

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN ANTICUERPO HUMANIZADO huscFv  
CONTRA EL RECEPTOR EGFR (ErbB1) EN COMBINACIÓN CON  
METFORMINA SOBRE CÉLULAS A549 *IN VITRO***

**Por**

**JORGE SOLÍS ESTRADA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTORADO EN  
CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

**Julio, 2024**

“Diseño y evaluación de un anticuerpo humanizado huscfv contra el receptor EGFR (ErbB1) en combinación con metformina sobre células A549 *in vitro*”.

Aprobación de la Tesis:

---

**DR. ISAÍAS BALDERAS RENTERÍA**

**Presidente**

---

**DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA**

**Secretario**

---

**DRA. PATRICIA GONZÁLEZ BARRANCO**

**Vocal**

---

**DR. FABIÁN ELISEO OLAZARÁN SANTIBÁÑEZ**

**Vocal**

---

**DRA. MARÍA DEL PILAR CARRANZA ROSALES**

**Vocal**

---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

**Sub-Directora de Posgrado**

“Diseño y evaluación de un anticuerpo humanizado huscfv contra el receptor EGFR (ErbB1) en combinación con metformina sobre células A549 *in vitro*”.

Revisión de la Tesis:

---

**DR. ISAÍAS BALDERAS RENTERÍA**

**Asesor de Tesis**

---

**DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA**

**Comité Tutorial**

---

**DRA. PATRICIA GONZÁLEZ BARRANCO**

**Comité Tutorial**

---

**DRA. MARÍA DEL PILAR CARRANZA ROSALES**

**Comité Tutorial**

---

**DR. FABIÁN ELISEO OLAZARÁN SANTIBÁÑEZ**

**Comité Tutorial**

---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**

**Sub-Directora de Posgrado**

## RESUMEN

**M.C. Jorge Solis Estrada**

**Fecha de Graduación: Julio 2024**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título de Estudio:** Diseño y evaluación de un anticuerpo humanizado huscFv contra el receptor EGFR (ErbB1) en combinación con metformina sobre células A549 *in vitro*.

**Número de Páginas:**      **Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con orientación en Farmacia**

**Propósito y Método del Estudio:** Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son fundamentales en la terapia contra enfermedades inmunológicas, infecciosas y cancerosas, desarrollados a partir de la tecnología del hibridoma. Su producción ha evolucionado con la ingeniería genética, permitiendo su fabricación a través de tecnologías de ADN recombinante. El receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR (HER1) es una diana terapéutica clave, especialmente en cánceres como el de colon, riñón, pulmón, páncreas y cabeza y cuello. En paralelo, la metformina, un agente antidiabético, ha suscitado interés en investigación por su potencial efecto anticancerígeno, demostrado en varios tipos de cáncer. En este proyecto se diseñó un anticuerpo humanizado basado en Cetuximab y evaluó su acción anticancerígena, en combinación con metformina, en células epiteliales de cáncer A549 *in vitro*.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se logró diseñar y aumentar la humanización del anticuerpo huscFv en un 16.4%, el cual fue secretado por células HEK293T, manteniendo su afinidad por EGFR. Los resultados de la evaluación biológica indican que la metformina tiene un efecto dosis-dependiente, con un IC<sub>50</sub> de 46 mM. En combinación con huscFv, se inhibe un 45% la viabilidad celular, en comparación con el 15% demostrado por huscFv solo. Nuestros hallazgos sugieren que la técnica de CDR grafting es eficaz para la humanización de scFv, manteniendo su afinidad por EGFR y demostrando capacidad inhibitoria cuando se combina con metformina en células A549.

---

Dr. Isaías Balderas Rentería

Director de Tesis

## TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo  | Página |
|---|--------|
| NOMENCLATURA.....   | 11     |
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 13     |
| 2. ANTECEDENTES .....   | 22     |
| 3. JUSTIFICACIÓN .....  | 27     |
| 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....   | 29     |
| 4.1. Hipótesis.....   | 29     |
| 4.2. Objetivo General .....   | 29     |
| Diseñar, clonar y evaluar la actividad biológica del anticuerpo humanizado huscFv en combinación con metformina sobre la línea celular A549 <i>in-vitro</i> ..... | 29     |
| 4.3. Objetivos Específicos.....   | 29     |
| 5. METODOLOGÍA.....   | 31     |
| 5.1. Obtención de secuencias del anticuerpo cetuximab y diseño del fragmento humanizado huscFv por inserción de CDR´s. ....                                       | 31     |
| 5.1.1. Obtención de secuencias del anticuerpo cetuximab .....   | 31     |
| 5.1.2. Análisis de la región variable de la cadena pesada y ligera del anticuerpo cetuximab.....  | 31     |
| 5.1.3. Diseño del formato huscFv por inserción de CDR´s y análisis de humanización.....   | 32     |
| 5.1.4. Acoplamiento de secuencias para los fragmentos de anticuerpo .....   | 33     |
| 5.2. Clonación molecular de la secuencia codificante huscFv en el vector de expresión eucariota pCEFL.....  | 33     |
| 5.2.1. Preparación de productos génicos para su inserción en el vector.....   | 33     |
| 5.2.2. Análisis de digestión del fragmento de anticuerpo .....  | 35     |
| 5.2.3. Obtención y tratamiento del vector de expresión.....   | 36     |
| 5.2.4. Reacción de ligación del fragmento de anticuerpo con el vector de expresión pCEFL.....   | 36     |
| 5.3. Evaluación biológica <i>in-vitro</i> por WST-1 .....   | 38     |
| 5.4. Análisis de afinidad del fragmento huscFv sobre receptores de membrana EGFR en células A549 por Dot-Blot. ....   | 40     |
| 5.5. Análisis estadístico .....   | 41     |
| 5.6. Manejo de residuos .....   | 41     |
| 6. RESULTADOS .....   | 42     |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 6.1.   | Diseño del fragmento humanizado huscFv .....  | 42 |
| 6.1.1. | Obtención de secuencias del anticuerpo cetuximab .....  | 42 |
| 6.1.2. | Análisis de la región variable de la cadena pesada y ligera de cetuximab<br>43                                    |    |
| 6.1.3. | Diseño del formato scFv/EGFR por inserción de CDR´s y análisis de<br>humanización. ....                           | 44 |
| 6.1.4. | Acoplamiento de secuencias para el fragmento de anticuerpo<br>humanizado.....                                     | 48 |
| 6.2.   | Clonación molecular.....  | 49 |
| 6.2.1. | Preparación de productos génicos para su inserción en el vector.....  | 49 |
| 6.2.2. | Obtención y tratamiento del vector de expresión.....  | 50 |
| 6.2.3. | Confirmación de clonas transformantes por PCR.....  | 51 |
| 6.3.   | Evaluación biológica <i>in-vitro</i> por WST-1 .....  | 52 |
| 6.4.   | Análisis de afinidad del fragmento huscFv sobre receptores de membrana<br>EGFR en células A549 por Dot-Blot. .... | 54 |
| 7.     | DISCUSIÓN .....   | 56 |
| 8.     | CONCLUSIONES.....   | 60 |
| 9.     | REFERENCIAS .....   | 61 |
| 10.    | RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....  | 67 |

## LISTA DE TABLAS

| <b>Tabla</b>   | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos usados para amplificar el fragmento de anticuerpo.  | 34            |
| <b>Tabla 2.</b> Mezcla de reacción, PCR punto final.....   | 34            |
| <b>Tabla 3.</b> Condiciones de reacción, PCR punto final. ....   | 35            |
| <b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción de digestión de los fragmentos de anticuerpo. ...   | 35            |
| <b>Tabla 5.</b> Mezcla de reacción de digestión del vector pCEFL-EGFP.....   | 36            |
| <b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción de ligación vector-inserto.....   | 37            |
| <b>Tabla 7.</b> Mezcla de reacción, PCR punto final con primers T7.....  | 38            |
| <b>Tabla 8.</b> Condiciones de reacción, PCR punto final. ....   | 38            |
| <b>Tabla 9.</b> Secuencia de aminoácidos de cetuximab.....   | 42            |
| <b>Tabla 10.</b> Secuencia de aminoácidos que conforma al fragmento huscFv (243 aminoácidos). En negritas el linker flexible (G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> ..... | 48            |

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Figura 1.</b> Número de nuevos casos en 2022, ambos sexos, todas las edades.<br>Organización Mundial de la Salud, Observatorio Global del Cáncer; 2022<br>[Consultado en Abril 2024; Disponible en: <a href="https://gco.iarc.fr/today/en">https://gco.iarc.fr/today/en</a> ]..... | 15            |
| <b>Figura 2.</b> Formatos de anticuerpos a partir de IgG.....   | 19            |
| <b>Figura 3.</b> Metformina (Clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida) .....   | 21            |
| <b>Figura 4.</b> A) Cadena pesada, B) Cadena ligera, identificación de secuencias marco (FR1-4) y CDR´s (CDR1-3).....   | 43            |
| <b>Figura 5.</b> A) Cadena pesada, B) Cadena ligera, probabilidad de contacto entre aminoácidos pertenecientes a CDR´s y EGFR. ....   | 44            |
| <b>Figura 6.</b> Análisis de identidad de la cadena pesada VH con su contraparte homóloga en humanos. ....  | 45            |
| <b>Figura 7.</b> CDR grafting de la secuencia VH con su contraparte homóloga en humanos. ....   | 45            |
| <b>Figura 8.</b> Análisis de identidad de la cadena pesada VL con su contraparte homóloga en humanos .....  | 46            |
| <b>Figura 9.</b> CDR grafting de la secuencia VL con su contraparte homóloga en humanos. ....   | 46            |
| <b>Figura 10.</b> Análisis de humanización. A) Cadena pesada VH de cetuximab de origen murino (Z-score -1.269), B) Cadena pesada VH humanizada (Z-score 0.107).....   | 47            |



|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 11.</b> Análisis de humanización. A) Cadena ligera VL de cetuximab de origen murino (Z-score -1.568), B) Cadena ligera VL humanizada (Z-score 0.404).....  | 48 |
| <b>Figura 12.</b> Amplificación del gen que codifica para el fragmento de anticuerpo humanizado. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: huscFv (723 pb) y carril 3: control negativo. ....  | 49 |
| <b>Figura 13.</b> Digestión con enzimas de restricción del fragmento de anticuerpo humanizado. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: huscFv (723 pb). ....   | 50 |
| <b>Figura 14.</b> Digestión con enzimas de restricción del vector pCEFL. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Vector pCEFL linealizado con Bgl II y Bam HI. ....  | 51 |
| <b>Figura 15.</b> Amplificación del gen que codifica para el fragmento de anticuerpo humanizado. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-4: clonas positivas para huscFv (723 pb), carril 5: control negativo.....  | 52 |
| <b>Figura 16.</b> Ensayo de viabilidad por WST-1. Células A549 fueron tratadas con metformina (10, 20, 40, 60, 80 y 120 mM) por 48 h. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD y se compararon contra el grupo control (Control negativo, C-), **P<0.01, ***P<0.001 y ns: diferencia no significativa.....              | 53 |
| <b>Figura 17.</b> Ensayo de viabilidad por WST-1. Células A549 fueron tratadas con metformina 46 mM, huscFv y la combinación metformina (46 mM) + huscFv. Como control negativo (C-) células no tratadas, los datos se compararon contra el grupo control (Control negativo, C-). La diferencia estadística entre grupos fue |    |

analizada usando ANOVA de un factor, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 y ns: diferencia no significativa. .... 54

**Figura 18.** Análisis de afinidad por Dot Blot. A) Afinidad del huscFv sobre células A549, B) Cetuximab como control positivo y C) Lisado de células HEK293T como control negativo. .... 55

