

Artículo de revisión

Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas

*Victor Sanabria Ayala**
*Abraham Landa Piedra***

RESUMEN

Los anticuerpos surgieron en los organismos en respuesta a las necesidades imperantes de neutralizar y destruir los embates de agentes externos nocivos para los mismos. Los anticuerpos son macromoléculas que por sus propiedades de especificidad y afinidad a sus antígenos, han sido utilizados para toda una gama de estudios en la medicina, su manipulación fuera de los sistemas vivientes ha permitido su aplicación en la terapéutica y el diagnóstico oportuno de varias enfermedades. El presente trabajo muestra una sinopsis de las propiedades bioquímicas de los anticuerpos y de las estrategias más recientes que han permitido la manipulación de estas moléculas, con la finalidad de mejorar su afinidad y avidéz, así como en los métodos de producción para incrementar su potencial de aplicación en la investigación biológica y médica. (MÉDICAS UIS 2007;20(1):15-30). **PALABRAS CLAVE:** Anticuerpos. Anticuerpos recombinantes. Anticuerpos monoclonales. Bacteriófagos. Inmunoglobulinas. Fragmento scFv. Terapia.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico tiene como función principal proteger al organismo de agentes extraños, está integrado por diferentes órganos, tejidos, células y moléculas que funcionan coordinadamente. Sus componentes más importantes son: la piel y las mucosas, los órganos linfoides como las amígdalas, las adenoides, el bazo, el timo, los ganglios linfáticos; numerosas células leucocitarias (linfocitos) y sus productos de secreción como citocinas, quimiocinas e inmunoglobulinas entre otros. Este sistema tiene tres propiedades esenciales: primera, tiene la habilidad de reconocer sustancias extrañas denominadas antígenos principalmente provenientes de patógenos, tales como bacterias, virus, hongos

y parásitos, en un sentido más estricto, tiene la capacidad de reconocer la totalidad de las moléculas que no le son propias, inclusive las de los organismos que no le son propiamente patógenos, y como todo sistema complejo no está exento de fallas, debido a que en ocasiones reacciona contra moléculas propias (autoinmunidad); segunda, reacciona y desencadena una respuesta específica, está provisto de un vasto repertorio para diferentes especificidades, aún para sustancias con las que tal vez jamás tendrá contacto; y tercera, tiene una memoria intrínseca, que puede responder a estimulaciones futuras e inclusive puede madurar su respuesta a sustancias con las que ya tuvo contacto previo¹.

Todos los vertebrados, desde los más ancestrales, tales como los elasmobranchios, hasta los mamíferos, poseen un sistema inmunológico compuesto de dos tipos de respuestas a los antígenos. La primera es la respuesta inmune celular, la cual depende de una comunicación química especializada entre diferentes estirpes celulares del sistema inmunológico (linfocitos T y fagocitos como macrófagos, neutrófilos, etc). La segunda comprende una respuesta inmune humoral, la cual involucra la producción de inmunoglobulinas, término introducido por vez primera por J. F. Heremans en 1959 para referirse

*Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. México.

** Profesor Titular C de Carrera. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. México.

Correspondencia: Dr. Landa. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. Edificio A, 2^{do} piso. Ciudad Universitaria. México D.F. 04510. México. e-mail: landap@servidor.unam.mx

Artículo recibido el 18 de diciembre de 2006 y aceptado para publicación el 16 de marzo de 2007.

a aquellas globulinas que se asocian al sistema linforreticular y que a menudo son referidas como “anticuerpos” que son producidas por las células plasmáticas². El descubrimiento de los anticuerpos fue el resultado global de un cúmulo de conocimientos derivados de observaciones científicas recabadas a lo largo de varios siglos, desde las vacunas rudimentarias de la antigua civilización China (varirolización), hasta la primera estructura resuelta por Edelman y Porter³. Nuestra salud esta influenciada directamente por el estado del sistema inmunológico, y no cabe la menor duda de que los anticuerpos surgieron en respuesta a las necesidades imperantes de mantener el equilibrio vital, sobre todo para neutralizar los embates de agentes externos nocivos y la eliminación de los mismos. Conforme los organismos vivos fueron adquiriendo mayor grado de complejidad y las relaciones ecológicas se fueron haciendo más estrechas, surgió la necesidad de establecer barreras que delimitaran el hábitat, para el caso de los parásitos y virus, estos encontraron en los anticuerpos una barrera biológica, que permite al organismo mantener, en gran manera, el equilibrio de su individualidad bioquímica; por otra parte, la evolución ha sido paralela, ya que los agentes patógenos han desarrollado mecanismos específicos para evitar el reconocimiento por estas moléculas y en situaciones más drásticas, la destrucción o el bloqueo de su síntesis.

La investigación en inmunología ha influido decisivamente en el conocimiento de muchos aspectos importantes de la biología y la medicina, y los anticuerpos han sido pieza fundamental, ya que son macromoléculas con alta especificidad que hacen posible la realización de toda una gama de estudios finos, es por ello que el objetivo de esta revisión es dar un panorama del desarrollo que han tenido estas moléculas, así como de su aplicación para mejorar las técnicas de investigación, de diagnóstico y de la terapéutica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda vía Internet en el sitio PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando las palabras anticuerpo e inmunoglobulina (en inglés), fueron seleccionados aquellos artículos que son pioneros en este tema y que en la actualidad son considerados pilares de la inmunología. Asimismo, seleccionamos aquellos que ofrecían un amplio contenido en la descripción de características bioquímicas y estructurales, así

como las bases genéticas, por otro lado, aquellos que abordaban el área biotecnológica para cubrir los aspectos de técnicas de producción, mejoras y alternativas de optimización. Aunado a esta búsqueda fueron consultados libros de inmunología comúnmente empleados en la enseñanza de ciencias biológicas y de la salud. Los artículos que no fueron encontrados en su formato electrónico, fueron obtenidos a través de las distintas bibliotecas y hemerotecas de la Universidad Nacional Autónoma de México. La búsqueda de la revisión abarco el periodo de 1959 al 2007.

GENERALIDADES DE LOS ANTICUERPOS

ESTRUCTURA

En general los anticuerpos, independientemente de su especificidad tienen una estructura común, consistente de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas de 55-70 kDa denominadas con la letra H (del inglés *heavy*), unidas covalentemente a un oligosacárido, y un par idéntico de cadenas livianas no glicosiladas de 24 kDa denominadas con la letra L (del inglés *light*). Un puente disulfuro y otras uniones no covalentes unen las cadenas pesadas con las livianas. Las cadenas pesadas también están unidas entre sí por al menos un puente disulfuro, tal unión está localizada en una región conocida como “bisagra”, región formada por aproximadamente 12 residuos de aminoácidos que proporciona una gran flexibilidad a la molécula, éstos residuos están expuestos a la ruptura química y enzimática. La papaína es una enzima que divide a las inmunoglobulinas en dos fragmentos idénticos conocidos como Fab (del inglés *antigen binding fragment*) que en la actualidad se sabe que son los que se unen al antígeno, y en un fragmento que posee la propiedad de ser fácilmente cristizable denominado Fc (del inglés *crystalline fragment*)⁴. La formación de puentes disulfuro internos en las cadenas H o L da como resultado la formación de dominios proteicos globulares (característico de todos los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas). Las cadenas livianas se componen de un dominio variable (V) y uno constante (C), denotados como VL y CL, respectivamente; mientras que las cadenas pesadas presentan un dominio variable y tres constantes, VH, CH1, CH2 y CH3, respectivamente. Las regiones variables y el primer dominio constante de las cadenas pesadas (VH y CH1) se asocian con las cadenas livianas (VL y

CL) para formar dos sitios idénticos de unión al antígeno, los fragmentos Fab⁴⁻⁶, cada uno de los cuales contiene las Regiones de Determinación de Complementariedad o simplemente CDR (del inglés *complementarity determining region*), tres aportados por la cadena ligera y otro tanto por la cadena pesada, las cuales interactúan directamente con un antígeno específico, siendo los CDR3 los que interactúan más estrechamente con éste (Figura 1). Por otro lado, las regiones CH2 y CH3 de las cadenas pesadas forman la fracción cristalizante o fragmento Fc, región que cumple con funciones efectoras, tales como transporte placentario, potenciación de la fagocitosis (opsonización) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo⁷. En los anticuerpos aparecen, además de las cuatro cadenas polipeptídicas básicas, un componente glicosídico en el dominio

CH2 que representa el 2-14% del peso total de la molécula⁸.

CLASES O ISOTIPOS

Existen diferentes clases de anticuerpos, las cuales son determinadas por el tipo de cadena pesada. Hay cinco tipos de cadenas pesadas, denotados por las letras griegas α , β , δ , ϵ , γ y μ para cada una de las inmunoglobulinas IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, respectivamente. En estas clases pueden existir cadenas livianas ya sea de tipo *kappa* (κ) o tipo *lambda* (λ). Los genes que codifican para las distintas variantes isotípicas están presentes en todos los individuos sanos, es decir, éstos poseen los genes para las cadenas pesadas denominadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, μ , $\alpha 1$, $\alpha 2$ localizados en el brazo largo del cromosoma 14 y para las cadenas livianas κ y λ , en los cromosomas 2 y 22, respectivamente⁹.

