la bacteria *E. coli*. Tras la interacción con el complejo proteico bacteriano TolA, el virus deposita su genoma dentro del citoplasma. En el interior, enzimas bacterianas convierten el genoma viral a ADN de doble hebra, el cual sirve de templado para la expresión de proteínas virales. De esta forma comienzan a producirse simultáneamente nuevas copias genómicas y proteicas del bacteriófago. Dímeros de proteína pV rodean las copias del ADN de hebra simple y lo acompañan hasta la membrana, donde actúa el complejo pI-pXI-pIV, el cual promueve el intercambio proteico entre pV y las 5 proteínas de la cápside viral (pVII, pIX, pVIII, pIII y pVI), permitiendo la formación y salida del bacteriófago definitivo. *Imagen modificada desde "Introduction to phage biology and phage display", Russel M, et al (2004).*



**Figura 3. Etapas de selección en método *phage display*.**

- (1) Biblioteca de bacteriófagos, en la que cada virus expresa una secuencia peptídica diferente fusionada a su proteína pIII. Estos fagos son expuestos al antígeno blanco.
- (2) Los bacteriófagos no específicos son descartados.
- (3) Los bacteriófagos específicos para el antígeno blanco son eluidos por competencia con un ligando específico para el antígeno o por intercambio iónico al disminuir el pH.
- (4) Los bacteriófagos obtenidos son amplificados y, luego de repetir tres veces las etapas anteriores, los clones específicos son aislados y secuenciados.

*Imagen modificada desde "Ph. D. Phage Display Libraries – Instruction manual" New England Biolabs.*

Mediante la tecnología *phage display* en el año 2000, Fukuda y Ohyama encontraron un péptido que redujo satisfactoriamente la metástasis tumoral en modelos de melanoma de ratón, este péptido inhibía la unión entre una proteína de la célula tumoral y selectinas específicas impidiendo su migración [37]. Del mismo modo, estudios *in vivo* han demostrado que péptidos seleccionados mediante *phage display* bloqueaban la acción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibiendo la angiogénesis tumoral [38-40]. Uno de estos péptidos fue un scFv específico para VEGF. Este último estudio, así como muchos otros, han mostrado la capacidad de generar nuevos anticuerpos específicos utilizando bibliotecas de bacteriófagos que expresan scFv [41-43].

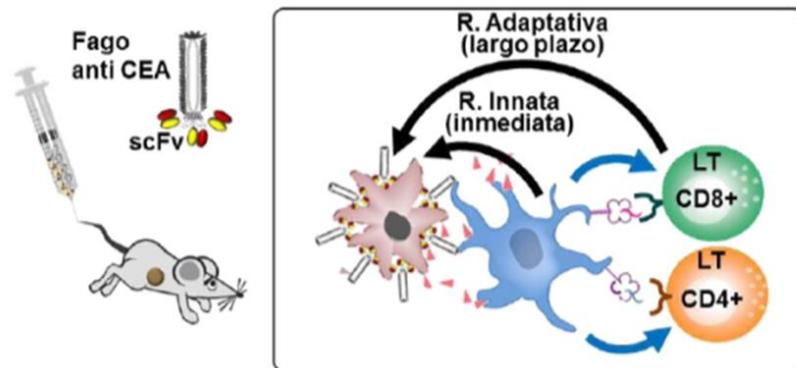
Se sabe que el bacteriófago M13 induce una respuesta inmunológica en organismos superiores ya que sus proteínas estructurales son degradadas y presentadas por las células presentadoras de antígeno, generando una respuesta inmune adaptativa tanto humoral como celular a través de un mecanismo dependiente de la proteína adaptadora MyD88 [44, 45], la que participa en la señalización de los receptores de reconocimiento de patrón denominados TLR (del inglés *Toll Like Receptors*). Uno de los componentes del bacteriófago que probablemente media la activación del sistema inmune innato es su ADN circular de hebra simple. Se ha descrito que este tipo de ADN activa receptores inmunes endosomales y citoplasmáticos, induciendo la secreción de interferones de tipo I y citoquinas proinflamatorias, permitiendo el uso de

bacteriófagos para estimular células dendríticas *in vitro* o para su uso como vehículo de entrega de antígenos *in vivo* [46, 47]. En el año 2006 se demostró que la inyección peritumoral de bacteriófagos específicos contra células tumorales logró aumentar la supervivencia y en algunos casos producir regresión tumoral en un modelo de melanoma murino [48]. Este hallazgo nos permite postular al bacteriófago M13 como un agente inmunoestimulador que, dada su capacidad de presentar un scFv anti CEA en su superficie, se asociará a células tumorales que expresen el antígeno CEA induciendo la acción del sistema inmune innato y, en consecuencia, la reversión de la inmunosupresión generada por el microambiente tumoral. De esta forma se espera producir finalmente la regresión tumoral.

### **III. 6. RESUMEN DE LA ESTRATEGIA PROPUESTA**

En esta tesis se busca generar la herramienta básica para el desarrollo futuro de una terapia inmunológica antitumoral. Esta herramienta consiste en un bacteriófago que se une específicamente al antígeno CEA presente en la superficie de células tumorales provocando la activación del sistema inmune innato. La inmunogenicidad de los bacteriófagos filamentosos permitirá activar a las células del sistema inmune innato cercanas e infiltrantes del tumor, promoviendo un microambiente proinflamatorio que traerá como consecuencia

la reversión de la inmunosupresión tumoral y la destrucción de las células tumorales que asocien el bacteriófago en su superficie ya que serán reconocidas como antígenos exógenos o potencialmente peligrosas. Además, las células presentadoras de antígeno presentes en el tumor madurarán y presentarán en sus moléculas de MHC péptidos derivados de antígenos tumorales a linfocitos T específicos, iniciando una respuesta inmune adaptativa antitumoral que impedirá a largo plazo (memoria inmunológica) y de forma específica la aparición de nuevos focos tumorales (Figura 4).



**Figura 4. Representación gráfica de la respuesta inmune esperada al inyectar bacteriófago anti-CEA en un modelo tumoral murino.**

#### **IV. HIPÓTESIS**

Un bacteriófago M13 que expresa un scFv específico para el antígeno carcinoembrionario se une específicamente al antígeno purificado y localizado en la superficie de células tumorales.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Generar un bacteriófago M13 que tenga fusionado a su superficie un scFv anti-CEA y comprobar que se una de manera específica tanto al antígeno purificado como al CEA presente en la superficie de células tumorales.

## VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### **1.- Generación del bacteriófago M13 modificado con el scFv anti-CEA.**

Insertar el gen del fragmento anti-CEA en el extremo 5' del gen *III* del bacteriófago M13 (el cual codifica la proteína de la cápside pIII) con el fin de generar la proteína de fusión scFv-pIII expresada en la superficie del bacteriófago.

**2.- Producción de bacteriófagos M13 anti-CEA.** Optimizar la producción de bacteriófagos M13 que presenten la proteína de fusión scFv-pIII en su superficie. Concentrar y purificar los bacteriófagos anti-CEA en cantidades suficientes para realizar ensayos *in vitro*.

**3.- Evaluación *in vitro* de la especificidad de unión a CEA del bacteriófago M13 modificado.** Realizar ensayos *in vitro* para comprobar que el bacteriófago modificado se une tanto al CEA purificado como al CEA presente en la superficie de células tumorales, mediante las técnicas de ELISA y citometría de flujo, respectivamente.

## VII. MATERIALES

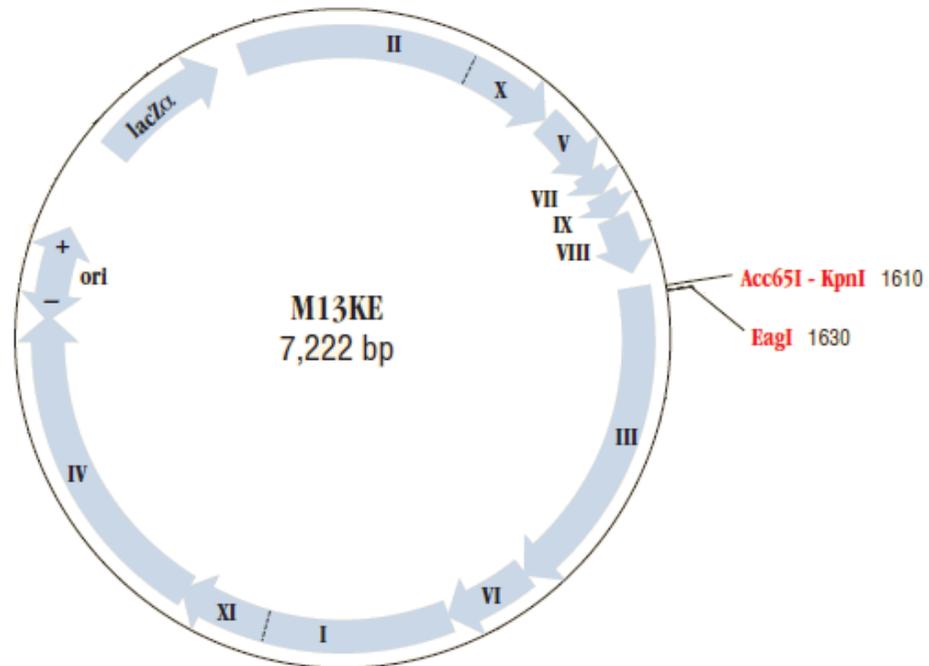
### VII. 1. Material biológico

1. La cepa bacteriana *Escherichia coli* K12 ER2738, cuyo genotipo es *F'proA+B+ lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 zzzf::Tn10(Tet<sup>R</sup>)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5*, se obtuvo de New England Biolabs.
2. Líneas celulares:
  - a. MCF7: células derivadas de tejido humano de adenocarcinoma mamario. Descritas como positivas para la expresión de CEA en su superficie. Se obtuvieron desde la ATCC.
  - b. HEK293T: células derivadas de tejido embrionario de riñón humano. Se obtuvieron desde la ATCC.
  - c. C15A3: células derivadas de adenocarcinoma de colon murino. Corresponden a células MC38 modificadas para expresar el antígeno CEA en su superficie. Donadas por el Dr. Hinrich Abken, investigador en el Hospital Universitario de Colonia (Uniklinik Köln), Alemania.
  - d. MC38: línea celular de origen murino derivada de adenocarcinoma de colon. Donada por el Dr. Hinrich Abken.

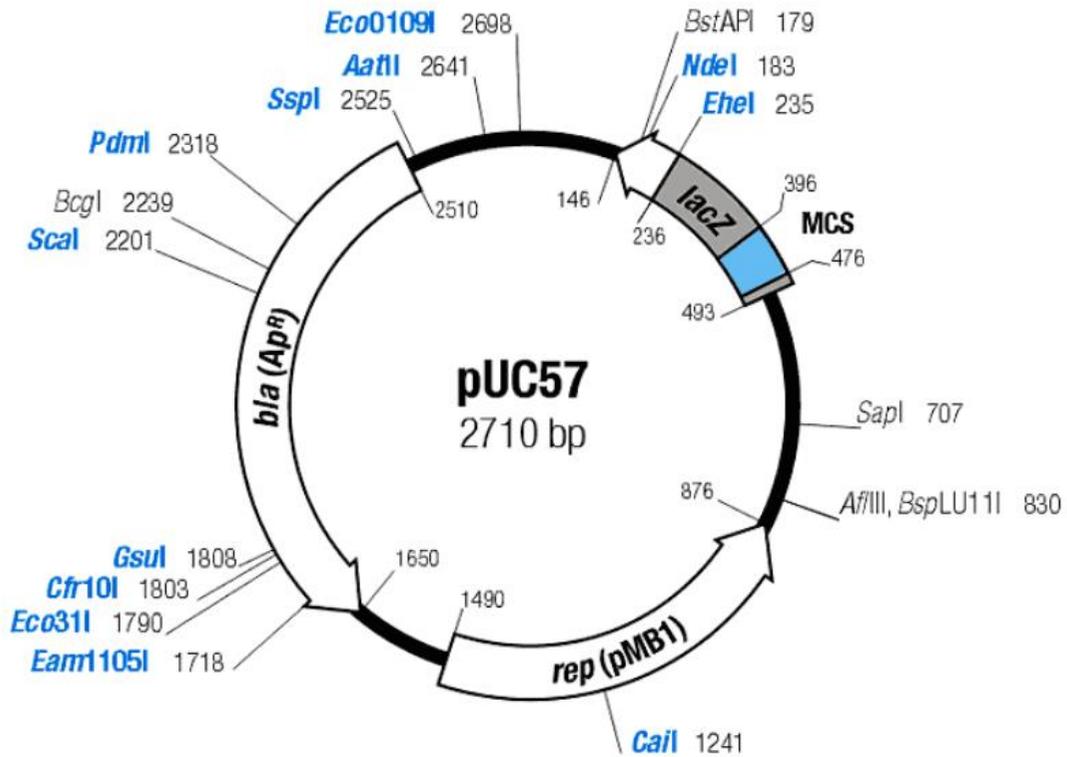
## VII. 2. Plásmidos

En esta tesis se utilizaron 4 vectores diferentes:

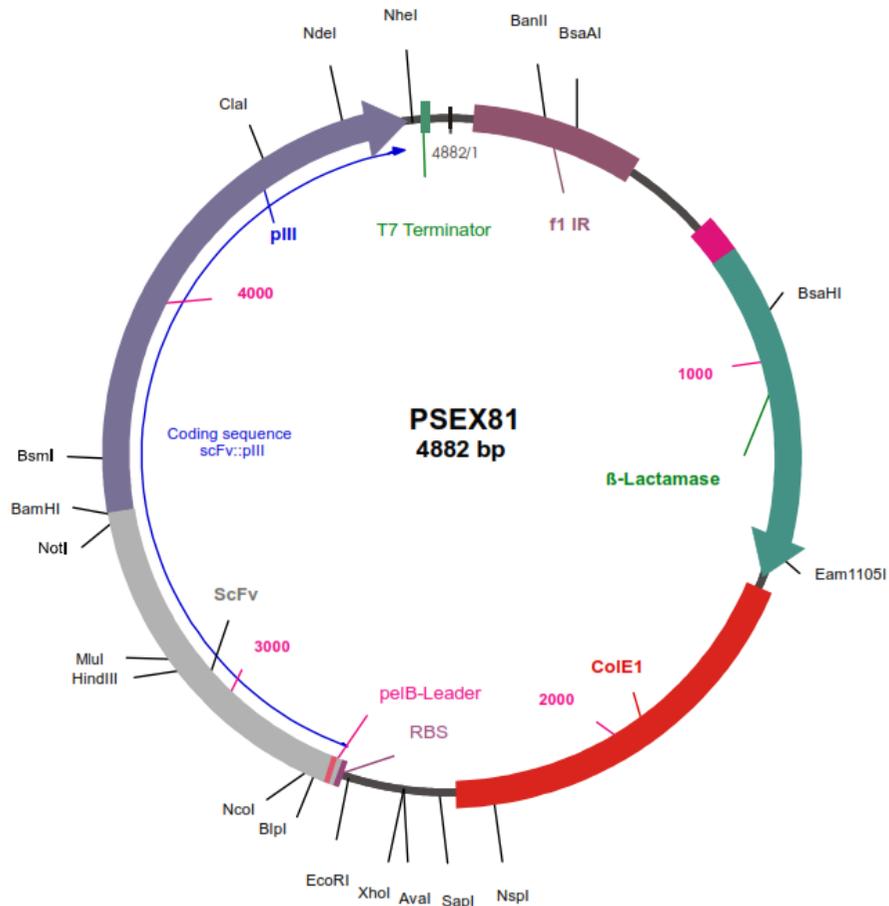
1. El vector M13KE (Figura 5) se obtuvo de New England Biolabs y se utilizó para generar un vector genómico que permitiera producir fagos que expresen la proteína de fusión scFv-pIII.
2. El plásmido pUC57 (Figura 6) es un vector de clonamiento en el cual la empresa GenScript clonó la secuencia scFv anti-CEA, por lo que fue utilizado para obtener esta secuencia y posteriormente clonarla dentro del vector M13KE.
3. El fagomidio pSEX81 (Figura 7) se obtuvo de PROGEN Biotechnik y está diseñado para generar una proteína de fusión scFv-pIII. La empresa GenScript clonó la secuencia scFv anti-CEA en el inicio del gen *III*.
4. El fago auxiliar denominado hiperfago (mapa desconocido) se obtuvo de PROGEN Biotechnik y posee el genoma completo del bacteriófago M13 menos el gen *III*.



