



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

500551

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DEPARTAMENTO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y BIOESTRUCTURA

CLONACION Y EXPRESION DEL FRAGMENTO Fab QUIMERICO MURINO-HUMANO CON AFINIDAD POR LA TOXINA Cn2 DEL ALACRAN Centruroides noxius Hoffmann.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

BIOL GABRIELA COSIO GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDUARDO HORJALES REBOREDO

CUERNAVACA, MORELOS 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central




UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Eduardo Horjales Reboredo del Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología, UNAM. Durante el periodo que se llevo a cabo este trabajo, conté con el apoyo de una beca para estudios de Maestría otorgada por el CONACyT y una beca-complemento otorgada por la DGEP.

Agradecimientos.

A mis padres por todo su amor, enseñanzas, apoyo y confianza.

A mis hermanos, Pavo y Diana.

A Héctor por todo su amor.

A mis muy buenos amigos de la maestría con quienes compartí esta nueva etapa de mi vida: Vancha, Lolita, Adriana, Gerardo, Isadora, Beto, Mao, y Gabo.

Al Dr. Eduardo Horjales por su dirección y por permitirme realizar el presente trabajo en su laboratorio.

De manera especial a Barbara Selisko por su valiosa asesoría, paciencia y amistad. Gracias!

A mi comité tutorial Dra. Marietta Tuena y Dr. Humberto Flores por sus importantes críticas, asesoría y ayuda.

A los Lab. de los Drs. L. Possani, E. Morett, X. Soberón, A. Alagón, por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

A Brenda Valderrama, Roberto Stock, Baltazar Becerril y Carlos González por su valiosa asesoría.

A mi Jurado de Examen integrado por la Dra. Brenda Valderrama, Dr. Baltazar Becerril, Dr. Karén Manoutcharian, Dr. Alejandro Alagón y Dr. Eduardo Horjales por sus críticas, comentarios y sugerencias.

De manera especial a Lolita, Beto y Markus por su cariño y hospitalidad.

A mis compañeros del laboratorio por hacer de él un lugar agradable donde trabajar: Sandra, Barbara, Rodrigo, Enrique, Rosario, Sonia y Angélica.

A mis amigos porque a pesar de la distancia lo seguimos siendo: Mike, Diana, Anizze, Samuel, Erika, Gerardo, Roxana, Mely e Ivonne.

A todos aquellos que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo Mil Gracias!.

Resumen.

En el presente trabajo se presenta la clonación y expresión de un fragmento Fab quimérico humano-murino usando los vectores del sistema de despliegue en fagos Pasteur-Merieux. El Fab quimérico se expresó de manera secretoria en *E. coli* y se extrajo del periplasma mediante lisis osmótica. El Fab producido presentó actividad por la toxina Cn2 del veneno del alacrán *C. noxius* Hoffmann, de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA. Adicionalmente a la expresión del Fab quimérico, se dieron los primeros pasos para probar la factibilidad del empleo del sistema Pasteur-Merieux en la futura construcción de bancos combinatorios.

La expresión soluble del Fab quimérico en *E. coli* presentada en este trabajo representa un avance hacia la obtención de material puro y en cantidades suficientes para posteriormente cristalizar la proteína y determinar su estructura tridimensional así como para determinar la afinidad y capacidad neutralizante del Fab hacia la toxina Cn2 y hacia venenos de otros alacranes del género *Centruroides*. El fragmento Fab quimérico recombinante puede representar el primer componente de un anti-veneno "policlonal" eficiente.

Indice.

Introducción	01-22
Características del veneno del alacrán <i>Centruroides noxius</i> Hoffmann	02-04
Toxina Cn2	05
Anticuerpo monoclonal BCF2	05-06
Seroterapia	06-11
Anticuerpos Quiméricos	11-12
Expresión de anticuerpos en <i>E. coli</i>	12-17
Sistema de Despliegue en fagos de Pasteur-Merieux	17-21
Antecedentes	22-23
Objetivos	23
Material y Método	24
Método	
1. Clonación de las regiones constantes humanas y de las variables murinas del Fab quimérico del anticuerpo monoclonal BCF2	25
1.1 Obtención por PCR de las regiones constantes humanas y variables murinas	25-27
1.2 Producción de Fagos λ gt11	27-28
1.3 Clonación de regiones constantes y variables del Fab quimérico	28
2. Expresión soluble del Fab quimérico	29-33
2.1 Transformación por choque térmico	29
2.2 Producción de fagos a partir del fagemido pM846/VH-CH	29
2.3 Titulación de fagos filamentosos	30
2.4 Protocolo de infección y recombinación	30
2.5 Rescate de Fagos	31
2.6 Reamplificación de fagos	31
2.7 Protocolo I de Inducción de la Expresión soluble	31
2.8 Protocolo II de Inducción de la Expresión soluble	32
2.9 Preparación del lisado celular	32
2.10 Preparación de fracciones periplásmicas	32
2.11 Transferencia tipo Western	33
2.12 ELISA	33
Resultados	34-60
I. Clonación de las regiones constantes humanas y de las variables murinas del Fab quimérico	34-38
A. Obtención por PCR de las regiones constantes humanas (CH1 y Ck) y de las regiones variables murinas (VH y Vk)	34-35
B. Clonación de las regiones constantes humanas (CH1 y Ck) y variables murinas (VH y Vk) en los vectores del sistema de despliegue en fagos Pasteur-Merieux	35-38

Introducción.

Las picaduras de alacrán constituyen un problema de salud pública endémico en varias regiones del mundo. En México ocurren alrededor de 200,000 accidentes por año (Dehesa-Dávila and Posanni, 1994). Los alacranes peligrosos al ser humano pertenecen a la familia Buthidae en la que se encuentran los géneros: *Androctonus*, *Buthus*, *Centruroides*, *Leiurus* y *Tityus* (Calderon-Aranda et al, 1993). En México, las 8 especies peligrosas al ser humano pertenecen al género *Centruroides* (Dehesa-Dávila et al, 1994). La sintomatología que se presenta después de una picadura se debe a la estimulación del sistema nervioso autónomo: pudiendo presentarse náuseas, vómito, problemas respiratorios y cardíacos que en algunas ocasiones pueden conducir a la muerte del individuo (Dehesa-Dávila et al, 1994). El tratamiento que más se ha empleado para contrarrestar los efectos del veneno de alacrán es la aplicación de un suero preparado a partir de caballos que han sido inyectados con un macerado de telsones de varios alacranes (Balozet, 1971). A partir del suero se purifican los anticuerpos equinos y se preparan fragmentos $F(ab)_2$ mediante su digestión con pepsina (Balozet, 1971). El antisuero preparado de este modo presenta algunas desventajas como es el bajo título del suero por lo que resulta necesario aplicar altas dosis del mismo y el empleo de mezclas altamente complejas de antígenos para la producción del antiveneno en caballos lo cual distrae la respuesta inmunológica (Calderon-Aranda et al, 1993). Debido a la baja eficiencia del antisuero equino en cuanto a la cantidad de inmunoglobulinas neutralizantes y al riesgo de ocasionar reacciones inmunogénicas en humanos por la presencia de proteínas del caballo, resulta importante la búsqueda de otras alternativas para la obtención de un antiveneno eficaz. Una de estas alternativas es la aplicación de un paso adicional de purificación de fragmentos $F(ab)_2$ mediante el cual se disminuye aún más su inmunogenicidad así como puede aumentarse el título del suero. La aplicación de fragmentos $F(ab)_2$ como antiveneno, recibe el nombre de faboterapia (Alagón et al, 1998). El uso de faboterápicos prácticamente ha eliminado las reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato (anafilaxia) y de tipo tardía (enfermedad del suero) (Alagón et al, 1998). Sin embargo, su aplicación aún presenta un riesgo inherente de provocar alguna reacción inmunogénica debido a la presencia de residuos de aminoácidos en la molécula del $F(ab)_2$ con carácter equino que pudieran ser reconocidos como extraños por el sistema inmune humano y si bien, no generar una respuesta

inmune adversa, si neutralizar y eliminar los efectos terapéuticos del antisuero. Otra alternativa consiste en la producción de fragmentos de anticuerpos neutralizantes quiméricos o humanizados usando la técnica de Despliegue en Fagos (*Phage Display*). La técnica de Despliegue en Fagos permite generar bancos de anticuerpos naturales o sintéticos. Los bancos naturales de anticuerpos pueden ser inmunes o no-inmunes y son creados a partir de la amplificación, clonación y expresión de los genes de las regiones variables de linfocitos B de sujetos donadores que presentan una reacción inmune contra un antígeno dado. Los bancos sintéticos de anticuerpos son creados a partir del ensamblaje, clonación y expresión de los genes de las regiones variables de la línea germinal. La técnica de despliegue en fagos también permite crear bancos de anticuerpos diseñados de acuerdo con distintos criterios para reducir la inmunogenicidad de la molécula (humanización) y para obtener anticuerpos con una determinada especificidad y afinidad por un antígeno.

En este trabajo se presenta la clonación y expresión de un anticuerpo quimérico humano-murino con afinidad por la toxina Cn2 del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann en un sistema de Despliegue en Fagos que fue diseñado para generar bibliotecas combinatorias a partir de las cuales es posible seleccionar el fragmento de anticuerpo que cumple con los requisitos de especificidad y afinidad requeridos.

Características del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann.

El veneno de alacrán está compuesto por una gran variedad de péptidos neurotóxicos; enzimas como la hialuronidasa y fosfodiesterasas (Master et al, 1963); aminoácidos libres y compuestos heterocíclicos (Tu, 1977; Zlotkin et al, 1978; Possani et al, 1980; Lazarovici et al, 1982). Los componentes responsables de la toxicidad del veneno de alacrán son polipéptidos. llamados toxinas, de 4-8 kD (Possani, 1984). Las toxinas son péptidos de carácter básico que actúan sobre canales de sodio (Catterall, 1977), potasio (Carbone et al, 1982), calcio (Valdivia and Possani, 1998) y cloro (DeBin et al, 1993). Los péptidos que se unen a canales de sodio representan el componente mas importante en cuanto a su efecto tóxico debido a su concentración y alta toxicidad (Possani, 1984). Las toxinas que actúan sobre canales de sodio son péptidos de 60-70 aminoácidos y pueden ser de tipo α o β , dependiendo de su efecto

fisiológico y propiedades de unión (Gordon, 1997). Ambos tipos de toxinas modifican la permeabilidad del sodio, modulando el mecanismo de apertura del canal. Las toxinas tipo α disminuyen o inhiben la inactivación de la corriente de sodio mediante su unión al sitio 3 del canal de sodio, mientras que las toxinas β se unen al sitio 4 y cambian el voltaje de activación hacia potenciales más negativos. Las toxinas α y β comparten el mismo motivo estructural constituido por una hoja β antiparalela de tres hebras, una hélice corta y cuatro puentes disulfuro que estabilizan la estructura (Fig. 1.) (Pintar et al, 1999).



Fig. 1. Estructura de Cn2 determinada por espectroscopía bidimensional ^1H - ^1H de NMR (Pintar et al, 1999).