Los anticuerpos pueden estar constituidos por una sola molécula (monómero) como es el caso de la IgG, IgD e IgE; formar dímeros como es el caso de la IgA, o pentámeros unidos por sus extremos Fc como es el caso de la IgM. Debido a la capacidad que tienen las cadenas α y μ de unirse entre sí mediante otras moléculas. Para el caso de la IgA, el péptido secretor, una glicoproteína de 58 kDa sintetizada por las células epiteliales de las mucosas y glándulas exocrinas, une las dos moléculas a través de la región Fc. En el caso de la IgM la unión se realiza a través de la cadena J, una glicoproteína con 12% de carbohidratos y un peso molecular de 15 kDa que mediante puentes disulfuro une los extremos de los Fc. Los anticuerpos presentan diferencias estructurales de un isotipo a otro, principalmente en la región constante de la cadena pesada, la región bisagra y el patrón de glicosilación implicado en las funciones efectoras (Figura 2). Los anticuerpos se encuentran distribuidos en todos los fluidos orgánicos de la anatomía de los vertebrados y en las membranas de los linfocitos B y células plasmáticas. Las cantidades relativas de cada una de las clases de anticuerpos en los diferentes compartimentos del organismo son muy diferentes. En el torrente sanguíneo predomina la IgG, mientras que en las secreciones (saliva, lágrimas, secreción bronquial, así como en el líquido cefalorraquídeo y mucosas) la IgA es la predominante. Los niveles de anticuerpos séricos fluctúan ampliamente en función de diversos aspectos, tales como el estado nutricional, la edad, entre otros (Tabla 1)⁹. Ontogénicamente se

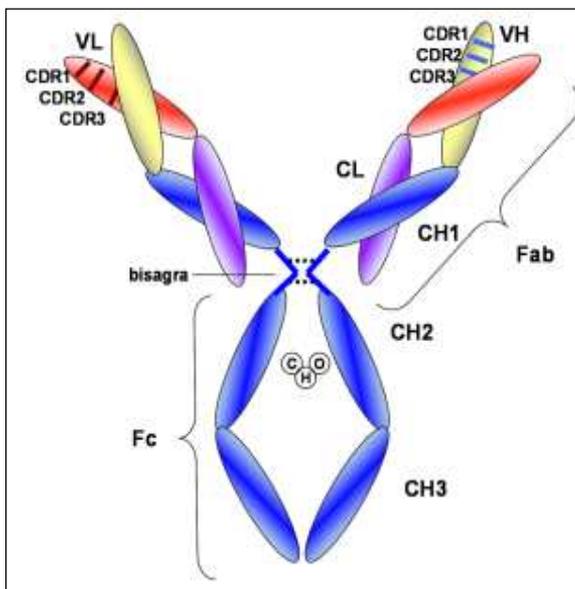


Figura 1. Representación esquemática de un anticuerpo. Consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H) y dos livianas (L). Las cadenas pesadas y livianas se unen entre sí por puentes disulfuro y algunas otras interacciones covalentes. La estructura flexible que une a las cadenas pesadas es denominada "bisagra" (línea punteada). La unión en la parte amino terminal de las cadenas pesadas y livianas da como resultado la formación de dos sitios idénticos de unión al antígeno (Fab). Las barras en las regiones variables representan las regiones de los determinantes de complementariedad (CDR 1-3), tres para la cadena ligera (VL) y tres para la cadena pesada (VH). La fracción cristalizante (Fc) está formada por los dominios CH2 y CH3, en la región CH2 se asocia un componente glicosídico.

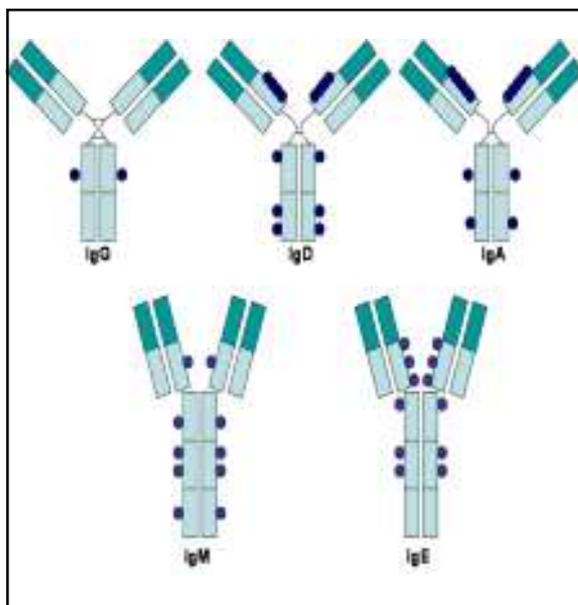


Figura 2. Los isotipos de anticuerpos. Se muestran las diferencias estructurales entre inmunoglobulinas, en la parte superior se encuentran las que tienen una región de bisagra, en la parte inferior las que no la tienen y que además presentan un dominio constante extra en la cadena pesada. También se muestra el patrón de glicosilación característico de cada isotipo.

producen múltiples cambios en los niveles de anticuerpos desde el nacimiento hasta los 10 años de edad, para después estabilizarse. Los niveles de IgG son muy altos en la vida fetal y en las primeras semanas de vida extrauterina, debido a que este anticuerpo es el único que pasa de la madre al feto a través de la placenta. Durante la lactancia, descienden los niveles de IgG por catabolismo de esas moléculas que no son repuestas por carecer el niño aún de la capacidad de síntesis de las mismas. Asimismo, en la edad fetal se sintetizan pequeñas cantidades de IgM. Cuando los anticuerpos se encuentran en la membrana de los linfocitos B, actúan como receptores de las señales de activación por su capacidad de reconocimiento del antígeno, o como en el caso de la IgE que se encuentra en las membranas de los basófilos y los mastocitos que forman parte de las reacciones de hipersensibilidad tipo I o atópica^{1,9,10}.

SUBCLASES

Se sabe que no todos los anticuerpos de una misma clase tienen una estructura idéntica, sino que dentro de las clases se pueden establecer subclases considerando la secuencia de

aminoácidos de la región constante de las cadenas H y el número y posición de los puentes disulfuro intracatenarios establecidos entre las cadenas pesadas. Así, la IgG humana se divide en cuatro subclases (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄), la IgA en dos (IgA₁ e IgA₂) y la IgM en dos (IgM₁ e IgM₂)⁹.

CAMBIO DE CLASE O ISOTIPO

Una importante función de los linfocitos B activos (células plasmáticas) durante la respuesta inmune es la producción de anticuerpos específicos de alta afinidad que faciliten la erradicación de patógenos. Bajo estimulación antigénica, las células B que son IgM⁺IgD⁺, pueden realizar un cambio en la expresión del tipo de anticuerpo, un cambio de isotipo, para producir anticuerpos IgG, IgE, o IgA, manteniendo su especificidad. Este cambio de isotipo está basado en una recombinación del ADN, evento que da como resultado un intercambio de segmentos genéticos de la región constante de la cadena pesada, mientras que la región variable es mantenida sin cambio. Este proceso sirve para cambiar las funciones efectoras correspondientes a cada isotipo de anticuerpos¹¹. En general se ha observado, que el cambio de isotipo en las células B está dado por una estimulación dependiente de células T, involucrando la estimulación vía CD40¹² y la producción de citocinas: IL-4 y IL-13 para IgG1 e IgE¹³; IL-10 para IgG1 e IgG3¹⁴; IL-10 en combinación con TGF-β1, para IgA1, e IgA2¹⁵. Por el contrario, la señal específica para IgG2 es difícil de describir, aunque se ha visto que TGF-β¹⁶, IFN-γ¹⁷, combinaciones de lipopolisacárido^{18,19} y anticuerpo anti-CD40²⁰ inducen la expresión de la cadena pesada γ2.

DIVERGENCIAS ESTRUCTURALES: CAMÉLIDOS, AVES Y TIBURONES

Los camélidos (camellos, dromedarios, llamas, alpacas) tienen una característica muy particular

Tabla 1. Concentración de anticuerpos en suero de un adulto promedio (70 kg).

isotipo	Concentración (mg/100ml)	Nivel inferior	Nivel superior
IgG	1,250	950	1,550
IgM	90	70	110
IgA	210	160	260
IgE	0,0004	0,0002	0,0006
IgD	0,2	0,1	0,3

en cuanto a sus anticuerpos. Una fracción importante de los anticuerpos, isotipo IgG, carecen de la cadena ligera y del primer dominio constante de la cadena pesada, por esto son referidos como IgG_H, tienen un peso aproximado de 90 kDa²¹. Esto hace que el sitio de unión de estos anticuerpos este formado solo por la región variable de la cadena pesada, y se denotan por las letras VHH para diferenciarlos de las cadenas pesadas del resto de los mamíferos, hasta la fecha, esta molécula representa la mínima expresión de un fragmento de unión al antígeno. Estos anticuerpos desarrollan una estrategia de interacción peculiar, el CDR3 es muy largo, lo cual le confiere la capacidad de penetrar en los huecos de las proteínas y así interaccionar con epítopes inaccesibles para otro tipo de CDRs^{22, 23}. Por ello se ha propuesto el uso de estos anticuerpos para la inhibición específica de enzimas empleándolos como mimetizadores del sustrato²⁴⁻²⁶.

Las aves, los reptiles y los anfibios producen un anticuerpo denominado IgY estructuralmente diferente a las de los mamíferos. La IgY difiere en que su cadena pesada es de 60 a 70 kDa, en contraste con la de los mamíferos que es de 50 kDa²⁷. Al inmunizar a alguno de los organismos ovíparos antes mencionados, se observó que la IgY es transferida a los huevos y que se acumula en la yema, este hecho ha promovido el interés del desarrollo de una tecnología para la obtención de anticuerpos terapéuticos, aludiendo el bajo costo de mantenimiento de aves de corral, así como la fácil purificación del anticuerpo proveniente de la yema. Esta IgY ha tenido aplicación útil en el tratamiento de enfermedades bacterianas mediante la inmunización pasiva²⁸⁻³⁰.

Por otra parte, está el caso de los peces cartilaginosos, específicamente haciendo referencia al tiburón nodriza, se encontró que posee un anticuerpo que por su novedosa estructura fue llamado receptor nuevo de antígeno (IgNAR). Este anticuerpo es un homodímero de dos cadenas pesadas unidas por puentes disulfuro, cada una contiene un dominio variable y cinco constantes; es bivalente, pero la unión al antígeno se realiza a través de un dominio variable sencillo, igual que los camélidos que despliegan sólo dos CDR, en contraste a los humanos que despliegan seis. Para compensar su tamaño reducido, los IgNARs despliegan un inusual, largo y estructuralmente complejo CDR3, el cual muestra un alto grado de variabilidad. Hasta la fecha, se han identificado



Figura 3. Divergencias estructurales de los anticuerpos. De izquierda a derecha: La IgG humana; la IgY de aves y reptiles; la IgG_H de camélidos y la IgNAR presente en los tiburones.

tres isotipos de IgNAR, los cuales varían en número y configuración de la posición de sus residuos de cisteína y tiempo de aparición en el desarrollo del tiburón³¹⁻³⁵. En la figura 3 pueden observarse las representaciones estructurales de los anticuerpos de los organismos mencionados en este apartado.