**Figura 5. Mapa del vector genómico M13KE.** Este plásmido de 7222 pares de bases posee el genoma completo del bacteriófago M13, incluyendo su origen de replicación. Además, posee el gen *lacZα* que codifica el fragmento N-terminal (péptido  $\alpha$ ) de la enzima  $\beta$ -galactosidasa para facilitar su detección en colonias bacterianas. En el inicio del gen *III* posee dos sitios de corte enzimáticos específicos para dos enzimas de restricción, *KpnI* y *EagI*. Estas son las enzimas que se utilizaron para clonar el fragmento scFv anti-CEA dentro del vector M13KE.



**Figura 6. Mapa del vector de clonamiento pUC57.** Este plásmido de 2710 pares de bases posee un sitio de múltiple clonamiento (MCS) con 6 sitios de restricción dentro del gen *lacZ*. Además, contiene un origen de replicación de alta copia (*rep pMB1*) y un gen que codifica  $\beta$ -lactamasa (resistencia a ampicilina). La empresa GenScript sintetizó la secuencia scFv anti-CEA y la clonó dentro de este vector de clonamiento.



**Figura 7. Mapa del fagomido pSEX81.** Este plásmido de 4882 pares de bases está diseñado para insertar secuencias genéticas de cadenas liviana y pesada de anticuerpos dentro del gen *III* del bacteriófago M13, con el fin de producir fagos que expresen proteínas de fusión scFv-pIII en su superficie. Posee el origen de replicación ColE1, el terminador T7 y el gen que codifica β-lactamasa ( $amp^R$ ). Además, posee la región intergénica del bacteriófago filamentoso f1, la cual permite que el plásmido pSEX81 sea encapsulado por las proteínas del fago M13 en el proceso de formación de nuevas partículas virales.

### **VII. 3. Medios de cultivo**

#### **1. Medios de cultivo bacteriano y otros reactivos**

- a. Medio Luria-Bertani (LB): bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l.
- b. Agar LB: bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l y agar 15 g/l.
- c. Agar LB semisólido: bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l y agar 7 g/l
- d. Ampicilina (US Biological): 100 µg/ml en medio LB.
- e. Kanamicina (Sigma-Aldrich): 50 µg/ml en medio LB.
- f. Tetraciclina (Applichem): 20 µg/ml en medio LB.
- g. IPTG (Thermo Scientific): 50 µg/ml en medio LB agar.
- h. X-Gal (Thermo Scientific): 40 µg/ml en medio LB agar.
- i. Glicerol (Invitrogen): 20% en medio de cultivo LB.
- j. PEG 8000 (Promega): 20% en solución de NaCl 2,5 M.

#### **2. Medios de cultivo celular y otros reactivos**

Los medios de cultivo DMEM + GlutaMAX<sup>TM</sup>-I y RPMI 1640 junto con los reactivos: azul de tripán 0,4%, suero fetal bovino, L-glutamina 200mM, aminoácidos no esenciales 100X (glicina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-prolina y L-serina, todos a una concentración de 10 mM), piruvato de sodio 100 mM y la solución antibiótica-antimicótica 100X que contiene 10,000 U/ml de

penicilina, 10,000 µg/ml de estreptomina y 25 µg/ml del antimicótico Fungizone, se obtuvieron de Gibco Life Technologies. Ambos medios de cultivo se suplementaron con solución antibiótica-antimicótica, FBS al 1%, piruvato de sodio 1mM, aminoácidos no esenciales y L-glutamina 2 mM.

#### **VII. 4. Soluciones y reactivos comerciales**

1. Tampón fosfato salino (PBS):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,06 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,97 mM, NaCl 155,17 mM, pH 7,4 (Gibco).
2. Acrilamida:Bis-acrilamida 29:1 solución 30% p/v (winkler).
3. Sustrato quimioluminiscente: *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific).
4. Marcador de tamaño molecular de para ADN: 1 Kb *Plus Ladder* (Invitrogen Life Technologies).
5. Tampón de reacción SAP: Tris-HCl 0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  0,1 M y BSA 1 mg/ml.
6. Marcador de peso molecular para proteínas: *PageRuler prestained protein ladder* (Thermo Scientific).
7. Agua bidestilada estéril (Apiroflex).
8. Tampón de carga de proteínas 5X: Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), glicerol 10%, SDS 2%, DTT 100 mM y azul de bromofenol 0,01%.
9. Gelred 10.000X (Biotium).
10. Tween 20 (Sigma).

11. TMB (Thermo Scientific).

12. Proteína CEA purificada desde tejido cancerígeno humano (Abcam).

#### **VII. 5. Reactivos de biología molecular**

1. Kits de extracción y purificación de ADN plasmidial “NucleoBond® Plasmid Miniprep” y “NucleoBond® Xtra Midi” (MACHEREY-NAGEL).
2. Enzimas de restricción: *XbaI*, *EcoRI*, *NcoI*, *MluI* y *BamHI* (Invitrogen); *EagI*, *KpnI*, *NcoI*, *BamHI*, FD-*EagI*, FD-*KpnI*, FD-*NcoI* y FD-*BamHI* (Thermo Scientific); *EagI*-HF y *KpnI*-HF (New England Biolabs).
3. Kit de purificación de ADN desde gel de agarosa “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” (MACHEREY-NAGEL).
4. Enzima fosfata alcalina de camarón (SAP, de su nombre en inglés *Shrimp Alkaline Phosphatase*) (Fermentas).
5. Enzima ADN ligasa del fago T4 (Promega).
6. Mezcla de reactivos para PCR “GoTaq Green Master Mix” (Promega) compuesta por: enzima ADN polimerasa *Taq*, tampón de reacción “2X Green GoTaq®” (pH 8.5), dATP 400µM, dGTP 400µM, dCTP 400µM, dTTP 400µM y MgCl<sub>2</sub> 3mM.

## **VII. 6. Tampones y otras soluciones**

1. Tampón de corrida para *western blot*: glicina 0,23 M, Tris 25 mM y SDS al 0,1%.
2. Tampón de transferencia para *western blot*: glicina 0,23 M, Tris 25 mM, SDS al 0,1% y metanol al 20%.
3. Tampón TE para electroforesis de ADN: Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM (pH 8).
4. TAE 50X: Tris-Base 242 g/L, ácido acético glacial 57,1 ml/L, Na<sub>2</sub>EDTA (solución 500 mM, pH 8) 100 ml/L.
5. Tampón de bloqueo para ELISA: NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (pH 8,6) y BSA 5 mg/ml.
6. TBS: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y NaCl 150 mM.

## **VII. 7. Anticuerpos**

1. Para la técnica de *western blot* se utilizó un anticuerpo específico contra la proteína pIII del fago M13 (New England Biolabs).
2. Para los ensayos de ELISA se utilizaron anticuerpos anti-M13 (Fitzgerald, clon B62-FE2), anti-CEA (Cell Signaling, isotipo IgG1 de ratón) y específicos contra inmunoglobulinas de ratón acoplados a HRP (Thermo Scientific, poli-HRP)
3. Para los ensayos de citometría de flujo se utilizaron anticuerpos anti-M13 (GE Healthcare, isotipo IgG2a de ratón), anti-CEA (Cell

Signaling, isotipo IgG1 de ratón), anti-IgG1 de ratón acoplado al fluoróforo PE (Biolegend, clon RMG1-1) y anti-IgG2a de ratón de ratón acoplado a PerCP/Cy5.5 (Biolegend, clon RMG2a-62). Además, se utilizó el marcador de viabilidad Zombie Aqua (Biolegend).

## **VIII. MÉTODOS**

### **VIII.1. Transformación de bacterias quimiocompetentes**

En primer lugar se generó un stock en glicerol de bacterias *E. coli* ER2738 quimiocompetentes. Para esto, se cultivaron bacterias en medio LB a 37°C y con agitación hasta alcanzar una lectura de densidad óptica (OD) a 600 nm de aproximadamente 0,5. En ese momento, las bacterias se precipitaron mediante centrifugación y se resuspendieron en una solución de NaCl 10 mM. Luego se precipitaron nuevamente, se resuspendieron en una solución de CaCl<sub>2</sub> 75 mM y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Finalmente, las bacterias se precipitaron nuevamente y se resuspendieron en la solución de CaCl<sub>2</sub> 75 mM. De esta solución final se generaron alícuotas en glicerol 20%, las que se almacenaron a -80°C.

La transformación de las bacterias quimiocompetentes generadas se realizó sometiendo dichas bacterias a un shock térmico de breve duración. El primer paso en este proceso consistió en incubar 100 µl de bacterias junto con

50 ng de ADN plasmidial durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, la solución se incubó a 42°C durante 90 segundos e inmediatamente después a 4°C durante 90 segundos. Finalizada esta incubación se agregaron 800 µl de medio LB y se incubó la solución durante 1 hora a 37°C y con agitación. Finalmente, las bacterias se precipitaron mediante centrifugación y luego se sembraron en una placa con agar LB suplementado con el antibiótico o reactivo necesario para la selección de colonias (IPTG + Xgal o ampicilina para los vectores M13KE y pSEX81, respectivamente). Dicha placa se incubó durante 16 horas a 37°C.

### **VIII.2. Transformación de bacterias mediante electroporación**

Por cada plásmido que se requería amplificar se utilizaron 1,5 ml de cultivo de bacterias *E. Coli* ER2738 en medio LB (OD<sub>600</sub> cercana a 0,5). Las bacterias del cultivo se precipitaron (5000 g por 5 minutos a 4°C) y luego se resuspendieron en 1 ml de agua bidestilada estéril temperada a 4°C. Este proceso se repitió 4 veces consecutivas con el fin de eliminar las sales presentes en el medio. Luego de los 4 lavados, las bacterias se centrifugaron, se resuspendieron en 100 µl de agua estéril bidestilada (a 4°C) y se le agregó 1 µl de ADN plasmidial. La mezcla de bacterias más ADN plasmidial se vertió en una cubeta de electroporación temperada a -20°C y luego se electroporó a 25 µF, 200 Ω y 2.500 V en el equipo electroporador “BIO-RAD Gene Pulser II”.

Inmediatamente después de la electroporación se agregó 1 ml de medio LB a la mezcla y se trasladó a un tubo de microcentrífuga para ser incubado con agitación a 37°C durante 1 hora. Finalmente, las bacterias incubadas se precipitaron y luego se sembraron en una placa con agar LB suplementado con el antibiótico o reactivo necesario para la selección de colonias (IPTG + Xgal o ampicilina para los vectores M13KE y pSEX81, respectivamente). Dicha placa se incubó durante 16 horas a 37°C.

### **VIII.3. Amplificación de plásmidos**

La amplificación de los plásmidos utilizados se llevó a cabo mediante protocolos de transformación bacteriana y extracción de ADN plasmidial desde las bacterias transformadas. Para esto, se utilizaron alternativamente las técnicas de electroporación o transformación de bacterias quimiocompetentes y, luego de la incubación de la placa con agar LB, se seleccionaron aleatoriamente 3 o más colonias bacterianas. El número de colonias seleccionadas era dependiente de la cantidad y morfología de las colonias observadas en toda la placa. Cada colonia seleccionada se incubó con agitación en 5 ml de medio LB durante 16 h y a 37°C para extraer el ADN plasmidial respectivo mediante el kit “NucleoSpin® Plasmid Miniprep” (MACHERY-NAGEL). El ADN extraído desde cada cultivo se analizó mediante PCR o digestión enzimática para seleccionar el conjunto de bacterias

que posee el plásmido deseado. El cultivo de bacterias seleccionado se creció en un volumen mayor de medio LB (~400 ml) durante 16 h a 37°C y con agitación para luego extraer el ADN plasmidial respectivo mediante el kit “NucleoBond® Xtra Midi” (MACHEREY-NAGEL). La concentración del ADN obtenido se cuantificó utilizando el equipo “Thermo-Scientific NanoDrop ND2000” y su integridad se analizó mediante PCR y/o digestión enzimática.

#### **VIII.4. Digestión enzimática de plásmidos**

La digestión de los plásmidos M13KE y pUC57-scFv se realizó en primer lugar incubando ambos vectores con las enzimas *EagI* y *KpnI* (Thermo Scientific) durante 90 minutos a 37°C. Con el fin de optimizar la digestión se utilizaron distintas cantidades de ADN y diferentes combinaciones de tiempo y temperatura. Además, se utilizaron enzimas de digestión de alta fidelidad *EagI*-HF y *KpnI*-HF (New England Biolabs), las que mejoraron la eficiencia de la técnica utilizando un protocolo de 60 minutos a 37°C, y enzimas de digestión rápida FD-*EagI* y FD-*KpnI* (Thermo Scientific) que permitieron digerir los plásmidos en 5 min a 37°C.

Las enzimas *XbaI*, *EcoRI*, *NcoI*, *MluI*, *BamHI* (Invitrogen), *NcoI* y *BamHI* (Thermo Scientific) se utilizaron para verificar los plásmidos pSEX81 y pUC57 utilizando un protocolo de digestión de 90 minutos a 37°C. Las enzimas

FD-*Nco*I y FD-*Bam*HI (Thermo Scientific) permitieron optimizar la digestión a un protocolo de 5 minutos a 37°C.

### **VIII.5. Purificación de ADN desde gel de agarosa**

Luego de la digestión enzimática en el proceso de clonamiento de la secuencia scFv anti-CEA dentro del vector M13KE, el vector digerido y el fragmento scFv anti-CEA se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,6% y 1%, respectivamente. Luego de resolver las bandas de tamaño molecular esperado se utilizó un bisturí para cortar los productos de digestión requeridos. El ADN se obtuvo desde cada corte de gel siguiendo el protocolo descrito en el kit de purificación “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” (MACHEREY-NAGEL).

### **VIII.6. Desfosforilación del vector M13KE**

El vector M13KE purificado desde un gel de agarosa se desfosforiló incubando la enzima fosfatasa alcalina de camarón SAP (Fermentas) con la solución tampón SAP (Fermentas) durante 1 hora a 37°C. La enzima se inactivó incubando 15 minutos a 65°C.