El veneno mejor caracterizado de los alacranes del género *Centruroides* es el de *Centruroides noxius* Hoffmann, el alacrán más peligroso para humanos en México (Hoffmann, 1938). El veneno presenta toxinas específicas para mamíferos (Possani et al, 1981), insectos (Selisko et al, 1996) y crustáceos (García et al, 1997). La dosis letal media (LD_{50}) del veneno soluble es de $0.26 \mu\text{g/g}$ de ratón albino (Dent et al, 1980). Después de aplicar tres pasos de purificación, se han obtenido alrededor de 74 péptidos tóxicos (Possani, comunicación personal). En la primera separación por una columna de Sephadex G50 se

obtienen 3 fracciones distintas (Fig.2A); la fracción I contiene componentes de alto peso molecular (enzimas como hialurodinasa), la fracción III contiene péptidos de bajo peso molecular y otros derivados libres aminados (M.A.R. Dent y L.D. Possani, observaciones no publicadas) y la fracción II contiene polipéptidos tóxicos de un peso molecular entre 3-15 kD (Possani et al, 1981). La fracción II corresponde al 63% del veneno total (Possani et al, 1981). La fracción II se sometió a un paso de separación por intercambio iónico, a partir del cual se obtuvieron 14 fracciones distintas (Fig. 2B) (Possani et al, 1981). De las 14 fracciones, la fracción II-9 se aplicó a una columna de carboximetil-celulosa a partir de la cual se obtuvo la toxina II.9.2.2, también llamada Cn2.

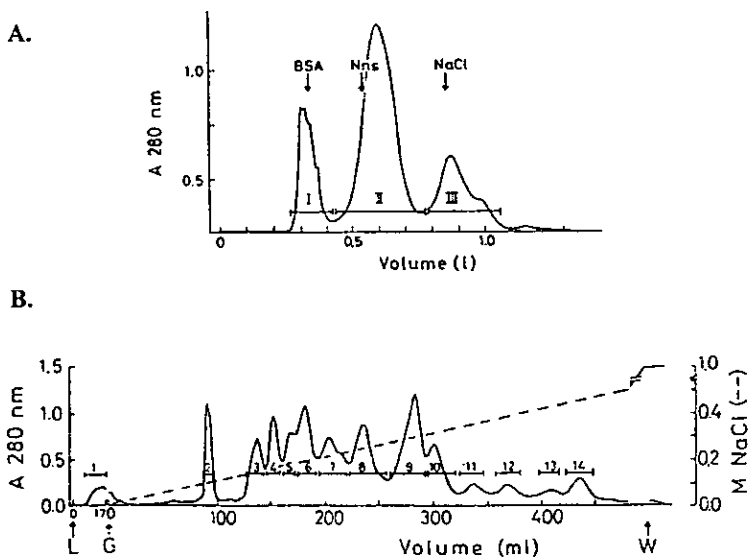


Fig. 2. A. Separación por una columna de Sephadex G50 de los componentes del veneno de *C. noxius* Hoffmann. La fracción I contiene componentes de alto peso molecular (enzimas como hialurodinasa), la fracción III contiene péptidos de bajo peso molecular y otros derivados libres aminados y la fracción II corresponde a polipéptidos tóxicos (Possani et al, 1981). B. La fracción II se sometió a una separación por una columna de carboximetil-celulosa, obteniendo así 14 fracciones distintas. La toxina Cn2 se encuentra en la fracción 14.

Toxina Cn2.

De las 74 toxinas obtenidas a partir del veneno de *C. noxius*, Cn2 es el componente mayoritario representando el 6.8% del veneno total (Zamudio et al, 1992; Valdivia et al, 1994). Cn2 es una toxina tipo β de 66 aminoácidos que afecta la actividad de los canales de sodio de mamíferos. Esta toxina es uno de los componentes más tóxicos del veneno de *C. noxius* y tiene una dosis letal media (LD₅₀) de 0.0125 $\mu\text{g/g}$ de ratón de la cepa CD1 inyectados intraperitonealmente (Licea et al, 1996), es decir, 20 veces más potente que la que presenta el veneno completo. Cn2 presenta una alta similitud a nivel de la estructura primaria con otras toxinas del veneno de *C. noxius* (Becerril et al, 1993; Vázquez et al, 1993; Valdivia et al, 1994) y con toxinas del veneno de alacranes del mismo género (*C. suffusus suffusus* y *C. limpidus tecomanus*) (Dehesa-Dávila et al, 1996). En la Fig. 1. se presenta la estructura de Cn2 determinada por espectroscopía bidimensional ^1H - ^1H de NMR (Pintar et al, 1999). Como se observa, es una estructura formada por una triple hoja β antiparalela y una α -hélice, estabilizada por cuatro puentes disulfuro (Pintar et al, 1999).

Anticuerpo Monoclonal BCF2.

BCF2 es uno de seis anticuerpos monoclonales que se obtuvieron mediante la inyección en ratones de la fracción II.9.2 (contiene a las toxinas Cn2 y Cn3) (Zamudio et al, 1992). BCF2 es una inmunoglobulina de la clase IgG1 para la cadena pesada y tipo kappa para la cadena ligera (Zamudio et al, 1992). De los seis monoclonales, el BCF2 presentó la mayor actividad neutralizante de la toxina Cn2 *in vivo* (Zamudio et al, 1992). BCF2 (650 μg) protegió de manera definitiva a 2 de los 5 ratones de la cepa CD1 inyectados con 7.5 veces la LD₅₀ de Cn2 y retrasó la muerte de los 3 restantes (Zamudio et al, 1992). Adicionalmente se mostró que el anticuerpo BCF2 y sus fragmentos Fab, obtenidos por digestión enzimática, son capaces de neutralizar no sólo a la toxina Cn2 sino también al veneno completo (Licea et al, 1996). En ratones CD1 se encontró que 1 mg de BCF2 es capaz de neutralizar el efecto de 32 LD₅₀ de toxina Cn2, mientras que la misma cantidad es capaz de neutralizar 28 LD₅₀ del veneno completo (Licea et al, 1996). Se prepararon fragmentos Fab de BCF2 mediante su

digestión con papaína y se encontró que 1 mg de fragmentos Fab pueden neutralizar 43 LD₅₀ de veneno (Licca et al. 1996). En proporciones molares eso significa que para neutralizar 1 mg de veneno completo se necesitan 124 µmoles de fragmentos Fab mientras que para neutralizar la misma cantidad de veneno, se requieren 64 µmoles de BCF2, lo cual concuerda con la presencia de una región neutralizante en un Fab y dos en una IgG completa (Licca et al, 1996). También se vió que en comparación con el antisuero de caballo que se utiliza comercialmente. producido por el Instituto Nacional de Higiene. Secretaria de Salud. México (Dehesa-Dávila et al, 1994), la cantidad necesaria de proteína para neutralizar el veneno de alacrán cuando se administran los fragmentos Fab de BCF2, es nueve veces menor que con el antiveneno comercial (Licca et al, 1996). Por otra parte, se ha visto que BCF2 presenta reacciones cruzadas con el veneno de otras especies de alacranes peligrosas para humanos como *Centruroides limpidus limpidus*, *C. limpidus tecomanus*, *C. limpidus acatlanensis*, *C. suffusus suffusus* y *C. infamatus infamatus* (Zamudio et al, 1992). Estas observaciones hacen de BCF2 un candidato prometedor para el diseño y creación de un nuevo antisuero más eficiente que el que se aplica actualmente en humanos.

Seroterapia.

En México, el número de personas heridas por una picadura de alacrán es aproximadamente de 200,000 por año, ocasionando entre 700-800 muertes (Dehesa-Dávila, 1989 ; Monroy-Velasco,1961), razón por la cual las picaduras de alacrán son consideradas un problema de salud pública. El uso de antisueros es el único tratamiento específico contra los efectos de los venenos de animales ponzoñosos (Bon, 1996).

Desde hace más de 100 años se dio a conocer con los trabajos de Sewall (1887), Calmette (1894) y Phisalix y Bertrand (1894) que los anticuerpos policlonales de los sueros de animales inmunizados con venenos resultaban un método simple para el tratamiento de casi cualquier tipo de envenenamiento (Dart and Horowitz, 1996). A principios de siglo se administraba directamente el suero de animales hiperinmunizados y aunque su administración resultaba un tratamiento efectivo en cuanto a la neutralización del veneno, también provocaba graves complicaciones debido a las reacciones inmunogénicas. Posteriormente se desarrolló

un nuevo antisuero obtenido a partir de una purificación parcial que removía algunos componentes no necesarios para la neutralización del veneno, sin embargo, este tipo de medicamentos aún conservan muchas de las desventajas de los sueros que los precedieron (Landon et al, 1995). El antiveneno polivalente de los laboratorios Wyeth (Crotalidae) es un ejemplo de este tipo de sueros. Este antiveneno fue introducido en 1956 y aún se produce a partir de la precipitación por sulfato de amonio del suero de caballos hiperinmunizados con una mezcla de venenos de serpientes (Laboratorios Wyeth, 1961). El producto final presenta varias desventajas tales como un bajo título en cuanto a anticuerpos neutralizantes del veneno y contiene una cierta cantidad de albumina así como otros componentes del suero del caballo (Sullivan, 1987). Tales contaminantes pueden inducir reacciones alérgicas (Dart and Horowitz, 1996).

Las reacciones alérgicas inducidas por antivenenos pueden ser de dos tipos: anafilaxis, una reacción de hipersensitividad de tipo I y la enfermedad del suero, una reacción de tipo III. Cualquier suero heterólogo es capaz de causar anafilaxis, la cual es una cascada de eventos que pueden producir efectos tales como bronquiokonstricción e hipotensión (Dart and Horowitz, 1996). En menos del 15% de los casos, la anafilaxis puede provocar la muerte del individuo aún con un tratamiento adecuado (Jurkovich et al, 1988).

En la década pasada se siguieron otras estrategias para obtener nuevos antisueros con el propósito de reducir la anafilaxis en pacientes como por ejemplo, la purificación por afinidad de IgGs específicas para el veneno (Sullivan and Russell, 1982). Esta estrategia permitió reducir la cantidad de componentes no neutralizantes del veneno, sin embargo, todavía presenta como componente activo a las IgGs del organismo que fue hiperinmunizado las cuales podrían resultar inmunogénicas para humanos como por ejemplo la variante estructural IgG_T en el suero de caballos (Weir and Porter, 1966) que es particularmente inmunogénica (Cartledge, 1992).

Otra desventaja que presenta el uso de estos sueros es el alto peso molecular del componente activo, es decir de 150 kD que es el peso de una IgG, lo cual limita su distribución al volumen sanguíneo, mientras que una molécula más pequeña podría

distribuirse de manera más rápida de la sangre al sitio de acumulación del veneno (Dart and Horowitz, 1996). A través de la modificación proteolítica de las inmunoglobulinas se obtienen moléculas de unión específica a antígenos más pequeñas que la IgG original con distintas propiedades inmunogénicas. Las enzimas que se utilizan para digerir anticuerpos son la pepsina y la papaína. Las moléculas resultantes de la modificación proteolítica de anticuerpos carecen de la porción efectora Fc, dado lo cual resultan ser menos inmunogénicas que las inmunoglobulinas completas.