MECANISMOS DE LA DIVERSIDAD DEL REPERTORIO DE ANTICUERPOS

En los años sesenta, conforme se iban acumulando datos de secuencias de inmunoglobulinas, se vio que cada anticuerpo difiere en la región V, pero que existe un repertorio limitado de tipos de regiones C. Cualquier modelo genético que intentara explicar la diversidad y estructura de anticuerpos debía partir de la difícil situación de concertar los siguientes datos experimentales: cada individuo de cada especie de mamífero es capaz de producir una gigantesca diversidad de especificidades de anticuerpos, 100 millones e incluso aún más. Puesto que los anticuerpos son proteínas y teniendo en cuenta que el genoma haploide humano contiene entre 25 000 y 30 000 genes, no era posible cotejar genéticamente la gran diversidad de especificidades de los mismos³⁶.

En 1965, Dreyer y Bennet elaboraron una teoría basada en tres postulados: primero, cada cadena H o L del anticuerpo está codificada por dos tipos diferentes de genes, uno para la región V y otro para la porción C; segundo, estos genes estarían separados en la línea germinal, pero se unirían durante el desarrollo de los linfocitos B para constituir un mensaje continuo responsable de la

producción de la cadena completa correspondiente y tercero en la línea germinal existirían cientos o miles de genes codificadores de regiones V y unos pocos genes para las regiones C. La comunidad científica de la época rechazó en su mayoría la idea la cual carecía de apoyo experimental que dos o más genes pudieran determinar una proteína. La demostración de la teoría de Dreyer y Bennet tardó unos 10 años, una vez que las técnicas de la recién nacida «Ingeniería Genética» permitieron disponer de herramientas como purificación de ARN, enzimas de restricción, clonación molecular del ADN, hibridación y secuenciación de ácidos nucleicos³⁷.

Fue hasta 1976 cuando los experimentos de Susumu Tonegawa y su equipo de colaboradores aportaron las pruebas experimentales contundentes para demostrar la recombinación somática. El modelo fue estudiado en linfocitos de ratón y en algunas líneas celulares de mieloma. En base a la recopilación de los datos arrojados se llegó a la conclusión que los genes que codifican para las regiones variables de las inmunoglobulinas son generados por un rearrreglo de las secuencias de ADN durante la diferenciación de las células precursoras linfocíticas³⁸⁻⁴⁰. Las convencionalmente definidas regiones V de las cadenas livianas, ambos tipos κ y λ , están constituidas de dos segmentos de ADN, el V_L y el J_L , los cuales están separados en el genoma de la línea germinal. Los dos segmentos están unidos en la región 3' del ADN del segmento V y la 5' del ADN del segmento J para formar un gen completo, el gen V de la cadena ligera⁴¹⁻⁴⁵. En contraste, el gen de la cadena variable pesada es codificada por tres segmentos de ADN, el V_H , el D o de diversidad (el cual codifica la tercera región hipervariable) y el J_H . Las uniones V_H -D y J_H -D son necesarias para generar el gen V completo de la cadena pesada⁴⁶⁻⁴⁸.

Estudios de la secuencia de estos genes revelaron la presencia de dos bloques con una secuencia altamente conservada alrededor de los sitios de recombinación. En la región flanqueante 5' de los segmentos J, un heptámetro palindrómico (CACTGTG), y un nonámetro rico en T (GGTTTTGT) que son conservados, con las secuencias complementarias respectivas ubicuas en la región 3' flanqueante de los segmentos V de la línea germinal. Se encontró que estos dos bloques son la señal de reconocimiento para la enzima recombinasa putativa. Las longitudes de

los espaciadores entre el heptámetro y el nonámetro son notablemente regulares. Los segmentos V_λ y J_λ tienen espaciadores de 23 y 12 pares de bases (pb), respectivamente. En contraste, los espaciadores de V_κ y J_κ tienen una longitud de 12 y 23 pb, respectivamente. Además, los espaciadores de todos los segmentos V_H y J_H son de 23 pb.

Recapitulando, la enzima recombinasa putativa⁴⁹ para las uniones V-J y V-D-J contiene dos regiones de unión a ADN: una que reconoce la secuencia señal con un espaciador corto (12 pb) y otro con un espaciador largo (23 pb), siguiendo la regla del espaciador (12/23). Todas las recombinaciones dan lugar a la generación de un gen V completo, es decir, las uniones V_κ y J_κ , V_λ y J_λ , V_H y D, y D y J_H , son mediadas por la misma o enzima similar siguiendo esta regla^{50, 51}. Después de las recombinaciones antes mencionadas participa la enzima terminal transferasa que añade hasta seis nucleótidos de forma aleatoria en las uniones de los genes recombinados⁵². Finalmente, para crear las cadenas completas de un anticuerpo es necesaria una segunda recombinación en la línea germinal, para unir el gen V con alguno de los genes C. Un mecanismo propuesto para cadenas pesadas es el de la remoción de segmentos genéticos (*trans-splicing*), en el cual está involucrado un rearrreglo en el ADN, la región 3' del fragmento J que esta unido a la región 5' de uno de los genes C, el cual es característico para cada clase o isotipo⁵³.

De esta manera, cada una de las cadenas pesadas está codificada por los segmentos genéticos: variable (V_H), de diversidad (D), de unión (J_H) y constante (C_H); mientras que cada cadena ligera es codificada por los segmentos V_L , J_L y C_L (Figura 4). Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos son relativamente conservadas en la región C entre ciertas especies, mientras que las de la región V son dependientes de antígeno. El empalme, de las regiones V-D-J de la cadena pesada con las regiones V-J de la cadena ligera, crea un sitio de unión al antígeno, referido como paratope, el cual reconoce un determinante antigénico sencillo, referido como epítipo. Cada región V consiste de un armazón alternativo, el cual es muy conservado y de tres regiones hipervariables o CDR con la mayor diversidad en la secuencia. Los CDR y en menor grado, los armazones alternativos, interactúan con el antígeno para formar el centro del sitio de unión a éste. Los primeros dos CDR son codificados por

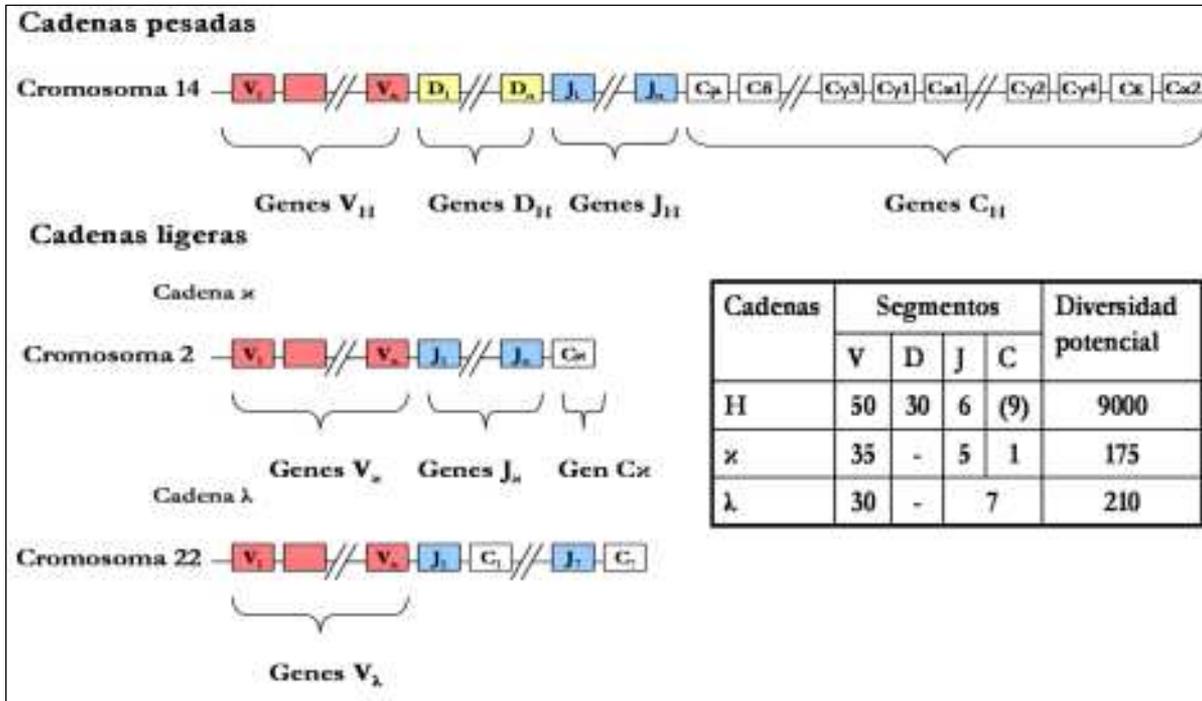


Figura 4. Genes de inmunoglobulinas (anticuerpos). Los diferentes segmentos que componen un gen completo de una cadena pesada, unión V-D-J-C y de una cadena ligera, unión V-J-C. Las recombinaciones somáticas explican la posibilidad de la generación de todas las especificidades

el segmento V, mientras que el tercero es producto de la unión de los segmentos V-D-J para la cadena pesada o V-J para la cadena ligera. Este conocimiento de la estructura del anticuerpo ha facilitado la creación de moléculas de anticuerpo completamente fuera de su hospedero natural⁵⁴⁻⁵⁶.