### VIII.7. Ligación de ácidos nucleicos

La ligación entre el vector M13KE desfosforilado y el inserto scFv anti-CEA se llevó a cabo incubando la enzima ligasa del fago T4 (Promega) a 16°C durante 16 horas. La cantidad de ADN utilizado se calculó según la relación molar requerida mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\mathit{ng} \text{ de vector} \times \mathit{kb} \text{ del inserto}}{\mathit{kb} \text{ del vector}} \times \text{relación molar} \frac{\mathit{inserto}}{\mathit{vector}} = \mathit{ng} \text{ de inserto}$$

### VIII.8. PCR convencional

La presencia del fragmento scFv anti-CEA dentro de los vectores M13KE, pUC57 y pSEX81 se estudió utilizando los siguientes pares de partidores:

*M13KE*                      Fw 5'-GCTCCTTTTGGAGCCTTTTT-3'  
   Rv 5'-CAGGGATAGCAAGCCCAATA-3'

*M13KE, pUC57 y pSEX81*    Fw 5'-GCCCCGCGAAGATTATGACTA-3'  
   Rv 5'-TAATAATCCGCCGCATCTTC-3'

La amplificación del fragmento anti-CEA se efectuó utilizando la mezcla de reactivos "GoTaq Green Master Mix" (Promega). Esta mezcla contiene la enzima polimerasa *Taq*, dNTPs y MgCl<sub>2</sub>.

El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% (Axygen).

### **VIII.9. Producción de bacteriófago M13 silvestre**

A 500 ml de medio LB suplementado con tetraciclina 20 µg/ml (el cassette de expresión del pilus F posee el gen de resistencia a tetraciclina) se le agregaron 5 ml de un cultivo saturado de bacterias *E. coli* ER2738 y 10 µl de bacteriófago M13 silvestre ( $10^{12}$  ufp/ml). La mezcla se incubó con agitación (250 rpm) durante 4,5 horas a 37°C. Luego, las bacterias se centrifugaron a 5.000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó e incubó a 4°C durante 16 horas con 83 ml (1/6 del volumen total) de solución PEG 8.000 al 20% en NaCl 2,5 M para precipitar los bacteriófagos presentes en la solución. Los fagos precipitados se centrifugaron a 5.000 g durante 30 minutos a 4°C y luego resuspendidos en 100 ml de TBS estéril. Para eliminar restos de bacteria, la solución se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó e incubó durante 16 horas a 4°C con 17 ml de solución PEG/NaCl. Finalmente, los fagos se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C y luego resuspendidos en 5 ml de PBS estéril. Los bacteriófagos son titulados en placas de agar LB con IPTG y X-Gal. El título promedio obtenido con este protocolo es aproximadamente  $10^{12}$  ufp/ml.

#### **VIII.10. Titulación de bacteriófagos M13 silvestres mediante infección de bacterias *E. coli* ER2738**

Para conocer la cantidad de fagos presentes en una solución determinada se realizaron diluciones seriadas de dicha solución. Luego, se mezclaron 30 µl de cada dilución con 270 µl de bacterias *E. coli* ER2738. Esta mezcla se agregó a 3 ml de agar LB blando o semisólido temperado a 45°C e inmediatamente después se vertió sobre una placa con agar LB (que posee IPTG y X-Gal en su superficie). Finalmente, cuando el agar blando gelificó por completo, la placa se incubó a 37°C durante 16 h. El conteo de placas azules multiplicado por el factor de dilución respectivo entregó el título de la dilución en unidades formadoras de placa por ml (ufp/ml).

#### **VIII.11. Detección de bacteriófagos mediante ELISA indirecto**

Para detectar la presencia de bacteriófagos anti-CEA en las preparaciones obtenidas mediante la técnica de fagomidio más hiperfago, cada solución se diluyó 10 veces en una solución de bicarbonato 0,1M y luego se incubó durante 16 horas a 4°C en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, la placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con una solución de bloqueo que contiene PBS BSA al 1%. Los fagos presentes en la placa se detectaron con un anticuerpo (Ac) murino específico contra el bacteriófago M13 (Fitzgerald), el cual se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Luego la placa fue lavada e incubada a temperatura ambiente durante 90 minutos con un Ac específico contra las inmunoglobulinas murinas (Thermo Scientific Pierce), acoplado a la enzima peroxidasa de rábano. Finalmente, se agregó el sustrato TMB y la absorbancia del producto azul se cuantificó a 603 nm utilizando el lector multi-modal de microplacas “Synergy HT” (BioTek).

#### **VIII.12. Titulación de bacteriófagos mediante ELISA indirecto**

Como método alternativo a la titulación de fagos mediante infección bacteriana, se estandarizó un protocolo de titulación mediante ELISA indirecto. Este protocolo consiste en la cuantificación de la absorbancia otorgada por una solución de bacteriófago M13 anti-CEA (de título desconocido) y su posterior interpolación en una curva de absorbancia construida con cantidades conocidas de M13 silvestre (curva estándar). La detección de ambos tipos de bacteriófago en la placa se realizó utilizando el protocolo descrito anteriormente para la detección de bacteriófagos mediante ELISA indirecto.

#### **VIII.13. Ensayo de especificidad contra CEA purificado**

La detección de fagos que se unen específicamente al antígeno CEA purificado se realizó mediante un ensayo de ELISA indirecto. En primer lugar se incubó (16 h a 4°C) una placa de 96 pocillos con proteína CEA de origen

humano (Abcam) diluida en una solución de bicarbonato 0,1 M. Luego, la placa se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con una solución de bloqueo que contiene proteína BSA al 1%. Posteriormente, la placa se lavó con PBS Tween 0,1% (PBST) y se incubó con  $10^{10}$  ufp de bacteriófagos M13 anti-CEA (o M13 silvestre como control) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar nuevamente con PBST para remover los fagos no unidos a CEA, la placa se incubó con anticuerpo anti-M13 (Fitzgerald) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Para confirmar la presencia de proteína CEA se incubó simultáneamente un par de pocillos con Ac anti-CEA (Cell Signaling). En seguida, se lavó con PBST 0,1% para remover el anticuerpo primario no unido y se incubó con un anticuerpo acoplado a HRP específico contra las inmunoglobulinas murinas (Thermo Scientific Pierce). Finalmente la placa se lavó con PBST 0,1% y se agregó a cada pocillo una solución de TMB y peróxido de hidrógeno. La enzima HRP acoplada al Ac secundario utiliza esta solución como sustrato y genera un producto de color azul. De esta forma, la intensidad del color azul presente en cada pocillo estará relacionada con la cantidad de bacteriófago que se ha unido al antígeno CEA. La absorbancia del producto azul se cuantificó a 630 nm utilizando el lector multi-modal de microplacas “Synergy HT” (BioTek).

#### **VIII.14. Cultivo celular**

Para la mantención de las líneas celulares de origen murino se utilizó medio de cultivo RPMI (Gibco) y las células tumorales de origen humano se cultivaron con medio de cultivo DMEM (Gibco). Ambos medios de cultivo se suplementaron con solución antibiótica-antimicótica, FBS al 1%, piruvato de sodio 1mM, aminoácidos no esenciales y L-glutamina 2 mM.

#### **VIII.15. Detección de bacteriófagos unidos a la superficie células tumorales mediante citometría de flujo**

En primer lugar, los bacteriófagos se incubaron con una solución de leche al 2,5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación para disminuir uniones inespecíficas. Las líneas celulares analizadas se despegaron desde una botella o placa de cultivo incubándolas durante 5 minutos a 37°C con una solución de EDTA 0,5 mM. Luego se lavaron con solución PBS/FBS al 2% y se incubaron con los bacteriófagos en solución PBS/leche 2,5% durante 1,5 h a 4°C. Nuevamente se lavaron con solución PBS/FBS al 2% y se incubaron simultáneamente con Ac anti-M13 de origen murino (GE Healthcare, isotipo IgG2a) y Ac anti-CEA (Cell Signaling, isotipo IgG1 murino) durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS/FBS 2% y se incubaron con dos Ac específicos contra las inmunoglobulinas de ratón IgG1 e IgG2a (Biolegend), ambos acoplados a los fluoróforos PE y PerCP/Cy5.5,

respectivamente. Además se incubaron con el marcador de viabilidad Zombie Aqua (Biolegend). Finalmente, las células se lavaron nuevamente con solución PBS/FBS 2% y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 2% en PBS.

La fluorescencia de las células fue detectada y cuantificada en el equipo BD FACSCanto II (BD Biosciences) utilizando el software BD FACSDiva (BD Biosciences). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software FlowJo (Tree Star Inc.).

#### **VIII.16. Detección de la proteína pIII mediante western blot**

En primer lugar, se agregó un volumen determinado de cada solución de bacteriófagos en una solución tampón que genera condiciones denaturantes para ser sometida a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. Las proteínas que se desplazaron a través del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA por 2 h. La membrana cargada con proteínas se incubó con leche al 5% en PBS durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente la membrana se incubó con un anticuerpo anti-pIII (New England Biolabs) en una dilución de 1:1000 en solución de leche al 5% durante 16 h a 4°C. Luego de hacer 3 lavados de 10 min, cada uno con una solución de PBS/Tween20 al 0,1% en agitación constante, la membrana se incubó con el anticuerpo específico contra las inmunoglobulinas de ratón que está acoplado a la enzima HRP (Thermo Scientific Pierce) en una dilución

1:3000 en solución de leche al 5% por 3 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Luego de hacer nuevamente 3 lavados con una solución de PBS/Tween208 al 0,1%, la membrana se incubó por 3 min con un reactivo sustrato EZ-ECL (Biological Industries) que al ser degradado por la enzima HRP genera un producto quimioluminiscente. Finalmente, un trozo de film fotográfico se expuso sobre la membrana de nitrocelulosa y luego se reveló y fijó, generando una imagen representativa de las bandas detectadas.

#### **VIII.17. Análisis estadístico**

Los resultados de la evaluación de la especificidad del fago M13 anti-CEA contra la proteína CEA se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias observadas son valoradas estadísticamente mediante la aplicación del test no paramétrico Mann Whitney para datos no pareados usando el software de análisis estadístico Graph Pad Prism (GraphPad Software, Inc.) Las diferencias entre grupos experimentales se consideran estadísticamente significativas para  $p < 0,05$ .

## IX. RESULTADOS

### OBJETIVO 1

#### Generación del bacteriófago M13 modificado con el scFv anti-CEA

##### Primera estrategia:

La primera estrategia utilizada para generar un bacteriófago M13 que presente la proteína de fusión scFv-pIII en su superficie, consistió en la inserción de la secuencia que codifica el scFv anti-CEA (782 pares de bases) dentro del vector genómico M13KE. El vector M13KE (New England Biolabs) contiene el genoma completo del bacteriófago M13 y presenta dos sitios de corte específicos para las enzimas de restricción *KpnI* y *EagI* en el inicio (extremo 5') del gen *III*. La secuencia scFv anti-CEA utilizada en este proyecto se diseñó con los mismos sitios de restricción flanqueantes (*KpnI* al extremo 5' y *EagI* al extremo 3') para ser digerida y clonada manteniendo el marco de lectura del gen *III*. Además, se agregó un espaciador compuesto de 3 codones codificantes de glicina para separar el scFv anti-CEA de la proteína pIII y así otorgar flexibilidad a este fragmento anti-CEA. Luego del diseño, esta secuencia de cadena única anti-CEA se sintetizó y clonó dentro del vector de clonamiento pUC57 por la empresa GenScript.

Los vectores pUC57 y M13KE se digirieron simultáneamente con las enzimas *KpnI* y *EagI*. Ambos productos de digestión se sometieron a

electroforesis para luego purificar tanto el fragmento scFv anti-CEA como el vector M13KE lineal, desde un gel de agarosa al 1% y al 0,6%, respectivamente. El vector lineal M13KE purificado desde el gel al 0,6% se desfosforiló utilizando la enzima fosfatasa alcalina para evitar ligaciones espontáneas. Luego, el fragmento scFv anti-CEA purificado desde el gel de agarosa al 1% se ligó al vector M13KE desfosforilado utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4. La inserción de la secuencia scFv anti-CEA dentro del vector M13KE se verificó mediante PCR, utilizando dos partidores que flanquean el sitio de inserción en el vector M13KE. El producto de este PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se observó la formación simultánea de dos bandas con tamaños de 1.000 y 300 pb (Figura 8). Las bandas observadas corresponden a los productos amplificados desde los vectores M13KE-scFv (con inserto) y M13KE (sin inserto), respectivamente. Este resultado confirma la presencia de ambos vectores (M13KE-scFv y M13KE) en el producto de ligación.

El producto de la ligación entre el inserto y el vector lineal se utilizó para transformar bacterias *E. coli* ER2738. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de agar LB con IPTG y X-Gal utilizando un agar semisólido saturado con bacterias de la misma cepa. El sistema IPTG/X-Gal permitió detectar las bacterias que incorporaron el vector M13KE (con o sin inserto), ya que este vector otorga la capacidad de sintetizar una enzima  $\beta$ -galactosidasa funcional (gen *lacZ*) y, por lo tanto, permite a la bacteria

degradar el compuesto X-Gal, generando un producto de color azul. El agar semisólido saturado con bacterias se utilizó para permitir la amplificación de los vectores M13KE-scFv o M13KE sin inserto, ya que la amplificación de ambos vectores es dependiente de la producción de nuevas partículas virales que infectarán bacterias adyacentes (no poseen un gen de resistencia a antibiótico). Las bacterias infectadas por los fagos generados desde el vector M13KE-scFv o M13KE formaron placas azules, las que se seleccionaron y cultivaron para luego extraer y analizar por PCR su ADN, utilizando el mismo par de primarios mencionado anteriormente. De esta forma, se analizó un gran número de clones provenientes desde distintos intentos de clonamiento y todos resultaron ser negativos para el vector M13KE-scFv (Figura 9).