La digestión de anticuerpos completos con pepsina da lugar al fragmento F(ab)₂ y a la porción efectora Fc (Fig. 3). El F(ab)₂ es una molécula divalente, es decir contiene dos sitios de unión con el antígeno y tiene una masa molecular de 100 por lo que su penetración tisular es más efectiva que la de una IgG completa (Dart and Horowitz, 1996). Otra ventaja de los fragmentos F(ab)₂ sobre las inmunoglobulinas es que se preservan mejor en el compartimento extravascular, lo que permite la neutralización eficiente de muchos componentes de los venenos que actúan fuera del torrente circulatorio (Alagón et al, 1998). A la utilización de fragmentos F(ab)₂ purificados por cromatografía como antiseros, se le conoce como faboterapia (Alagón et al, 1998). El empleo de faboterápicos en pacientes ha reducido considerablemente las reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato (anafilaxis) y las de tipo tardío (enfermedad del suero) (Alagón et al, 1998).

La papaína separa a una IgG en tres partes: el fragmento Fc, que lleva a cabo la función efectora y dos fragmentos Fab (Fig. 3). La porción Fab presenta varias ventajas como son: un bajo peso molecular (50 kD) por lo que su volumen de distribución es mayor que el de una IgG, la capacidad de unirse al antígeno así como la de neutralizar los efectos tóxicos del veneno. Un fragmento Fab presenta una mejor penetración tisular que una inmunoglobulina (Dart and Horowitz, 1996).

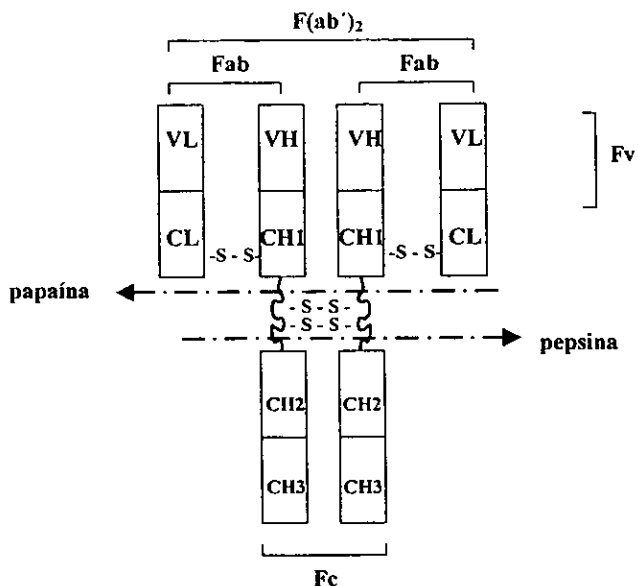


Fig. 3. Esquema general de una inmunoglobulina y de los fragmentos que se originan por la digestión enzimática con pepsina y papaína.

El secuestro y neutralización de una toxina por un anticuerpo depende del volumen de distribución de ambas moléculas, de la tasa de distribución y eliminación del anticuerpo, de la afinidad del anticuerpo por la toxina y de su capacidad de formar un complejo inmunológicamente inactivo con la toxina. La redistribución de la toxina depende de su unión reversible con sus receptores o blancos biológicos. Durante la eliminación de la toxina, ésta generalmente adopta las propiedades de eliminación del anticuerpo para compuestos de bajo peso molecular. Los mecanismos de desintoxicación (secuestro, neutralización, redistribución y eliminación) pueden ser optimizados mediante el empleo del anticuerpo "ideal", en términos de tamaño y origen que permitan desactivar la toxicidad del antígeno (Schermann, 1994). Un anticuerpo "ideal" sería aquél que presentara una amplia y rápida distribución corporal, una exposición tisular prolongada y una alta afinidad por el antígeno.

El volumen de distribución de un anticuerpo en humanos puede ir de 5 litros para el caso de IgMs e IgGs y hasta de 30 litros para el caso de fragmentos Fab (Schermann, 1994). Para el caso de las toxinas, su volumen de distribución puede ser de varios cientos de litros para aquellas de bajo peso molecular (colchicina, digoxinina) hasta el volumen ocupado por el agua extracelular para toxinas de alto peso molecular (venenos) (Schermann, 1994). Las IgGs completas y los fragmentos F(ab)₂ presentan el tamaño apropiado para neutralizar toxinas pobremente distribuidas, mientras que los fragmentos Fab representan la solución para neutralizar toxinas altamente distribuidas (Schermann, 1994). Considerando el tiempo de distribución corporal, las inmunoglobulinas y los fragmentos F(ab)₂ alcanzan su equilibrio de distribución entre los espacios intravascular e intersticial en 12-24 hrs, mientras que los fragmentos Fab se distribuyen más rápidamente y en un volumen mayor, en 2-4 hrs (Schermann, 1994).

La utilización de fragmentos de anticuerpos más pequeños que los Fab, tales como los fragmentos Fv de 25 kD (Huston et al, 1988; Anthony et al, 1992), resulta en una más amplia y rápida distribución corporal pero en una eliminación catabólica más rápida del anticuerpo por lo que los tejidos quedan expuestos por menos tiempo a estos agentes (Berry et al, 1992).

Además del tamaño del anticuerpo que debe utilizarse como agente terapéutico, también debe considerarse el origen del mismo ya que la administración en humanos de anticuerpos o fragmentos de origen distinto pueden generar reacciones inmunogénicas importantes, además de presentar una tasa catabólica alta (Schermann, 1994). El empleo de faboterápicos (fragmentos Fab y F(ab')₂) (Fig. 3), ha resultado en un tratamiento mucho más conveniente ya que al eliminar la porción Fc, se ha reducido la inmunogenicidad en los pacientes (Dart and Horowitz, 1996), además de que presentan una mayor y más rápida distribución corporal con la misma afinidad y especificidad que el anticuerpo completo (Schermann, 1994).

A pesar de las ventajas que presenta la utilización de fragmentos de anticuerpos purificados, aún existe cierto riesgo de generar respuestas inmunogénicas en humanos. Debido a esto es que se han desarrollado metodologías que implican la modificación de anticuerpos

monoclonales de otros organismos hacia la obtención de nuevas moléculas que pueden disminuir aún más el riesgo de ocasionar daño en humanos pero que conserven la misma afinidad y especificidad del anticuerpo original. El término aplicado a este tipo de modificaciones se conoce como humanización.

Anticuerpos Quiméricos.

Durante el proceso de humanización la molécula de anticuerpo es modificada de tal forma que se reduzca en lo posible la respuesta inmunogénica que generaría su aplicación en humanos a través de la sustitución de los aminoácidos murinos con aquellos típicamente encontrados en humanos (Hurle and Gross, 1994). Hasta ahora el reto principal ha sido hacerlo de modo que se conserve la afinidad y especificidad del anticuerpo original (Hurle and Gross, 1994).

El primer paso hacia la humanización de anticuerpos monoclonales murinos es la construcción de anticuerpos quiméricos mediante la unión del dominio constante humano (CH1 y CL) con su respectivo dominio variable murino (VH y VL) (Boulianne et al, 1984; Morrison et al, 1984; Neuberger et al, 1985; Better et al, 1988). Diversos estudios en una variedad de quimeras humano-murino han probado su utilización como agentes terapéuticos en humanos. Para el caso de anticuerpos quiméricos completos, se vio que pueden interactuar de manera más efectiva con el sistema inmune celular humano debido a la presencia del dominio constante humano (Hoogenboom et al, 1990). Datos de experimentos llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* mostraron que los anticuerpos quiméricos completos son más eficientes en inducir funciones efectoras humanas tales como fijación del complemento y ADCC (Emery and Harris, 1995). En el mismo estudio se observó que las respuestas inmunogénicas en pacientes se han reducido hasta en un 80% con el uso de anticuerpos quiméricos (Emery and Harris, 1995). La creación de anticuerpos quiméricos resulta en una molécula que conserva la especificidad por el antígeno del anticuerpo monoclonal murino pero que minimiza el riesgo de generar una respuesta inmune. En el caso de los fragmentos Fab quiméricos humano-murino, ya se han aplicado con éxito en humanos para tratar padecimientos como cáncer, en

los que el Fab se administra acoplado a agentes quimioterápicos (Otsuji, E. et al 1996) y en algunos padecimientos cardiovasculares (Reverter et al, 1996). Los Fab quiméricos pueden presentar un alto potencial como agentes terapéuticos en humanos debido a su baja antigenicidad, elevado volumen de distribución corporal, y similares afinidad y especificidad por el antígeno que la del anticuerpo murino completo.

Expresión de Anticuerpos en *E.coli*.

La tecnología del hibridoma desarrollada por Köhler y Milstein (1975) y la capacidad de producir anticuerpos monoclonales dio lugar a una nueva etapa en la biomedicina. Posteriormente, el uso de la tecnología del DNA recombinante y el estudio de la genética y estructura de las inmunoglobulinas, permitieron la manipulación genética de las moléculas de anticuerpos. Dicha manipulación ha llevado al diseño y creación de nuevas moléculas con distintas propiedades, derivadas de inmunoglobulinas. Entre éstas se encuentran los fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')₂, así como otros fragmentos basados en el dominio Fv como el scFv (Bird et al, 1988; Huston et al, 1988) y el dsFv (Glockshuber et al, 1990). Adicionalmente, con el propósito de reducir la inmunogenicidad de una molécula de origen murino, se han creado anticuerpos o fragmentos quiméricos que presentan las regiones V de origen murino y las regiones constantes de origen humano, así como anticuerpos humanizados en las que sólo las CDRs son de origen murino (Jones et al, 1986; Riechmann et al, 1988.). Los fragmentos de anticuerpos presentan varias ventajas con respecto a las inmunoglobulinas completas en el sentido de que pueden ser producidos a través de bibliotecas desplegadas en fagos (McCafferty et al, 1990) a través de las cuales es posible seleccionar la variante con mayor afinidad por un determinado antígeno.

La necesidad de obtener fragmentos de anticuerpos, así como inmunoglobulinas completas en cantidades suficientes para ser empleados en los campos de la medicina y biotecnología, ha llevado al desarrollo de distintos sistemas de expresión heteróloga de anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes han sido producidos en bacterias (Better et al, 1998; Skerra and Plückthun, 1988; Huston et al, 1988; Bird et al, 1988), células de mamífero

(Jost et al, 1994; Dorai et al, 1994), células de insecto (Bei et al, 1995), levaduras (Davis et al, 1991; Ridder et al, 1995), células vegetales (Whitelam et al, 1994) y en sistemas de traducción *in vitro* (Nicholls et al, 1993). El rendimiento y actividad biológica de las proteínas recombinantes dependen de un gran número de factores tales como la solubilidad, estabilidad y tamaño de la proteína. Cada proteína presenta problemas únicos en su expresión debido principalmente a su secuencia de aminoácidos, por lo que un sistema que puede resultar favorable para un anticuerpo en particular, puede no serlo en el caso de otro anticuerpo. El sistema óptimo de expresión depende del tipo de molécula (IgG, Fab, sFv, etc.), del anticuerpo individual y de otros factores como la cantidad y pureza que se requieran.

La expresión de anticuerpos en *E. coli* resulta muy conveniente debido a que es posible obtener grandes cantidades de proteína en un corto tiempo debido al rápido crecimiento del organismo. Por otro lado, la transformación de *E. coli* con DNA ajeno resulta relativamente fácil además de que requiere pequeñas cantidades de DNA. Además de todas estas características, el cultivo y manejo de *E. coli* implica un costo relativamente bajo. Una posible desventaja puede ser la incapacidad de *E. coli* para glicosilar por lo cual resulta un sistema ineficiente para la expresión de moléculas de anticuerpo completas, las cuales están glicosiladas en el dominio CH2.

La expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli* requiere de ciertas secuencias que permitan la transcripción y traducción del gen. Generalmente se emplean promotores inducibles que controlan la expresión. Algunos de los promotores más empleados son el promotor *lac*, el promotor *trp* y el híbrido de ambos (*tac*) el cual es regulado por el represor *lac* y es inducido por isopropil- β -galactosidasa (IPTG) (Aman et al, 1983; de Boer et al, 1983). Un factor necesario para una traducción eficiente en *E. coli* es la presencia de un sitio de unión a ribosomas (Gold et al, 1981). Este sitio consiste de un codón de inicio (ATG) y la secuencia Shine-Dalgarno (SD). El último elemento de control importante es un terminador de la transcripción que previene la transcripción de genes localizados después de la secuencia de interés además que proporciona estabilidad al DNA.

Existen distintas maneras de producir fragmentos de anticuerpos en *E. coli*. La formación de los puentes disulfuro es crucial para la estabilidad de los dominios de las inmunoglobulinas por lo que se han diseñado estrategias para conseguir su formación ya sea *in vivo* o *in vitro* (Glockshuber et al, 1992). Una forma de obtener anticuerpos en *E. coli* es mediante su expresión en el ambiente reductor del citoplasma lo cual da lugar a la producción del anticuerpo en su forma insoluble y su agregación en cuerpos de inclusión, por lo que resulta necesario aplicar tratamientos que permitan el plegamiento *in vitro* de la proteína para recuperarla en su conformación nativa (Buchner and Rudolph 1991). La mayoría de las estrategias consisten en aislar los cuerpos de inclusión, solubilizar las proteínas recombinantes y renaturalizarlas en un ambiente que promueva la correcta formación de puentes disulfuro así como la formación de la estructura tridimensional apropiada (Verma et al, 1998). De esta forma se han obtenido fragmentos sFv alcanzando rendimientos de 100-130 mg/l de proteína activa (Huston et al, 1995), fragmentos Fab con rendimientos de 0.14 g/l a partir de un cultivo de baja densidad celular (Condra et al, 1990) y hasta de 1-2 g/l de un cultivo de mediana densidad (Shibui et al, 1993). Otra forma de obtener anticuerpos en *E. coli* es mediante su expresión funcional en el citoplasma pero en una cepa mutante con genotipo *trxB* la cual facilita la formación de puentes disulfuro en el citoplasma (Derman et al, 1993; Proba et al, 1995).

Otra manera de producir fragmentos de anticuerpos recombinantes en *E. coli* es mediante la utilización de secuencias líder que permiten la secreción del anticuerpo al espacio periplásmico de la bacteria (Skerra and Plückthun, 1988). El espacio periplásmico se localiza entre las membranas interna y externa de las bacterias Gram negativas. Este espacio provee de un ambiente oxidante en donde se localizan moléculas parecidas a chaperoninas así como disulfuro isomerasas que asisten en el plegamiento del anticuerpo recombinante (Verma et al, 1998). Algunas de las secuencias señal más utilizadas son pelB del gen de la pectato liasa de *Erwinia carotovora* (Lei et al, 1987) y el péptido señal derivado del gen de la fosfatasa alcalina. Estas secuencias son eliminadas por peptidasas dentro del periplasma (Ferencsi and Silhavy, 1987).

En algunos casos puede detectarse la salida del anticuerpo recombinante a través de la membrana externa hacia el medio de cultivo (Ward et al, 1989). La cantidad de proteína que sale del periplasma depende de la cepa bacteriana, de las condiciones de inducción y posiblemente de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo (Knappik and Plüctun, 1995) más que de la secuencia señal (Suominen et al, 1987). Si el material no se exporta hacia el medio de cultivo entonces se aísla la proteína recombinante del periplasma, generalmente mediante lisis osmótica (Verma et al, 1998). Lo anterior presenta la ventaja de que la proteína se encuentra frecuentemente en altas concentraciones y en una forma relativamente pura (Skerra, 1994). A partir de la expresión en el periplasma se han obtenido moléculas de Fab con rendimientos de 700 mg/l (Rodríguez et al 1992), un Fab humanizado con rendimientos de 2 g/l (Carter et al, 1992), también se ha reportado la producción de un fragmento Fv que escapó del periplasma hacia el medio de cultivo a partir del cual se obtuvieron rendimientos de 10 mg/l (Ward et al, 1989). En muchos casos, el material puede precipitarse y agregarse dentro del periplasma por lo que resulta necesario solubilizar la proteína y renaturalizarla (Verma et al, 1998).

La secuencia primaria del anticuerpo tiene un papel crítico en el rendimiento del plegamiento llevado a cabo *in vivo* o *in vitro* (Knappik and Plüctun 1995). El máximo rendimiento en el plegamiento *in vitro* que se ha reportado es del 47%, aunque generalmente los rendimientos están entre el 5%-20% (Horn et al, 1996).

Dado que cada anticuerpo es un caso distinto, no es posible comparar directamente las condiciones de expresión y los rendimientos que se obtienen para diferentes anticuerpos por lo cual los datos de rendimientos hasta ahora citados sólo indican el rango que puede obtenerse de proteína recombinante a partir de su expresión en *E. coli*. Existen diversos factores que deben determinarse durante la expresión de un fragmento de anticuerpo tales como, el compartimento en donde habrá de localizarse la proteína recombinante, el tiempo óptimo de inducción, la temperatura óptima de la inducción y si son necesarias otras condiciones de cultivo que aumenten el rendimiento como por ejemplo la adición de azúcares no metabolizables al medio de cultivo (Kipriyanov et al, 1997).

Cabe mencionar que es posible mejorar la producción de anticuerpos en bacterias mediante la mutación de ciertos residuos en su secuencia. Las mutaciones P40A, S63A y A64D, en la región del armazón ("framework") de la cadena pesada de un fragmento Fv permitió la obtención de 60 veces más de proteína en su forma soluble que en la insoluble (Knappik and Plückthun, 1995). En el caso de un fragmento Fab, la sustitución de 5 aminoácidos (F10S, T45K, T77S, L78V) en el dominio VL aumentó el rendimiento de 40 mg/l a 500 mg/l, mientras que cuatro cambios en el dominio VH disminuyó la lisis celular durante la fermentación (Forsberg et al, 1997).

La expresión en bacterias resulta muy conveniente en la producción de moléculas basadas en anticuerpos, en particular de fragmentos que no requieren glicosilación. Sin embargo, el rendimiento y condiciones en las que se expresan dependen en gran medida del fragmento de anticuerpo. Lo anterior se aplica también en el caso de la expresión de anticuerpos en organismos tales como levadura, células de insecto y células de mamífero.

El sistema de levadura presenta varias ventajas sobre el sistema de *E. coli* para la expresión de anticuerpos ya que además de ser un eucariote capaz de secretar y plegar correctamente proteínas heterólogas, tiene todas las ventajas que presenta el cultivo de un microorganismo en cuanto a rápido crecimiento y bajo costo de las condiciones de su crecimiento. Se ha reportado la correcta expresión de anticuerpos completos y de fragmentos de anticuerpos en levadura (Wood et al, 1985; Horwitz et al, 1988) como por ejemplo la del fragmento scFv anti-humano inhibitorio de leucemia en la que se obtuvo un rendimiento de 100 mg/l en la levadura *Pichia pastoris* (Ridder et al, 1995).

El sistema de expresión en células de mamífero así como el de células de insecto presentan la ventaja de que todas las señales para la síntesis, procesamiento y secreción de proteínas eucarióticas son reconocidas eficientemente, sin embargo ambos sistemas representan un alto costo además de ser complicados en su manejo. Con el sistema de expresión en células de insecto mediante el vector baculovirus pueden obtenerse rendimientos del orden 1-500 mg de proteína recombinante por litro de células infectadas (Luckow and Summers, 1988). Algunos fragmentos de anticuerpos se han expresado en células de

mamífero como por ejemplo la producción en células CHO de un Fv con un rendimiento de 4 mg/l (King et al, 1993) así como de un fragmento scFv secretado al medio de cultivo por células Sp2/0 con un rendimiento de 10 mg/l (Dorai et al, 1994).

Sistema de Despliegue en Fagos de Pasteur-Merieux.

El sistema de despliegue en fagos de Pasteur-Merieux ha sido diseñado para la construcción de grandes bibliotecas de fragmentos de anticuerpos expresados en la superficie de fagos a través de la recombinación de dos bancos independientes que contienen a los genes de las regiones pesada (VH-CH1) y ligera (VL-CL) (Geoffroy et al, 1994). El proceso se basa en la recombinación sitio-específica del sistema *att* del fago λ y permite la asociación física irreversible entre un plásmido y un fagemido que contienen a las secuencias VL-CL y VH-CH1, respectivamente (Geoffroy et al, 1994). La asociación entre el plásmido y el fagemido da lugar a un nuevo fagemido que contiene el banco combinatorio VL-CL/VH-CH en un mismo vector de expresión (Fig 5). La secuencia VL-CL en el plásmido se localiza adyacente al extremo N-terminal de la proteína III de la cápside del fago. La fusión de la secuencia de la cadena ligera del Fab con el gen III permite obtener fagos, previa infección con un fago "helper", que presentan al Fab unido covalentemente al dominio N-terminal de la proteína III y desplegado así en su superficie. El fagemido recombinante también permite la producción soluble del fragmento de anticuerpo en una cepa no supresora (Sodoyer et al, 1996), la cual es capaz de reconocer al codón ámbar (TAG) en el extremo 5' del gen III como codón de término (Sodoyer et al, 1996).

Durante la fase lisogénica, una forma circular del fago λ se integra al genoma bacteriano a través de la recombinación entre los sitios *attP* (240 pb) codificada por el fago, y *attB* (23 pb) del cromosoma bacteriano (Geoffroy et al, 1994). La integración al cromosoma bacteriano requiere de la proteína Int (Integrasa Recombinasa) codificada por el fago y del Factor de Integración del Hospedero (IHF) codificada por *E. coli* (Geoffroy et al, 1994). Después de la recombinación, se generan dos sitios *att* nuevos, el *attL* (99 pares de bases) y el *attR* (164pb) (Geoffroy et al, 1994). La presencia del Factor de Excision (Xis) codificado por

el fago, revierte el proceso de recombinación, por lo que para el despliegue en fagos y expresión soluble de fragmentos de anticuerpos es necesario utilizar una cepa que carezca de esta proteína para asegurar la irreversibilidad de la recombinación (Hasan and Szybalski, 1987).

El sistema de Pasteur-Merieux consiste en dos familias de vectores (plásmido y fagemido) y de una cepa modificada de *E. coli* (Sodoyer et al, 1996). En el presente trabajo se utilizó al plásmido pM849 y al fagemido pM846 (Fig.4).

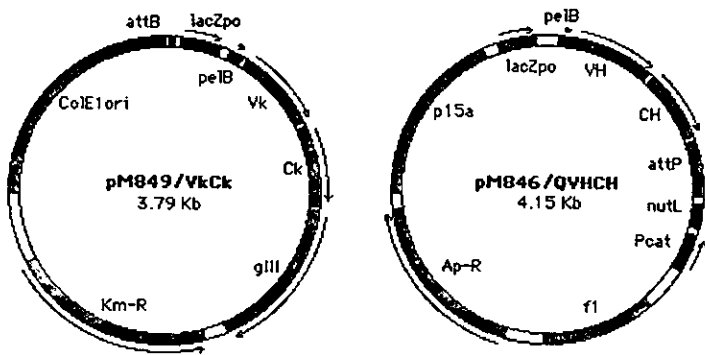


Fig. 4. Esquema General de los vectores del sistema de Pasteur-Merieux. Se muestran el plásmido pM849 y el fagemido pM846.