ANTICUERPOS MONOCLONALES

En 1975 los investigadores Georges Köhler y Cesar Milstein fueron los primeros en obtener anticuerpos con una sola especificidad, por medio de una célula híbrida generada *in vitro*. Esta célula híbrida fue producto de la fusión de linfocitos B y células de mieloma. Los células híbridas, o hibridomas, tienen la capacidad de multiplicarse rápida e indefinidamente y además pueden producir anticuerpos en gran proporción, características recibidas de las células cancerosas y los linfocitos B, respectivamente⁵⁷. Por este aporte a la ciencia Köhler y Milstein recibieron el premio Nobel de medicina en 1984.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Primeramente, el bazo del animal inmunizado (ratón) es disgregado para obtener los linfocitos B,

para posteriormente fusionarlos con polietilenglicol con las células de una línea de mieloma deficiente en enzimas implicadas en la síntesis de nuevos ácidos nucleicos (vía exógena o de salvamento), como la timidina cinasa o la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa. Los hibridomas productos de la fusión celular son cultivados en medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) con la finalidad de eliminar las células de mieloma, ya que la aminopterina bloquea la síntesis de ácidos nucleicos endógena (a partir de aminoácidos y carbohidratos), y al carecer de las enzimas de salvamento éstas mueren. Las células B y las fusiones entre ellas, mueren en un lapso de ocho días de cultivo. Las células híbridas obtenidas tras el proceso de fusión contienen un número elevado de cromosomas (72 del mieloma y 40 del linfocito B) que en las sucesivas divisiones celulares se irán perdiendo hasta oscilar entre los 70 y los 80 cromosomas. Como consecuencia de dicho proceso algunas células pierden la capacidad de secreción de anticuerpos o bien de funciones básicas para la viabilidad celular, es por ello que en el momento que se tenga conocimiento de que

una muestra es positiva es necesario realizar una clonación mediante el método de dilución limitante⁵⁸⁻⁶⁰.

Una vez caracterizados los anticuerpos (determinación de su isotipo, afinidad y especificidad por el antígeno) se procede a la producción en gran escala. Existen dos métodos principales: el cultivo *in vitro*, en donde se hace crecer las clonas en recipientes de cultivo o en biorreactores y del medio de cultivo son recuperados los anticuerpos; y la producción *in vivo*, en el que, las clonas híbridas estables son inoculadas en la cavidad peritoneal de ratones previamente tratados por la misma vía con una sustancia irritante (2,6,10,14 tetrametil pentadecano-pristane)⁶¹ que promueve la formación de tumores y la secreción de fluidos donde van los anticuerpos (líquido ascítico)⁶².

Cada vez son más los anticuerpos monoclonales que tienen utilidad terapéutica en enfermedades como el cáncer (antineoplásicos), enfermedades infecciosas o de uso inmunológico (desordenes inmunes e inflamatorios, prevención y reversión de rechazo a transplantes). Existen más de 18 anticuerpos monoclonales aprobados por la *Food & Drug Administration*, de los cuales sólo 9 ha aprobado la Unión Europea, estos tienen los siguientes nombres genéricos: Rituximab, Trastuzumab, Alemtuzumab, Ibritumomab tiuxetan, todos ellos antineoplásicos; Daclizumab, Basiliximab, Infliximab y Adalimumab de uso inmunológico; y Palivizumab, hasta ahora el único de uso antiinfeccioso (virus sincitial respiratorio). Pero el número de anticuerpos monoclonales en fase de ensayo clínico es elevado y representan un 30% de todos los compuestos en investigación en el 2005⁶³.

ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Desde la aparición de la tecnología de despliegue en fagos la búsqueda e identificación de moléculas de interés biológico ha tenido un avance inminente. Dicha tecnología fue descrita y desarrollada por vez primera por George P. Smith en 1985, en la cual empleó fagos filamentosos de *Escherichia coli* (M13, fd y f1) como vehículos para expresar diversas proteínas o péptidos como parte de las proteínas de su cubierta. Esta tecnología ha tenido un auge muy importante en las áreas de la inmunología, biología celular, farmacología y en la investigación de fármacos. La técnica es una

herramienta poderosa para identificar y caracterizar interacciones de polipéptidos recombinantes con sus blancos de unión. Su aplicación potencial incluye la identificación de moléculas líderes para su uso en terapéutica, por ejemplo, epítopes con potencial uso inmunogénico para el desarrollo de vacunas o anticuerpos bloqueadores⁶⁴.

Los bacteriófagos son virus que infectan una variedad de bacterias gram-negativas, usando el pili F como receptor. El genoma total del fago consiste de 11 genes. Un fago viable expresa cerca de 2 700 copias de la proteína VIII (pVIII) y de tres a cinco copias de la proteína III (pIII) en su conformación estructural, ambas son las proteínas de elección para expresar, en fusión a los genes correspondientes de las proteínas recombinantes de interés⁶⁵ (Figura 5). No obstante, a últimas fechas se han empleado los genes de las proteínas VI⁶⁶, VII y IX con gran éxito^{67,68}. Los fagos

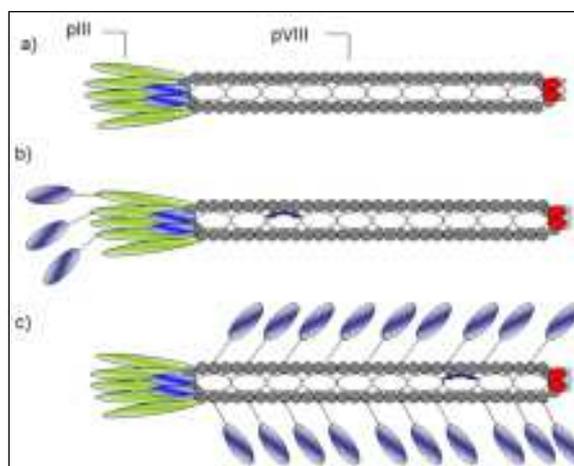


Figura 5. Representación esquemática de (a) un fago silvestre, (b) un péptido desplegado en la proteína III (pIII), y (c) un péptido desplegado en la proteína VIII (pVIII) de un fago.

filamentosos no desarrollan infección lítica en *Escherichia coli*, pero si inducen un estado en el cual la bacteria infectada produce y secreta partículas virales, viéndose atenuada la división celular. En una primera generación se obtienen cerca de 1000 partículas virales, y subsecuentemente por cada división celular son liberadas cerca de 100 a 300 partículas⁶⁹ al medio a través de la membrana bacteriana, esto representa una gran ventaja, ya que facilita los procesos de purificación de las partículas virales⁷⁰. Asimismo, las nuevas

metodologías proporcionadas por la ingeniería genética, tales como la inclusión de péptidos etiqueta facilitan el proceso de recuperación de los anticuerpos recombinantes mediante el simple empleo de la cromatografía de afinidad^{71, 72}.

BIBLIOTECAS DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS EXPRESADAS EN FAGOS FILAMENTOSOS

Una de las más poderosas aplicaciones de la tecnología del despliegue de proteínas en fagos, ha sido el aislamiento de anticuerpos recombinantes con una única especificidad, los cuales presentan muchas ventajas sobre los anticuerpos monoclonales generados por la tecnología del hibridoma, pues el proceso es menos laborioso, las horas de laboratorio son menos intensas, la inmunización de animales puede ser eliminada, la fuente genética es muy estable y el sistema de expresión requiere mínimas exigencias. Los anticuerpos recombinantes han venido a facilitar aún más las cosas, ya que pueden obtener con un alto rendimiento a bajo costo y con una manipulación genética adecuada es posible mejorar su afinidad y avidéz. A este respecto, la tecnología puede ser utilizada para: generar anticuerpos monoclonales humanos o humanizar anticuerpos de ratón; aislar anticuerpos

humanos de pacientes expuestos a ciertos virus patógenos para mejorar la comprensión de la respuesta inmune durante la infección, así como conocer el papel que juegan los anticuerpos generados y elucidar la especificidad de los anticuerpos autoinmunes.

Es bien conocido que el paratopo es la mínima unidad funcional de reconocimiento al antígeno por un anticuerpo, esta constituida por la asociación de los dominios variables de la cadena pesada y ligera, dicha asociación forma los seis CDR. Bajo este precepto y aprovechando el advenimiento de la técnica del despliegue de proteínas en fagos, hoy en día es posible obtener una biblioteca que exprese sólo los fragmentos variables en fusión a una de las proteínas de cubierta del fago, debido a la naturaleza de la construcción, este tipo de moléculas son referidas como scFv (del inglés *single chain variable fragment*), pues ambos polipéptidos son expresados como una única cadena, y no en dos como ocurre naturalmente (Figura 6). Los genes de la cadena variable pesada (V_H) y la cadena variable sencilla (V_L) obtenidos de los linfocitos B están unidos por un fragmento de DNA que codifica para un péptido conector flexible de 15 residuos de aminoácidos, generalmente constituido de la secuencia repetida de cuatro glicinas y una serina, $(Gly_4Ser)_3$, cuya función es la de un espaciador entre los dos polipéptidos para que se lleve a cabo el plegamiento correcto de éstos. Este fragmento híbrido es clonado en fusión a uno de los genes que codifican para proteínas estructurales de la cápside del fago en un vector denominado fagémido, el cual es un híbrido entre un plásmido y el genoma de un fago, que posee los orígenes de replicación de la célula hospedera (*E. coli*) y del bacteriófago (M13). El fagémido es usado para transformar una cepa de *E. coli* (TG1) por métodos químicos o mediante electroporación. Las bacterias portadoras del fagémido son cultivadas y posteriormente infectadas con un fago cooperador, como el VCSM13 o M13K07. Este proceso es llamado rescate de fago, el nombre se debe a que el fagémido no contiene los genes estructurales para expresar un fago como tal, por lo tanto el fago cooperador proporciona las proteínas estructurales para generar un fago completo, así el resultado es un fago híbrido que está conformado tanto de proteínas nativas, como de la recombinante proveniente del fagémido. Con la finalidad de optimizar el proceso se ha dispuesto que los fagos cooperadores tengan un origen de replicación