El análisis de los resultados obtenidos con esta estrategia sugiere la presencia de ambos vectores, M13KE y M13KE-scFv, en un mismo clon de bacterias transformadas con el producto de ligación (Figura 9, clon 4.1). Para comprobar la presencia del vector M13KE-scFv se electroporó nuevamente con el ADN del clon 4.1 (clon que posiblemente contiene el vector M13KE-scFv) y se analizaron los nuevos clones obtenidos. No se logró detectar clones positivos para el vector modificado M13KE-scFv (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos con la primera estrategia se explicaron por los siguientes fundamentos. Este primer objetivo busca producir un bacteriófago M13 que contenga un péptido (scFv) de aproximadamente 250 aminoácidos

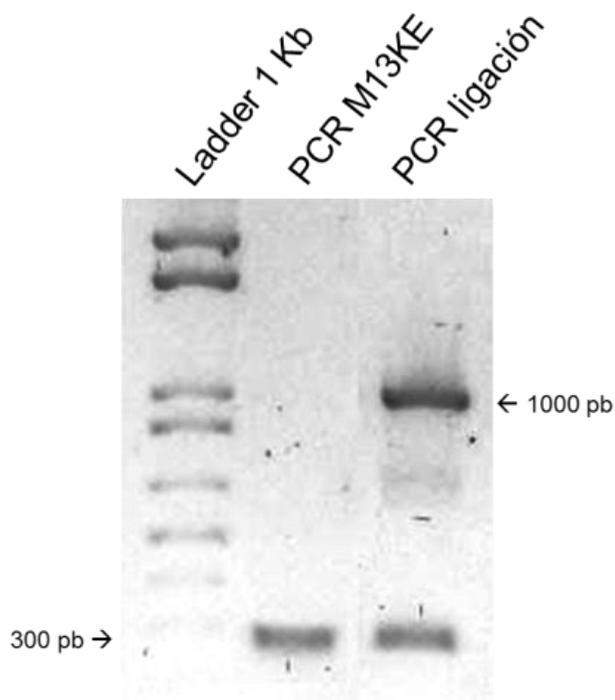
fusionado a cada una de las 5 copias de la proteína pIII presentes en su superficie. Sin embargo, la proteína pIII del bacteriófago M13 cumple la función de reconocer y unirse al pilus F de las bacterias *E. coli* ER2738, etapa fundamental en el proceso de infección. Por lo tanto, la infectividad del fago generado puede disminuir considerablemente debido a que su proteína pIII está fusionada al scFv de 250 residuos. Por otro lado, es probable que en el proceso de purificación del vector M13KE digerido con *KpnI* y *EagI* se obtenga tanto el vector lineal doblemente digerido como el vector digerido sólo con una enzima. Esto se debe a que ambos sitios de corte están muy cercanos en el vector M13KE y los tamaños de los productos de digestión generados por la acción de una (7.222 pb) o ambas enzimas (7.202pb) son muy similares y no se pueden resolver mediante electroforesis en gel de agarosa en las condiciones usadas. De esta forma, el vector M13KE que no haya sido digerido por ambas enzimas puede ser recircularizado sin el inserto (scFv) durante el proceso de ligación, siendo capaz de generar bacteriófagos silvestres con capacidad infectiva normal. Todo esto, sumado al hecho de que el vector M13KE no posee resistencia a antibiótico y su amplificación depende de numerosas rondas de replicación de los fagos, sugiere que el fago silvestre, aunque esté presente inicialmente en cantidades menores, podría competir y desplazar al fago que presenta el fragmento de anticuerpo, impidiendo la obtención de un clon positivo para el vector M13KE-scFv.

### Segunda estrategia:

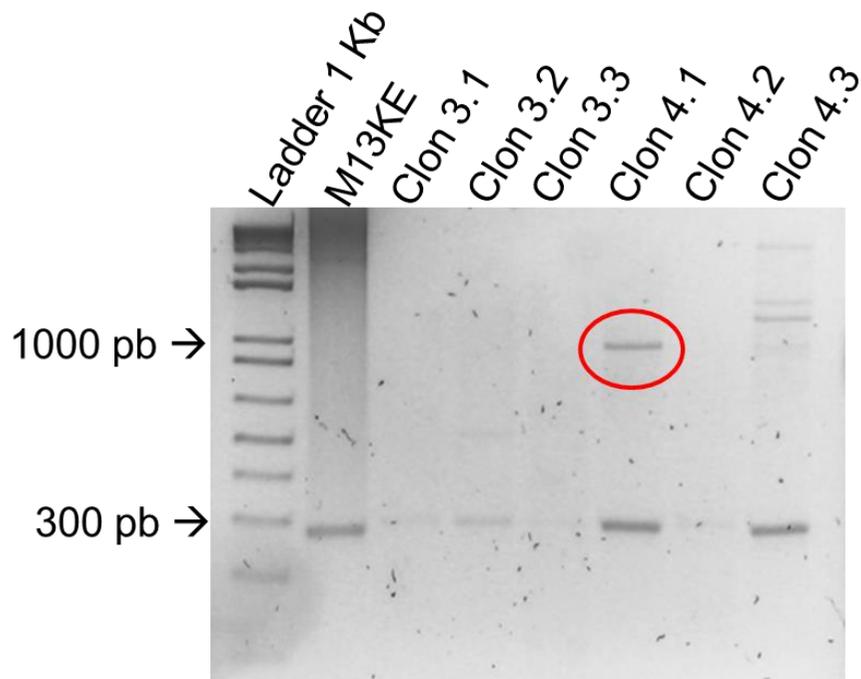
En consecuencia, se propuso utilizar una nueva estrategia basada en el uso de dos vectores: pSEX81 (fagomidio) y M13K07ΔpIII (fago auxiliar denominado hiperfago). El vector pSEX81 (PROGEN Biotechnik) es un plásmido diseñado para expresar una proteína de fusión scFv-pIII, ya que presenta varios sitios de clonamiento en el inicio del marco de lectura del gen III, los que permiten la inserción de dos secuencias codificantes de regiones variables (de cadenas liviana y pesada) de un anticuerpo. El hiperfago M13K07ΔpIII (PROGEN Biotechnik), por su parte, posee el genoma completo del bacteriófago M13 a excepción del gen III. En consecuencia, la transformación de bacterias F<sup>+</sup> con pSEX81 y su posterior infección con el bacteriófago auxiliar que contiene al vector M13K07ΔpIII permite generar bacteriófagos que expresen exclusivamente la proteína de fusión scFv-pIII en su superficie. Este proceso es garantizado por la presencia en ambos vectores de genes que otorgan resistencia a antibiótico.

La secuencia codificante del scFv anti-CEA se sintetizó y clonó dentro del vector pSEX81 por la empresa GenScript. El vector pSEX81 que contiene la secuencia scFv anti-CEA se utilizó para transformar bacterias *E. coli* ER2738. Once clones obtenidos de esta transformación se amplificaron e infectaron con hiperfago. Todos los clones utilizados se conservaron a -80°C en alícuotas de 1 ml de glicerol 20% (denominado stock N°1), previo a la infección con

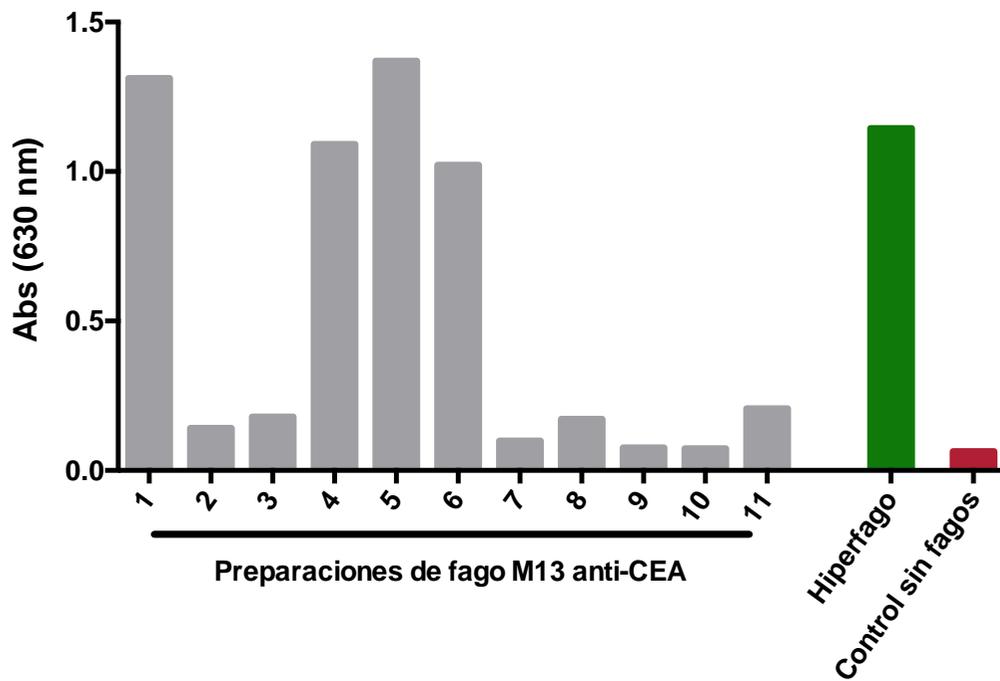
hiperfago. La infección con M13K07ΔpIII (kan<sup>R</sup>) de cada clon de bacterias transformadas con pSEX81 (amp<sup>R</sup>) y su posterior cultivo en un medio de crecimiento (LB) suplementado con kanamicina y ampicilina permitió originar un nuevo stock de bacterias en glicerol, compuesto por 11 clones de bacterias productoras de fago anti-CEA (denominado stock N°2). Los bacteriófagos presentes en el medio se precipitaron y resuspendieron en TBS estéril. La presencia de bacteriófagos en las 11 soluciones de fago obtenidas desde los 11 clones de bacterias del stock N°2 se confirmó mediante un ensayo de ELISA indirecto (Figura 10). Para demostrar de forma preliminar la presencia de una cantidad detectable de fagos se compararon los valores obtenidos con la absorbancia de una muestra de hiperfagos con título conocido ( $10^{12}$  ufp/ml, control positivo). Para evaluar la unión inespecífica de los anticuerpos utilizados se midió la absorbancia de una muestra sin fagos (control negativo). Cuatro de las 11 preparaciones analizadas presentaron una absorbancia cercana al control positivo. Este resultado demostró que 4 de los 11 clones de bacterias *E. coli* ER2738 transformadas con pSEX81 y posteriormente infectadas con hiperfago generaron bacteriófagos M13 que potencialmente presentan la proteína de fusión scFv-pIII en su superficie. Por lo tanto, la nueva estrategia experimental permitió solucionar los problemas que se originaron con la primera estrategia de producción del bacteriófago M13 anti-CEA.



**Figura 8. Análisis por PCR del producto de ligación entre el vector M13KE y el fragmento scFv anti-CEA.** El producto de PCR generado al utilizar dos partidores que flanquean el sitio de inserción en el vector M13KE fue sometido a electroforesis en gel de agarosa (1%). Para conocer la longitud aproximada de las bandas observadas se utilizó un estándar de fragmentos de ADN con tamaños conocidos (*Ladder 1 Kb*). Como control de la técnica se utilizó el producto de amplificación del vector M13KE original (PCR M13KE). Las bandas con un tamaño aproximado de 300 pb se obtienen desde el vector M13KE original, mientras que la banda de aproximadamente 1.000 pb se obtiene desde el vector ligado al fragmento anti-CEA. En la amplificación por PCR del producto de ligación entre el vector M13KE y el fragmento scFv anti-CEA (PCR ligación) se observaron ambas bandas.



**Figura 9. Análisis por PCR de posibles clones positivos para la ligación M13KE-scFv anti-CEA.** El producto de PCR formado al utilizar dos partidores que flanquean el sitio de inserción en el vector M13KE fue sometido a electroforesis en gel de agarosa (1%). El carril denominado *Ladder 1 Kb* corresponde a una muestra estándar de oligonucleótidos. Como control de la técnica se utilizó el producto de amplificación del vector M13KE original (M13KE). Los carriles clon 3.1, clon 3.2, clon 3.3, clon 4.1, clon 4.2 y clon 4.3 corresponden a los productos de amplificación del ADN de 6 clones de bacterias transformadas con el resultado de la ligación. Las bandas con un tamaño aproximado de 300 pb se obtienen desde el vector M13KE original, mientras que un vector ligado al fragmento anti-CEA genera una banda de aproximadamente 1.000 pb. En el producto de PCR del clon 4.1 se detectó una banda con tamaño aproximado de 1.000 pb (óvalo rojo).



**Figura 10. Detección de bacteriófago M13 mediante ensayo de ELISA indirecto.** Absorbancia detectada a 630 nm de 11 soluciones de fago obtenidas en forma independiente con la estrategia de fagomidio más hiperfago. Como control positivo se adhirieron a la placa  $10^{11}$  ufp de hiperfago. La absorbancia de las preparaciones 1, 4, 5 y 6 fue cercana al control positivo de hiperfago. El control sin fagos permitió descartar uniones inespecíficas propias de los anticuerpos primario y/o secundario. La absorbancia fue medida a los 6 minutos. Todas las mediciones se efectuaron en duplicado.

## **OBJETIVO 2**

### **Producción de bacteriófagos M13 anti-CEA**

La producción de bacteriófago anti-CEA mediante la técnica de fagomidio más hiperfago se puede resumir en 3 pasos (Figura 11). En primer lugar, las bacterias *E. coli* ER2738 son transformadas con fagomidio (stock N°1) y cultivadas hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0,4. Luego, estas bacterias son infectadas con hiperfago (stock N°2) y cultivadas durante 16 horas a 30°C para favorecer la formación de las nuevas partículas virales. Finalmente, los bacteriófagos anti-CEA presentes en el sobrenadante del cultivo bacteriano son precipitados, concentrados y titulados para luego evaluar su especificidad.

En base a protocolos descritos en la literatura, se diseñó un método básico para generar bacteriófagos anti-CEA. En primer lugar, los clones de bacterias que generaron fagos M13 anti-CEA (stock N°2, ver Figura 11) se cultivaron con agitación en LB suplementado con tetraciclina, ampicilina y kanamicina, durante 16 horas a 37°C. Luego, cada cultivo se centrifugó (12.000 g durante 15 minutos a 4°C) con el fin de recuperar el sobrenadante con fagos anti-CEA. Para precipitar los fagos en solución, cada sobrenadante recuperado se incubó con una solución de NaCl 2,5M con PEG 8.000 al 20% durante 16 horas a 4°C. De esta forma, luego de centrifugar se obtuvo un

precipitado con bacteriófagos anti-CEA. Finalmente, los fagos precipitados se resuspendieron en PBS estéril para analizar su especificidad contra CEA. Este método de producción generó fagos anti-CEA directamente desde un stock de bacterias conteniendo ambos vectores (fagomidio e hiperfago), sin la necesidad de efectuar los pasos de transformación con fagomidio e infección con hiperfago en cada nueva producción.

Para comprobar la eficiencia del método de producción de bacteriófagos anti-CEA propuesto fue necesario diseñar un método de titulación, debido a que el usado hasta ese momento requería la infección de bacterias *E. coli* ER2738 y la presencia del scFv anti-CEA disminuye la infectividad del fago específico. Por lo tanto, se estandarizó un protocolo de titulación de bacteriófagos mediante un método de ELISA indirecto. Este protocolo se basa en el uso de una curva estándar de concentraciones conocidas de bacteriófago M13 silvestre y en la interpolación de la absorbancia cuantificada para los fagos anti-CEA (de título desconocido) dentro de dicha curva. Concentraciones de bacteriófago M13 silvestre entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{11}$  ufp/ml generaron una curva logarítmica que correlaciona absorbancia y título (ver ejemplo en Figura 12).