El plásmido pM849 presenta el sitio *attB*, el promotor *lacZpo*, el péptido señal *peIB* que guía la proteína hacia el espacio periplásmico, la cadena ligera del anticuerpo anti-HIV gp160, el gen III del fago M13, el gen de resistencia a Kanamicina, y el origen de replicación *ColE1*. El fagemido pM846 presenta el sitio *attP*, el gen *nutL/N* del fago lambda, la secuencia *Pcat*, el origen de replicación del fago *fl*, el gen de resistencia a Ampicilina, el origen de replicación *P15a*, el promotor *lacZpo*, el péptido señal *peIB* y la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo anti-HIV gp160. Están presentes dos secuencias adicionales en pM846, la

secuencia *nutL/N*, un antiterminador de la transcripción del fago λ (Daniels et al, 1983) y la secuencia *Pcat* que corresponde al promotor de la cloramfenicol acetiltransferasa. Estas dos secuencias fueron introducidas originalmente para ser utilizadas con otros vectores de la familia de plásmidos del sistema Pasteur-Merieux distintos a pM849. Tales vectores contienen la secuencia del gen *cat* que confiere resistencia a cloramfenicol o la secuencia del gen *aacCI* que confiere resistencia a gentamicina. Su recombinación permitiría que el promotor *Pcat* quedara adyacente al gen *cat* o *aacCI*, reestableciendo así la resistencia (Sodoyer et al, 1996). La secuencia del antiterminador *nutL/N* fue introducida en el extremo 5' del gen de resistencia en el fagemido con el propósito de ubicarla entre el gen de resistencia y su promotor después de la recombinación y asegurar así la expresión del gen de resistencia en altos niveles. Informaciones del grupo de Pasteur-Merieux, así como algunos experimentos preliminares en nuestro laboratorio con el plásmido pM845 que contiene al gen *aacCI*, indicaron la presencia de recombinaciones inespecíficas con el empleo de dicho plásmido, fue por esta razón que decidimos utilizar otro plásmido de la familia de vectores de Pasteur-Merieux.

En la Figura 5 se muestra un esquema general del sistema Pasteur-Merieux. La recombinación se lleva a cabo en la cepa D1210HPF', de modo que es necesario transformar primero con el plásmido pM849 y luego infectar la cepa transformada, con fagos producidos a partir del fagemido pM846. La obtención de fagos se hace mediante la infección con un fago "helper" de la cepa transformada con el fagemido.

La cepa D1210HPF' hace posible la recombinación irreversible entre los dos vectores. D1210HP se obtuvo a partir de la cepa D1210 lisogenizada con el fago λ_{xis} (Δ sal-Xhol) *kil*^{c/857} (Sadler et al, 1980). La secuencia integrada provee de la función de la Integrasa Recombinasa mediante su inducción por choque térmico (Hasan and Szybalski, 1987) además de que asegura la irreversibilidad de la recombinación debido a la presencia del gen *xis* mutado. Posteriormente la cepa D1210HP fue transformada con el episoma F' derivado de XL1Blue (Stratagene) (Hasan and Szybalski, 1987). La presencia del episoma F', mantenido por su resistencia a tetraciclina, permite la infección por fagos filamentosos (Geoffroy et al.

1994). El genotipo de la nueva cepa (D1210HPF') es HB101, *recA*, *lacI^q*, *lacY⁺*, λ , *clts857* *xis⁻*, *kiF* [*F'*, *proAB⁺*, *lacP⁺ZΔM15*, *Tn10 (tet^R)*] (Sodoyer et al., 1996).

La expresión del Fab de manera soluble se llevó a cabo en la cepa no supresora TOPP2, la cual mostró ser apta para la expresión soluble de fragmentos Fab a través del sistema de Pasteur-Merieux (Sodoyer et al, 1994). La cepa TOPP2 (*Rif^R* [*F'*, *proAB⁺*, *lacP⁺ZΔM15*, *Tn10 (tet^R)*]) fue transformada con el fagemido recombinante. La cadena ligera y el dominio Fd se expresan simultáneamente en *E. coli* y son guiados hacia el periplasma bacteriano en donde se pliegan y se ensamblan para dar lugar a un fragmento Fab.

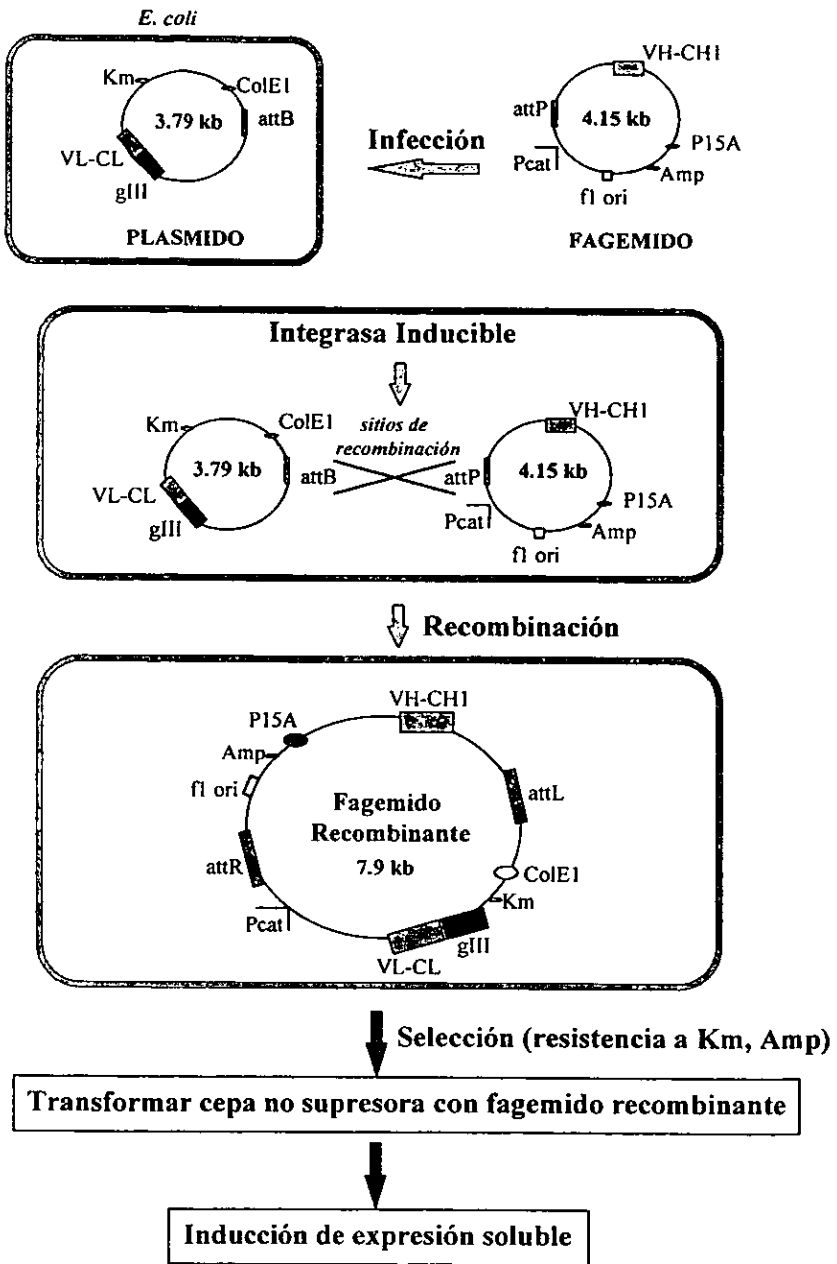


Fig. 5. Esquema general del Sistema Pasteur-Merieux para la expresión de proteínas recombinantes de manera soluble.

Antecedentes.

En el Laboratorio del Dr. Lourival Possani se obtuvo el anticuerpo monoclonal BCF2 luego de la inyección en ratones de la fracción II.9.2 (Zamudio et al, 1992). Se mostró que BCF2 y sus fragmentos Fab son capaces de neutralizar el efecto tóxico de la toxina Cn2 y del veneno completo del alacrán *C. noxius* Hoffmann (Licea et al, 1996). Por otro lado se observó también que BCF2 presenta reacciones cruzadas con el veneno de otras especies del mismo género tales como *C. limpidus limpidus*, *C. limpidus tecomanus* y *C. limpidus acatlanensis* y en menor grado con *C. suffusus suffusus* y *C. infamatus infamatus* (Zamudio et al, 1992). De esta manera BCF2 representa un candidato prometedor de ser utilizado como antídoto específico contra *C. noxius* y posiblemente contra otros alacranes también.

Otros antecedentes importantes a este trabajo son la determinación de la secuencia del cDNA de BCF2 y el modelo tridimensional del complejo Cn2-BCF2 (Selisko et al, 1999) llevado a cabo en el Laboratorio del Dr. Eduardo Horjales Reboredo. El modelo se elaboró tomando como base la estructura de Cn2 determinada por resonancia magnética nuclear (NMR) (Pintar et al, 1999) así como los datos experimentales que llevaron a la identificación mediante ensayos de unión y desplazamiento con péptidos sintéticos del epítopo en Cn2 que es reconocido por BCF2 (Calderón-Aranda et al, 1999; York et al, 1995). En este estudio se proponen residuos en el paratopo de BCF2 que hacen contacto con el epítopo de Cn2 y viceversa. A partir de estos resultados surgió la propuesta de generar un banco combinatorio de variantes de BCF2 que pudieran presentar una más amplia especificidad usando el sistema de despliegue en fagos Pasteur-Merieux.

En este trabajo se presenta la clonación de la cadena ligera y pesada del fragmento Fab quimérico murino-humano de BCF2 en los vectores del sistema Pasteur-Merieux, la recombinación de los vectores resultando en la formación de un vector recombinante y la expresión de manera soluble del Fab a partir del vector recombinante en la cepa no-supresora TOPP2 recomendada para la expresión de fragmentos de anticuerpos.

El presente estudio representa un precedente importante en la utilización del sistema Pasteur-Merieux para la generación de bancos combinatorios de variantes de BCF2 y abre el camino para la producción de cantidades suficientes del Fab puro con el propósito de producir cristales y determinar la estructura tridimensional del Fab libre y unido a la toxina Cn2.

Objetivos.

Objetivo General.

Clonar y Expresar de manera soluble el Fab quimérico humano-murino del anticuerpo monoclonal BCF2 a través del sistema de Pasteur-Merieux.

Objetivos Particulares.

- Clonación en los vectores del sistema de Pasteur-Merieux de los dominios constantes humanos Ck y CH1 obtenidos a partir de la secuencia del fragmento Fab de un anticuerpo humano contra la toxina del tétanos clonada en el vector pComb3TT.
- Clonación en los vectores del sistema de Pasteur-Merieux de las regiones VH y Vk a partir de la secuencia del anticuerpo monoclonal BCF2 clonada en el vector λ gt11.
- Expresar el fragmento Fab quimérico como proteína soluble.
- Examinar si el Fab expresado en *E.coli* es capaz de reconocer a la toxina Cn2 mediante ensayos de ELISA.