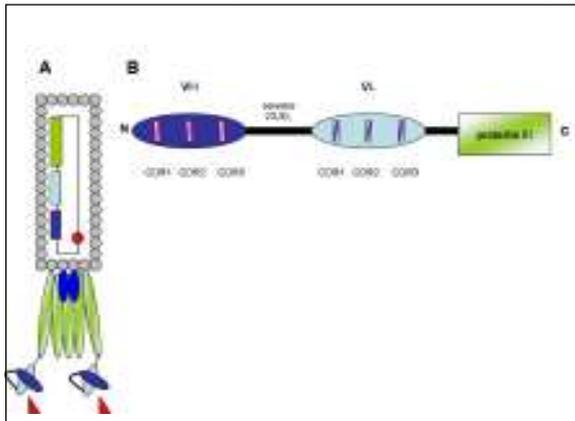
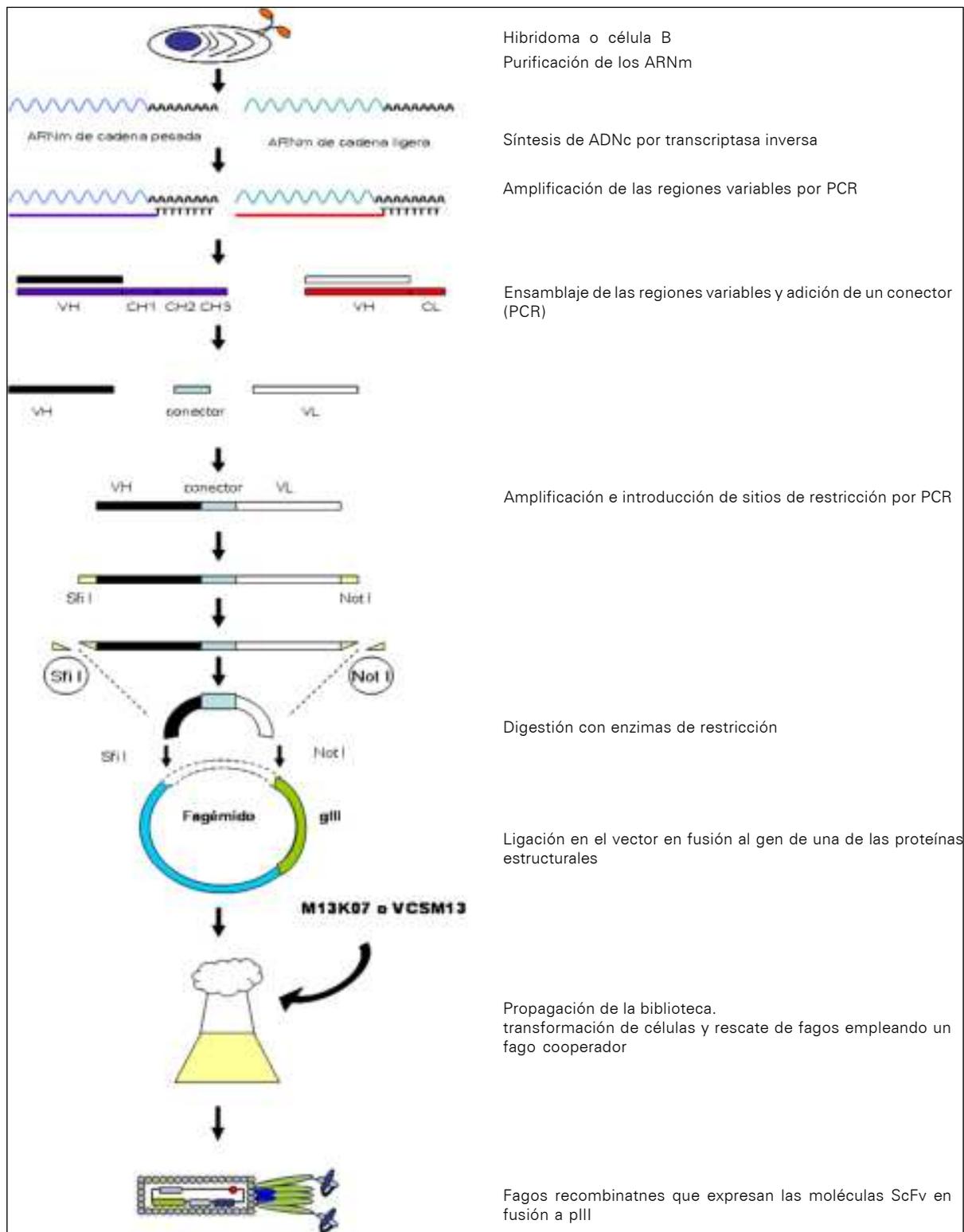


Figura 6. El despliegue de las fracciones de anticuerpos en fagos. El esquema A muestra la estructura del fago recombinante, en su interior se representa el genoma de cadena sencilla circular, en azul oscuro y claro se muestran los genes de las cadenas V_H y V_L , respectivamente, fusionados al gen de la proteína III en verde, y el origen de replicación en rojo. Los triángulos en rojo representan el antígeno que interacciona con el sitio de unión formado por el plegamiento de las cadenas V_H y V_L . El esquema B muestra la estructura de la proteína recombinante, formada por las cadenas V_H , V_L y la proteína III; el correcto plegamiento de la molécula es debido al péptido conector constituido de glicinas y serinas $(G_4S)_3$



Hibridoma o célula B
Purificación de los ARNm

Síntesis de ADNc por transcriptasa inversa

Amplificación de las regiones variables por PCR

Ensamblaje de las regiones variables y adición de un conector (PCR)

Amplificación e introducción de sitios de restricción por PCR

Digestión con enzimas de restricción

Ligación en el vector en fusión al gen de una de las proteínas estructurales

Propagación de la biblioteca.
transformación de células y rescate de fagos empleando un fago cooperador

Fagos recombinantes que expresan las moléculas ScFv en fusión a pIII

Figura 7. Construcción de una biblioteca de expresión de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de anticuerpos en fagos filamentosos

ligeramente defectuoso para disminuir la producción de la proteína nativa que es homóloga a la recombinante; se tiene que la proporción de la proteína recombinante respecto a la nativa va desde 1:9 hasta 1:1000, dependiendo del tipo de fagémido, las condiciones de crecimiento y la naturaleza de la proteína de fusión. Este proceso permite obtener un fago que expresa un scFv en su superficie capaz de reconocer específicamente a un antígeno sin verse interferido por las demás proteínas de cubierta del fago^{73,74} (Figura 6). En la figura 7 se muestra una descripción detallada de los pasos involucrados en la construcción de este tipo de bibliotecas.

SELECCIÓN DE CLONAS ESPECÍFICAS Y MADURACIÓN DE LA AFINIDAD

Esta se lleva a cabo tamizando la biblioteca de scFvs utilizando como blanco de unión el antígeno de interés, generalmente éste adherido a los pozos de una placa tipo de ELISA. El proceso de tamizaje involucra varias rondas de selección, conforme se van realizando, la astringencia del medio va aumentando para que al final queden sólo las clonas con la más alta afinidad. Las clonas más afines y específicas son analizadas, midiendo su afinidad⁷⁵⁻⁷⁷, y determinando su secuencia nucleotídica⁷⁸. Algunas veces, es necesario someter las clonas específicas a un proceso de maduración, con la finalidad de mejorar la afinidad. Existen dos formas de madurar clonas específicas de scFv, por mutagénesis dirigida y por intercambio de cadenas. En el primero, aminoácidos de uno o más de los CDR son sustituidos con diferentes residuos seguidos por la selección de clonas con la más alta afinidad para el antígeno blanco. Una variante más fina de este método consiste en analizar la secuencia completa de los CDR para identificar aminoácidos que están activamente involucrados en la unión al antígeno⁷⁹⁻⁸². Siguiendo este método la afinidad puede ser incrementada hasta 30 veces⁸³.

PRODUCCIÓN DE UN SCFV SOLUBLE

El fin último de esta tecnología es obtener el fragmento del anticuerpo y tenerlo disponible sin limitaciones para poder emplearlo en investigación, terapéutica, diagnóstico. La obtención de scFv soluble puede conseguirse clonando el fragmento de DNA que codifica para este en un vector de expresión bacteriano o eucarionte, por ejemplo, comúnmente se empleaba el sistema de expresión en levadura (*Pichia pastoris*). Recientemente, las

manipulaciones genéticas han permitido desarrollar un sistema efectivo para la expresión de scFvs solubles, usando fagémidos y cepas bacterianas adecuadas al diseño de éste. En el fagémido el codón de termino UAG (ámbar) es colocado entre el scFv y la proteína III, y se emplea un sistema de dos cepas, una supresora (TG1) de la mutación ámbar (utilización del codón UAG para una glutamina) la cual sirve para propagar la biblioteca y generar fagos recombinantes, y otra no supresora (HB2151) que reconoce el termino de la transcripción al encontrar el codón ámbar, lo que produce el fragmento del anticuerpo soluble. Asimismo, para mejorar la obtención y purificación de los fragmentos solubles se han implementado otras estrategias, por ejemplo, la inserción de una secuencia etiqueta situada entre el inserto y el codón ámbar, la cual puede codificar para un péptido específico reconocido por un anticuerpo monoclonal de fácil adquisición en las casas comerciales (por ejemplo, E-tag, flag, myc/His), permitiendo su rápida purificación mediante una cromatografía de afinidad, o de la unión de un hexapéptido de histidinas para permitir su purificación por cromatografía de afinidad por metales.