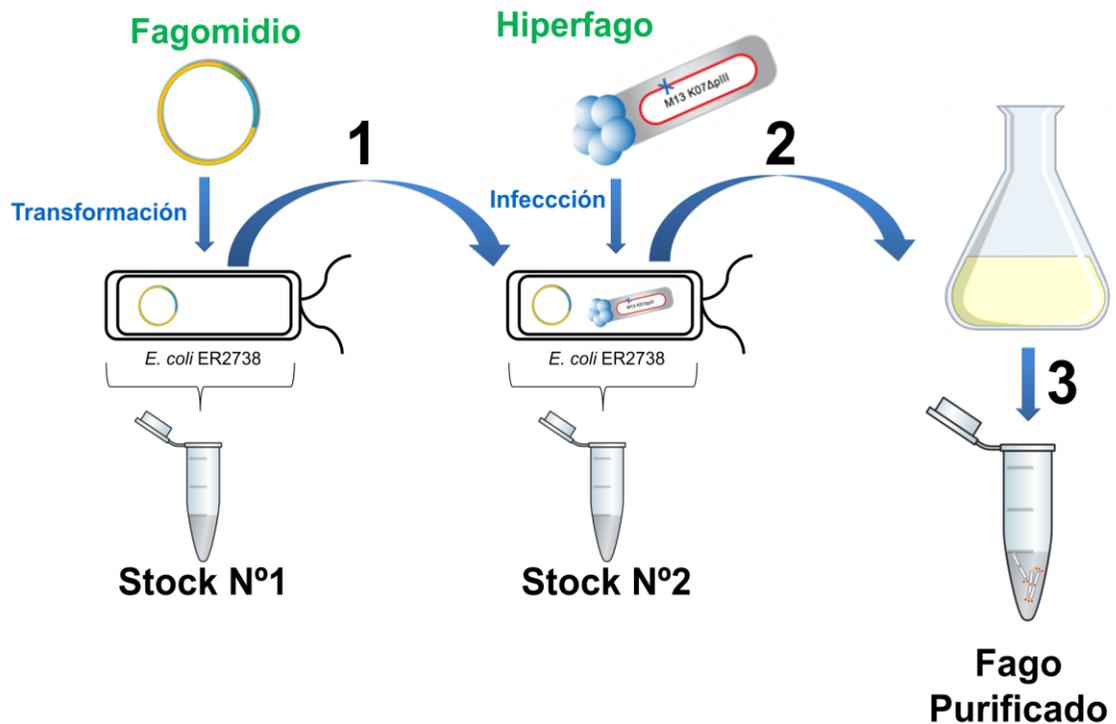
La titulación del bacteriófago M13 anti-CEA permitió concluir que el método utilizado para la producción de este bacteriófago era ineficiente. Los títulos de fago anti-CEA obtenidos con este método no superaban la concentración de  $10^{10}$  ufp/ml en 1 ml, y la producción desde un mayor volumen

inicial de cultivo bacteriano (1 litro) y luego su concentración a un volumen de 1 ml sólo aumentó los títulos a valores cercanos a  $10^{11}$  ufp/ml. A pesar de la baja producción del bacteriófago anti-CEA, al evaluar su especificidad mediante ensayos de ELISA se detectó su unión a la proteína CEA purificada (ver más adelante en el objetivo 3).

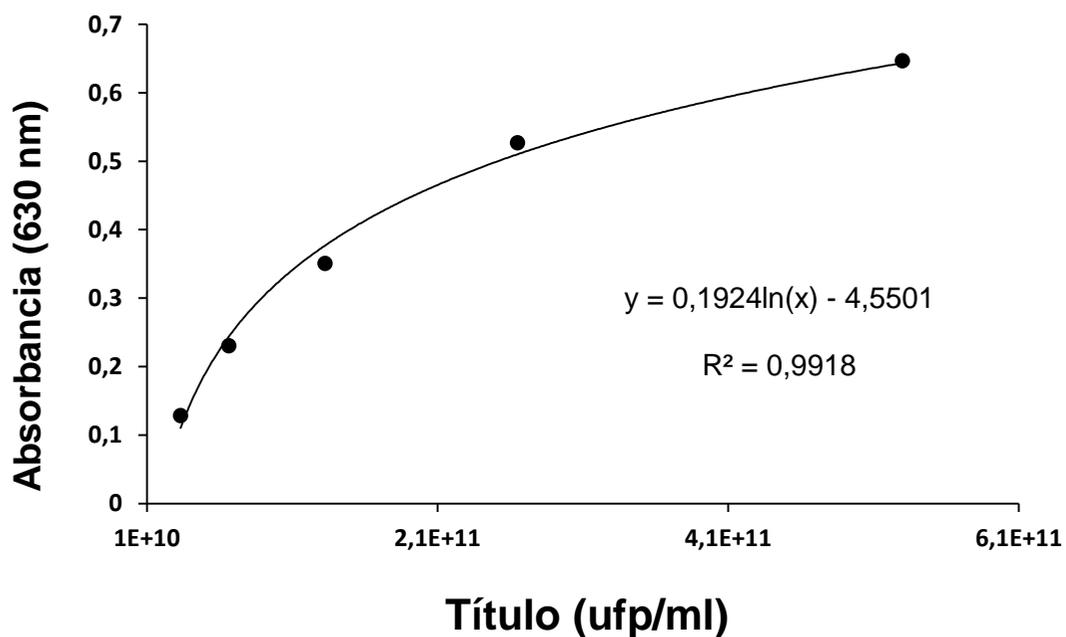
La literatura y los datos obtenidos sugieren que la producción de bacteriófagos anti-CEA desde un stock de bacterias que poseen ambos vectores, fagomidio e hiperfago en su interior (stock N°2) es poco eficiente. Esto se explicaría por el bajo número de copias del vector hiperfago, factor limitante en la generación de nuevas partículas virales completas. Con el fin de revertir esta situación, se probó una nueva estrategia experimental: bacterias provenientes del stock N°1 (sólo con fagomidio en su interior) se cultivaron y luego infectaron con hiperfago. De esta forma, siguiendo los pasos ya mencionados de purificación y concentración del bacteriófago desde un cultivo bacteriano de 500 ml, se logró obtener una solución de 2 ml con un título aproximado de  $1 \times 10^{12}$  ufp/ml, el cual representa el límite de la técnica según algunos autores. Para confirmar que los bacteriófagos producidos expresan la proteína scFv-pIII se determinó el tamaño de la proteína pIII mediante la técnica *western blot*. El peso molecular de esta proteína es cercano a 65 kDa y cuando está fusionada al scFv anti-CEA el peso observado es de aproximadamente 100 kDa (Figura 13 A). Este resultado demostró que los bacteriófagos generados tienen la proteína de fusión scFv-pIII. Además, se

observó la presencia de una banda del tamaño de la proteína pIII silvestre (65 kDa), fenómeno que ha sido explicado por algunos autores como un producto correspondiente de la degradación de la proteína de fusión scFv-pIII.

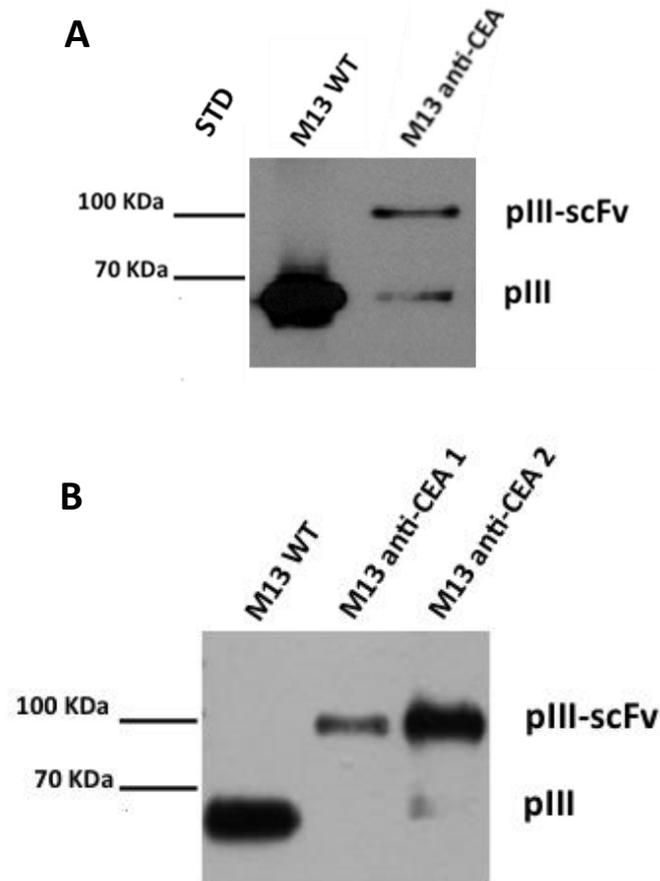
La producción desde el stock N°1 aumentó considerablemente la concentración final de bacteriófagos M13 anti-CEA. Sin embargo, el alto costo del fago auxiliar no permitió aumentar los volúmenes de producción, por lo que se evaluaron nuevas condiciones para optimizar el protocolo. Luego de evaluar distintas multiplicidades de infección (MOI) de hiperfago en cultivos bacterianos con diferentes índices de crecimiento ( $OD_{600nm}$  desde 0,1 a 1), se concluyó que la infección con un MOI igual a 20 en un cultivo de bacterias (desde stock N°1) con una  $OD_{600}$  cercana a 0,2 permitía disminuir la cantidad de hiperfago requerida sin reducir la concentración final de bacteriófagos anti-CEA. Además, se observó que el volumen del cultivo podía aumentarse hasta 10 veces más luego de finalizar la infección con hiperfagos, aumentando el título final de fagos anti-CEA. Esto último quiere decir que se maximizó el volumen al que puede llevarse un cultivo de bacterias con fagomidio e hiperfago en su interior (etapa 2 de la Figura 11). Con el fin de confirmar la mejora en la producción de fagos anti-CEA se realizó una nueva detección de la proteína pIII mediante *western blot*. El resultado obtenido demostró que tanto la eficiencia como la eficacia de la producción aumentaron, ya que se observó claramente la banda correspondiente a la proteína de fusión scFv-pIII y no se observó la banda del tamaño de pIII silvestre en las muestras de fago M13 anti-CEA (Figura 13 B).



**Figura 11. Resumen esquemático de la producción de bacteriófagos anti-CEA.** Etapas para la preparación de fagos anti-CEA mediante la técnica de fagomidio más hiperfago. Las bacterias *E. coli* ER2738 son transformadas con el fagomidio, vector que posee el gen de la proteína pIII ligado al gen del scFv anti-CEA. **(1)** Las bacterias transformadas son cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina y tetraciclina. De este cultivo se obtiene el stock en glicerol N°1. Luego, estas bacterias son infectadas con hiperfago, bacteriófago M13 que posee su genoma completo a excepción del gen *III*. **(2)** Las bacterias transformadas e infectadas son cultivadas en medio LB suplementado con tetraciclina, ampicilina y kanamicina. De este nuevo cultivo se obtiene el stock en glicerol N°2. **(3)** Los nuevos bacteriófagos generados a partir de la expresión de los genes presentes en ambos vectores son purificados desde el sobrenadante del cultivo, concentrados y utilizados en los ensayos de especificidad correspondientes.



**Figura 12. Curva estándar de M13 silvestre detectados mediante ELISA.** Curva de titulación obtenida al medir cinco soluciones de M13 silvestre de títulos conocidos mediante un ensayo de ELISA indirecto. La muestra más concentrada posee un título aproximado de  $5 \times 10^{11}$  ufp/ml y las siguientes se obtuvieron mediante diluciones seriadas a la mitad. La línea de tendencia dibujada se ajusta matemáticamente a una ecuación logarítmica. Cada punto de la curva corresponde al promedio de dos mediciones. La absorbancia se midió a los 10 minutos. La gráfica es representativa de 3 experimentos independientes.



**Figura 13. Detección de la proteína de fusión scFv-pIII mediante *western blot*.** Se comprobó la presencia de la proteína scFv-pIII en bacteriófagos M13 anti-CEA al observar el aumento en el tamaño de la proteína pIII. La banda cercana a los 70 kDa corresponde a pIII silvestre y la de 100 kDa a la proteína de fusión scFv-pIII. Como control negativo se utilizó una muestra de bacteriófago M13 silvestre con un título de  $5 \times 10^{12}$  ufp/ml (M13 WT). **(A)** Análisis de bacteriófagos M13 anti-CEA obtenidos luego de infectar con hiperfago a bacterias provenientes del stock N°1, a una  $OD_{600}$  cercana a 0,4. **(B)** Análisis de fagos anti-CEA obtenidos luego de infectar con hiperfago a un cultivo bacteriano proveniente del stock N°1 con una  $OD_{600}$  cercana a 0,2. El fago M13 anti-CEA 2 fue producido maximizando el volumen de cultivo luego de la infección con hiperfagos y M13 anti-CEA 1 no lo fue. Los tamaños indicados se obtuvieron desde un estándar de peso molecular (STD). Este resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

### **OBJETIVO 3**

#### **Evaluación *in vitro* de la especificidad de unión a CEA del bacteriófago M13 modificado**

La finalidad de este proyecto es generar un bacteriófago que se una específicamente al antígeno CEA expresado en la superficie de células tumorales. Por esta razón, la capacidad del fago anti-CEA de unirse al antígeno CEA purificado y presente en la superficie de células tumorales se evaluó utilizando las técnicas de ELISA y citometría de flujo, respectivamente.

#### Análisis de la unión del fago anti-CEA al antígeno CEA purificado

La unión del fago anti-CEA a la proteína CEA purificada se evaluó mediante ensayos de ELISA indirecto. Para esto, los bacteriófagos anti-CEA se incubaron con el antígeno CEA inmovilizado en placas de 96 pocillos y posteriormente los bacteriófagos unidos se detectaron con un anticuerpo específico contra M13. Con el fin de demostrar la especificidad otorgada por el scFv anti-CEA contra el antígeno CEA, los ensayos de ELISA se efectuaron utilizando dos controles: bacteriófagos anti-CEA incubados en pocillos sin la proteína CEA y fagos M13 silvestres incubados con CEA (Figura 14 A). Además, para descartar resultados falsos positivos otorgados por uniones no específicas del anticuerpo secundario se utilizó un control sin anticuerpo anti-M13 en presencia de ambos tipos de fagos.

Como se mencionó anteriormente (objetivo 1, Figura 10), luego del primer intento de producción de fagos anti-CEA mediante la técnica de fagomidio más hiperfago se detectó bacteriófago M13 en 4 de las 11 preparaciones de fago anti-CEA. La especificidad de unión a CEA de las preparaciones 4, 5 y 6 se evaluó por ELISA indirecto (fagos A, B y C, respectivamente en Figura 14 B). El resultado confirmó que la solución B (proveniente de la preparación 5 de la Figura 10) contiene fagos específicos contra la proteína CEA purificada, ya que la absorbancia detectada en presencia de CEA es aproximadamente 3 veces mayor que la absorbancia del control sin CEA. No se realizó un análisis estadístico de estos resultados ya que corresponden al promedio de dos mediciones.