El presente estudio representa un precedente importante en la utilización del sistema Pasteur-Merieux para la generación de bancos combinatorios de variantes de BCF2 y abre el camino para la producción de cantidades suficientes del Fab puro con el propósito de producir cristales y determinar la estructura tridimensional del Fab libre y unido a la toxina Cn2.

Objetivos.

Objetivo General.

Clonar y Expresar de manera soluble el Fab quimérico humano-murino del anticuerpo monoclonal BCF2 a través del sistema de Pasteur-Merieux.

Objetivos Particulares.

- Clonación en los vectores del sistema de Pasteur-Merieux de los dominios constantes humanos Ck y CH1 obtenidos a partir de la secuencia del fragmento Fab de un anticuerpo humano contra la toxina del tétanos clonada en el vector pComb3TT.
- Clonación en los vectores del sistema de Pasteur-Merieux de las regiones VH y Vk a partir de la secuencia del anticuerpo monoclonal BCF2 clonada en el vector λ gt11.
- Expresar el fragmento Fab quimérico como proteína soluble.
- Examinar si el Fab expresado en *E.coli* es capaz de reconocer a la toxina Cn2 mediante ensayos de ELISA.

Material y Método.

Los reactivos y enzimas empleados para Biología Molecular (ligasas, cinasas, defosfatasa y enzimas de restricción) fueron provistos por las compañías *Boehringer-Mannheim*, *New England Biolabs* y *Research Organics*.

La preparación de plásmidos se hizo por el método de lisis alcalina (Sambrook, J. et al 1989) y mediante la utilización de los métodos comerciales *Wizard Plus Minipreps* de *Promega* y *High Pure Plasmid Isolation Kit* de *Boehringer-Mannheim*.

El aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se hizo mediante el método comercial *Agarose Gel DNA Extraction Kit* de la compañía *Boehringer-Mannheim*

Para la transformación de células competentes por electroporación se utilizaron celdas con capacidad para 0.1 ml (Biorad) y un electroporador BioRad Gene Pulser Mod. 1692075 100 V y Pulse Controller Mod. 1652098.

En los experimentos de PCR se empleó la enzima Vent® Polimerasa de la compañía *New England Biolabs*. Los oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM por el método del Fosfito-Triéster en Fase Sólida.

La determinación de las secuencias nucleotídicas se llevaron a cabo por el método de Secuenciación Fluorescente de DNA Automatizada (Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing) en un Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 377-18EI, a través del servicio provisto por el Instituto de Biotecnología, UNAM.

Método.

1. Clonación de las regiones constantes humanas y de las variables murinas del Fab quimérico del anticuerpo monoclonal BCF2.

1.1. Obtención por PCR de las regiones constantes humanas y variables murinas.

Las regiones constantes se obtuvieron por PCR, utilizando como templado la secuencia nucleotídica del Fab del anticuerpo humano contra la toxina del tétanos clonada en el vector pComb3TT (obsequiado por el grupo de Carlos Barbas III del The Scripps Research Institute). En el caso de las regiones murinas, se utilizó como templado el cDNA del anticuerpo murino BCF2 clonado en el vector λ gt11 (Selisko et al, 1999). Para obtener las regiones murinas, fue necesario producir fagos λ gt11 (Ver 1.2.) que pudieran utilizarse directamente como templado en la reacción de PCR.

Las concentración de los reactivos en cada PCR fue:

Reactivo	Concentración Final
10X Buffer	1X
dATP	200 μ M
dCTP	200 μ M
dGTP	200 μ M
dTTP	200 μ M
Primers	0.1-1 μ M
DNA molde	0.1-1 μ M
Vent Polimerasa (Biolabs)	2.5 unidades/100 μ l

Las condiciones de reacción de PCR fueron:

	Temperatura	Tiempo	# ciclos
Desnaturalización Inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 seg	30
Hibridación	()	45 seg	
Polimerización	72° C	1 min	
Polimerización Final	72° C	10 min	1
Fin	4 ° C	∞	

La temperatura de hibridación usada en cada reacción de PCR fue distinta, dependiendo del producto que se deseaba amplificar y de los oligonucleótidos usados en cada caso. A continuación se citan tales temperaturas.

Producto de PCR	Oligonucleótidos	Temp. Hibridación (°C)
Variable Pesada (VH)	VH5, vH3	55.4
Variable Ligera (Vk)	VK5, vK3	56.5
Constante Pesada (CH1)	CH5, cH3	59.4
Constante Ligera (Ck)	CK5, cK3	56.7

A continuación se muestran las secuencias de los oligonucleótidos usados en cada PCR. Los sitios de restricción se indican en subrayado.

vH5

XhoI

5' GAT-CCT-CGA-GGT-TCA-GCT-GCA-ACA-GTC-TGG-TCC-TG 3'

vH3

SalI

5' CGA-GGT-CGA-CGC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-TGA-GGT 3'

cH5

BamHI

SalI

5' CCC-AGG-ATC-CGC-GTC-GAC-CAA-GGG-CCC-ATC-GGT-CTT-C 3'

cH3

5' CAC-CAC-SpeI
TAG-TTT-TGT-CAC-AAG-ATT-TG 3'

vK5

5' AAG-TGA-SacI
GCT-CGA-CAT-TGT-GTT-GAC-CCA-ATC-TCC 3'

vK3

5' CGC-RsrII
CGT-CGT-TTC-AGC-TCC-AGG-TTG-GT 3'

cK5

5' GTA-RsrII
TGC-GTC-CGT-GAT-CAG-GAC-AGC-AAA-GAC-AGC-ACC 3'

cK3

5' GCG-XbaI
CTC-TAG-AAA-CAC-TCT-CCC-CTG-TTG-AAG-C 3'

1.2. Producción de Fagos λ gt11.

Las secuencia del cDNA del anticuerpo BCF2 estaba clonada en el vector λ gt11 (Selisko et al, 1999). Se prepararon fagos λ gt11 a partir de una alícuota proporcionada por el Dr. Alexei Licea del Lab. del Dr. Lourival Possani utilizando la cepa Y1090. Se inocularon 100 μ l de un precultivo en LB/Cb (carbenicilina) y se adicionaron 100 μ l de una solución de maltosa (20%). Se dejó crecer a 37°C en agitación hasta una O.D._{600nm} de 0.5. Se mezclaron 100 μ l del cultivo, 100 μ l de una solución CaMg y 100 μ l de la dilución de fagos (diluciones 1:100, 1:1000, 1:10,000, 1: 100,000, 1:1000,000). Se dejó infectando durante 20 minutos a 37°C en agitación. Se combinaron 3 ml de "Top Agar" / Cb (carbenicilina) (0.1 mg/ml) con la mezcla de células y fagos y se vació en medio sólido LB/Cb. Se incubó a 37°C durante la noche. Una vez que aparecieron las placas de lisis, se agregaron 3 ml de agua desionizada estéril a cada caja. Se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y la solución con los fagos se guardó a 4°C. Los fagos se usaron directamente en la reacción de PCR para obtener las

regiones variables del BCF2. Se tomaron 12 μ l de la solución de fagos por cada reacción de PCR.

1.3. Clonación de regiones constantes y variables del Fab quimérico.

Los productos amplificados de las regiones constantes y variables se analizaron en geles de poliacrilamida al 7.5% (Sambrook et al, 1989) de modo que pudiera detectarse la presencia de productos inespecíficos. En los casos en los que se obtuvieron inespecificidades, se purificaron los productos mediante el corte de las bandas de interés a partir del gel de poliacrilamida (Ausebel et al, 1992). Los productos de PCR se trataron con fenol-cloroformo y se precipitaron con n-butanol (Sambrook et al, 1989).

Los vectores se digirieron con enzimas de restricción de acuerdo con Sambrook et al, 1989 y se purificaron a partir de geles de agarosa (*Agarose Gel DNA Extraction Kit. Böehringer-Mannheim*). Las regiones constantes se digirieron con las enzimas de restricción necesarias para su clonación y se ligaron a los vectores del sistema de Pasteur-Merieux según protocolos de Sambrook et al, 1989. En el caso de las regiones variables murinas, no fue posible obtener una clonación exitosa cuando se intentó la inserción directa de los productos de PCR cortados y purificados por lo que fue necesario clonar los productos de PCR en sitios romos del vector transitorio pUC18. Los productos de PCR tratados con fenol-cloroformo y precipitados con butanol se clonaron directamente en el sitio SmaI de pUC18 de acuerdo a protocolos de Sambrook et al, 1989. A partir de la clonación en pUC18, se extrajeron las regiones variables con las enzimas de restricción apropiadas para ser después ligadas a los vectores de Pasteur-Merieux según protocolos de Sambrook et al, 1989.

2. Expresión soluble del Fab quimérico.

2.1. Transformación por choque térmico.

Se inocularon 100 μ l de un precultivo en 30 ml de Lb/Tc (tetraciclina). Se dejó crecer a 37°C con agitación hasta una O.D._{600 nm} de 0.3. Se colectaron las células por centrifugación a 10,000 rpm/4°C por 5 min y se resuspendieron en 10 ml de NaCl 10 mM frío. Se incubó en hielo durante 1 hora con agitación. Se centrifugó por 10 min a 5000 rpm/4°C. Las células se resuspendieron en 1 ml de 0.1M CaCl₂. Se mezclaron 100 μ l de las células competentes con el DNA y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. Se aplicó un choque térmico a 37°C durante 5 minutos y se regresó a hielo por 5 minutos. Se adicionaron 500 μ l de LB y se incubó durante 1 hr a 37°C con agitación. Se sembraron 50-250 μ l en medio sólido LB y se incubó toda la noche a 37°C.

2.2. Producción de fagos a partir del fagemido pM846/VH-CH.

Se prepararon fagos de acuerdo con el protocolo descrito en Ausubel et al, 1992. Se infectaron las células XL1Blue transformadas con el fagemido pM846/VH-CH con el fago helper R408 (Stratagene) a una MOI (*Multiplicity of Infection*) 10-100.

Los fagos se precipitaron con PEG/NaCl, para lo cual se adicionó al sobrenadante con los fagos, 1/5 del volumen de una solución 2.5 M NaCl/ 20% PEG 8000. Se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se colectaron los fagos por centrifugación a 10,000 g durante 5 minutos y se resuspendieron en 1/2 o 1/5 del volumen inicial en buffer STE (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA + 100mM NaCl).

2.3. Titulación de fagos filamentosos.

Se preparó un cultivo de la cepa XL1Blue en Lb/Tc y se dejó crecer durante la noche. El cultivo se diluyó para llegar a una O.D. de 0.1 y se dejó crecer hasta una O.D. de 0.7-0.8. Se mezclaron 200 μ l de las células con 1 μ l de cada dilución de los fagos (1:100; 1:1000; 1:10,000; 1:100,000; 1:1000,000). Los fagos se diluyeron en buffer TE (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA). Se incubó durante 15 min a 37°C. Se adicionaron 3 ml de "Top Agar" y la mezcla se vació en medio sólido LB. Se incubó a 37°C hasta que se observaron las placas de retardamiento del crecimiento.