MEJORAMIENTO DE LA AVIDEZ

La molécula scFv es monovalente y contiene un sencillo paratopo funcional; consecuentemente su avides es baja. Como ya se mencionó, el scFv debe su plegamiento a la presencia de un conector

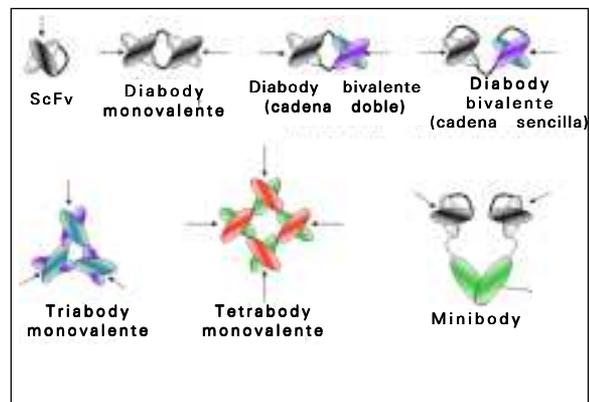


Figura 8. Anticuerpos recombinantes. La avides de los anticuerpos puede ser mejorada haciendo construcciones bivalentes con una sola especificidad o con dos especificidades distintas. La manipulación de este tipo de moléculas ha permitido obtener construcciones tri- y tetravalentes, e incluso anticuerpos sintéticos que contienen el tercer dominio constante de la cadena pesada. Las flechas indican la zona de unión a antígeno.

flexible de 15 residuos de aminoácidos que permite se dé la interacción correcta entre cadenas N-terminal de V_H con la N-terminal de V_L . Bajo este precepto, es posible la construcción de moléculas diméricas, ya que al acortar el conector a 5 residuos de longitud se previene el alineamiento intramolecular, forzando a la molécula a asociarse con los dominios de otra molécula, dicha asociación recibe el nombre de “*diabody*”. Un *diabody* es un dímero de scFvs con dos paratopos funcionales con una avidéz más alta que el monómero. Acortando el conector a 3 residuos o haciendo el ensamblado sin conector, previene la formación del dímero y permite una asociación más estable como la del trímero o *triabody* con tres paratopos, y/o del tetrámero con cuatro⁸⁴⁻⁸⁷.

Las construcciones anteriores hacen referencia a una sola especificidad, sólo reconocen un epítipo (monoclonalidad). Sin embargo en algunos casos, lo conveniente es tener moléculas biespecíficas. Para construir una molécula scFv biespecífica es necesario hacer un intercambio de cadenas de diferente especificidad. Por ejemplo, si se tiene un scFv con especificidad para A ($V_{HA}V_{LA}$) y otra para B ($V_{HB}V_{LB}$) es necesario hacer un nuevo ensamblaje, una intercalación de cadenas en el mismo vector de expresión, la nueva construcción quedaría de la siguiente forma: $V_{HA}V_{LB}-V_{HB}V_{LA}$, también es indispensable el uso de un conector de cinco residuos para evitar la asociación intramolecular. Hasta ahora la asociación más estable como consecuencia de un conector corto, es un tipo de cruceta, en la que el producto es un dímero o *diabody* biespecífico⁸⁸⁻⁹⁰. La figura 8 muestra los diferentes tipos de moléculas de anticuerpos recombinantes.

APLICACIONES Y PERSPECTIVAS

Las principales aplicaciones de los anticuerpos, hasta la fecha, en donde han tenido gran relevancia son el área biomédica, la investigación, el diagnóstico y la terapéutica. En investigación han tenido aplicación en la identificación y clonación de genes, aislamiento de proteínas, la activación de enzimas, en el conocimiento de la estructura molecular y en morfogénesis, así como en la localización de moléculas en tejidos. En diagnóstico, debido a su gran especificidad y capacidad ilimitada de reconocimiento de cualquier estructura química, han permitido la detección de hormonas, vitaminas, citocinas, metabolitos; monitorear el estado de vías metabólicas principales, medir el abuso de drogas

o el funcionamiento de los órganos; la detección de enfermedades infecciosas, autoinmunes, alérgicas, oncológicas o congénitas; en hematología han contribuido a la detección de grupos sanguíneos y pruebas relacionadas con transfusiones⁹¹ y transplantes (moléculas HLA). Las aplicaciones terapéuticas constituyen el campo más importante de los anticuerpos, ya que son capaces de erradicar ciertas infecciones y destruir células, incluidas las tumorales, mediante distintos mecanismos. Por esta razón, son excelentes biomoléculas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes, cáncer o para evitar el rechazo trasplantes.

Existen varios anticuerpos monoclonales aprobados para su uso en determinadas enfermedades, hasta el momento sólo son 18, pero una gran cantidad están en proceso y muchos otros en fase de ensayo. En un principio nadie se imaginaba que fuera posible sintetizar anticuerpos, una molécula tan importante y estructuralmente compleja fuera del organismo, en la actualidad es posible hacerlo *in vitro*, además la biotecnología ha puesto su parte en el desarrollo de metodologías que permitan optimizar los procesos para producción a gran escala, que hasta el momento son muy costosos. Sin embargo; los tópicos que aún no han sido resueltos del todo son la recuperación y purificación de estas moléculas; a este respecto los métodos de producción *in vivo* tienen una limitante de connotación ética, pues todavía no están bien establecidas las legislaciones apropiadas sobre el uso de animales transgénicos, por ejemplo. Por otra parte, la tecnología de anticuerpos recombinantes ha venido a facilitar aún más las cosas debido a sus bajos costos de producción y desde el punto de vista bioquímico, las moléculas implicadas representan la mínima expresión del sistema de reconocimiento, por ejemplo los VHH, que aun cuando son sólo el dominio variable de la cadena pesada derivados de los camélidos, no pierden la capacidad de interactuar con el antígeno correspondiente con alta afinidad y especificidad y han sido puestos a prueba con antígenos de diferente naturaleza^{92,93}, y desde el punto de vista terapéutico, es mínimo el reconocimiento por el sistema del organismo a tratar. Esta tecnología ha demostrado ser prometedora, ya que se han tenido resultados tan buenos como los de los anticuerpos monoclonales, tanto que en la actualidad se han recuperado los genes de las cadenas V_H y V_L de hibridomas importantes, los cuales ya han sido

producidos en fagos y evaluados, manteniendo el mismo efecto, pero bajo la salvedad de que las exigencias de producción son mínimas y los costos más bajos. Respecto a otras ventajas que ofrece la tecnología, es muy importante mencionar que es posible aumentar la afinidad de las moléculas mediante manipulación de los genes V_H y V_L y más específicamente mediante la modificación de los CDR. En la naturaleza este proceso se lleva a cabo por recombinación somática, por lo que nuevamente esta técnica ha sido empleada para mejorar la afinidad de los anticuerpos producidos mediante hibridomas con probada efectividad en diversas áreas terapéuticas. Por otra parte, como ya se mencionó, es factible mejorar la avidéz de las moléculas, haciéndolas más sofisticadas y complejas, por ejemplo, es posible hacer una molécula bi-, tri- o tetravalente por simple modificación en la longitud del conector, o hacer moléculas con varias especificidades por reordenamiento en la posición de los genes de las cadenas involucradas⁹⁴. Aunado a estas mejoras, sobre todo respecto a la terapéutica, es posible hacer un acoplamiento de los de los scFv a moléculas que coadyuven el efecto, por ejemplo toxinas, fármacos, radionúclidos o moléculas efectoras, lo que permite que su acción sea sitio-específica para casos como el cáncer o trasplantes, o para aumentar la biodisponibilidad de un fármaco, así como disminuir los efectos secundarios indeseables⁹⁵.

Existe ya una extensa cantidad de ejemplos de anticuerpos recombinantes con potencial uso terapéutico, entre los cuales destacan los hechos contra distintos tipos de cáncer, para leucemia⁹⁶⁻⁹⁸, adenocarcinomas⁹⁹, tumores^{100, 101}, melanomas¹⁰²⁻¹⁰⁴, por mencionar algunos. Una limitación importante de los anticuerpos es que tienen un intervalo de acción limitado al espacio extracelular, lo que ha sido resuelto acoplado al anticuerpo un péptido acarreador^{105, 106} de naturaleza anfipática que lo ayude a atravesar la membrana plasmática. Bajo la perspectiva de la terapia génica, y las mejoras en las estrategias de la transgénesis, varios esfuerzos han sido encausados para combatir ciertas enfermedades de índole infecciosa o degenerativa, con la generación de anticuerpos recombinantes bloqueadores expresados en el interior de la célula, estos anticuerpos recombinantes intracelulares son referidos como *intrabodies*. Esto se logra introduciendo por medio de un vector, generalmente de tipo viral, los genes de las cadenas

V_H y V_L con secuencias específicas de localización subcelular, con la finalidad de que los anticuerpos recombinantes generados sean transportados a algún compartimento celular en particular, por ejemplo el núcleo, las mitocondrias o el retículo, dependiendo del lugar en que se encuentre la molécula a bloquear^{107, 108}. Los *intrabodies* han demostrado ser una herramienta importante para la investigación, validación e incuestionablemente en la terapéutica, tanto que en la actualidad se ha vuelto una opción atractiva que cada vez comienza a ganar más adeptos respecto a la estrategia del ARN de interferencia¹⁰⁹. Experimentalmente existen casos específicos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson^{110, 111}, Huntington^{112, 113} y Alzheimer^{114, 115}; virales como el herpes virus asociado a sarcoma de Kaposi¹¹⁶, virus del papiloma¹¹⁷, virus de la hepatitis C¹¹⁸, rotavirus¹¹⁹ y virus de la inmunodeficiencia humana¹²⁰⁻¹²³. En oncología este tipo de moléculas no sólo han servido para el área clínica, si no también para dilucidar algunos mecanismos de transformación involucrados^{124, 125}. Cabe mencionar que el área microbiológica y parasitológica todavía tiene muchos retos a vencer pues existen varias enfermedades de difícil erradicación causadas por parásitos intracelulares tales como *Trypanosoma sp.*, *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.*, *Toxoplasma sp.*; bacterias como *Mycobacterium sp.*, *Chlamydia sp.*, *Listeria sp.*, y hongos como *Histoplasma sp.* y *Cryptococcus sp.*, por lo que habría que considerar la posibilidad de aplicar esta tecnología para su estudio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el Donativo para Abraham Landa (Contrato: 43806-M) y la beca otorgada a Víctor Sanabria (Becario # 204074).

SUMMARY

Antibodies: properties, applications and perspectives

Antibodies appeared in the organisms in response to the needs of neutralizing and destroying the attacks of external agents injurious to themselves. Antibodies are macromolecules that because of their properties of specificity and affinity to their antigens, have been used in a great variety of studies in medicine. Moreover, their manipulation out of living systems has permitted their application in the treatment and opportune diagnosis of several diseases. The present work shows a synopsis of antibodies' biochemical properties and the most recent strategies that have allowed the manipulation of these molecules in order to improve their affinity and avidity. This work will also present the methodological advances that can increase antibodies application potential in biology and in medical research. (MÉDICAS UIS 2007;20(1):15-30).