## NOMENCLATURA

|                  |  |
|------------------|--|
| °C               | Grados Centígrados                                   |
| μL               | Microlitro   |
| ADN              | Ácido Desoxirribonucleico                            |
| ATCC             | Colección de Cultivos de Tipo americano              |
| pb               | Pares de bases                                       |
| DH5α             | Cepa de <i>Escherichia coli</i> carente de nucleasas |
| dNTP's           | Desoxiribonucleótidos trifosfatados                  |
| μg               | Microgramo   |
| mL               | Mililitro  |
| M                | Molar  |
| DMEM             | Medio esencial mínimo modificado por Dulbeco         |
| mM               | Milimolar  |
| ng               | Nanogramos   |
| fmol             | Fentomolar   |
| PCR              | Reacción en cadena de la polimerasa                  |
| rpm              | revoluciones por minuto                              |
| xg               | Fuerza centrífuga en gravedades                      |
| WST-1            | Sal de Tetrazolio soluble en agua                    |
| h                | Hora   |
| min              | Minutos  |
| s                | Segundos   |
| LB               | Medio de cultivo Luria Bertani                       |
| VH               | Cadena variable pesada                               |
| VL               | Cadena variable ligera                               |
| IC <sub>50</sub> | Concentración inhibitoria media                      |
| MCS              | Sitio de clonación múltiple                          |
| CDR              | Región determinante de complementariedad             |

|        |  |
|--------|--|
| FAB    | Fragmento de unión al antígeno                           |
| scFv   | Fragmento variable de cadena sencilla                    |
| mAb    | Anticuerpo monoclonal                                    |
| IgG    | Inmunoglobulina G  |
| VPH    | Virus de Papiloma Humano                                 |
| OMS    | Organización Mundial de la Salud                         |
| RB     | Retinoblastoma   |
| TP53   | Proteína tumoral 53                                      |
| HAMA   | Anticuerpos humanos anti-ratón                           |
| AMPK   | Proteína cinasa activada por AMP                         |
| ELISA  | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas              |
| MTT    | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)2,5difeniltetrazol |
| Ni-NTA | Tris-nitriloacético cargado con níquel                   |
| PEG    | Polietilenglicol   |
| MET    | Metformina   |
| CaSki  | Células de papilomavirus humano 16                       |
| C33A   | Células epiteliales de carcinoma cervical                |
| HeLa   | Células epiteliales de adenocarcinoma cervical           |
| huscFv | Fragmento humanizado de cadena sencilla                  |
| EGFP   | Proteína mejorada verde fluorescente                     |

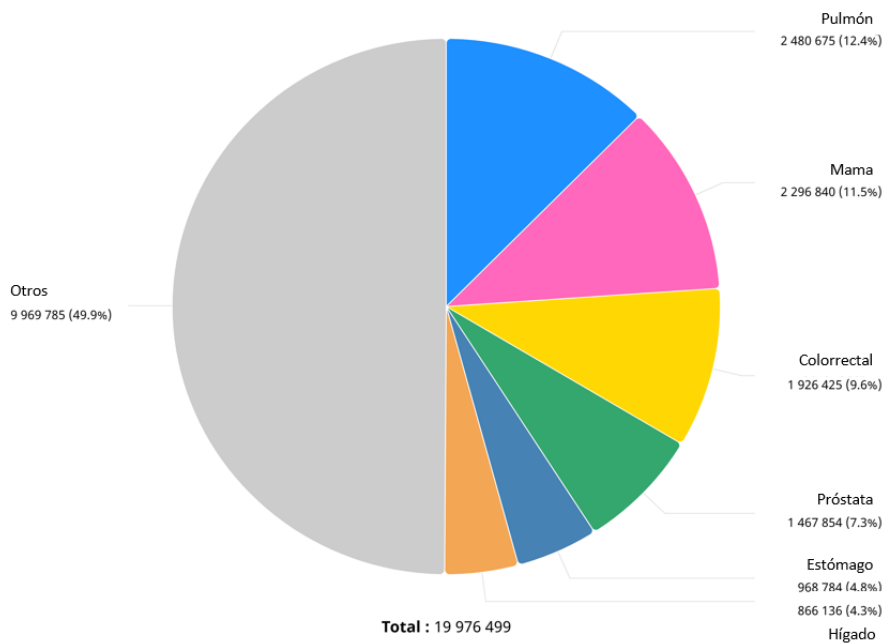
## **CAPITULO I**

### **1. INTRODUCCIÓN**

Los órganos y tejidos que conforman nuestro cuerpo conservan un equilibrio homeostático entre la regeneración y muerte celular. En circunstancias normales, el número de células se regenera y mantiene constante, sin embargo, diversos eventos moleculares propician la aparición de células que ya no se encuentran sujetas a los mecanismos normales que regulan el crecimiento celular (1). Estas células “transformadas” presentan la capacidad de crecer descontroladamente, evaden los mecanismos que inducen la muerte celular programada denominada apoptosis y son capaces de diseminarse a otros tejidos evadiendo el sistema inmunológico. El cáncer surge como un término empleado para describir un grupo de enfermedades que son el resultado de alteraciones celulares y que involucran procesos de desregulación de numerosos procesos biológicos (2).

Hay más de 100 tipos de cáncer, y se clasifican de acuerdo con el origen embrionario del tejido. Cerca del 90% se concentra en carcinomas, que tienen su origen en tejidos como la piel o el revestimiento epitelial de los órganos, por ejemplo, cáncer de colon, mama, próstata y pulmón. El 9% lo representan las leucemias y linfomas que afectan a células hematopoyéticas en médula ósea, y el 1% corresponde a sarcomas que se derivan de tejidos conjuntivos mesodérmicos como el hueso (3, 4).

A nivel mundial, se estima que en 2022 hubo 20 millones de nuevos casos de cáncer y 9.7 millones de muertes debido a esta enfermedad. Aproximadamente, 1 de cada 5 personas desarrollará cáncer en algún momento de su vida, y alrededor de 1 de cada 9 hombres y 1 de cada 12 mujeres fallecerán a causa de esta enfermedad. De acuerdo con las nuevas estimaciones del Observatorio Mundial del Cáncer CIIC (OMS), diez tipos de cáncer representaron en conjunto alrededor de dos tercios de los nuevos casos y muertes en todo el mundo en 2022. El cáncer de pulmón es el más frecuente con 2.5 millones de nuevos casos (12.4%), el cáncer de mama ocupó el segundo lugar con 2.3 millones de casos (11.6%), seguido del cáncer colorrectal (1.9 millones de casos, 9.6%), el cáncer de próstata (1.5 millones de casos, 7.3%) y el cáncer de estómago (970,000 casos, 4.9%), véase Figura 1 (5).



**Figura 1.** Número de nuevos casos en 2022, ambos sexos, todas las edades. Organización Mundial de la Salud, Observatorio Global del Cáncer; 2022 [Consultado en Abril 2024; Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/en>]

Las células cancerosas poseen características distintivas que les otorgan la capacidad biológica de crecer en forma de tumores y propagarse a otros tejidos (6), entre ellas destacan las siguientes:

- Autosuficiencia en señales de proliferación: La señalización en las células cancerosas se mantiene de manera constante de varias formas: la proliferación autocrina estimula la producción de ligandos similares al factor de crecimiento y la expresión de receptores correspondientes. Además, induce a las células normales del estroma a suministrar diversos factores de crecimiento. Por otro lado, el número de proteínas receptoras en la superficie celular puede modificarse, lo que hace que las células sean hiperreactivas a cantidades limitadas del ligando. Por otro lado, las alteraciones estructurales en la molécula receptora pueden facilitar la

activación independiente del ligando, lo que resulta en una activación constitutiva en las vías de señalización aguas abajo del receptor. Se sabe que las mutaciones somáticas "activadoras" en diversos tumores pueden inducir la activación de toda una red de señalización celular (7).

- Evasión de supresores del crecimiento: Los genes supresores de tumores codifican proteínas que controlan procesos celulares como la proliferación o la activación de programas de senescencia y apoptosis. La proteína RB, asociada al retinoblastoma, integra señales tanto extracelulares como intracelulares para determinar si una célula debe pasar por su ciclo celular. Por otro lado, TP53 responde a sensores de estrés y señales intracelulares, deteniendo el avance del ciclo celular si el genoma sufre daño excesivo, hay niveles elevados de glucosa u oxigenación, hasta que estas condiciones se normalicen, y de lo contrario, puede inducir la apoptosis (8). Algunas infecciones virales pueden desencadenar cáncer, como la proteína E7 del VPH, que al unirse a RB impide la detención del ciclo celular y provoca una proliferación celular descontrolada (9).
- Inducción de angiogénesis: Al igual que los tejidos normales, los tumores necesitan nutrientes y oxígeno, así como la eliminación de desechos metabólicos y dióxido de carbono. La angiogénesis es un proceso que se activa de forma transitoria en ciertos estados fisiológicos del organismo, pero está regulado por inductores e inhibidores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y la trombospondina 1 (TSP-1). Durante la progresión de un tumor, la angiogénesis permanece activa, y los factores angiogénicos como el VEGF aumentan su expresión a través



de señales oncogénicas que operan dentro de las células tumorales, como Ras y Myc. Se ha observado en modelos animales y en humanos que la angiogénesis se induce durante etapas tempranas del desarrollo de múltiples tipos de cánceres invasivos.

Entre el 5% y el 10% de todos los tipos de cáncer son hereditarios, mientras que el 90% al 95% restante se desarrolla debido a mutaciones genéticas causadas por agentes externos. Estos agentes incluyen la radiación ultravioleta y ionizante, carcinógenos químicos como las aflatoxinas y el arsénico, y carcinógenos biológicos como virus, bacterias y parásitos (10, 11).

La progresión de células normales a un estado neoplásico es un proceso de varias etapas en el que las células adquieren diversas características. Estas incluyen cambios en el metabolismo celular, angiogénesis, metástasis, evasión del sistema inmunológico, supresión del crecimiento, y finalmente, la desregulación de numerosos receptores de membrana. Estos receptores se consideran dianas moleculares específicas para dirigir moléculas efectoras con alta selectividad hacia células cancerígenas (12).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico, también conocido como ErbB1 o HER1, es una glicoproteína transmembranal con 1,186 residuos de aminoácidos. Pertenece a la familia de receptores tirosina cinasa y se expresa en la superficie de diversos tipos celulares. Cuando está activo, transmite señales al interior de la célula a través de vías de señalización como MAPK, PI3K-Akt y STAT, desencadenando procesos clave como el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la motilidad (13). La asociación de EGFR con el cáncer ha sido

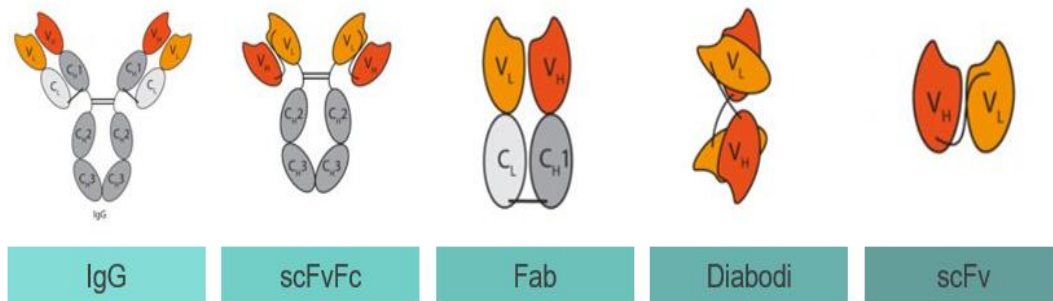
ampliamente documentada, lo que vincula su expresión desregulada en células de cáncer esofágico, de pulmón, mama y colon con procesos carcinogénicos, angiogénicos y de metástasis (14).

Actualmente se encuentra en el mercado un anticuerpo monoclonal quimérico (región variable de origen murino y región constante de origen humano) anti-EGFR en su formato de IgG (cetuximab) indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico en combinación con quimioterapia basada en irinotecán (antineoplásico, inhibidor de la topoisomerasa 1), pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello en combinación con radioterapia y para la enfermedad localmente avanzada en combinación con quimioterapia basada en platino para la enfermedad recurrente y/o metastásica.

Cetuximab desempeña su actividad biológica a través de la unión al dominio extracelular de EGFR previniendo la dimerización del receptor, lo cual es necesario para su activación y señalización. Además, induce la internalización de EGFR lo que puede conllevar una disminución de los receptores disponibles en la superficie celular (down-regulation, regulación a la baja) (15). A pesar de ser una molécula dirigida a células cancerosas que sobre expresan EGFR, cetuximab muestra tres inconvenientes: el primero radica en el tamaño de la molécula, las inmunoglobulinas IgG rondan los 150 kDa por lo que son incapaces de penetrar la masa tumoral, en segundo, se necesita de un agente antineoplásico que maximice su efecto, por lo tanto, carece de discriminación entre células normales y cancerosas característico de los antineoplásicos. El

tercer inconveniente radica en la producción de anticuerpos neutralizantes anti-ratón (respuesta HAMA) como respuesta contra los sitios de unión al antígeno de la región variable murina de cetuximab. Por lo tanto, sigue siendo un reto importante para el objetivo terapéutico dirigir moléculas con alta especificidad que sean capaces de penetrar en los tejidos tumorales sólidos (16).