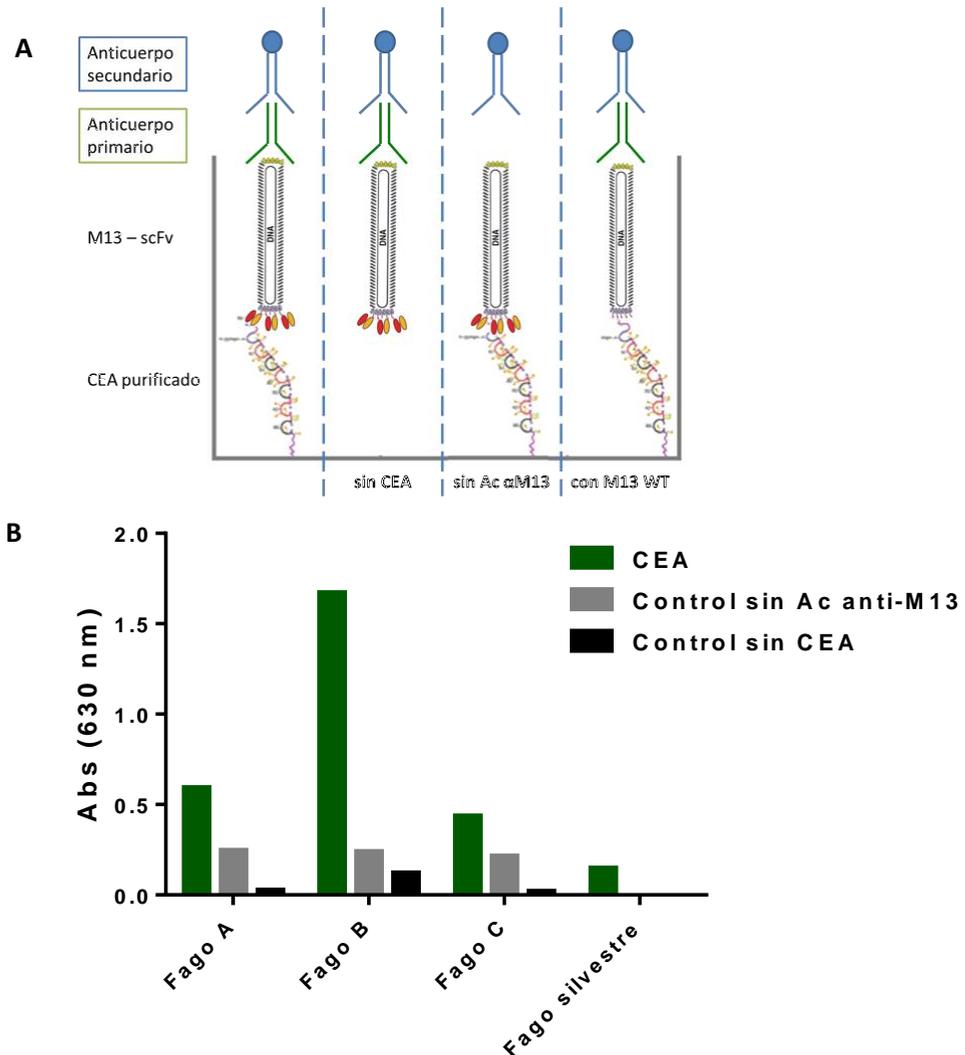
Luego de estandarizar el protocolo de titulación de fagos anti-CEA, se realizó una nueva producción de bacteriófagos anti-CEA desde el stock de bacterias N°2. De las soluciones de fagos obtenidas se incubaron aproximadamente  $10^9$  ufp de ambos bacteriófagos (anti-CEA y silvestre) y se evaluó su especificidad contra la proteína CEA purificada (Figura 15). Se observó que el fago anti-CEA se une específicamente a la proteína CEA purificada, ya que la absorbancia medida al incubarlo con proteína CEA es significativamente mayor a la absorbancia medida sin proteína CEA (aproximadamente 3 veces) y a la absorbancia del control de fago silvestre incubado con proteína CEA (aproximadamente 2,5 veces).

## Análisis de la unión del bacteriófago anti-CEA a líneas tumorales que expresan CEA en su superficie

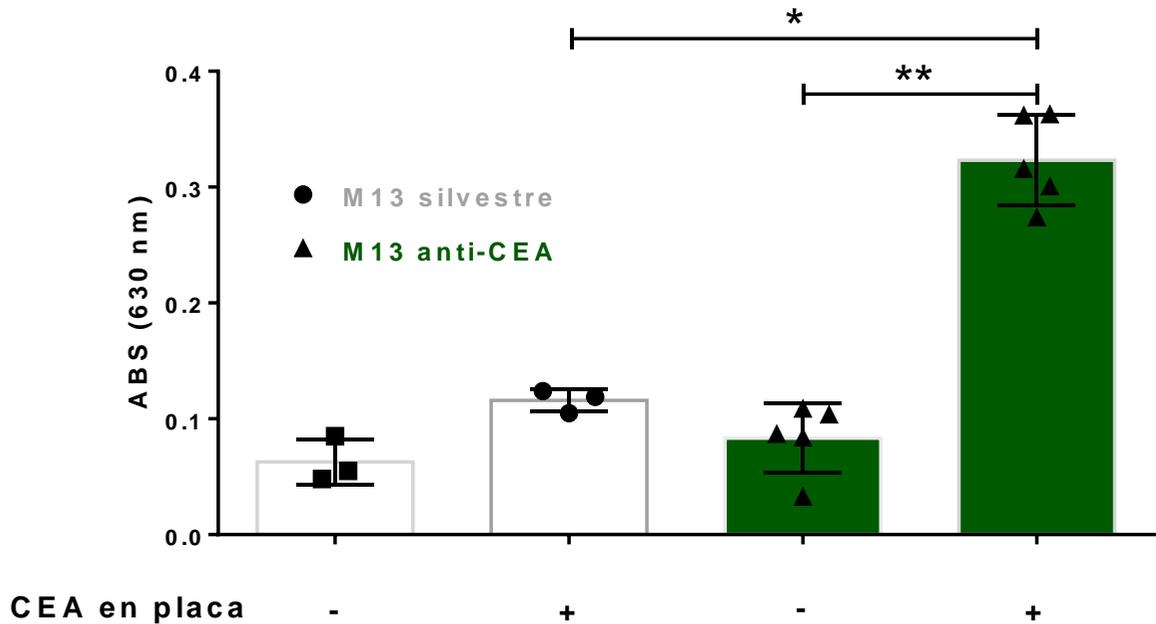
Una vez demostrada la unión del bacteriófago anti-CEA a la proteína CEA purificada, el siguiente paso fue demostrar que dicho fago se une específicamente a células tumorales que expresan el antígeno CEA en su superficie. Se incubaron  $10^{11}$  ufp de fagos M13 anti-CEA con células tumorales de origen murino (C15A3, de adenocarcinoma de colon) y humano (MCF7, de cáncer mamario) que expresan CEA en su superficie y luego se detectó la presencia de bacteriófagos en su superficie mediante citometría de flujo. Como control se utilizaron células de origen murino (MC38, de adenocarcinoma de colon) y humano (HEK293T, embrionarias de riñón) que no expresan el antígeno en su superficie. Además, como control de la especificidad otorgada por el scFv anti-CEA, todas las células se incubaron con bacteriófago silvestre. Los fagos unidos a la superficie de las células se detectaron utilizando un anticuerpo específico contra bacteriófagos M13 (isotipo IgG2a de ratón), el cual se detectó mediante un Ac específico contra el isotipo IgG2a de inmunoglobulinas de ratón acoplado al fluoróforo PerCP/Cy5.5. Simultáneamente, la expresión de CEA por parte de estas células se evaluó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CEA de origen murino (isotipo IgG1), el cual se detectó mediante un Ac específico contra el isotipo IgG1 de inmunoglobulinas de ratón acoplado al fluoróforo PE. De esta forma, la detección simultánea de fagos y proteína CEA en la superficie de las células

permitió demostrar que la unión del bacteriófago anti-CEA es específica contra este antígeno (Figura 16). En el resultado obtenido se observó que la detección del fago M13 anti-CEA en las células CEA<sup>+</sup> es directamente proporcional a la detección de CEA en la superficie de las mismas, lo que indica una clara relación entre la expresión del antígeno y la unión del bacteriófago anti-CEA. No se detectó unión de fagos en los controles de células sin CEA y de incubación con fago silvestre, lo que confirma que la unión observada se debe a la presencia del fragmento scFv anti-CEA expresado por el fago específico.

Los ensayos de evaluación de especificidad permitieron demostrar que el bacteriófago M13 anti-CEA producido mediante la estrategia de fagomidio más hiperfago se une específicamente a la proteína CEA purificada y a células que expresan este antígeno en su superficie. Esta especificidad se debe a la expresión del scFv anti-CEA fusionado a la proteína pIII del bacteriófago. La unión específica a células tumorales CEA<sup>+</sup> fundamenta el estudio del fago M13 anti-CEA como potencial inmunoterapia contra cánceres del aparato digestivo.

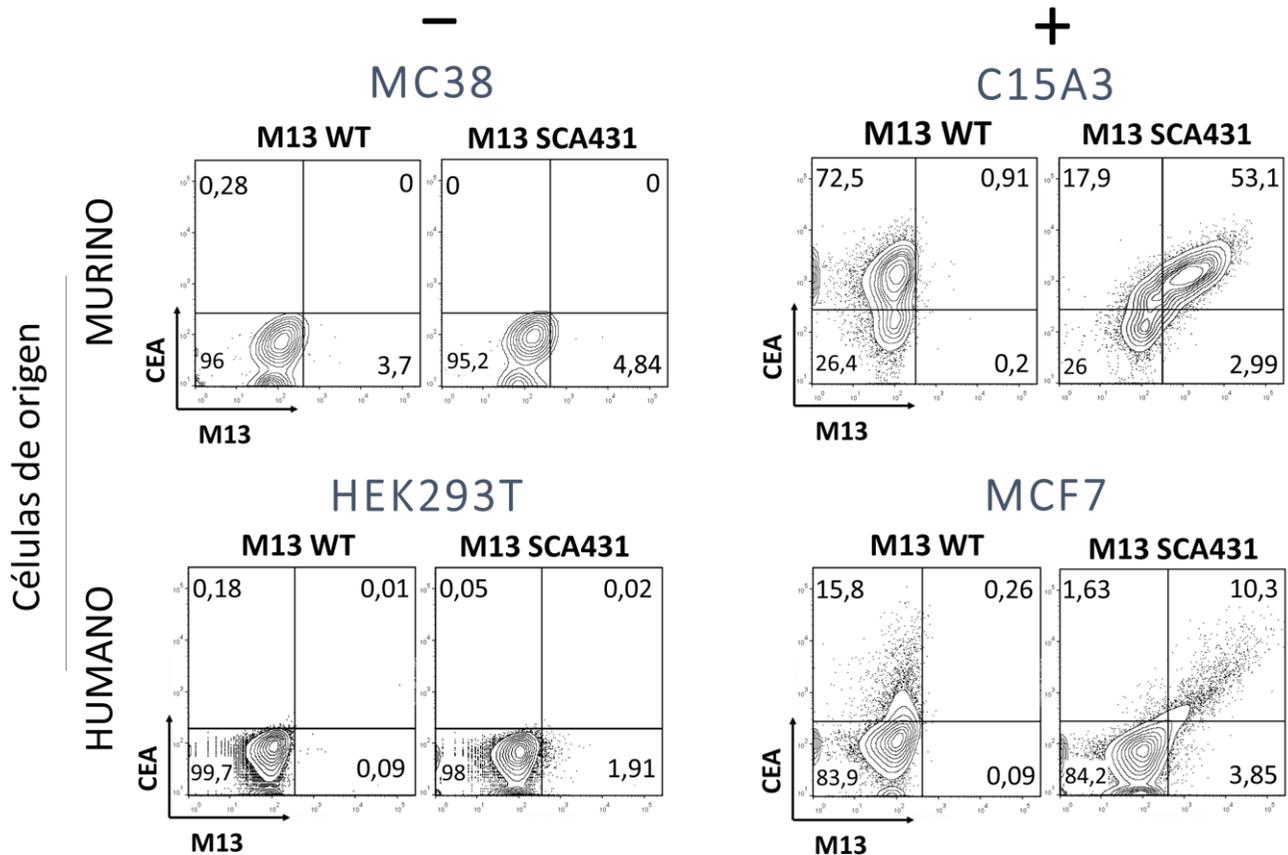


**Figura 14. Evaluación de la especificidad del bacteriófago M13 anti-CEA mediante ELISA.** (A) Representación esquemática de las condiciones experimentales utilizadas en el ensayo de ELISA indirecto. Los controles sin CEA y con M13 WT descartan uniones inespecíficas del scFv anti-CEA e interacciones entre CEA y las proteínas del bacteriófago M13 silvestre, respectivamente. El control sin Ac αM13 descarta resultados falsos positivos generados por uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. (B) Resultado de la evaluación de especificidad mediante ELISA indirecto. Las muestras Fago A, Fago B y Fago C corresponden a 3 preparaciones de fago anti-CEA. La absorbancia de cada muestra, incluyendo el control de fago inespecífico (M13 silvestre), fue cuantificada a los 10 minutos (a 630 nm). Todas las condiciones fueron realizadas en duplicado.



**Figura 15. El bacteriófago M13 anti-CEA se une específicamente a la proteína CEA purificada.** La especificidad del bacteriófago M13 anti-CEA contra CEA se evaluó mediante ELISA indirecto. El gráfico muestra la absorbancia promedio medida al incubar bacteriófagos anti-CEA con la proteína CEA (columna verde en extremo derecho). Como controles se incubaron el fago anti-CEA en ausencia de CEA (columna verde en el centro), el fago M13 silvestre en presencia (columna sin relleno en el centro) y ausencia (columna sin relleno a la izquierda) de CEA. El resultado corresponde a dos preparaciones independientes de bacteriófagos M13 anti-CEA. La absorbancia de cada muestra fue medida en duplicado o triplicado a los 10 minutos. Las barras representan el promedio de las mediciones  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Mann Whitney. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$

## Expresión de CEA en superficie



**Figura 16. El bacteriófago M13 anti-CEA se une específicamente a células que expresan CEA en su superficie.** La especificidad de unión del fago M13 anti-CEA a células que expresan CEA en su superficie se evaluó mediante ensayos de citometría de flujo. Como control de especificidad se utilizaron bacteriófagos M13 silvestres (M13 WT). La unión de ambos fagos se evaluó en células que expresan (C15A3 y MCF7) y que no expresan (MC38 y HEK293T) el antígeno en la superficie. Las células MC38 y C15A3 son de origen murino y las células HEK293T y MCF7 son de origen humano. Los bacteriófagos fueron detectados mediante un anticuerpo específico contra M13, el cual fue detectado con un anticuerpo específico contra el isotipo IgG2a de inmunoglobulinas de ratón acoplado al fluoróforo PerCP/Cy5.5. La proteína CEA fue detectada mediante un anticuerpo específico contra este antígeno, el cual fue detectado con un anticuerpo específico contra el isotipo IgG1 murino acoplado al fluoróforo PE. Los números en cada cuadrante indican el porcentaje de la población correspondiente dentro de la población de células vivas. Los gráficos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

## X. DISCUSIÓN

Debido a su alta tasa de mortalidad, los cánceres que afectan el aparato digestivo son un problema de salud de vital importancia a nivel mundial. Los tratamientos utilizados actualmente para combatir este tipo de cánceres no son totalmente eficaces y producen una gran cantidad de efectos secundarios no deseados que disminuyen la calidad de vida del paciente [1]. Este proyecto de tesis tuvo como objetivo generar la herramienta básica de una nueva inmunoterapia antitumoral contra CADs, un bacteriófago M13 específico contra el antígeno tumoral CEA, antígeno expresado en un alto porcentaje en CADs. Esta terapia se basa en la alta inmunogenicidad del fago M13 y la posibilidad de expresar péptidos en su superficie, y en la sobreexpresión de CEA en las células tumorales de este tipo de cánceres.