El título de los fagos se determinó mediante la fórmula:

$$\text{Unidades formadoras de placas (pfu)/ml} = \frac{(\text{No. Placas} \times \text{Factor de Dilución})}{\text{Volumen sembrado}} (1000)$$

2.4. Protocolo de infección y recombinación.

Se preparó un cultivo de la cepa D1210HPF' transformada con el plásmido pM849/Vk-Ck en LB/Km-Tc. Se dejó crecer durante la noche a 37°C con agitación. Se diluyó en 2XYT (Sambrook et al, 1989)/2% glucosa para llegar a una O.D._{600nm} de 0.01 y se dejó crecer a 30°C con agitación hasta una O.D._{600nm} de 0.5-0.7. Se infectaron las células con fagos pM846/VH-CH a una MOI (*Multiplicity of Infection*) de 10. Se incubó durante 1 hr a 30°C y se aplicó un choque térmico de 42°C durante 30 minutos para inducir la recombinación. Se dejó recuperando a 30°C durante 10 minutos sin agitación. El cultivo se diluyó 10 veces y se adicionaron los antibióticos Km y Cb. El cultivo se dividió en dos partes iguales, una para seguir el crecimiento en medio 2XYT(Sambrook et al, 1989)/2%glucosa y otra en medio mínimo M9 (Sambrook et al, 1989). Esta última fase del proceso se hizo con el propósito de observar en qué condición se favorecía la formación del fagemido recombinante. Se tomaron alícuotas en las distintas etapas del proceso para aislar vectores así como para sembrar en medio sólido con los antibióticos: Km.Cb y Km/Cb.

2.5. Rescate de Fagos.

Se preparó un cultivo de la cepa D1210HPF' transformada con el fagemido recombinante en Lb/Km/Cb, durante una noche. Se diluyó 25 veces en 2XYT (Sambrook et al, 1989) y se dejó crecer a 37°C con agitación hasta llegar a una O.D. de 0.5. Se infectó con fagos "helper" R408 (Stratagene) a una MOI de 20 y se dejó infectando a 37°C durante 1 hora. Se incubó a 30°C con agitación durante 8 horas. Se centrifugó a 4000g por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se calentó a 65°C durante 15 minutos y los fagos se precipitaron con PEG/NaCl, adicionando 1/5 del volumen de una solución 20% PEG/2.5M NaCl. Se dejó incubando 30 minutos a 4°C y los fagos se colectaron por centrifugación a 10,000g por 8 minutos. Los fagos se resuspendieron en buffer STE (10mM Tris-HCl; 1 mM EDTA + 100mM NaCl).

2.6. Reamplificación de fagos.

Se diluyó 10 veces un cultivo de células XL1Blue que creció durante una noche. Se dejó crecer hasta una O.D. de 1.0. Se infectó con los fagos recombinantes a una MOI de 10 y se dejó incubando durante 15 minutos a 37°C. Se adicionó Cb y Km, a 20 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente. Se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. Se adicionó Cb hasta completar una concentración de 50 µg/ml, y Km para completar los 25 µg/ml. El cultivo se dejó en agitación por una hora a 37°C. Se diluyó 4 veces y se dejó crecer a 37°C con agitación durante 8 horas. Se sembró en medio sólido con Km/Cb y se prepararon vectores.

2.7. Protocolo I de Inducción de la Expresión Soluble. (McCafferty y Johnson, 1996.)

Se preparó un cultivo en medio 2XYT (Sambrook et al, 1989)/2%glucosa de la cepa TOPP2 con el fagemido recombinante y se dejó crecer a 30°C hasta una O.D. de 0.7-1.0. Se colectaron las células por centrifugación a 1,500 rpm durante 15 minutos. La pastilla celular se resuspendió en 2XYT (Sambrook et al, 1989) con 1 mM IPTG. Se dejó crecer durante 6 y 12 horas. Se analizaron el medio de cultivo, las fracciones periplásmicas y el lisado celular.

2.8. Protocolo II de Inducción de la Expresión Soluble.

Se preparó un cultivo en 2XYT(Sambrook et al, 1989) / 2%glucosa de la cepa TOPP2 con el fagemido recombinante y se incubó a 30°C con agitación durante la noche. Se diluyó el cultivo 100 veces en 2XYT(Sambrook et al, 1989) / 0.1%glucosa y se dejó crecer a 30°C hasta una O.D. de 0.6. Se agregó 1mM de IPTG y se incubó a 30°C. Se tomaron alícuotas de 50 ml del cultivo a distintos tiempos después de la inducción (8,12,18 y 23 horas). Se analizaron el medio de cultivo, las fracciones periplásmicas y el lisado celular.

2.9. Preparación del lisado celular.

- Por congelamiento y descongelamiento:

La pastilla celular se resuspendió en 1 ml de buffer PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) y se sumergió en un baño de hielo seco/etanol durante 5 minutos. La pastilla se descongeló en un baño de agua a 37°C. El proceso se repitió 4 veces.

- Por Sonicación (Geoffroy, F. et al 1994):

La pastilla celular se obtuvo por centrifugación a 3000g durante 15 minutos y se resuspendió en 1.5 ml de PBS/PMSF (0.034 mg/ml). Se aplicaron 3-4 pulsos de ultrasonido, con una duración de 30 seg cada uno. Se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante.

2.10. Preparación de fracciones periplásmicas

Se tomaron alícuotas de 50 ml del cultivo a distintos tiempos después de la inducción (8,12,18 y 23 horas). Las muestras del cultivo se sometieron a centrifugación a 3000g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se guardó el sobrenadante a -20° C para su análisis por Western Blot. La pastilla celular se resuspendió en 1 ml de buffer periplásmico frío (PBS/ 1M NaCl / 1 mM EDTA) y se dejó reposar en hielo durante 15 minutos. La muestra se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se guardó a -20° C para su análisis por Western Blot.

2.11. Transferencia tipo Western.

Se llevaron a cabo de acuerdo a las especificaciones de Sambrook et al, 1989. Para la transferencia se utilizó una cámara semiseca marca OWL. La transferencia se llevó a cabo a 400 mA y 10-14 V durante 1 hora.

La membrana de nitrocelulosa se incubó para su bloqueo en una solución de 5% leche descremada/TBST (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20). La membrana se incubó con el anticuerpo comercial anti-cadenas kappa de IgG1 de humano acoplado a peroxidasa (*Zymed*) en una solución de 0.1% leche descremada/TBST. Se reveló con el sustrato cromogénico TMB (*Zymed*).

2.12. ELISA.

Se inmovilizaron en una placa de ELISA 50 μ l de una solución de la toxina Cn2 en buffer de bicarbonato de sodio pH 9.2 (6 μ g/ml). La placa se incubó para su bloqueo en una solución de 1% BSA/PBS. El Fab quimérico y el anticuerpo BCF2 se detectaron con un anticuerpo comercial anti-cadenas kappa de IgG1 de humano y de ratón, respectivamente, acoplados a peroxidasa (*Zymed*) y reconstituídos de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Ambos anticuerpos se aplicaron a la placa en una dilución 1:250 en PBS/0.05%Tween20. La placa se reveló con el agente ABTS en un buffer de citratos (50mM ácido cítrico; 50 mM citrato de sodio) y peróxido de hidrógeno. Se midió la absorbancia a 405 nm.

Resultados.

I. Clonación de las regiones variables murinas y de las constantes humanas del Fab quimérico del anticuerpo monoclonal BCF2.

A. Obtención por PCR de las regiones constantes humanas (CH1 y Ck) y de las regiones variables murinas (VH y Vk).

Las regiones constantes humanas se obtuvieron por PCR a partir de la secuencia nucleotídica del fragmento Fab de un anticuerpo humano contra la toxina del tétanos clonada en el vector pComb3TT. Este vector fue proporcionado por C. Barbas del Scripps Research Institute. Las regiones variables se obtuvieron también por PCR, a partir del cDNA del anticuerpo murino BCF2 clonado en el vector λ gt11. Estas reacciones se hicieron tomando como molde el DNA de fagos λ gt11 que se prepararon a partir de una alícuota proporcionada por el Dr. Alexei Licea del Lab. del Dr. Lourival Possani.

Las reacciones para obtener las regiones constantes humanas se realizaron con los oligonucleótidos cH3 y cH5 para la región CH1; y ck3 y ck5 para la región Ck (Material y Métodos). En el caso de las regiones variables murinas se usaron los iniciadores vH5 y vH3 para la región VH y los vk5 y vk3 para la Vk (Material y Métodos). Los oligonucleótidos presentan sitios de restricción en sus extremos 5' que facilitan la clonación de los productos amplificados (Material y Métodos).

Los productos amplificados se analizaron en geles de poliacrilamida al 7.5%, de modo que pudiera detectarse la presencia de productos inespecíficos. En aquellos casos en los cuales se observaron inespecificidades, se purificaron los productos mediante el corte de las bandas de interés a partir del gel de poliacrilamida (Ausubel et al, 1992). Los productos de PCR se trataron con fenol-cloroformo y se precipitaron con n-butanol. En la Fig. 6 se muestra un gel de poliacrilamida 7.5% con los productos VH, Vk, CH1 y Ck.

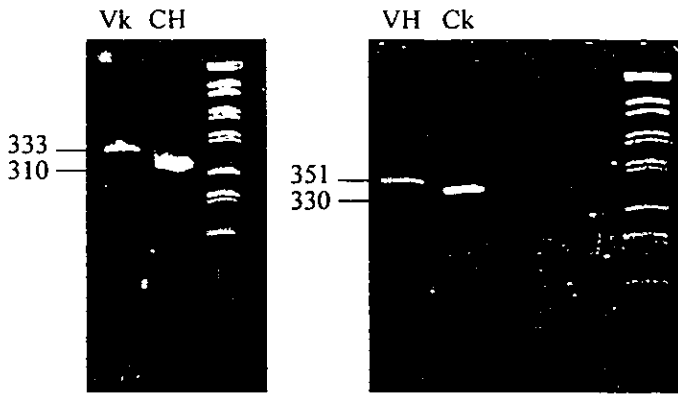


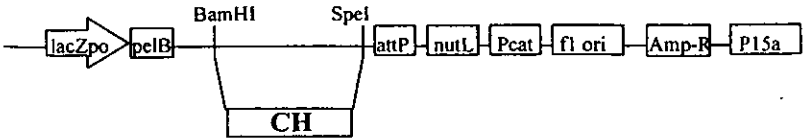
Fig. 6. Geles de poliacrilamida 7.5% en los que se muestran los productos de PCR correspondientes a las regiones variables murinas VH y Vk, y a las regiones constantes humanas CH1 y Ck.

B. Clonación de las regiones constantes humanas (CH1 y Ck) y variables murinas (VH y Vk) en los vectores del sistema de despliegue en fagos Pasteur-Merieux.

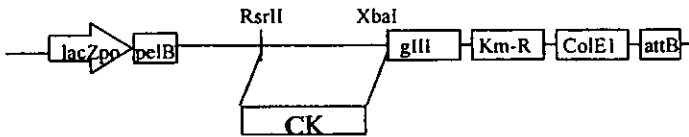
Las regiones constantes y variables del Fab quimérico se clonaron en los vectores del sistema de despliegue en fagos de Pasteur-Merieux (Fig. 5). La cadena ligera se clonó en el plásmido pM849 y la cadena pesada en el fagemido pM846. En la Fig. 7 se muestra el esquema general de clonación.