A partir de anticuerpos de clase IgG, se han desarrollado formatos de cadena sencilla (scFv) en los cuales las regiones variables pesada (VH) y ligera (VL) son empalmadas por medio de un péptido flexible (Figura 2). Comparado con su contraparte completa IgG, los anticuerpos scFv son más pequeños y retienen los sitios de unión al antígeno (fragmento FAB). La reducción del tamaño de los anticuerpos les confiere ventajas, incluida la velocidad de penetración en el tumor y la eliminación rápida en circulación sanguínea (17).

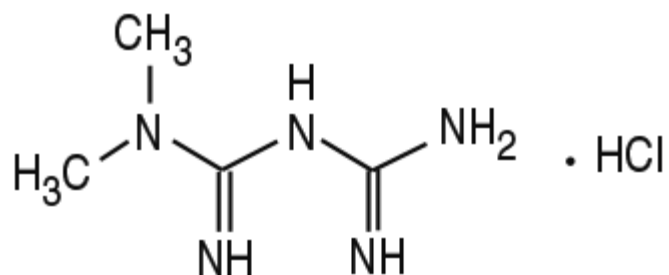


**Figura 2.** Formatos de anticuerpos a partir de IgG

Además de reducir el tamaño de los fragmentos scFv, la humanización de anticuerpos de cadena sencilla busca minimizar la respuesta inmune causada por la región variable murina de los anticuerpos quiméricos. Un método común para lograrlo es el injerto de Regiones Determinantes de Complementariedad,

CDR grafting, en el que las CDR murinas se extraen de la región variable y se insertan en secuencias de marcos de regiones variables de inmunoglobulinas humanas (18). Los fragmentos de anticuerpo han sido objeto de exhaustivas investigaciones y han evidenciado efectos biológicos en diversas líneas celulares cancerígenas, tanto como entidades moleculares independientes como conjugados con distintas sustancias, tales como citocinas, toxinas, ARN interferentes e incluso nanomateriales (19–23)

Metformina (clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida, Figura 3) es un fármaco ampliamente utilizado para tratar la diabetes tipo 2, una enfermedad metabólica caracterizada por la resistencia de los tejidos a la insulina. Esto resulta en una eliminación periférica inadecuada de glucosa, una inhibición deficiente de la gluconeogénesis y una producción hepática elevada de glucosa. La metformina ejerce su efecto principalmente en hepatocitos, miocitos, adipocitos y células  $\beta$ -pancreáticas, inhibiendo la producción de glucosa en el hígado y aumentando la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos. Esto se traduce en una mayor captación y consumo de glucosa por parte del músculo esquelético y los tejidos adiposos. Además, el tratamiento con metformina reduce la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ -pancreáticas. La proteína AMPK es crucial en la ejecución de estas funciones, regulando el metabolismo energético celular al reducir la síntesis de proteínas, ácidos grasos y colesterol, mientras aumenta la utilización de ácidos grasos (24, 25).



**Figura 3.** Metformina (Clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida)

Además de reducir los niveles de glucosa en sangre, estudios recientes sugieren que la metformina podría tener efectos positivos en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares, cáncer y el envejecimiento. Este compuesto, que actúa principalmente reduciendo la producción de glucosa en el hígado y aumentando la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, también se ha relacionado con efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antitumorales. A medida que se acumulan evidencias sobre los posibles beneficios adicionales de la metformina, su perfil de seguridad y su bajo costo la convierten en un candidato atractivo para la exploración de nuevas aplicaciones terapéuticas más allá de la diabetes (26–28).

## **CAPITULO II**

### **2. ANTECEDENTES**

El receptor EGFR es altamente expresado en cáncer de mama, pulmón, colorrectal y esofágico; además, cuando el receptor es activado por medio de su ligando, es internalizado en endosomas para ser degradado a través de la vía de degradación mediada por lisosomas, y reciclado a la superficie celular a través de la vía de reciclaje de receptores, o, por el contrario, translocado a otro compartimiento subcelular como el núcleo o mitocondria. El EGFR nuclear fue detectado hace dos décadas en la regeneración de hepatocitos y descrito en células y tejidos de muchos tipos de cáncer. EGFR representa una diana clave para el desarrollo de agentes terapéuticos, estos incluyen una variedad de moléculas de alta afinidad como los anticuerpos, péptidos y algunos compuestos naturales. El concepto de la aplicación de anticuerpos monoclonales anti-EGFR como un enfoque en la terapia del cáncer fue desarrollado por primera vez por Mendelsohn y colaboradores en 1987 (29).

En 2016, Akbari y colaboradores desarrollaron una nueva inmunotoxina humanizada anti-EGFR (huscFv-PE25) mediante la fusión genética de un fragmento variable de cadena única humanizada anti-EGFR (huscFv) con una exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* modificada (PE25KDEL). La reactividad y toxicidad de esta inmunotoxina con las células tumorales fueron evaluadas mediante procedimientos de dot-blot, ELISA y MTT. Los resultados del ELISA y del dot-blot indicaron que la inmunotoxina reconoce y se une eficientemente a las células tumorales que sobreexpresan EGFR. El ensayo MTT mostró un efecto inhibitorio específico sobre el crecimiento de las células A431 que sobreexpresan EGFR, sin ningún efecto inhibitorio sobre células que carecen de EGFR. En conclusión, los resultados de este estudio indicaron que huscFv-PE25 puede reconocer y ejercer un efecto inhibitorio sobre las células cancerosas que sobreexpresan EGFR, a pesar de su menor tamaño y menor inmunogenicidad (30).

En 2017, Banisadr y colaboradores diseñaron un anticuerpo humanizado de cadena sencilla (scFv) para dirigirse a células cancerosas que sobreexpresan EGFR. Para ello, injertaron bucles CDR de cetuximab en regiones de estructura primaria derivadas de secuencias germinales humanas de tipo 3 (VH3 y VL3 kappa) para obtener dominios VH y VL recombinantes unidos por un enlace flexible (Gly4Ser)<sub>3</sub>. El gen sintético que codifica el scFv se expresó en células *E. coli* Origami™ 2 (DE3) y el scFv resultante se purificó mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA. El scFv fue capaz de reconocer células cancerosas con sobreexpresión de EGFR (A431) a través de un ELISA, pero no pudo detectar

células cancerosas con bajos niveles de EGFR (células MCF-7). Aunque la afinidad del scFv por las células A431 fue 9 veces menor que la de cetuximab, fue lo suficientemente fuerte como para reconocer estas células. Considerando su capacidad para unirse a las moléculas de EGFR, el scFv puede tener una aplicación potencial para la detección de células cancerosas que sobreexpresan EGFR (31).

En 2020, Nguyen y colaboradores desarrollaron un sistema de nanovectores dirigidos (NV-scFv) para la entrega de RNA's interferentes (siRNA), compuesto por un nanocargador con propiedades de direccionamiento, un siRNA como agente farmacológico y polímeros catiónicos (quitosano, poli-L-arginina). El NV-scFv se basó en nanopartículas superparamagnéticas (SPION) marcadas con Dylight™680, una capa de PEG y un scFv anti-EGFR humanizado. La densidad de PEG se optimizó y el número de ligandos de direccionamiento por NV-scFv aumentó, lo que mejoró la internalización celular y la eficacia del sistema. Se realizó un diseño de experimentos para optimizar las relaciones de carga de quitosano/siRNA que influyeron significativamente en la protección del siRNA y el efecto de silenciamiento génico. Estos resultados demuestran la aplicación prometedora de NV-scFv para la entrega dirigida de siRNA en células de cáncer de mama triple negativo (23).

En 2019, Lee y colaboradores evaluaron liposomas encapsulantes de MET (LP-MET) y liposomas conjugados con Herceptin (Her-LP-MET) por su efecto anticancerígeno *in vitro* e *in vivo*. Her-LP-MET mostró una mayor inhibición de la proliferación de células madre de cáncer de mama (BCSCs) *in vitro* que MET



libre o LP-MET, así como un efecto antiproliferativo a largo plazo dependiente de la dosis. Además, el efecto de Her-LP-MET en BCSCs fue superior al de MET o LP-MET, y se potenció cuando se usó junto con doxorubicina (DOX). En un modelo de ratón, Her-LP-MET combinado con DOX libre fue más efectivo que MET libre, DOX libre o Her-LP-MET. Además, Her-LP-MET combinado con DOX libre produjo la remisión del tumor, mientras que DOX libre solo resultó en metástasis o muerte. Por lo tanto, este estudio sugiere que la formulación de Her-LP-MET proporcione una nueva modalidad terapéutica dirigida a BCSCs (32).

En 2020, Chen y colaboradores evaluaron los efectos de la metformina en células de cáncer cervical humano. En comparación con el grupo control, la metformina inhibió significativamente la viabilidad y migración celular, e indujo apoptosis y detención del ciclo celular en líneas celulares de cáncer CaSki y HeLa. Después del tratamiento con metformina, los niveles de expresión proteica de la p-quinasa activada por AMP (p-AMPK), que promueve la muerte celular, y la proteína supresora de tumores p53, se incrementaron notablemente en las células CaSki y C33A en comparación con el grupo control. Los resultados de este estudio sugieren que la metformina induce apoptosis mediada por AMPK, por lo tanto, la metformina puede servir como agente quimioterapéutico para el cáncer cervical humano (33).

En 2023, Bernal y colaboradores exploraron los efectos de la combinación de sotorasib y metformina en la citotoxicidad, apoptosis y la actividad de las vías MAPK y mTOR. Crearon curvas de dosis-respuesta para determinar la concentración de IC<sub>50</sub> de sotorasib y la IC<sub>10</sub> de metformina en tres líneas celulares

de cáncer de pulmón; A549 (KRAS G12S), H522 (KRAS tipo salvaje) y H23 (KRAS G12C). La citotoxicidad celular se evaluó mediante un ensayo MTT, la inducción de apoptosis mediante citometría de flujo y las vías MAPK y mTOR se evaluaron mediante Western blot. Los resultados mostraron un efecto sensibilizador de la metformina en el efecto de sotorasib en células con mutaciones de KRAS y un ligero efecto sensibilizador en células sin mutaciones de K-RAS. Además, se observó un efecto sinérgico en la citotoxicidad y la inducción de apoptosis, así como una notable inhibición de las vías MAPK y AKT-mTOR después del tratamiento con la combinación, predominantemente en células con mutaciones de KRAS (H23 y A549). La combinación de metformina con sotorasib potenció sinérgicamente la citotoxicidad y la inducción de apoptosis en células de cáncer de pulmón, independientemente del estado mutacional de KRAS (34).

## **CAPITULO III**

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son fundamentales en la terapia antitumoral y en el tratamiento de diversas enfermedades inmunológicas e infecciosas. Su desarrollo se ha perfeccionado desde la tecnología del hibridoma en 1975 hasta la actualidad, donde la ingeniería genética permite producirlos mediante tecnología de ADN recombinante. El receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR (HER1) es un objetivo terapéutico importante, especialmente en el cáncer, donde su sobreexpresión se asocia con varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de colon, riñón, pulmón, páncreas y cabeza y cuello. Cetuximab, un anticuerpo monoclonal quimérico, es un tratamiento aprobado para el cáncer de cabeza y cuello que bloquea la vía de señalización de EGFR. Sin embargo, sus regiones variables murinas pueden provocar respuestas inmunológicas adversas. Para abordar este problema, se ha utilizado el método de CDR grafting para humanizar los anticuerpos, conservando su afinidad y eficacia terapéutica.

Los anticuerpos humanizados de cadena única (scFv) resultantes son moléculas pequeñas que presentan una mejor distribución y penetración en el tejido tumoral, así como una farmacocinética más rápida que los anticuerpos completos de tipo IgG. Estos scFv han sido diseñados para dirigirse a EGFR, mostrando una fuerte actividad inhibitoria en células cancerosas.

Metformina, un agente antidiabético, ha ganado interés en la investigación del cáncer debido a su actividad antitumoral. Estudios han demostrado que metformina exhibe efectos antitumorales en varias líneas celulares de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, colon, pulmón, gástrico y pancreático. Además, en combinación con otros fármacos como doxorubicina, potencia su efecto antitumoral.