### *1.-Primera estrategia utilizada para la generación del fago M13 anti-CEA*

La primera estrategia utilizada consistía en insertar la secuencia codificante para un fragmento variable de cadena simple de un anticuerpo específico contra la proteína CEA dentro del gen *III* en el vector M13KE. El vector M13KE posee el genoma completo del bacteriófago M13 más el gen *lacZ* que permite a las bacterias *E. coli* ER2738 expresar la enzima  $\beta$ -galactosidasa funcional, pero no posee gen de resistencia a antibiótico. Por

esta razón, las bacterias transformadas con el producto de la ligación entre M13KE y scFv anti-CEA se identificaron exclusivamente por su capacidad de degradar el compuesto X-Gal, generando un producto de color azul. En consecuencia, este método de identificación se basaba únicamente en la capacidad de los fagos generados para infectar nuevas bacterias y replicarse. Sin embargo, en el producto de ligación utilizado para transformar las bacterias se encontró presente tanto el vector M13KE-scFv como el vector M13KE sin inserto (objetivo 1, Figura 8). Esta coexistencia de ambos vectores fue el principal obstáculo para la obtención del bacteriófago M13 anti-CEA, ya que se ha demostrado que la infectividad de los bacteriófagos puede disminuir cuando presentan péptidos en su proteína pIII [49-51]. Esto quiere decir que al cultivar las bacterias transformadas con el producto de ligación, el fago M13 silvestre generado por el vector M13KE sin inserto compite con el fago M13 anti-CEA generado por el vector M13KE-scFv y probablemente logra desplazarlo gracias a su mayor capacidad infectiva. Esta situación dificultó la identificación de bacterias que contenían exclusivamente el vector M13KE-scFv (objetivo 1, Figura 9) por lo tanto se decidió utilizar una nueva estrategia experimental.

## *2.-Segunda estrategia usada para la generación del fago M13 anti-CEA*

Se encontró en la literatura que la estrategia más utilizada para presentar scFv en la proteína pIII del fago M13 consistía en el uso conjunto de

un vector que contiene únicamente el gen *III* (denominado fagomidio) y de un fago auxiliar que contiene el genoma completo del bacteriófago M13 menos el gen que codifica pIII [42, 52-59]. Este método tiene la ventaja de que el fagomidio utilizado para expresar la proteína de fusión scFv-pIII también otorga resistencia a un antibiótico determinado, por lo tanto las bacterias que adquieren este fagomidio son de fácil selección. Por otro lado, el fago auxiliar aporta la información genética necesaria para generar nuevas partículas virales completas, eliminando la necesidad de utilizar un vector único que contenga el genoma completo del fago [60-62].

Bajo estos fundamentos se decidió utilizar en conjunto al fagomidio pSEX81 y al fago auxiliar denominado hiperfago, ambos de la empresa alemana Progen. El vector pSEX81 posee distintos sitios de corte enzimático en el inicio del gen *III*, lo que facilita la inserción de la secuencia scFv anti-CEA. Además, este fagomidio posee un gen codificante de la enzima  $\beta$ -lactamasa, por ende las bacterias que tengan el fagomidio en su interior serán resistentes a ampicilina. Por su parte, el hiperfago es un fago auxiliar que infecta bacterias  $F^+$  ya que su estructura proteica es completa y funcional, pero es incapaz de replicarse porque en su genoma no se encuentra el gen que codifica pIII. Se ha demostrado que el uso de este hiperfago genera un mayor número de proteínas de fusión scFv-pIII ya que todas las copias de proteína pIII producidas provienen únicamente del gen presente en el fagomidio [63, 64]. Además, es importante destacar que este fago auxiliar confiere a la bacteria

hospedera resistencia a kanamicina. De esta forma, al transformar bacterias *E. coli* ER2738 con el fagomidio pSEX81, infectarlas con el hiperfago y luego incubarlas en medio LB suplementado con ampicilina y kanamicina, se obtienen bacterias con la información genética necesaria para generar bacteriófagos M13 que expresen el scFv anti-CEA en su superficie. Dicho esto, se procedió a optimizar el protocolo de producción mediante el sistema fagomidio/hiperfago.

### *3.-Optimización de la producción de bacteriófagos M13 anti-CEA*

La estrategia de presentación de péptidos basada en el uso de un fagomidio más fagos ayudantes ha sido ampliamente utilizada para generar grandes bibliotecas de fagos que expresan fragmentos de anticuerpo [42, 52-60, 65-67]. El fin de estos estudios es encontrar, mediante *phage display*, una secuencia genética que codifique un fragmento de anticuerpo específico contra un antígeno determinado. Así, la secuencia genética que codifica estos fragmentos es utilizada para sintetizar (de forma independiente al bacteriófago) el fragmento de anticuerpo específico para el antígeno en estudio. Por esta razón, la producción a gran escala de bacteriófagos que presenten el fragmento de anticuerpo específico no es relevante en este proceso. En consecuencia, los protocolos de producción presentes en la literatura no consideran estrategias para aumentar considerablemente el número de

bacteriófagos específicos contra el antígeno en estudio, ya que el título obtenido con las metodologías descritas es suficiente para ejecutar cada paso del proceso de selección [68-72].

#### *4.-Titulación del bacteriófago M13 anti-CEA*

El bacteriófago M13 silvestre utilizado en esta tesis posee el gen *lacZ* en su genoma por lo que cada bacteria *E. coli* ER2738 infectada es capaz de degradar el reactivo X-Gal. De esta forma, al sembrar una mezcla de bacteriófagos y bacterias en agar suplementado con X-Gal se observa la formación de placas de infección azules. El conteo de placas azules entrega un número aproximado de partículas virales definido en unidades formadoras de placa (ufp). Este método de titulación no puede ser utilizado para cuantificar el fago M13 anti-CEA debido a que la disminución en su capacidad infectiva por la presencia del scFv en la proteína pIII generaría una subestimación del número real de fagos en la solución, por lo que el título obtenido no sería comparable con el título de los fagos M13 silvestres. En consecuencia, basándonos en protocolos que describen el uso de la técnica de ELISA para titular bacteriófagos mediante la comparación con una curva de concentraciones conocidas de fago (curva estándar) [63, 68, 69] desarrollamos un nuevo protocolo de titulación de bacteriófagos M13 anti-CEA. Este protocolo consistió en la adhesión de los bacteriófagos M13 anti-CEA de título desconocido y de

una curva de concentraciones conocidas de fagos M13 silvestre a una placa de ELISA para ser detectados mediante un anticuerpo contra bacteriófagos M13. Este anticuerpo anti-M13 se detectó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a la enzima HRP y luego de agregar un sustrato específico para esta enzima se midió la absorbancia del producto de color azul. Así, la absorbancia medida en las muestras de fago anti-CEA se interpoló dentro de la curva estándar de fago silvestre para calcular el título aproximado de cada muestra.

#### *5.-Detección de la proteína pIII mediante western blot*

La migración de la proteína pIII en un SDS-PAGE y su posterior inmunodetección es una estrategia utilizada por varios autores para demostrar la expresión de la proteína de fusión compuesta por un fragmento de anticuerpo y la proteína pIII [63, 64, 73, 74]. En el resultado presentado en la Figura 13 se observa una banda correspondiente a la proteína pIII silvestre en la muestra de fago M13 anti-CEA, además de la banda correspondiente a la proteína de fusión scFv-pIII. La presencia de esta proteína concuerda con los resultados obtenidos en los trabajos citados y ha sido explicada por la degradación de la proteína de fusión, la que puede producirse dentro de la bacteria debido a que el fagomidio pSEX81 codifica una secuencia peptídica de corte enzimático específica para tripsina. Este sitio de corte está diseñado para

recuperar los fagos unidos al antígeno blanco en el proceso de selección mediante *phage display*, permitiendo recuperar la infectividad de estos al presentar una proteína pIII sin scFv. Aunque la tripsina es una enzima ausente en bacterias, se han descrito enzimas con actividad similar a la tripsina en ciertas cepas bacterianas [75-77]. Indudablemente, falta investigación para fundamentar certeramente que la digestión de la proteína scFv-pIII se debe a este tipo de enzimas similares a tripsina.

#### *6.-Detección de bacteriófagos unidos a la proteína CEA purificada*

La especificidad del bacteriófago anti-CEA contra la proteína CEA purificada se evaluó mediante un ensayo de ELISA indirecto basado en protocolos previamente descritos [63, 78, 79]. Esta evaluación se hizo en cada nueva producción de bacteriófagos anti-CEA con el fin de verificar directamente que los fagos obtenidos poseen el fragmento scFv anti-CEA en su superficie.

La Figura 15 (objetivo 3) muestra el resultado obtenido en la evaluación de especificidad contra CEA mediante ELISA indirecto. Si bien se observa una diferencia significativa entre la detección del fago M13 anti-CEA y sus controles, la absorbancia cuantificada fue menor a lo esperado. Esto puede explicarse en términos de la sensibilidad de la técnica ya que para eliminar señales de unión inespecífica el número de bacteriófagos incubados debió ser

disminuido a  $10^9$  ufp y probablemente la unión específica es muy débil para ser detectada mediante este tipo de ensayo de ELISA.

### *7.-Expresión de CEA en las líneas celulares estudiadas*

La línea celular humana MCF7 ha sido estudiada como modelo celular de cáncer positivo para la expresión de CEA [80, 81], por lo tanto representa un modelo confiable y funcional para la evaluación de la especificidad del fago M13 anti-CEA. La detección de CEA mediante citometría de flujo corroboró empíricamente la presencia de este antígeno en la superficie de estas células.

Es importante destacar que la expresión de la proteína CEA sólo se ha descrito en células humanas, por lo tanto el estudio de inmunoterapias basadas en la expresión de este antígeno debe realizarse en modelos murinos modificados para expresar CEA. La línea celular de origen murino C15A3 que expresa CEA en su superficie proviene de células tumorales que han sido modificadas por el grupo de investigación del Dr. Hinrich Abken [82, 83]. En consecuencia, la evaluación de la expresión de CEA mediante citometría de flujo fue necesaria para confirmar la expresión de esta proteína en la superficie de esta línea celular y para confirmar la ausencia de CEA en la superficie de células MC38. Tal como se esperaba, la línea celular C15A3 expresa CEA en su superficie, mientras que las células MC38 no (objetivo 3, Figura 16). La importancia de utilizar células de origen murino se fundamenta en su posterior

uso *in vivo* como modelos tumorales CEA<sup>+</sup>. Esto quiere decir que luego de confirmar que el fago anti-CEA se une a las células C15A3, estas serán utilizadas para generar tumores CEA<sup>+</sup> en ratones C57BL6 y así analizar el potencial terapéutico del fago anti-CEA.

#### *8.-Detección del bacteriófago M13 anti-CEA unido a la superficie de líneas celulares que expresan CEA en su superficie*

El número mínimo de bacteriófagos necesario para analizar su especificidad en células es  $10^{11}$  ufp. Al incubar esta cantidad de partículas virales se logró observar unión del fago anti-CEA a las células tumorales CEA<sup>+</sup> lo que sugiere fuertemente que el fago producido se une específicamente a estas células (Figura 16).

Las condiciones escogidas para optimizar el protocolo de evaluación de especificidad mediante citometría de flujo fueron muy similares a las descritas por Eriksson, *et al* en el año 2006 [48]. Esta publicación describe la generación de tres bacteriófagos M13 específicos contra la línea tumoral de melanoma murino B16 y la posterior evaluación de su potencial como inmunoterapia antitumoral en el modelo de melanoma *in vivo*. Uno de estos tres bacteriófagos posee características similares al fago M13 anti-CEA ya que se generó mediante el uso de un fagomidio y expresa un fragmento de anticuerpo (Fab) fusionado a su proteína pIII. Según lo descrito por los autores, mediante

citometría de flujo se logró detectar la unión del fago Fab a un 32% de las células tumorales B16-F10. Sin embargo, al momento de evaluar el efecto *in vivo* del fago Fab en el modelo de melanoma murino, se observó que este fago indujo regresión tumoral completa en más de un 50% de los ratones y, en consecuencia, aumentó significativamente el porcentaje de supervivencia. De esta forma, si comparamos los resultados descritos por este grupo de investigación con el resultado obtenido en este trabajo de tesis podemos concluir que la detección de fago M13 anti-CEA unido a la superficie de células tumorales CEA<sup>+</sup> es un dato promisorio en cuanto a su potencial uso como inmunoterapia antitumoral.

## 9.-Proyecciones

Luego de optimizar la producción de bacteriófagos específicos contra CEA, el siguiente paso es realizar estudios *in vivo* de su especificidad y funcionalidad en modelos tumorales murinos. En estos estudios se evaluará tanto la regresión tumoral como la respuesta inmune antitumoral generada, detectando las poblaciones celulares infiltrantes del tumor. El protocolo de análisis de poblaciones celulares infiltrantes ya ha sido estandarizado en nuestro laboratorio para el modelo celular C15A3.