KEY WORDS: Antibodies. Recombinant antibodies. Monoclonal antibodies. Bacteriophages. Immunoglobulins. scFv fragment. Therapy.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stites DP, Carr MC, Fudenberg HH. Ontogeny of cellular immunity in man. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1975;11(1):489-93.
2. Heremans JF. Immunochemical studies on protein pathology. The immunoglobulin concept. *Clin Chim Acta.* 1959;4:639-46.
3. Edelman G. The covalent structure of an entire α -globulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1969;63:78-85.
4. Edelman GM, Heremans JF, Heremans MT, Kunkel HG. Immunological studies of human gamma-globulin. Relation of the precipitin lines of whole gamma-globulin to those of the fragments produced by papain. *J Exp Med* 1960;112:203-23.
5. Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
6. Silvertown EW, Navia MA, Davies DR. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(11):5140-4.
7. Jefferis R, Lund J, Pound JD. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev.* 1998;163:59-76.
8. Raju TS, Scallon B. Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(3):797-803.
9. Goodman JW. Inmunoglobulinas I: estructura y función. En: Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, Wells JV, eds. *Inmunología básica y clínica.* 5ª ed. México D.F: El manual moderno 1985; 32-44.
10. Martin NH. The immunoglobulins: a review. *J Clin Pathol* 1969;22(2):117-31.
11. Kracker S, Radbruch A. Immunoglobulin class switching: in vitro induction and analysis. *Methods Mol Biol* 2004;271:149-59.
12. Cerutti A, Zan H, Schaffer A, Bergsagel L, Harindranath N, Max EE, et al. CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. *J Immunol* 1998;160(5):2145-57.
13. Snapper CM, Finkelman FD, Stefany D, Conrad DH, Paul WE. IL-4 induces co-expression of intrinsic membrane IgG1 and IgE by murine B cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol* 1988;141:489.
14. Malisan F, Briere F, Bridon JM, Harindranath N, Mills FC, Max EE, et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* 183(3):937-47.
15. Islam KB, Nilsson L, Sideras P, Hammarstrom L, Smith CI. TGF-beta 1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol* 1991;3(11):1099-106.
16. McIntyre TM, Klinman DR, Rothman P, Lugo M, Dasch JR, Mond JJ, et al. Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. *J Exp Med* 1993;177(4):1031-7.
17. Collins JT, Dunnick WA. Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma. *Int Immunol* 1993;5(8):885-91.
18. Bossie A, Vitetta ES. IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN-gamma in class switching. *Cell Immunol* 1991;135(1):95-104.
19. Snapper CM, Peschel C, Paul WE. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1988;140:2121.
20. Strom L, Laurencikienė J, Miskiniene A, Severinson E. Characterization of CD40-dependent immunoglobulin class switching. *Scand J Immunol* 1999;49(5):523-32.
21. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993;363(6428):446-8.
22. Riechmann L, Muyldermans S. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *J Immunol Methods* 1999;231(1-2):25-38.
23. Muyldermans S, Lauwereys M. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *J Mol Recognit* 1999;12(2):131-40.
24. Transue TR, De Genst E, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate. *Proteins* 1998;32(4):515-22.
25. Lauwereys M, Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Kinne J, Holzer W, De Genst E, Wyns L, Muyldermans S. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J* 1998;17(13):3512-20.
26. Desmyter A, Spinelli S, Payan F, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S, Cambillau C. Three camelid VHH domains in complex with porcine pancreatic alpha-amylase. Inhibition and versatility of binding topology. *J Biol Chem* 2002;277(26):23645-50.
27. Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 1995;16(8):392-8.
28. Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J Med Food* 2002;5(3):159-69.
29. Shin NR, Choi IS, Kim JM, Hur W, Yoo HS. Effective methods for the production of immunoglobulin Y using immunogens of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Sci* 2002;3(1):47-57.
30. Shin JH, Roe IH, Kim HG. Production of anti-*Helicobacter pylori* urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of H. pylori urease. *J Med Microbiol* 2004;53(Pt 1):31-4.
31. Streltsov VA, Carmichael JA, Nuttall SD. Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype. *Protein Sci* 2005;14(11):2901-9.
32. Marchalonis JJ, Schluter SF, Bernstein RM, Hohman VS. Antibodies of sharks: revolution and evolution. *Immunol Rev* 1998;166:103-22.
33. Nuttall SD, Irving RA, Hudson PJ. Immunoglobulin VH domains and beyond: design and selection of single-domain binding and targeting reagents. *Curr Pharm Biotechnol* 2000;1(3):253-63.
34. Diaz M, Flajnik MF, Klinman N. Evolution and the molecular basis of somatic hypermutation of antigen receptor genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356(1405):67-72.
35. Langman R, Cohn M. Haplotype exclusion: the solution to a problem in natural selection. *Semin Immunol* 2002;14(3):153-62.
36. Tonegawa S. Nobel lecture in physiology or medicine—1987. Somatic generation of immune diversity. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988;4:253-65.
37. Dreyer WJ, Bennett JC. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1965; 54: 864-870.
38. Tonegawa S, Steinberg C, Dube S, Bernardini A. Evidence for somatic recombination of antibody diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1974; 71; 10: 4027-31.
39. Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1976; 73:3628.
40. Braek C, Hiramama M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell.* 1978;15:1.
41. Lenhard-Schuller R, Hohn B, Brack C, Hiramama M, Tonegawa S. DNA clones containing mouse immunoglobulin ϵ chain genes isolated by in vitro packaging into phage ϕ coats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978; 74:4709.
42. Seidman JG, Leder P. The arrangement and rearrangement of antibody genes. *Nature* 1978; 276:790.
43. Sakano H, Hiiippi K, Heinrich G, Tonegawa S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 1979; 280:288.
44. Max EE, Seidman JG, Leder P. Sequences of five recombination sites encoded close to an immunoglobulin μ constant region gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979;76:3450.
45. Blomberg B, Tonegawa S. DNA sequences of the joining regions of mouse δ light chain immunoglobulin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79: 530-3.
46. Schilling J, Clevinger B, Davie JM, Hood L. Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy-chain V-region gene segments. *Nature* 1980; 283:35.
47. Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L. An immunoglobulin heavy-chain variable region gene is generated from three segments of DNA: V_{H1}, D and J_{H1}. *Cell* 1980; 19:981.
48. Sakano H, Maki R, Kurosawa Y, Roeder W, Tonegawa S. Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy chain genes. *Nature* 1980; 286:676.
49. Wu LC, Mak CH, Dear N, Boehm T, Foroni L, Rabbitts TH. Molecular cloning of a zinc finger protein which binds to the heptamer of the