En este contexto, se propone el diseño de un anticuerpo humanizado anti-EGFR scFv usando CDR grafting y su evaluación en combinación con metformina en células de cáncer de pulmón A549 *in vitro*. Esta combinación podría representar una estrategia terapéutica efectiva para el tratamiento del cáncer de pulmón y posiblemente de otros tipos de cáncer.

## CAPITULO IV

### 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 4.1. Hipótesis

“El anticuerpo humanizado scFv será capaz de unirse a su receptor e inducir un efecto anticancerígeno en combinación con metformina sobre células de cáncer de pulmón A549 *in-vitro*”.

#### 4.2. Objetivo General

Diseñar, clonar y evaluar la actividad biológica del anticuerpo humanizado huscFv en combinación con metformina sobre la línea celular A549 *in-vitro*.

#### 4.3. Objetivos Específicos

1. Obtención de secuencias del anticuerpo cetuximab y diseño del fragmento humanizado huscFv por inserción de CDR's.
2. Clonación molecular de la secuencia codificante huscFv en el vector de expresión eucariota pCEFL.

3. Evaluación *in-vitro* de la actividad anticancerígena de metformina en células A549.
4. Evaluación *in-vitro* de la actividad anticancerígena del fragmento huscFv y en combinación con metformina en células A549.
5. Análisis de afinidad del fragmento huscFv sobre receptores de membrana EGFR en células A549 por Dot-Blot.

## CAPÍTULO V

### 5. METODOLOGÍA

#### **5.1. Obtención de secuencias del anticuerpo cetuximab y diseño del fragmento humanizado huscFv por inserción de CDR's.**

##### 5.1.1. Obtención de secuencias del anticuerpo cetuximab.

Las secuencias de aminoácidos que conforman la región variable del anticuerpo comercial cetuximab (Merck; Burlington, MA, USA) se obtuvieron de la base de datos Protein (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) con número de acceso 1YY8\_B y 1YY8\_A para la cadena pesada y ligera respectivamente.

##### 5.1.2. Análisis de la región variable de la cadena pesada y ligera del anticuerpo cetuximab

A partir de las secuencias obtenidas del anticuerpo cetuximab, el análisis consistió en someter cada una de las cadenas pesada y ligera al servidor proABC (Prediction of antibody contacts, <https://wenmr.science.uu.nl/proabc2/>) el cual

identificó las secuencias de aminoácidos que corresponden a las tres CDR's, así como las cuatro secuencias marcos de cada cadena de la región variable. Además, se obtuvieron los análisis de probabilidad de contacto para la cadena principal y lateral de los átomos (main/side chain) que corresponden al subconjunto de residuos de aminoácidos que entran en contacto con el receptor de EGFR (35, 36).

### 5.1.3. Diseño del formato huscFv por inserción de CDR's y análisis de humanización.

Las secuencias de aminoácidos que conforman la región variable de Cetuximab se sometieron a un análisis de identidad para su contraparte homóloga en humanos, con ayuda de la herramienta bioinformática Protein Blast (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se obtuvo una secuencia con número de acceso ACS96128.1 para la cadena pesada VH y una secuencia con número de acceso BAC01586.1 para la cadena ligera VL. Las secuencias se seleccionaron de acuerdo con el grado de identidad y similitud en humanos. Los CDR's fueron empalmados (CDR grafting) entre cada una de las secuencias marco seleccionadas y las secuencias resultantes fueron sometidas al servidor Antibodies (<http://www.bioinf.org.uk/abs/shab/>) para determinar el grado de humanización mediante el parámetro Z-score. El servidor Antibodies indica cuántas desviaciones estándar hay por encima o por debajo de la media de un número de secuencias humanas de inmunoglobulinas reportadas en la base de datos KabatMan (<http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>). Una puntuación de Z-score de cero representa una secuencia que muestra una



similitud media con respecto a secuencias humanas en bases de datos del IMGT, una puntuación positiva mayor a cero representa una secuencia que en promedio muestra una mayor identidad con secuencias humanas, por el contrario, una puntuación negativa debajo de cero representa una secuencia con un carácter menos humano (37).

#### 5.1.4. Acoplamiento de secuencias para los fragmentos de anticuerpo

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a la cadena ligera y pesada de la región variable humanizadas fueron convertidas a secuencias nucleotídicas con ayuda de la herramienta Backtranseq (European Molecular Biology Laboratory, [https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_backtranseq/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/)). Ambas cadenas humanizadas fueron conectadas por un linker flexible de 15 aminoácidos (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> para generar el fragmento huscFv. La secuencia resultante que codifica el fragmento huscFv fue sintetizada por el laboratorio biotecnológico Gene Universal Inc. (Newark, DE, USA), el vector de propagación seleccionado fue pUC57.

### **5.2. Clonación molecular de la secuencia codificante huscFv en el vector de expresión eucariota pCEFL.**

#### 5.2.1. Preparación de productos génicos para su inserción en el vector

El método de choque térmico fue empleado para transformar la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  (Merck) y propagar el vector pUC57 que porta el gen para el fragmento huscFv, en placas de agar Luria-Bertani LB y ampicilina 100  $\mu$ g/mL (Merck) como marcador de selección (38). El ADN plasmídico se purificó a través de un kit

comercial Monarch® Plasmid Miniprep Kit (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se procedió a realizar la amplificación por PCR punto final del gen correspondiente para el fragmento de anticuerpo, los primers empleados se muestran en la Tabla 1. Siguiendo las especificaciones del fabricante, la mezcla y condiciones de reacción se muestran en las Tablas 2 y 3 respectivamente. Posteriormente se corroboró la integridad y tamaño de los amplicones obtenidos empleando un gel de agarosa al 1%, del cual, se purificaron por medio de un kit comercial Monarch® DNA Gel Extraction (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA).

|               |         |                                      |
|---------------|---------|--------------------------------------|
| <b>huscFv</b> | Forward | 5´ TAAGATCTGCCACCATGGAGACAGACACA3´   |
|               | Reverse | 5´ ATGGATCCTCACACTGTCCTCTTGATCTCC 3´ |

**Tabla 1.** Oligonucleótidos usados para amplificar el fragmento de anticuerpo

| <b>Componente</b>     | <b>Volumen/Concentración final</b> |
|-----------------------|------------------------------------|
| Agua Milli-Q          | 41 µL                              |
| Buffer (10X)          | 5 µL (1X)                          |
| dNTP´s (5 mM)         | 1 µL (200 µM)                      |
| Primer Fwd (10 µM)    | 1 µL (0.2 µM)                      |
| Primer Rev (10 µM)    | 1 µL (0.2 µM)                      |
| DNA template (500 ng) | 0.5 µL (5 ng)                      |
| Vent DNA polimerasa   | 0.5 µL (1 U)                       |
| Volumen total         | 50 µL                              |

**Tabla 2.** Mezcla de reacción, PCR punto final.

| <b>Paso</b>       | <b>Ciclos</b> | <b>Tiempo</b> | <b>Temperatura</b> |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|
| Desnaturalización | 1             | 3 min         | 95°C               |
| Desnaturalización | 35            | 30 s          | 95°C               |
| Alineamiento      |               | 30 s          | 59°C               |
| Elongación        |               | 1 min         | 72°C               |
| Extensión final   | 1             | 5 min         | 72°C               |

**Tabla 3.** Condiciones de reacción, PCR punto final.

### 5.2.2. Análisis de digestión del fragmento de anticuerpo

Una vez obtenido el gen puro que codifica para el fragmento, se procedió a digerir con enzimas de restricción *Bgl* II y *Bam* HI (Promega; Madison, WI, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción se muestra en la Tabla 4 y el tiempo de incubación fue de 1 h a 37°C. Al término de la reacción, se procedió a migrar un gel de agarosa al 1% para corroborar la integridad de la secuencia génica.

| <b>Componente</b>    | <b>Volumen/Concentración final</b> |
|----------------------|------------------------------------|
| Agua Milli-Q         | 5.5 µL                             |
| Buffer NEB 3.1 (10X) | 2.5 µL (1X)                        |
| Amplicones           | 15 µL (1 µg)                       |
| Enzima <i>Bgl</i> II | 1 µL (1 U)                         |
| Enzima <i>Bam</i> HI | 1 µL (1 U)                         |
| Volumen total        | 25 µL                              |

**Tabla 4.** Mezcla de reacción de digestión de los fragmentos de anticuerpo.

### 5.2.3. Obtención y tratamiento del vector de expresión

Para el análisis de expresión en el sistema eucariota HEK293T se empleó el vector pCEFL donado por el Dr. José Vázquez Prado (CINVESTAV-IPN, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; Ciudad de México, México). A partir de un Miniprep a una concentración de 100 ng/μL del vector pCEFL-EGFP, se preparó una digestión con enzimas de restricción *Bgl* II y *Bam* HI para liberar EGFP del sitio de clonación múltiple, la reacción se incubó durante 1 h a 37°C y la mezcla de reacción de digestión se muestra en la Tabla 5. Al término de la reacción, se procedió a migrar un gel de agarosa al 1%, del cual se extrajo y purificó el vector linealizado, por medio de un kit comercial Monarch® DNA Gel Extraction.

| <b>Componente</b>    | <b>Volumen/Concentración final</b> |
|----------------------|------------------------------------|
| Agua Milli-Q         | 6 μL                               |
| Buffer NEB 3.1 (10X) | 2 μL (1X)                          |
| Vector pCEFL-EGFP    | 10 μL (1 μg)                       |
| Enzima <i>Bgl</i> II | 1 μL (1 U)                         |
| Enzima <i>Bam</i> HI | 1 μL (1 U)                         |
| Volumen total        | 20 μL                              |

**Tabla 5.** Mezcla de reacción de digestión del vector pCEFL-EGFP.

### 5.2.4. Reacción de ligación del fragmento de anticuerpo con el vector de expresión pCEFL

Los productos de digestión vector e inserto fueron unidos covalentemente en una reacción catalizada por la enzima T4 ADN Ligasa (Invitrogen; Waltham, MA, USA) en una relación molecular 3:1 (inserto-vector), para dar como resultado

una molécula recombinante, la mezcla de reacción se muestra en la Tabla 6, la reacción se mantuvo por un periodo de incubación de 16 h a 25°C y un tiempo de inactivación de la enzima por 10 min a 65°C. El producto de ligación fue transformado y propagado empleando la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  en placas de agar LB/ampicilina (100  $\mu$ g/mL) durante un periodo de incubación de 16 h a 37°C. Posteriormente, tres colonias fueron inoculadas en tubos de 1.5 mL con 1 mL de medio LB/Ampicilina (100  $\mu$ g/mL) se incubaron a 37°C durante 4 h sin agitación. Pasado el tiempo de incubación, 5  $\mu$ L de cada cultivo se diluyeron con 45  $\mu$ L de agua Milli-Q (18,2 M $\Omega$ ·cm, Merck) en tubos de 1.5 mL y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 5 min; transcurrido este tiempo, 3  $\mu$ L de cada muestra fueron empleados para un análisis de identidad por PCR punto final, la mezcla y condiciones de reacción se muestran en la Tabla 7 y 8. El resto del volumen de los cultivos se mantuvo en resguardo a 4°C, una vez confirmada la construcción por PCR, se procedió a la extracción de plásmidos con el kit comercial Monarch<sup>®</sup> Plasmid Miniprep.

| <b>Componente</b>    | <b>Volumen/Concentración final</b> |
|----------------------|------------------------------------|
| Agua Milli-Q         | 5 $\mu$ L                          |
| Buffer 10X           | 3 $\mu$ L (1X)                     |
| Vector               | 16 $\mu$ L (50 fmol)               |
| Inserto              | 5 $\mu$ L (150 fmol)               |
| Enzima T4 ADN Ligasa | 1 $\mu$ L (5 U)                    |
| Volumen total        | 30 $\mu$ L                         |

**Tabla 6.** Mezcla de reacción de ligación vector-inserto.

| <b>Componente</b>           | <b>Volumen/Concentración final</b> |
|-----------------------------|------------------------------------|
| Agua Milli-Q                | 34 $\mu$ L                         |
| Buffer (5X)                 | 10 $\mu$ L (1X)                    |
| dNTP's (5 mM)               | Incluidos en el Buffer             |
| Primer Forward (10 $\mu$ M) | 1 $\mu$ L (0.2 $\mu$ M)            |
| Primer Reverse (10 $\mu$ M) | 1 $\mu$ L (0.2 $\mu$ M)            |
| DNA template                | 3 $\mu$ L                          |
| Taq DNA polimerasa          | 1 $\mu$ L (5 U)                    |
| Volumen total               | 50 $\mu$ L                         |