## **XI. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente:

1. Las condiciones utilizadas en este trabajo para clonar la secuencia codificante del scFv anti-CEA dentro del vector genómico M13KE no permitieron generar bacteriófagos que expresaran el fragmento anti-CEA fusionado a la proteína pIII, dado que la baja infectividad de los fagos generados y la ausencia de un gen de resistencia a antibiótico impiden la selección y purificación del fago buscado.
2. El uso de la estrategia basada en los vectores fagomidio e hiperfago permitió producir bacteriófagos que expresan una proteína pIII fusionada al scFv anti-CEA.
3. El bacteriófago M13 anti-CEA que presenta la proteína de fusión scFv-pIII en su superficie se une específicamente al antígeno CEA purificado.
4. El bacteriófago M13 anti-CEA que presenta la proteína de fusión scFv-pIII en su superficie se une específicamente a células tumorales que expresan la proteína CEA en su superficie.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Cancer. Fact sheet N° 297., 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297>.
2. MINSAL, Departamento de estadística e información de salud., 2011. <http://www.deis.cl/>.
3. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Globocan, 2012. <http://globocan.iarc.fr/>.
4. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Globocan, 2008. <http://globocan.iarc.fr/>.
5. Kasper, D., Chapter 70: "Principles of Cancer Treatment: Surgery, Chemotherapy, and Biologic Therapy". Harrison's Principles of Internal Medicine, 2005.
6. Ministerio de Salud. "Guía clínica alivio del dolor por cáncer avanzado y cuidados paliativos". Santiago, MINSAL 2011. .
7. Instituto Nacional del Cáncer, EE.UU. Terapias biológicas contra el cancer. Revisión 13 de junio del 2006., <http://www.cancer.gov/espanol>.
8. Capítulo 17: "Inmunidad antitumoral". Inmunología Celular y Molecular, Abbas, 6ª Edición, 2008.
9. Burnet, F.M., The concept of immunological surveillance. Prog Exp Tumor Res, 1970. **13**: p. 1-27.
10. Purtilo, D.T., Defective immune surveillance in viral carcinogenesis. Lab Invest, 1984. **51**(4): p. 373-85.
11. Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., Robinson, M.R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C.A., Rogers-Freezer, L., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., White, D.E. and Rosenberg, S.A., Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
12. Dougan, M. and Dranoff, G., Immune therapy for cancer. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 83-117.
13. Hammarstrom, S., The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. Semin Cancer Biol, 1999. **9**(2): p. 67-81.
14. Gold, P. and Freedman, S.O., Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J Exp Med, 1965. **122**(3): p. 467-81.
15. Thomson, D.M., Krupey, J., Freedman, S.O. and Gold, P., The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. Proc Natl Acad Sci U S A, 1969. **64**(1): p. 161-7.
16. Graham, R.A., Wang, S., Catalano, P.J. and Haller, D.G., Postsurgical surveillance of colon cancer: preliminary cost analysis of physician

- examination, carcinoembryonic antigen testing, chest x-ray, and colonoscopy. *Ann Surg*, 1998. **228**(1): p. 59-63.
17. Grem, J., The prognostic importance of tumor markers in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Oncol*, 1997. **9**(4): p. 380-7.
  18. Forones, N.M. and Tanaka, M., CEA and CA 19-9 as prognostic indexes in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 1999. **46**(26): p. 905-8.
  19. Distler, M., Pilarsky, E., Kersting, S. and Grutzmann, R., Preoperative CEA and CA 19-9 are prognostic markers for survival after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas - a retrospective tumor marker prognostic study. *Int J Surg*, 2013. **11**(10): p. 1067-72.
  20. Basbug, M., Arikanoglu, Z., Bulbuller, N., Cetinkaya, Z., Aygen, E., Akbulut, S. and Satıcı, O., Prognostic value of preoperative CEA and CA 19-9 levels in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 2011. **58**(106): p. 400-5.
  21. Webb, A., Scott-Mackie, P., Cunningham, D., Norman, A., Andreyev, J., O'Brien, M. and Bensted, J., The prognostic value of CEA, beta HCG, AFP, CA125, CA19-9 and C-erb B-2, beta HCG immunohistochemistry in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol*, 1995. **6**(6): p. 581-7.
  22. Lee, K.J., Yi, S.W., Chung, M.J., Park, S.W., Song, S.Y., Chung, J.B. and Park, J.Y., Serum CA 19-9 and CEA levels as a prognostic factor in pancreatic adenocarcinoma. *Yonsei Med J*, 2013. **54**(3): p. 643-9.
  23. Thomas, P. and Zamcheck, N., Role of the liver in clearance and excretion of circulating carcinoembryonic antigen (CEA). *Dig Dis Sci*, 1983. **28**(3): p. 216-24.
  24. Tsouma, A., Aggeli, C., Lembessis, P., Zografos, G.N., Korkolis, D.P., Pectasides, D., Skondra, M., Pissimissis, N., Tzonou, A. and Koutsilieris, M., Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*, 2010. **16**(47): p. 5965-74.
  25. Roa, I., Araya, J.C., Shiraisch, T., Yatani, R., Wistuba, I., Villaseca, M. and de Aretxabala, X., [Gallbladder cancer: immunohistochemical expression of CA-19-9, epithelial membrane antigen, dupan-2 and carcinoembryonic antigen]. *Rev Med Chil*, 1992. **120**(11): p. 1218-26.
  26. Qiu, M.Z., Li, Z.H., Zhou, Z.W., Li, Y.H., Wang, Z.Q., Wang, F.H., Huang, P., Aziz, F., Wang, D.Y. and Xu, R.H., Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA in blood using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to predict recurrence of gastric adenocarcinoma. *J Transl Med*, 2010. **8**: p. 107.
  27. Apetoh, L., Vegran, F., Ladoire, S. and Ghiringhelli, F., Restoration of antitumor immunity through selective inhibition of myeloid derived suppressor cells by anticancer therapies. *Curr Mol Med*, 2011. **11**(5): p. 365-72.

28. Peng, S., Kim, T.W., Lee, J.H., Yang, M., He, L., Hung, C.F. and Wu, T.C., Vaccination with dendritic cells transfected with BAK and BAX siRNA enhances antigen-specific immune responses by prolonging dendritic cell life. *Hum Gene Ther*, 2005. **16**(5): p. 584-93.
29. Hiraoka, K., Yamamoto, S., Otsuru, S., Nakai, S., Tamai, K., Morishita, R., Ogihara, T. and Kaneda, Y., Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating [correction of hemagglutinating] virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 2004. **173**(7): p. 4297-307.
30. Shirota, Y., Shirota, H. and Klinman, D.M., Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 2012. **188**(4): p. 1592-9.
31. Russel M, et al. Introduction to phage biology and phage display. *Practical Approach to Phage Display*. New York: Oxford University Press, Inc., 2004.
32. Trun N, et al. Chapter 7: Bacteriophage. *Fundamental Bacterial Genetics.*, 2004
33. Iannolo, G., Minenkova, O., Petruzzelli, R. and Cesareni, G., Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein. *J Mol Biol*, 1995. **248**(4): p. 835-44.
34. Sidhu, S.S., Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2000. **11**(6): p. 610-6.
35. Rodi, D.J. and Makowski, L., Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol*, 1999. **10**(1): p. 87-93.
36. Wilson, D.R. and Finlay, B.B., Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol*, 1998. **44**(4): p. 313-29.
37. Fukuda, M.N., Ohyama, C., Lowitz, K., Matsuo, O., Pasqualini, R., Ruoslahti, E. and Fukuda, M., A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells. *Cancer Res*, 2000. **60**(2): p. 450-6.
38. Hetian, L., Ping, A., Shumei, S., Xiaoying, L., Luowen, H., Jian, W., Lin, M., Meisheng, L., Junshan, Y. and Chengchao, S., A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *J Biol Chem*, 2002. **277**(45): p. 43137-42.
39. Vitaliti, A., Wittmer, M., Steiner, R., Wyder, L., Neri, D. and Klemenz, R., Inhibition of tumor angiogenesis by a single-chain antibody directed against vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*, 2000. **60**(16): p. 4311-4.

40. Binetruy-Tournaire, R., Demangel, C., Malavaud, B., Vassy, R., Rouyre, S., Kraemer, M., Plouet, J., Derbin, C., Perret, G. and Mazie, J.C., Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J*, 2000. **19**(7): p. 1525-33.
41. Brockmann, E.C., Selection of stable scFv antibodies by phage display. *Methods Mol Biol*, 2012. **907**: p. 123-44.
42. Zhang, J., Valianou, M., Simmons, H., Robinson, M.K., Lee, H.O., Mullins, S.R., Marasco, W.A., Adams, G.P., Weiner, L.M. and Cheng, J.D., Identification of inhibitory scFv antibodies targeting fibroblast activation protein utilizing phage display functional screens. *FASEB J*, 2013. **27**(2): p. 581-9.
43. Alirezapour, B., Rajabibazl, M., Rasaee, M.J. and Omidfar, K., Production and characterization of recombinant scFv against digoxin by phage display technology. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2013. **32**(3): p. 172-9.
44. Hashiguchi, S., Yamaguchi, Y., Takeuchi, O., Akira, S. and Sugimura, K., Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **402**(1): p. 19-22.
45. Kucharewicz-Krukowska, A. and Slopek, S., Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 1987. **35**(5): p. 553-61.
46. Pajtasz-Piasecka, E., Rossowska, J., Dus, D., Weber-Dabrowska, B., Zablocka, A. and Gorski, A., Bacteriophages support anti-tumor response initiated by DC-based vaccine against murine transplantable colon carcinoma. *Immunol Lett*, 2008. **116**(1): p. 24-32.
47. Sartorius, R., Bettua, C., D'Apice, L., Caivano, A., Trovato, M., Russo, D., Zanoni, I., Granucci, F., Mascolo, D., Barba, P., Del Pozzo, G. and De Berardinis, P., Vaccination with filamentous bacteriophages targeting DEC-205 induces DC maturation and potent anti-tumor T-cell responses in the absence of adjuvants. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(9): p. 2573-84.
48. Eriksson, F., Culp, W.D., Massey, R., Egevad, L., Garland, D., Persson, M.A. and Pisa, P., Tumor specific phage particles promote tumor regression in a mouse melanoma model. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. **56**(5): p. 677-87.
49. Smith, G.P., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
50. Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W. and Dower, W.J., Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(16): p. 6378-82.
51. Miersch, S. and Sidhu, S.S., Synthetic antibodies: concepts, potential and practical considerations. *Methods*, 2012. **57**(4): p. 486-98.

52. Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P. and Yamabhai, M., A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC Biotechnol*, 2009. **9**: p. 6.
53. Deramchia, K., Jacobin-Valat, M.J., Laroche-Traineau, J., Bonetto, S., Sanchez, S., Dos Santos, P., Massot, P., Franconi, J.M., Martineau, P. and Clofent-Sanchez, G., By-Passing Large Screening Experiments Using Sequencing as a Tool to Identify scFv Fragments Targeting Atherosclerotic Lesions in a Novel In Vivo Phage Display Selection. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(6): p. 6902-23.
54. Sotelo, P., Collazo, N., Zuniga, R., Gutierrez-Gonzalez, M., Catalan, D., Ribeiro, C.H., Aguillon, J.C. and Molina, M.C., An efficient method for variable region assembly in the construction of scFv phage display libraries using independent strand amplification. *MAbs*, 2012. **4**(4): p. 542-50.
55. Brocks, B., Garin-Chesa, P., Behrle, E., Park, J.E., Rettig, W.J., Pfizenmaier, K. and Moosmayer, D., Species-crossreactive scFv against the tumor stroma marker "fibroblast activation protein" selected by phage display from an immunized FAP-/- knock-out mouse. *Mol Med*, 2001. **7**(7): p. 461-9.
56. Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. and Little, M., A surface expression vector for antibody screening. *Gene*, 1991. **104**(2): p. 147-53.
57. Soderlind, E., Lagerkvist, A.C., Duenas, M., Malmberg, A.C., Ayala, M., Danielsson, L. and Borrebaeck, C.A., Chaperonin assisted phage display of antibody fragments on filamentous bacteriophages. *Biotechnology (N Y)*, 1993. **11**(4): p. 503-7.
58. Dubel, S., Breitling, F., Fuchs, P., Braunagel, M., Klewinghaus, I. and Little, M., A family of vectors for surface display and production of antibodies. *Gene*, 1993. **128**(1): p. 97-101.
59. Soderlind, E., Simonsson, A.C. and Borrebaeck, C.A., Phage display technology in antibody engineering: design of phagemid vectors and in vitro maturation systems. *Immunol Rev*, 1992. **130**: p. 109-24.
60. Tohidkia, M.R., Barar, J., Asadi, F. and Omid, Y., Molecular considerations for development of phage antibody libraries. *J Drug Target*, 2012. **20**(3): p. 195-208.
61. Qi, H., Lu, H., Qiu, H.J., Petrenko, V. and Liu, A., Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *J Mol Biol*, 2012. **417**(3): p. 129-43.
62. Carmen, S. and Jermutus, L., Concepts in antibody phage display. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2002. **1**(2): p. 189-203.
63. Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. and Dubel, S., A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol*, 2001. **19**(1): p. 75-8.

64. Hust, M., Meysing, M., Schirrmann, T., Selke, M., Meens, J., Gerlach, G.F. and Dubel, S., Enrichment of open reading frames presented on bacteriophage M13 using hyperphage. *Biotechniques*, 2006. **41**(3): p. 335-42.
65. Ganesan, R., Zhang, Y., Landgraf, K.E., Lin, S.J., Moran, P. and Kirchhofer, D., An allosteric anti-hepsin antibody derived from a constrained phage display library. *Protein Eng Des Sel*, 2012. **25**(3): p. 127-33.
66. Rangnoi, K., Jaruseranee, N., O'Kennedy, R., Pansri, P. and Yamabhai, M., One-step detection of aflatoxin-B(1) using scFv-alkaline phosphatase-fusion selected from human phage display antibody library. *Mol Biotechnol*, 2011. **49**(3): p. 240-9.
67. Zhang, W.J., Liu, X.R., Li, G.C. and He, Z.M., [Construction and selection of human Fab antibody phage display library of extracellular domain of HER 2]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2011. **27**(3): p. 297-300.
68. Broders, O., Breitling, F. and Dubel, S., Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display. *Methods Mol Biol*, 2003. **205**: p. 295-302.
69. Kontermann, R. and Dübel, S., *Antibody Engineering*. 2010: Springer.
70. O'Brien, P.M. and Aitken, R., *Antibody Phage Display: Methods and Protocols*. 2004: Humana Press.
71. Reischl, U., *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases*. 1998: Humana Press.
72. Even-Desrumeaux, K. and Chames, P., Phage display and selections on cells. *Methods Mol Biol*, 2012. **907**: p. 225-35.
73. Kirsch, M., Zaman, M., Meier, D., Dubel, S. and Hust, M., Parameters affecting the display of antibodies on phage. *J Immunol Methods*, 2005. **301**(1-2): p. 173-85.
74. Huovinen, T., Sanmark, H., Yla-Pelto, J., Vehniainen, M. and Lamminmaki, U., Oligovalent Fab display on M13 phage improved by directed evolution. *Mol Biotechnol*, 2010. **44**(3): p. 221-31.
75. Yoshimura, F., Nishikata, M., Suzuki, T., Hoover, C.I. and Newbrun, E., Characterization of a trypsin-like protease from the bacterium *Bacteroides gingivalis* isolated from human dental plaque. *Arch Oral Biol*, 1984. **29**(7): p. 559-64.
76. Potempa, J., Pike, R. and Travis, J., The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun*, 1995. **63**(4): p. 1176-82.
77. Takada, K. and Hirasawa, M., Expression of trypsin-like activity by the genera *Corynebacterium* and *Actinomyces* in canine periodontitis. *J Med Microbiol*, 2000. **49**(7): p. 621-5.
78. Wu, D., Li, G., Qin, C. and Ren, X., Phage displayed peptides to avian H5N1 virus distinguished the virus from other viruses. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23058.

79. New England Biolabs. Ph.D.TM Phage Display Libraries. Instruction Manual (Cat. #E81111). 2014.
80. Blumenthal, R.D., Hansen, H.J. and Goldenberg, D.M., Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). *Cancer Res*, 2005. **65**(19): p. 8809-17.
81. Wang, X.L., Ma, B., Jia, J., Yuan, Y.H., Yan, Y., Di, L.J., Song, G.H., Yu, J. and Ren, J., [Dendritic cells infected by recombinant adeno-associated virus with CEA gene to induce antigen-specific CTL response to CD44(+)CD24(-/low) cells from MCF-7 breast cancer cell line]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2011. **43**(2): p. 173-8.
82. Kofler, D.M., Chmielewski, M., Rappl, G., Hombach, A., Riet, T., Schmidt, A., Hombach, A.A., Wendtner, C.M. and Abken, H., CD28 costimulation Impairs the efficacy of a redirected t-cell antitumor attack in the presence of regulatory t cells which can be overcome by preventing Lck activation. *Mol Ther*, 2011. **19**(4): p. 760-7.
83. Chmielewski, M., Hahn, O., Rappl, G., Nowak, M., Schmidt-Wolf, I.H., Hombach, A.A. and Abken, H., T cells that target carcinoembryonic antigen eradicate orthotopic pancreatic carcinomas without inducing autoimmune colitis in mice. *Gastroenterology*, 2012. **143**(4): p. 1095-107 e2.