- signal sequence for V(D)J recombination. *Nucleic Acids Res* 1993;21(22):5067-73.
50. Sakano H, Kurosawa Y, Weigert M, Tonegawa S. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 1981;290:562.
 51. Kurosawa Y, von Boehmer H, Haas W, Sakano H, Traunecker A, Tonegawa S. Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes. *Nature* 1981;290:565.
 52. Schwartz RS. Shattuck lecture: diversity of the immune repertoire and immunoregulation. *N Engl J Med* 2003;348(11):1017-26.
 53. Maki R, Traunecker A, Sakano H, Roeder W, Tonegawa S. Exon shuffling generates an immunoglobulin heavy chain gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77;4:2138-42.
 54. Novotny J, Brucoleri R, Newell J, Murphy D, Haber E, Karplus M. Molecular anatomy of the antibody binding site. *J Biol Chem*. 1983;10:258(23):14433-7.
 55. Novotny J, Haber E. Structural invariants of antigen binding: comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimmers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(14):4592-6.
 56. Chothia C, Gelfand I, Kister A. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol* 1998;1:278(2):457-79.
 57. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975, *J Immunol* 2005;174(5):2453-5.
 58. de StGroth SF, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods*;35(1-2):1-21.
 59. Milstein C. From the structure of antibodies to the diversification of the immune response. *EMBO J* 1985;4(5):1083-92.
 60. Galfré G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol* 1981;73(PtB):3-46.
 61. Anderson PN, Potter M. Induction of plasma cell tumours in BALB-c mice with 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane). *Nature* 1969;222(5197):994-5.
 62. Kuhlmann II, Kurth W, Ruhdel II. Monoclonal antibodies: in vivo- and in vitro-production in laboratory scale with consideration of the legal aspects of animal protection. *ALTEX* 1989;6(2):12-26.
 63. Reichert J, Pavolu A. Monoclonal antibodies market. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3(5):383-4.
 64. Smith GP, Petrenko V. Phage Display. *Chem. Rev.* 1997;97:391-410.
 65. Stricker N, Li M. Phage Display Technologies. *Encyclopedia of Life Sciences/Nature Publishing Group* 2001;1-5.
 66. Jespers LS, Messens JH, De Keyser A, Eeckhout D, Van den Brande I, Gansemans YG, Lauwereys MJ, Vlasuk GP, Stanssens PE. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Biotechnology* 1995;13(4):378-82.
 67. Gao C, Mao S, Kaufmann G, Wirsching P, Lerner RA, Janda K. A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(20):12612-12616.
 68. Gao C, Mao S, Ditzel HJ, Farnaes L, Wirsching P, Lerner RA, Janda KD. A cell-penetrating peptide from a novel pVII-pIX phage-displayed random peptide library. *Bioorg Med Chem* 2002;10(12):4057-65.
 69. Russel M. Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export. *Science* 1994;265:612-14.
 70. Azzazy HM, Highsmith E. Phage display technology: Clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*. 2002;35:425-45.
 71. Gao C, Lin CH, Lo CH, Mao S, Wirsching P, Lerner RA, Janda KD. Making chemistry selectable by linking it to infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(22):11777-82.
 72. Beckmann C., Haase B, Timmis KN, Tesar M. Multifunctional g3p-peptide tag for current phage display systems. *J Immunol Methods* 1998;212:131-8.
 73. Barbas CF, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(18):7978-82.
 74. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991;352(6336):624-8.
 75. Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 1992;226(3):889-96.
 76. Malmberg AC, Michaelsson A, Ohlin M, Jansson B, Borrebaeck CA. Real time analysis of antibody-antigen reaction kinetics. *Scand J Immunol* 1992;35(6):643-50.
 77. Malmberg AC, Duenas M, Ohlin M, Soderlind E, Borrebaeck CA. Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore biosensor. *J Immunol Methods* 1996;198(1):51-7.
 78. Eggena M, Targan SR, Iwanczyk L, Vidrich A, Gordon LK, Braun J., Phage display cloning and characterization of an immunogenetic marker (perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody) in ulcerative colitis. *J Immunol* 1996;156(10):4005-11.
 79. Schier R, Balint RF, McCall A, Apell G, Larrick JW, Marks JD. Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. *Gene* 1996;169(2):147-55.
 80. Marks JD. Antibody affinity maturation by chain shuffling. *Methods Mol Biol* 2004;248:327-43.
 81. Figini M, Marks JD, Winter G, Griffiths AD. In vitro assembly of repertoires of antibody chains on the surface of phage by renaturation. *J Mol Biol* 1994;239(1):68-78.
 82. Garrard LJ, Yang M, O'Connell MP, Kelley RF, Henner DJ. Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Biotechnology* 1991;9(12):1373-7.
 83. Schier R, Marks JD. Efficient in vitro affinity maturation of phage antibodies using BIAcore guided selections. *Hum Antibodies Hybridomas* 1996;7(3):97-105.
 84. Kort AA, Lah M, Oddie GW, Gruen CL, Burns JE, Pearce LA, Atwell JL, McCoy AJ, Howlett GJ, Metzger DW, Webster RG, Hudson PJ. Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. *Protein Eng.* 1997;10(4):423-33.
 85. Atwell JL, Breheny KA, Lawrence LJ, McCoy AJ, Kort AA, Hudson PJ. ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng* 1999;12(7):597-604.
 86. Iliades P, Kort AA, Hudson PJ. Triabodies: single chain Fv fragments without linker form trivalent trimers. *FEBS Lett* 1997;409(3):437-41.
 87. Le Gall F, Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Little M. Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding. *FEBS Lett* 1999;453(1-2):164-8.
 88. Kranz DM, Gruber M, Wilson ER. Properties of bispecific single chain antibodies expressed in *Escherichia coli*. *J Hematother* 1995;4(5):403-8.
 89. McGuinness BT, Walter C, FitzGerald K, Schuler P, Mahoney W, Duncan AR, Hoogenboom HR. Phage diabody repertoires for selection of large numbers of bispecific antibody fragments. *Nature Biotechnol* 1996;14(9):1149-54.
 90. Zhu Z, Presta LG, Zapata G, Carter P. Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation. *Protein Sci* 1997;6(4):781-8.
 91. Furuta M, Uchikawa M, Ueda Y, Yabe T, Taima T, Tsumoto, et al. Construction of mono- and bivalent human single-chain Fv fragments against the D antigen in the Rh blood group: multimerization effect on cell agglutination and application to blood typing. *Protein Eng* 1998;11(3):233-41.
 92. Riechmann L, Muyldermans S. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *J Immunol Methods* 1999;231(1-2):25-38.
 93. Desmyter A, Decanniere K, Muyldermans S, Wyns L. Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. *J Biol Chem* 2001;276(28):26285-90.
 94. Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kort AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. Design and application of diabodies, triabodies and tetraabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods* 2001;248(1-2):47-66.
 95. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1(2):118-29.
 96. Lin Y, Pagel JM, Axworthy D, Pantelias A, Hedin N, Press OW. A genetically engineered anti-CD45 single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted radioimmunotherapy of hematologic malignancies. *Cancer Res* 2006;66(7):3884-92.
 97. Erickson HA, Jund MD, Pennell CA. Cytotoxicity of human RNase-based immunotoxins requires cytosolic access and resistance to ribonuclease inhibition. *Protein Eng Des Sel* 2006;19(1):37-45.
 98. Schwemmler M, Peipp M, Barbin K, Saul D, Stockmeyer B, Repp R, Birkmann J, Odunco F, Emmerich B, Fey GH. A CD33-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of cultured human myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol* 2006;133(2):141-51.
 99. Mayer A, Francis RJ, Sharma SK, Tolner B, Springer CJ, Martin J, et al. A Phase I Study of Single Administration of Antibody-Directed Enzyme

- Prodrug Therapy with the Recombinant Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibody-Enzyme Fusion Protein MFCEP1 and a Bis-Iodo Phenol Mustard. *Prodrug, Clin Cancer Res* 2006;12(21):6509-16.
100. Krauss J, Arndt MA, Vu BK, Newton DL, Seeber S, Rybak SM. Efficient killing of CD22+ tumor cells by a humanized diabody-RNase fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331(2):595-602.
 101. Moosmayer D, Berndorff D, Chang CH, Sharkey RM, Rother A, Borkowski S, et al . Bispecific antibody pretargeting of tumor neovasculature for improved systemic radiotherapy of solid tumors. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5587-95.
 102. Liu Y, Zhang W, Niu T, Cheung LH, Munshi A, Meyn RE Jr, et al. Targeted apoptosis activation with GrB/scFvMEL modulates melanoma growth, metastatic spread, chemosensitivity, and radiosensitivity. *Neoplasia* 2006;8(2):125-35.
 103. Pacifico MD, Pearl RA, Kupsch JM. The use of a cocktail of single chain Fv antibody fragments to improve the in vitro and in vivo targeting of melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(1):45-53.
 104. Liu Y, Zhang W, Cheung LH, Niu T, Wu Q, Li C, et al . The antimelanoma immunocytokine scFvMEL/TNF shows reduced toxicity and potent antitumor activity against human tumor xenografts. *Neoplasia* 2006 ;8(5):384-93.
 105. Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2001;19(12):1173-6.
 106. Heng BC, Cao T. Making cell-permeable antibodies (Transbody) through fusion of protein transduction domains (PTD) with single chain variable fragment (scFv) antibodies: potential advantages over antibodies expressed within the intracellular environment (Intrabody). *Med Hypotheses* 2005;64(6):1105-8.
 107. Lobato MN, Rabbitts TH. Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends Mol Med.* 2003;9(9):390-6.
 108. Stocks M. Intrabodies as drug discovery tools and therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 2005 ;9(4):359-65.
 109. Heng BC, Kemeny DM, Liu H, Cao T. Potential applications of intracellular antibodies (intrabodies) in stem cell therapeutics. *J Cell Mol Med* 2005;9(1):191-5.
 110. Maguire-Zeiss KA, Yehling E, Giuliano R, Sullivan M, Federoff, HJ. HSV amplicon expression of single-chain antibodies directed against a synuclein conformer. *Mol. Ther* 2004;9: S86.
 111. Maguire-Zeiss KA, Wang CI, Yehling E, Sullivan MA, Short DW, Su X, Gouzer G, Henricksen LA, Wuertz CA, Federoff HJ. Identification of human alpha-synuclein specific single chain antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349(4):1198-205.
 112. Colby DW, Chu Y, Cassady JP, Duennwald M, Zazulak H, Webster JM, Messer A, Lindquist S, Ingram VM, Wittrup KD. Potent inhibition of huntingtin aggregation and cytotoxicity by a disulfide bond-free single-domain intracellular antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(51):17616-21.
 113. Wolfgang WJ, Miller TW, Webster JM, Huston JS, Thompson LM, Marsh JL, Messer A. Suppression of Huntington's disease pathology in *Drosophila* by human single-chain Fv antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(32):11563-8.
 114. Paganetti P, Calanca V, Galli C, Stefani M, Molinari M. Beta-site specific intrabodies to decrease and prevent generation of Alzheimer's Abeta peptide. *J Cell Biol* 2005;168(6):863-8.
 115. Fukuchi K, Tahara K, Kim HD, Maxwell JA, Lewis TL, Accavitti-Loper MA, et al . Anti-Abeta single-chain antibody delivery via adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2006;23(3):502-11.
 116. Corte-Real S, Collins C, Aires da Silva F, Simas JP, Barbas CF III, Chang Y, et al. Intrabodies targeting the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency antigen inhibit viral persistence in lymphoma cells. *Blood* 2005;106(12):3797-802.
 117. Griffin H, Elston R, Jackson D, Ansell K, Coleman M, Winter G, et al. Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting. *J Mol Biol* 2006;355(3):360-78
 118. Zemel R, Berdichevsky Y, Bachmatov L, Benhar I, Tur-Kaspa R. Inhibition of hepatitis C virus NS3-mediated cell transformation by recombinant intracellular antibodies. *J Hepatol* 2004;40(6):1000-7.
 119. Vascotto F, Visintin M, Cattaneo A, Burrone OR. Design and selection of an intrabody library produced de-novo for the non-structural protein NSP5 of rotavirus. *J Immunol Methods* 2005;301(1-2):31-40.
 120. Marasco WA, LaVecchio J, Winkler A. Human anti-HIV-1 tat sFv intrabodies for gene therapy of advanced HIV-1-infection and AIDS. *J Immunol Methods* 1999;231(1-2):223-38.
 121. Bai J, Sui J, Zhu RY, Tallarico AS, Gennari F, Zhang D, Marasco WA. Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclinT1 intrabodies. *J Biol Chem* 2003;278(3):1433-42.
 122. Aires da Silva F, Santa-Marta M, Freitas-Vieira A, Mascarenhas P, Barahona I, Moniz-Pereira J, et al. Camelized rabbit-derived VH single-domain intrabodies against Vif strongly neutralize HIV-1 infectivity. *J Mol Biol* 2004 ;340(3):525-42.
 123. Swan CH, Buhler B, Tschan MP, Barbas CF, Torbett BE. T-cell protection and enrichment through lentiviral CCR5 intrabody gene delivery. *Gene Ther* 2006;13(20):1480-92
 124. Paz K, Brennan LA, Iacolina M, Doody J, Hadari YR, Zhu Z. Human single-domain neutralizing intrabodies directed against Etk kinase: a novel approach to impair cellular transformation. *Mol Cancer Ther* 2005;4(11):1801-9.
 125. Williams BR, Zhu Z. Intrabody-based approaches to cancer therapy: status and prospects. *Curr Med Chem* 2006;13(12):1473-80.