**Tabla 7.** Mezcla de reacción, PCR punto final con primers T7.

| <b>Paso</b>       | <b>Ciclos</b> | <b>Tiempo</b> | <b>Temperatura</b> |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------|
| Desnaturalización | 1             | 3 min         | 95°C               |
| Desnaturalización | 35            | 30 s          | 95°C               |
| Alineamiento      |               | 30 s          | 59°C               |
| Elongación        |               | 1 min 30 s    | 72°C               |
| Extensión final   | 1             | 5 min         | 72°C               |

**Tabla 8.** Condiciones de reacción, PCR punto final.

### **5.3. Evaluación biológica *in-vitro* por WST-1**

El ensayo de WST-1 nos permitirá determinar la actividad anticancerígena, y se fundamenta en la reducción de sales de tetrazolio a formazan por actividad de enzimas deshidrogenasas mitocondriales en células metabólicamente activas. Primeramente, se evaluó el efecto inhibitorio de metformina (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA) en la viabilidad celular empleando el reactivo WST-1 (Merck). Células A549 (ATCC® CCL-185™; Manassas, VA, USA) fueron cultivadas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos

(100  $\mu$ L,  $5 \times 10^3$  células por pocillo) en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Después de 24 h, 6 diferentes concentraciones de metformina fueron evaluadas (10, 20, 40, 60, 80 y 120 mM) por 48 h. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco con WST-1 (1:10 dilución final) y se incubó durante 1 h, después se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (BioTek, Vermont, USA). Células no tratadas fueron usadas como control negativo. Para determinar la concentración inhibitoria media IC<sub>50</sub> se empleó la herramienta online AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

Para evaluar el efecto inhibitorio del huscFv se hizo un ensayo de co-cultivo sin contacto empleando insertos permeables Transwell 24-pocillos (Corning Inc.; New York, NY, USA) de un tamaño de poro de 0.4  $\mu$ m. En una placa de 24 pocillos se sembraron células A549 (700  $\mu$ L,  $2 \times 10^4$  células por pocillo) y en pocillos adyacentes se colocaron los insertos permeables sembrados con 700  $\mu$ L,  $2 \times 10^4$  células HEK293T (ATCC® CRL-3216; donada por el Departamento de fisiología y Neurodesarrollo del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México) por pocillo. Después de 24 h de incubación, el medio de crecimiento que contienen las células HEK293T fue reemplazado por medio DMEM fresco y se procedió a transfectar 1  $\mu$ g por pocillo de la construcción pCEFL/huscFv con el reactivo de transfección Xfect™ (Clontech Takara; San Jose, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posterior a las 4 h de la transfección, los insertos fueron colocados dentro de los pocillos que contienen

la monocapa de células A549 y se incubó por un periodo de 48 h. Para el ensayo huscFv + metformina se agregó la concentración estimada IC<sub>50</sub> de metformina dentro de los pocillos de células A549 por 48 h, se colectó el medio de cultivo de ambos ensayos para el ensayo Dot-Blot. La viabilidad se midió usando la monocapa de células A549 empleando el ensayo de WST-1 previamente descrito, se emplearon células sin tratamiento como control negativo.

#### **5.4. Análisis de afinidad del fragmento huscFv sobre receptores de membrana EGFR en células A549 por Dot-Blot.**

Para analizar la expresión y afinidad del huscFv sobre EGFR se empleó la técnica de Dot-Blot. Se depositó el lisado de  $1 \times 10^5$  células A549 sobre una membrana de nitrocelulosa (Sigma Aldrich) y se mantuvieron a 37°C durante 1 h, células HEK293T fueron usadas como control negativo. Los sitios no específicos de la membrana se bloquearon por inmersión en una solución de bloqueo (5% leche libre de grasas en PBS-T) por 1 h con agitación a temperatura ambiente. Se emplearon los 700  $\mu$ L de cultivo post-transfección y cetuximab comercial como control positivo, ambos fueron adicionados a la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con PBS-T (PBS con 0.05 Tween 20) y se agregó HRP-protein L 0.5  $\mu$ g/mL (GenScript; Piscataway, NJ, USA) en solución de bloqueo como anticuerpo secundario por 1 h. Después de descartar la solución de HRP-protein L y tres lavados con PBS-T, la membrana se sumergió en una solución de substrato DAB 3,3'-diaminobenzidina



tetrahidrocloruro (Thermo Fisher Scientific) hasta la aparición de un precipitado marrón.

### **5.5. Análisis estadístico**

El análisis de datos fue llevado a cabo usando el software GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). Los resultados son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (SD), se usó el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey para comparar los datos. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### **5.6. Manejo de residuos**

Los residuos químicos y biológicos se dispusieron en diversos contenedores etiquetados como:

- A. Soluciones salinas pH 6.8, soluciones de: sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, orgánicos y bases inorgánicas.
- D. Tóxicos inflamables, combinaciones orgánicas halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas.
- E. Muy tóxico, cancerígeno orgánico.

Estos contenedores se encuentran estratégicamente ubicados en el Laboratorio de Farmacología y Modelos Biológicos de la División de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas.

## CAPÍTULO VI

### 6. RESULTADOS

#### 6.1. Diseño del fragmento humanizado huscFv

##### 6.1.1. Obtención de secuencias del anticuerpo cetuximab

Las secuencias de aminoácidos que corresponden para la cadena pesada y ligera de cetuximab IgG se obtuvieron de la base de datos Protein con número de acceso 1YY8\_B y 1YY8\_A conformadas por 449 y 214 aminoácidos. La Tabla 9 muestra las secuencias correspondientes.

| Nombre        | Secuencia  |
|---------------|--|
| Cadena pesada | QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLGVIWGGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSKVFFK<br>MNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS<br>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF<br>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Cadena ligera | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSDFTLSINSVESEDIADY<br>YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD<br>SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |

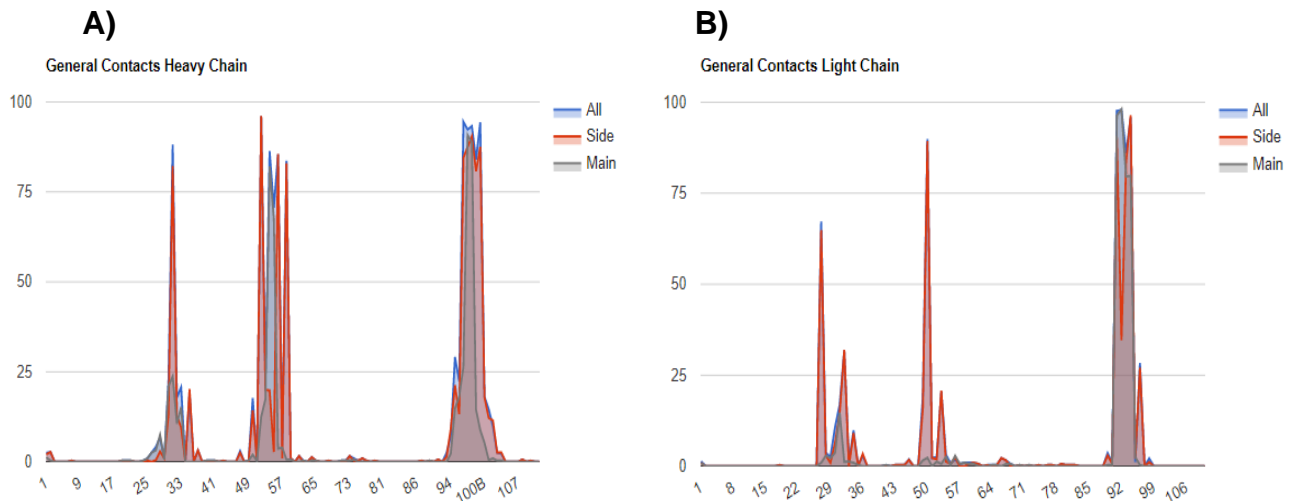
**Tabla 9.** Secuencia de aminoácidos de cetuximab.

### 6.1.2. Análisis de la región variable de la cadena pesada y ligera de cetuximab

A partir de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera se identificó la región variable que está conformada por tres CDR's intercaladas entre cuatro secuencias marco, la Figura 4 muestra el análisis. En la Figura 5 se observan los datos de probabilidad superior al 75% para la cadena principal y lateral de los átomos (main/side chain) que corresponden al subconjunto de aminoácidos que entran en contacto con el EGFR.

| A)   | B)  |
|--|---|
| <pre> Heavy Chain: QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLG IWSGGNTDYNTPTFTRLSINKDNSKQVFFKMNLSQNDTAIYYCARALT YYDYEFAYWGGTLVTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTY ICNHNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSIVLTVLHQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK  Heavy Chain FR1: QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLT Heavy Chain CDR1: N-----YGVH Heavy Chain FR2: IWRQSPGKLEWLG Heavy Chain CDR2: VIW-----SGGNTDYNTPTFS Heavy Chain FR3: RLSINKDNSKQVFFKMNLSQNDTAIYYCAR Heavy Chain CDR3: ALTYDYEF-----AY Heavy Chain FR4: WGGTLVTVS- VH gene: IGHV2-2*03 Mus musculus_BALB/c VH gene sequence: QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLG IWSGGNTDYNAAFISRLSINKDNSKQVFFKMNLSQNDTAIYYCAR H1 CS:1,Length:5 H2 CS:1,Length:16 H3 CS:bulaed.Length:11 </pre> | <pre> DILLTQSPVILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIK ASEISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNINWPTTGA Input Light Chain: GTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQMKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC  Light Chain FR1: DILLTQSPVILSVSPGERVSVFSC Light Chain CDR1: RASQSIG-----TNIH Light Chain FR2: WYQRTNGSPRLLIK Light Chain CDR2: Y-----ASESIS Light Chain FR3: GIPSRFSGSGSG-----TDFTLINSVESEDIADYYC Light Chain CDR3: QQNINWPTTGA Light Chain FR4: FGAGTKLELKRVA VL gene: IGKV5-48*01 Mus musculus_BALB/c VL gene sequence: DILLTQSPVILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIK ASEISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNINWPTTGA L1 CS:kappa_2,Length:11 L2 CS:kappa_1,Length:7 L3 CS:kappa_1,Length:9 </pre> |

**Figura 4.** A) Cadena pesada, B) Cadena ligera, identificación de secuencias marco (FR1-4) y CDR's (CDR1-3).



**Figura 5.** A) Cadena pesada, B) Cadena ligera, probabilidad de contacto entre aminoácidos pertenecientes a CDR´s y EGFR.

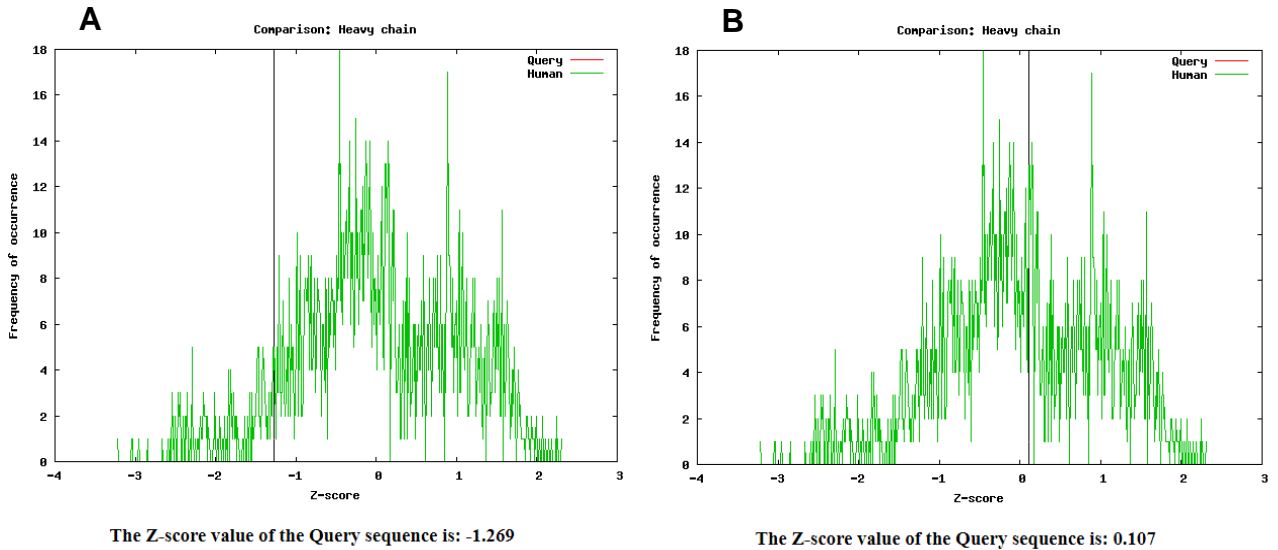
### 6.1.3. Diseño del formato scFv/EGFR por inserción de CDR´s y análisis de humanización.

La secuencia de la cadena pesada VH con número de acceso ACS96128.1 mostró un grado de identidad del 55% para su contraparte homóloga en humanos, como se observa en la Figura 6. El siguiente paso consistió en cambiar las cuatro secuencias marco (FR´s) sin modificar las secuencias CDR´s, lo que se conoce como CDR grafting, la secuencia humanizada se muestra en la Figura 7, los aminoácidos en negritas representan aquellos aminoácidos que se cambiaron y que por lo tanto no se compartían con la secuencia murina, los aminoácidos con un asterisco (\*) debajo, representan aquellos que se comparten entre ambas cadenas humana y murina, los aminoácidos entre corchetes corresponden a las tres CDR´s los cuales no se modificaron.

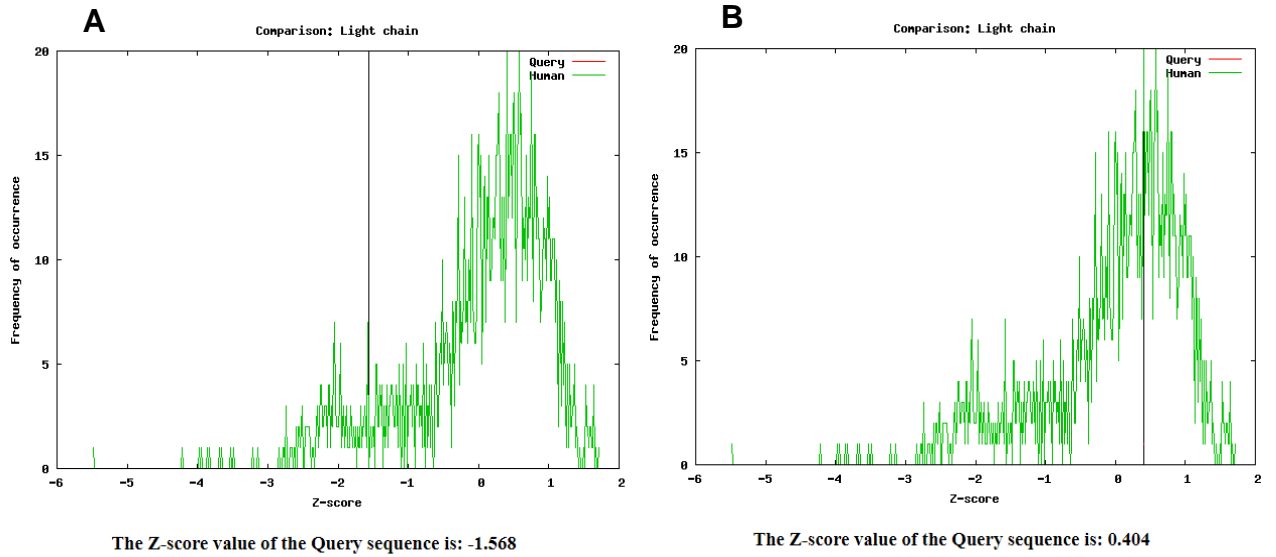




obtuvo un Z-score de -1.568 para la cadena ligera VL nativa de cetuximab, posterior a la humanización el Z-score incrementó a 0.404 grados de humanización, comparado con bases de datos antes mencionadas, véase Figura 11.



**Figura 10.** Análisis de humanización. A) Cadena pesada VH de cetuximab de origen murino (Z-score -1.269), B) Cadena pesada VH humanizada (Z-score 0.107).



**Figura 11.** Análisis de humanización. A) Cadena ligera VL de cetuximab de origen murino (Z-score -1.568), B) Cadena ligera VL humanizada (Z-score 0.404).

#### 6.1.4. Acoplamiento de secuencias para el fragmento de anticuerpo humanizado.

En la Tabla 10 se muestran la secuencia de aminoácidos para el fragmento de anticuerpo humanizado.

| Nombre | Secuencia   |
|--------|---|
| huscFv | EVQLVESGGGVVVRPGDSLRLSCEASGFLSNYGVHVVVRQAPGKLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLFTISRDNA<br>KNSLYLQMNSLRAEDTAFYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTV <b>SGGGGSGGGGSGGGGS</b> DVVMTQSPATLSVSP<br>GERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLLIKYASESISGIPARFSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQNNN<br>WPTTFGQGTKVEIKRT |

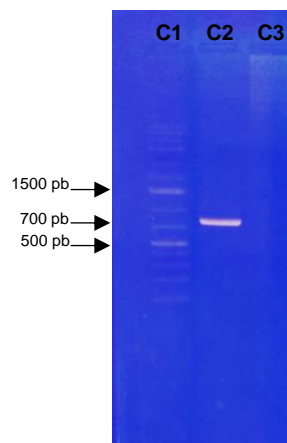
**Tabla 10.** Secuencia de aminoácidos que conforma al fragmento huscFv (243 aminoácidos). En negritas el linker flexible (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>.



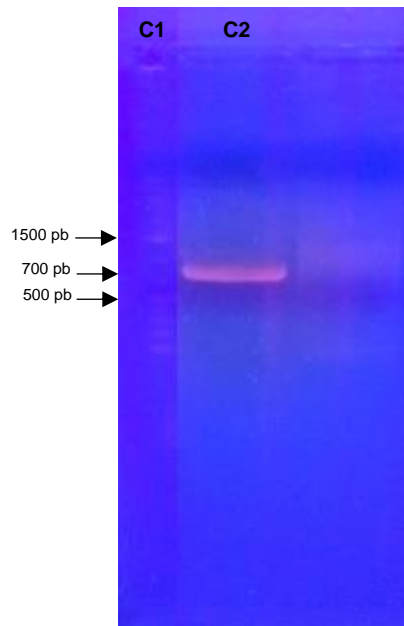
## 6.2. Clonación molecular

### 6.2.1. Preparación de productos génicos para su inserción en el vector

El gen que codifica para el fragmento de anticuerpo humanizado fue amplificado por PCR punto final, en la Figura 12 se muestra la integridad del amplicón obtenido con un tamaño de 723 bp. Una vez purificado el producto de PCR, se procedió con una digestión con enzimas de restricción *Bgl* II y *Bam* HI, la Figura 13 muestra un gel de agarosa al 1% con el producto de digestión.



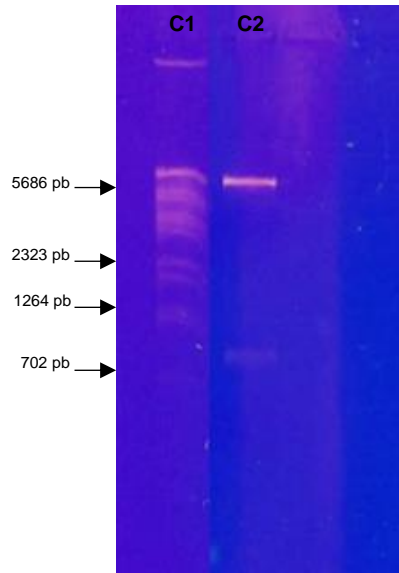
**Figura 12.** Amplificación del gen que codifica para el fragmento de anticuerpo humanizado. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: huscFv (723 pb) y carril 3: control negativo.



**Figura 13.** Digestión con enzimas de restricción del fragmento de anticuerpo humanizado. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: huscFv (723 pb).

#### 6.2.2. Obtención y tratamiento del vector de expresión

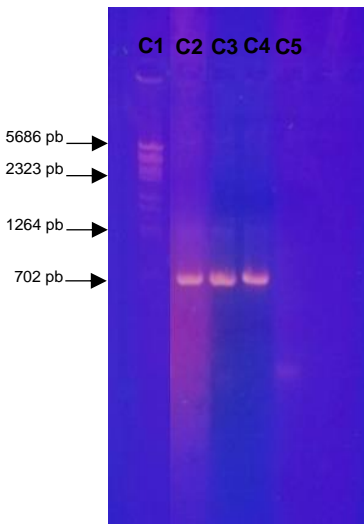
El vector pCEFL-EGFP se propagó en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  en presencia de ampicilina (100  $\mu$ g/mL), posteriormente fue aislado por medio de un estuche comercial para llevar a cabo la linealización con las enzimas de digestión *Bgl II* y *Bam HI*. La Figura 14 muestra la integridad del vector de expresión con un tamaño de 6759 bp, así como la liberación de un gen reportero que codifica para la proteína EGFP contenida en el sitio de clonación múltiple con un tamaño aproximado de 717 pb. Posteriormente, a partir del gel de agarosa se purificó el vector linealizado para su posterior uso en la reacción de ligación.



**Figura 14.** Digestión con enzimas de restricción del vector pCEFL. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Vector pCEFL linealizado con Bgl II y Bam HI.

### 6.2.3. Confirmación de clonas transformantes por PCR

A partir de la extracción de ADN plasmídico recombinante de tres colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se procedió a montar una reacción de PCR para cada extracción. En la Figura 15 se muestra la amplificación del fragmento huscFv con un tamaño de 723 pb, como control negativo la misma mezcla de reacción sin ADN plasmídico. Las moléculas de ADN plasmídico serán empleados para ensayos posteriores de subclonación y expresión proteica.

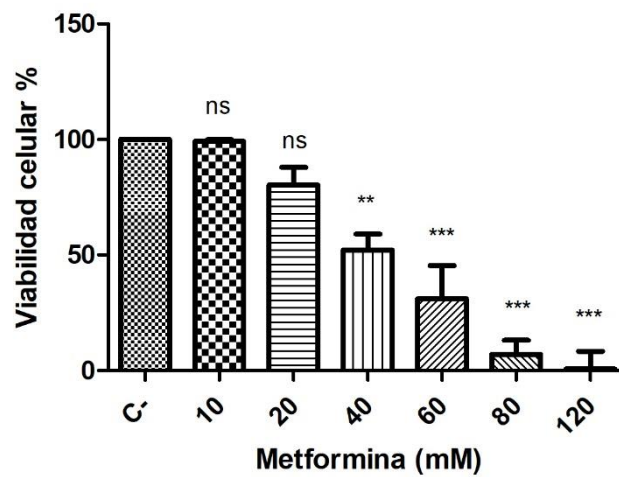


**Figura 15.** Amplificación del gen que codifica para el fragmento de anticuerpo humanizado. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-4: clonas positivas para huscFv (723 pb), carril 5: control negativo.

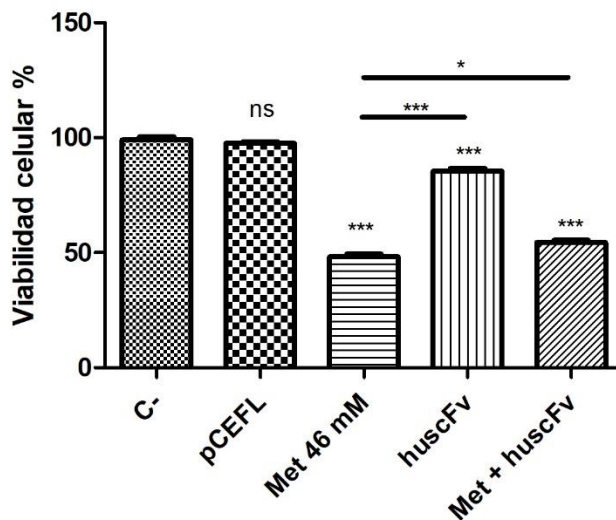
### 6.3. Evaluación biológica *in-vitro* por WST-1

Se evaluaron diversas concentraciones de metformina en la línea celular A549 durante 48 h y la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de WST-1. Como se muestra en la Figura 16, metformina exhibe un efecto dependiente de la dosis. A concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 120 mM, se observa una viabilidad del 99, 80, 52, 31, 7 y 1% respectivamente. El análisis estadístico revela diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) al comparar las concentraciones de 40, 60, 80 y 120 mM con respecto al control negativo; a las dosis de 10 y 20 mM no se observa una diferencia significativa. La concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de metformina se estimó en 46 mM. El efecto del huscFv y la combinación con metformina (46 mM) se evaluó sobre células A549 por el

mismo método. Nuestros resultados muestran que la viabilidad celular inhibe un 15% cuando se evalúa el huscFv sólo, en combinación con metformina se inhibe un 45% la viabilidad (Figura 17). Se empleó el vector pCEFL vacío como un control el cual no muestra actividad biológica sobre las células. La comparación entre los grupos de metformina y huscFv reveló una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).



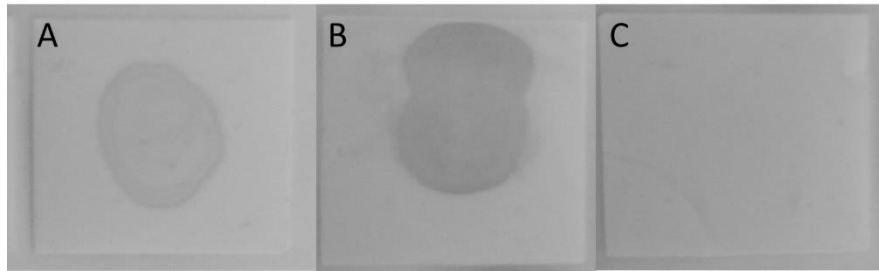
**Figura 16.** Ensayo de viabilidad por WST-1. Células A549 fueron tratadas con metformina (10, 20, 40, 60, 80 y 120 mM) por 48 h. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SD y se compararon contra el grupo control (Control negativo, C-), \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  y ns: diferencia no significativa.



**Figura 17.** Ensayo de viabilidad por WST-1. Células A549 fueron tratadas con metformina 46 mM, huscFv y la combinación metformina (46 mM) + huscFv. Como control negativo (C-) células no tratadas, los datos se compararon contra el grupo control (Control negativo, C-). La diferencia estadística entre grupos fue analizada usando ANOVA de un factor, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 y ns: diferencia no significativa.

#### **6.4. Análisis de afinidad del fragmento huscFv sobre receptores de membrana EGFR en células A549 por Dot-Blot.**

El análisis de afinidad por Dot Blot muestra que el huscFv es expresado por las células HEK293T y se encuentra presente en el medio de cultivo empleado en el ensayo, el huscFv y cetuximab reaccionaron con las células A549, huscFv no mostró reacción con células HEK293T control negativo (Figura 18).



**Figura 18.** Análisis de afinidad por Dot Blot. A) Afinidad del huscFv sobre células A549, B) Cetuximab como control positivo y C) Lisado de células HEK293T como control negativo.

## **CAPÍTULO VII**

### **7. DISCUSIÓN**

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se han considerado atractivos agentes terapéuticos contra el cáncer en las últimas décadas debido a su gran capacidad de unirse selectivamente a moléculas dianas específicas. Esto permite un enfoque directo para el desarrollo de moléculas anticancerígenas efectivas con una toxicidad menor en comparación con fármacos citotóxicos usados actualmente. Sin embargo, el tamaño de los anticuerpos, así como su origen no humano son dos factores importantes para su aplicación terapéutica (39). Además, los mAbs generados a partir de técnicas tradicionales que emplean la generación de hibridomas enfrentan el desafío de su potencial inmunogenicidad debido a las regiones de origen murino en su estructura (40). Para superar este obstáculo, se han implementado técnicas de humanización, y en este trabajo, se desarrolló un fragmento de anticuerpo humanizado anti-EGFR scFv (huscFv) a partir de la región variable de cetuximab. Las secuencias humanas donantes



seleccionadas, ACS96128 para VH y BAC01586.1 para VL, se utilizaron en el proceso de CDR-grafting. Antes de la humanización, estas secuencias compartían una similitud e identidad del 76% y 55% para la cadena pesada, y 82% y 66% para la cadena ligera, respectivamente, en comparación con cetuximab. Posterior a la humanización, se logró un aumento significativo en la similitud e identidad de las secuencias resultantes, alcanzando un 89% y 76% para VH, y 90% y 78% para VL, respectivamente, representando un incremento del 16.4% en la humanización. Este aumento se corroboró mediante el análisis de Z-score, que mostró un cambio de puntuación negativa a positiva en ambas cadenas de la región variable. El grado de humanización obtenido en este estudio es consistente con investigaciones previas que han logrado incrementos similares en la humanización de scFv (30, 41). Además, la observación de un aumento significativo en la similitud e identidad de las secuencias resultantes después del proceso de CDR grafting, así como el análisis de afinidad por Dot-Blot respaldan la eficacia de esta técnica en el diseño de anticuerpos humanizados. Esto coincide con los resultados obtenidos por otros autores, al utilizar un enfoque similar y lograr mantener la afinidad en el diseño de scFv en comparación con cetuximab (31). La eficiencia de este método, centrado en la similitud e identidad durante el CDR grafting, se traduce en una mayor correspondencia estructural a nivel de aminoácidos y, por ende, en la retención de la afinidad del anticuerpo resultante.

Por otro lado, nos propusimos examinar el efecto antiproliferativo de metformina en células A549 mediante el ensayo WST-1. Los resultados indican una relación

dosis-respuesta, donde mayores concentraciones de metformina se asocian con una disminución progresiva en la viabilidad celular. Esto fue útil para determinar la concentración media inhibitoria de metformina ( $IC_{50}$ , 46 mM) para minimizar la toxicidad celular mientras se mantiene la eficacia. Estos resultados son consistentes con múltiples informes previos donde metformina ha destacado por el efecto antiproliferativo en células A549 y H460 mediado por la activación de la vía de AMPK, un sensor clave en la respuesta al estrés energético celular (42). En otras líneas celulares como RPMI8226 y U266 (células de cáncer de mieloma múltiple), metformina exhibe un  $IC_{50}$  de 20.2 y 17.9 mM respectivamente; y en células HeLa (células de carcinoma cervical) un  $IC_{50}$  de 60 mM (43, 44). Esta observación también se alinea con otros estudios en distintas líneas celulares de cáncer donde Metformina induce autofagia y arresto del ciclo celular en células RPMI8226 y U266; y apoptosis en células CaSki, C33A y HeLa a través de las vías de señalización AMPK/p53 y PI3K/AKT/mTOR (20, 33). Además, estudios recientes indican que metformina provoca la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la muerte celular por apoptosis en células HCT116 (45). Los resultados obtenidos en nuestros ensayos refuerzan consistentemente estos informes previos, sugiriendo que metformina podría estar ejerciendo su efecto biológico al inducir la muerte celular a través de la regulación de la vía de señalización AMPK, que emerge como un regulador fundamental del metabolismo celular. Finalmente, de forma individual se observa que el huscFv reduce la viabilidad celular en un 15% y en combinación con metformina (46mM) se logra una reducción del 45% en comparación con el tratamiento individual de metformina que resulta en una disminución del 50% en la viabilidad celular. Esto

sugiere una posible interacción entre los tratamientos lo cual parece modular la reducción de la viabilidad celular causada por metformina sola. Nosotros no observamos un efecto sinérgico entre ambas moléculas. Algunos estudios previos indican que metformina exhibe un efecto sinérgico con diversas estrategias terapéuticas tradicionales, así como el uso con anticuerpos monoclonales (46–49). Por ejemplo, el desarrollo de una formulación de liposomas que incorpora Herceptin y metformina representa un enfoque terapéutico novedoso y prometedor para el tratamiento del cáncer de mama (50). Se ha demostrado que el uso simultáneo de inhibidores de la tirosina cinasa (TKI) en combinación con metformina mejora significativamente los resultados clínicos y retrasa la aparición de resistencia a los EGFR-TKI (51). Los fragmentos de anticuerpo han sido objeto de exhaustivas investigaciones y han evidenciado efectos biológicos en diversas líneas celulares cancerígenas, tanto como entidades moleculares independientes como conjugados con distintas sustancias, tales como citocinas, toxinas, ARN interferentes e incluso nanomateriales (19, 21–23, 52, 53). Es posible que se necesiten más experimentos y análisis para comprender completamente la interacción entre metformina y los huscFv. A pesar de que este tipo de anticuerpo no mejore el efecto citotóxico de metformina podría estar ejerciendo un efecto protector sobre las células.

## CAPÍTULO VIII

### 8. CONCLUSIONES

- Las secuencias humanas donantes de secuencias marco seleccionadas por similitud e identidad permitieron retener la afinidad del fragmento de anticuerpo huscFv sobre el receptor EGFR.
- El método de CDR grafting permitió un incremento del 16.4% en el grado de humanización del anticuerpo huscFv.
- Metformina tiene un efecto dependiente de la dosis, a 46 mM inhibe el 50% de viabilidad de células de cáncer de pulmón A549 *in-vitro*.
- El fragmento de anticuerpo huscFv inhibe el 15% de la viabilidad en células A549 *in-vitro*.
- No se observa un efecto sinérgico en la combinación de metformina y huscFv, lo que sugiere una interacción que modula la reducción de la viabilidad celular inducida por metformina

## 9. REFERENCIAS

- 1 Lambert AW, Pattabiraman DR and Weinberg RA: Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 168: 670–691, 2017. PMID: 28187288. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037.
- 2 Jemal A, Center MM, De Santis C and Ward EM: Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 19: 1893–1907, 2010. PMID: 20647400. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0437.
- 3 Kuby D: *Immunology*, 2013.
- 4 Yin W, Wang J, Jiang L and James Kang Y: Cancer and stem cells. *Exp Biol Med* 246: 1791–1801, 2021.
- 5 Organización Mundial de la Salud: *Crece la carga mundial de cáncer en medio de una creciente necesidad de servicios.*, 2024.
- 6 Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646–674, 2011. PMID: 21376230. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 7 Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A and Moses HL: Transforming growth factor- $\beta$  signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research* 6: 1521–1533, 2008. PMID: 18922968. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203.
- 8 Burkhart DL and Sage J: Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 8: 671–682, 2008. PMID: 18650841. DOI: 10.1038/nrc2399.
- 9 Richards KH, Doble R, Wasson CW, Haider M, Blair GE, Wittmann M and Macdonald A: Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Increases Production of the Anti-Inflammatory Interleukin-18 Binding Protein in Keratinocytes. *J Virol* 88: 4173–4179, 2014. DOI: 10.1128/jvi.02546-13.
- 10 Clark AG and Vignjevic DM: Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol* 36: 13–22, 2015. PMID: 26183445. DOI: 10.1016/j.ceb.2015.06.004.
- 11 Oh JK and Weiderpass E: Infection and cancer: Global distribution and burden of diseases. *Ann Glob Health* 80: 384–392, 2014. PMID: 25512154. DOI: 10.1016/j.aogh.2014.09.013.

- 12 Alagkiozidis I, Facciabene A, Tsiatas M, Carpenito C, Benencia F, Adams S, Jonak Z, June CH, Powell DJ and Coukos G: Time-dependent cytotoxic drugs selectively cooperate with IL-18 for cancer chemo-immunotherapy. *J Transl Med* 9: 77, 2011. PMID: 21609494. DOI: 10.1186/1479-5876-9-77.
- 13 Nguyen LT, Yang XZ, Du X, Wang JW, Zhang R, Zhao J, Wang FJ, Dong Y and Li PF: Enhancing tumor-specific intracellular delivering efficiency of cell-penetrating peptide by fusion with a peptide targeting to EGFR. *Amino Acids* 47: 997–1006, 2015. DOI: 10.1007/s00726-015-1928-y.
- 14 Bakker J, Spits M, Neefjes J and Berlin I: The EGFR odyssey – from activation to destruction in space and time. *J Cell Sci* 130: 4087–4096, 2017. PMID: 29180516. DOI: 10.1242/jcs.209197.
- 15 Henson E, Chen Y and Gibson S: EGFR family members' regulation of autophagy is at a crossroads of cell survival and death in cancer. *Cancers (Basel)* 9: 1–13, 2017. PMID: 28338617. DOI: 10.3390/cancers9040027.
- 16 Kiesgen S, Arndt MAE, Körber C, Arnold U, Weber T, Halama N, Keller A, Bötticher B, Schlegelmilch A, Liebers N, Cremer M, Herold-Mende C, Dyckhoff G, Federspil PA, Jensen AD, Jäger D, Kontermann RE, Mier W and Krauss J: An EGF receptor targeting Ranpirnase-diabody fusion protein mediates potent antitumour activity in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 357: 364–373, 2015. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.11.054.
- 17 Lu J, Peng Y, Zheng ZJ, Pan JH, Zhang Y and Bai Y: EGF-IL-18 fusion protein as a potential anti-tumor reagent by induction of immune response and apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett* 260: 187–197, 2008. PMID: 18160214. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.10.042.
- 18 Khantasup K, Chantima W, Sangma C, Poomputsa K and Dharakul T: Design and Generation of Humanized Single-chain Fv Derived from Mouse Hybridoma for Potential Targeting Application. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 34: 404–417, 2015. PMID: 26683180. DOI: 10.1089/mab.2015.0036.
- 19 Bemani P, Mohammadi M and Hakakian A: Anti-ROR1 scFv-EndoG as a novel anti-cancer therapeutic drug. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 19: 97–102, 2018. PMID: 29373898. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.1.97.
- 20 Peng XH, Wang Y, Huang D, Wang Y, Shin HJ, Chen Z, Spewak MB, Mao H, Wang X, Wang Y, Chen Z, Nie S and Shin DM: Targeted delivery of cisplatin to lung cancer using ScFvEGFR-heparin- cisplatin nanoparticles. *ACS Nano* 5: 9480–9493, 2011. PMID: 22032622. DOI: 10.1021/nn202410f.

- 21 Manivasagan P, Nguyen VT, Jun SW, Hoang G, Mondal S, Kim H, Doan VHM, Kim J, Kim CS and Oh J: Anti-EGFR antibody conjugated thiol chitosan-layered gold nanoshells for dual-modal imaging-guided cancer combination therapy. *Journal of Controlled Release* 311–312: 26–42, 2019. PMID: 31401198. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.08.007.
- 22 Karam S, Raigani M, Afshar SH, Talebkhan Y, Bayat E, Komijani S, Nematollahi L, Barkhordari F, Ardestani MS and Davami F: Production of an antibody fragment (Scfv) targeting pcrv protein of pseudomonas aeruginosa in fed-batch cultivation mode. *Iran Biomed J* 25: 390–398, 2021. PMID: 34641643. DOI: 10.52547/IBJ.25.6.390.
- 23 Nguyen PV, Hervé-Aubert K, David S, Lautram N, Passirani C, Chourpa I, Aubrey N and Allard-Vannier E: Targeted nanomedicine with anti-EGFR scFv for siRNA delivery into triple negative breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 157: 74–84, 2020. PMID: 33059006. DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.10.004.
- 24 Yu X, Mao W, Zhai Y, Tong C, Liu M, Ma L, Yu X and Li S: Anti-tumor activity of metformin: from metabolic and epigenetic perspectives, 2017.
- 25 Vancura A, Bu P, Bhagwat M, Zeng J and Vancurova I: Metformin as an Anticancer Agent. *Trends Pharmacol Sci* 39: 867–878, 2018.
- 26 Wang Y, Xu W, Yan Z, Zhao W, Mi J, Li J and Yan H: Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 37, 2018. PMID: 29554968. DOI: 10.1186/s13046-018-0731-5.
- 27 Luo Z, Zhu T, Luo W, Lv Y, Zhang L, Wang C, Li M, Wu W and Shi S: Metformin induces apoptotic cytotoxicity depending on AMPK/PKA/GSK-3 $\beta$ -mediated c-FLIP I degradation in non-small cell lung cancer. *Cancer Manag Res* 11: 681–689, 2019. DOI: 10.2147/CMAR.S178688.
- 28 Zhou X, Liu S, Lin X, Xu L, Mao X, Liu J, Zhang Z, Jiang W and Zhou H: Metformin inhibit lung cancer cell growth and invasion in vitro as well as tumor formation in vivo partially by activating PP2A. *Medical Science Monitor* 25: 836–846, 2019. PMID: 30693913. DOI: 10.12659/MSM.912059.
- 29 Sha H, Zou Z, Xin K, Bian X, Cai X, Lu W, Chen J, Chen G, Huang L, Blair AM, Cao P and Liu B: Tumor-penetrating peptide fused EGFR single-domain antibody enhances cancer drug penetration into 3D multicellular spheroids and facilitates effective gastric cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 200: 188–200, 2015. PMID: 25553823. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.12.039.

- 30 Akbari B, Farajnia S, Zarghami N, Mahdieh N, Rahmati M, Khosroshahi SA and Rahbarnia L: Design, expression and evaluation of a novel humanized single chain antibody against epidermal growth factor receptor (EGFR). *Protein Expr Purif* 127: 8–15, 2016. PMID: 27298212. DOI: 10.1016/j.pep.2016.06.001.
- 31 Banisadr A, Safdari Y, Kianmehr A and Pourafshar M: Production of a germline-humanized cetuximab scFv and evaluation of its activity in recognizing EGFR- overexpressing cancer cells. *Hum Vaccin Immunother* 14: 856–863, 2018. PMID: 29185855. DOI: 10.1080/21645515.2017.1407482.
- 32 Lee JY, Shin DH and Kim JS: Anticancer effect of metformin in herceptin-conjugated liposome for breast cancer. *Pharmaceutics* 12, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12010011.
- 33 Chen YH, Yang SF, Yang CK, Tsai H Der, Chen TH, Chou MC and Hsiao YH: Metformin induces apoptosis and inhibits migration by activating the AMPK/p53 axis and suppressing PI3K/AKT signaling in human cervical cancer cells. *Mol Med Rep* 23: 1–11, 2021. PMID: 33236135. DOI: 10.3892/mmr.2020.11725.
- 34 Barrios-Bernal P, Lucio-Lozada J, Ramos-Ramírez M, Hernández-Pedro N and Arrieta O: A Novel Combination of Sotorasib and Metformin Enhances Cytotoxicity and Apoptosis in KRAS-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines through MAPK and P70S6K Inhibition. *Int J Mol Sci* 24, 2023. PMID: 36901764. DOI: 10.3390/ijms24054331.
- 35 Olimpieri PP, Chailyan A, Tramontano A and Marcatili P: Prediction of site-specific interactions in antibody-antigen complexes: The proABC method and server. *Bioinformatics* 29: 2285–2291, 2013. PMID: 23803466. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt369.
- 36 Choi Y and Deane CM: Predicting antibody complementarity determining region structures without classification. *Mol Biosyst* 7: 3327, 2011. PMID: 22011953. DOI: 10.1039/c1mb05223c.
- 37 Abhinandan KR and Martin ACR: Analyzing the “Degree of Humanness” of Antibody Sequences. *J Mol Biol* 369: 852–862, 2007. PMID: 17442342. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.02.100.
- 38 Chan W, Verma CS, David P and Gan SK: A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*., 2013. DOI: 10.1042/BSR20130098.
- 39 Hafeez U, Parakh S, Gan HK and Scott AM: Antibody↓drug conjugates for cancer therapy. *Molecules* 25, 2020.



- 40 Parray HA, Shukla S, Samal S, Shrivastava T, Ahmed S, Sharma C and Kumar R: Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int Immunopharmacol* 85, 2020.
- 41 Veisi K, Farajnia S, Zarghami N, Khorshid HRK, Samadi N, Safdari Y and Ahmadzadeh V: Development and Evaluation of a Cetuximab-based Humanized Single Chain Antibody Against EGFR-overexpressing Tumors. DOI: 10.2014/MPS.
- 42 Luo Z, Zhu T, Luo W, Lv Y, Zhang L, Wang C, Li M, Wu W and Shi S: Metformin induces apoptotic cytotoxicity depending on AMPK/PKA/GSK-3 $\beta$ -mediated c-FLIP I degradation in non-small cell lung cancer. *Cancer Manag Res* 11: 681–689, 2019. DOI: 10.2147/CMAR.S178688.
- 43 Wang Y, Xu W, Yan Z, Zhao W, Mi J, Li J and Yan H: Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 37, 2018. PMID: 29554968. DOI: 10.1186/s13046-018-0731-5.
- 44 Yudhani RD, Astuti I, Mustofa M, Indarto D and Muthmainah M: Metformin modulates cyclin D1 and P53 expression to inhibit cell proliferation and to induce apoptosis in cervical cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 20: 1667–1673, 2019. PMID: 31244286. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.6.1667.
- 45 Chen H, Sun B, Sun H, Xu L, Wu G, Tu Z, Cheng X, Fan X, Mai Z, Tang Q, Wang X and Chen T: Bak instead of Bax plays a key role in metformin-induced apoptosis s in HCT116 cells. *Cell Death Discov* 7, 2021. DOI: 10.1038/s41420-021-00755-y.
- 46 Lee JO, Kang MJ, Byun WS, Kim SA, Seo IH, Han JA, Moon JW, Kim JH, Kim SJ, Lee EJ, In Park S, Park SH and Kim HS: Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51. *Breast Cancer Research* 21, 2019. PMID: 31640742. DOI: 10.1186/s13058-019-1204-2.
- 47 Zhang JW, Zhao F and Sun Q: Metformin synergizes with rapamycin to inhibit the growth of pancreatic cancer in vitro and in vivo. *Oncol Lett* 15: 1811–1816, 2018. DOI: 10.3892/ol.2017.7444.
- 48 Zhu Z, Jiang T, Suo H, Xu S, Zhang C, Ying G and Yan Z: Metformin Potentiates the Effects of Anlotinib in NSCLC via AMPK/mTOR and ROS-Mediated Signaling Pathways. *Front Pharmacol* 12, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.712181.

- 49 Lesan V, Ghaffari SH, Salaramoli J, Heidari M, Rostami M, Alimoghaddam K and Ghavamzadeh A: Evaluation of Antagonistic Effects of Metformin with Cisplatin in Gastric Cancer Cells, 2014.
- 50 Wang Y, Hu J, Sun Y, Song B, Zhang Y, Lu Y and Ma H: Metformin Synergizes with PD-L1 Monoclonal Antibody Enhancing Tumor Immune Response in Treating Non-Small Cell Lung Cancer and Its Molecular Mechanism Investigation. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2022. DOI: 10.1155/2022/5983959.
- 51 Han R, Jia Y, Li X, Zhao C, Zhao S, Liu S, Liu Y, Chen D, Zhang Q, Liu X, Shi J, Li J and Zhou C: Concurrent use of metformin enhances the efficacy of EGFR-TKIs in patients with advanced EGFR-mutant non-small cell lung cancer-an option for overcoming EGFR-TKI resistance. *Transl Lung Cancer Res* 10: 1277–1291, 2021. DOI: 10.21037/tlcr-20-1153.
- 52 Heuser C, Diehl V, Abken H and Hombach A: Anti-CD30-IL-12 antibody-cytokine fusion protein that induces IFN- $\gamma$  secretion of T cells and NK cell-mediated lysis of Hodgkin's lymphoma-derived tumor cells. *Int J Cancer* 106: 545–552, 2003. PMID: 12845650. DOI: 10.1002/ijc.11279.
- 53 Rezaie E, Amani J, Bidmeshki Pour A and Mahmoodzadeh Hosseini H: A new scfv-based recombinant immunotoxin against EPHA2-overexpressing breast cancer cells; High in vitro anti-cancer potency. *Eur J Pharmacol* 870, 2020. PMID: 31926992. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.172912.

## 10. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



Jorge Solís Estrada

Candidato para el grado de:

**Doctorado en Ciencias con Orientación en Farmacia**

**Tesis: Diseño y evaluación de un anticuerpo humanizado huscfv contra el receptor EGFR (ErbB1) en combinación con metformina sobre células**

**A549 *in vitro*.**

**Campo de estudio:** Ciencias de la Salud

### **Biografía:**

**Datos personales:** nacido en Zihuatanejo, Guerrero; el 03 de Junio de 1991, hijo de Jorge Solís Zúñiga y Antonia Estrada Gordillo.

**Educación:** egresado de la Universidad Autónoma de Guerrero, grado obtenido: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 2014 y Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia en 2016 por la Universidad Autónoma de Nuevo León.