Clonación de regiones constantes humanas (CH y CK).

pM846 (fagemido)

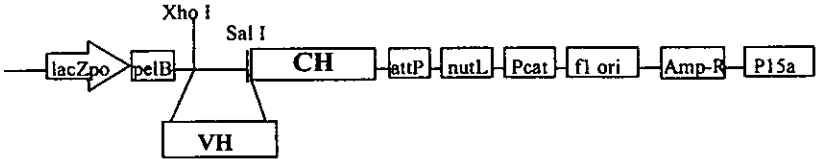


pM849 (plásmido)



Clonación de regiones variables murinas (VH y VK).

pM846 -CH



pM849 -CK

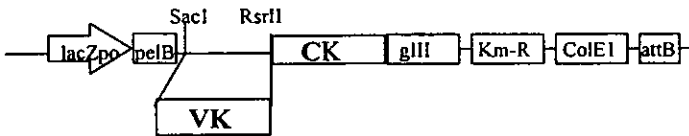


Fig. 7. Esquema General de Clonación del fragmento Fab quimérico en los vectores del Sistema de Pasteur Merieux.

El vector pM849 y el producto de PCR Ck se cortaron con las enzimas RsrII y XbaI. El fagemido pM846 y el producto CHI se cortaron con BamHI y SpeI. Los vectores se purificaron mediante geles de agarosa (Material y Métodos) y los productos de PCR por geles de poliacrilamida (Ausubel et al, 1992). Se ligaron los fragmentos y se transformaron células de *E. coli* XL1Blue por electroporación.

Se analizaron algunas colonias candidatas por PCR y por su patrón de restricción. Se vio que 6 de 15 clonas analizadas contienen la región CHI en pM846 y 3 de 17 la región Ck en pM849. La identidad de las clonas se corroboró por la determinación de su secuencia nucleotídica (Material y Métodos).

En el caso de la clonación de las regiones variables murinas no se obtuvieron clonas después de intentar la inserción directa de los productos de PCR digeridos, por lo cual se siguió una estrategia alterna que consistió en la clonación de los productos de PCR en sitios romos de un vector transitorio. El vector pUC18 se digirió con SmaI, se desfosforiló en sus extremos 5' y 3' y se purificó de un gel de agarosa. Los productos de PCR se analizaron en un gel de poliacrilamida 7.5%, se trataron con fenol-cloroformo y se precipitaron con n-butanol. Posteriormente se fosforilaron los extremos 5' y 3', se trataron con fenol-cloroformo, se precipitaron con acetato de sodio y se ligaron a pUC18.

La región VH en pUC18 y la construcción pM846/CH se cortaron con XhoI y Sall. Se desfosforilaron los extremos del vector digerido para evitar la religación de los extremos compatibles XhoI y Sall, se trató con fenol-cloroformo, se precipitó con acetato de sodio y se purificó a partir de un gel de agarosa. El fragmento VH digerido con XhoI y Sall se purificó a partir de un gel de poliacrilamida 7.5%. El vector digerido y defosforilado se ligó con el fragmento VH digerido.

Las construcciones Vk en pUC18 y pM849/Ck se digirieron con RsrII y SacI. El vector digerido se purificó a partir de un gel de agarosa. El fragmento Vk se purificó a partir de un gel de poliacrilamida 7.5%. Se ligaron los fragmentos purificados.

Se efectuaron reacciones de PCR de algunas colonias candidatas y se encontró que 4 de 10 analizadas de la construcción VK en pM849/Ck presentaron el inserto de interés; y que 16 de 27 analizadas presentaron el inserto VH en pM846/CH. La identidad de las clonas se corroboró por la determinación de su secuencia nucleotídica.

II. Expresión de manera soluble del Fab quimérico.

A. Transformación de la cepa D1210HPF' con el plásmido pM849/Vk-CK.

D1210HPF' es una cepa de *E. coli* capaz de expresar de manera inducible a la enzima integrasa recombinasa que lleva a cabo la recombinación entre los sitios *att* presentes en los vectores pM846 y pM849. También presenta un episoma F', el cual contiene la información necesaria que le permite a la cepa ser infectada por fagos filamentosos. Con estas características, la cepa transformada con el plásmido pM849/Vk-Ck es capaz de ser infectada por fagos originados a partir del fagemido pM846/VH-CH, así como permitir que los vectores pM846 y pM849 se recombinen entre sí para dar lugar a un fagemido recombinante que presente las dos cadenas del Fab quimérico en un mismo vector de expresión.

Se transformaron bacterias D1210HPF' mediante choque térmico con el plásmido pM849/Vk-Ck (Material y Métodos).

B. Producción y Titulación de los fagos a partir del fagemido pM846/VH-CH

Se infectaron células de *E. coli* XL1Blue transformadas con el fagemido pM846/VH-CH con fagos "helper" R408 (Stratagene) a una MOI de 100. Se obtuvieron fagos pM846/VH-CH con un título de 6.3×10^{11} pfu/ml (Material y Métodos).

C. Infección de la cepa D1210HPF' (pM849/Vk-Ck) con fagos pM846/VH-CH. Recombinación de los dos vectores.

Se infectó la cepa D1210HPF' (pM849/Vk-Ck) a una MOI de 10 durante 1 hr a 30° C y se indujo la recombinación a 42° C por 30 minutos. Después del choque térmico, el cultivo se diluyó 10 veces y se dividió en dos partes iguales, una para seguir su crecimiento en medio 2XYT/2% glucosa y otra en medio mínimo M9 (Material y Métodos). Se siguió el crecimiento en dos medios diferentes para distinguir cual condición favorecía la formación del fagemido recombinante.

Se tomaron alícuotas del cultivo en los distintos pasos del proceso para purificar plásmidos/fagemidos, así como para sembrar en medio sólido con los siguientes antibióticos: Km, Cb y Km/Cb. Esto último se hizo con el propósito de poder calcular los porcentajes de infección y supervivencia al choque térmico, para examinar el momento en el que se adquiere la resistencia a carbenicilina (incorporación del fagemido) y si esta se mantiene a lo largo del proceso, para observar si el crecimiento del cultivo se ve alterado durante el proceso, así como para preparar plásmido/fagemido a partir de colonias individuales crecidas después de cada etapa y examinar el tipo de vector presentado. Como control negativo se siguió en paralelo el crecimiento de un cultivo no infectado.

En la Tabla 1 se presenta el número aproximado de colonias de los sembrados que crecieron en cada etapa del proceso y en presencia de los antibióticos que se indican. Se sembraron 100 µl de un dilución 1:10,000 de un alícuota del cultivo.

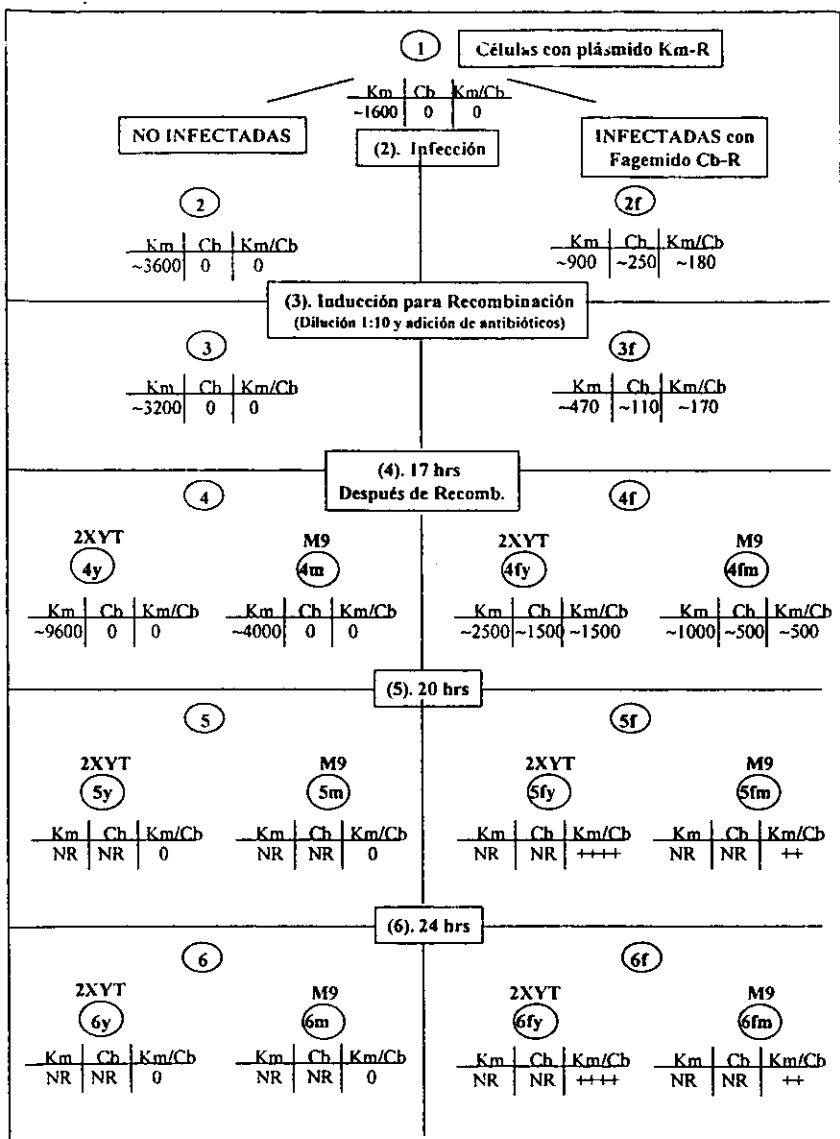


Tabla 1. Número aproximado de colonias que crecieron después de cada etapa del proceso de infección y recombinación en presencia de los antibióticos que se indican. En todos los casos se muestra el número de colonias que crecieron después de sembrar 100 µl de una dilución 1:10,000 de una alícuota del cultivo. Km: kanamicina; Cb: carbenicilina. NR: No se Realizaron. ++ : incontables ++++ : mayor numero que en ++

En la Tabla 1 podemos observar que la infección retarda el crecimiento del cultivo, ya que el número de colonias obtenido en la caja con Km para las muestras del cultivo infectado es varias veces menor que el de aquellas del cultivo control sin infectar en todos los tiempos. Por otra parte, se midió la D.O._{600 nm} de los cultivos en distintas etapas del proceso y se vio que el cultivo infectado crecido en medio 2XYT/2% glucosa se duplica cada 6 horas mientras que el no infectado y crecido en las mismas condiciones se duplica cada 2 horas.

El porcentaje de infección fue del 23%. Este dato se obtuvo tomando en cuenta el número de colonias que crecieron en presencia de Km y aquellas que crecieron en presencia de Cb y Cb/Km, que provenían de las muestras de la etapa 2f. El porcentaje de supervivencia al choque térmico fue del 60%, el cual se obtuvo relacionando el número de colonias que crecieron en la etapa 2f con las que crecieron en la etapa 3f.

Se purificó plásmido/fagemido a partir de alícuotas tomadas del cultivo en las etapas que se indican en la Tabla 1. En la Fig. 8 se muestra el DNA de estas preparaciones digerido con HindIII, un sitio único en el plásmido pM849 y ausente en el fagemido.

En la Fig. 8 podemos observar el plásmido linearizado (3.7 kb) y una banda de 6.5 kb en aquellas muestras infectadas. También en muestras infectadas pero de las etapas 4f, 5f y 6f se observa una tercera banda de aproximadamente 7.9 kb que pudiera ser el producto de recombinación, ya que su tamaño corresponde a la suma de ambas construcciones.

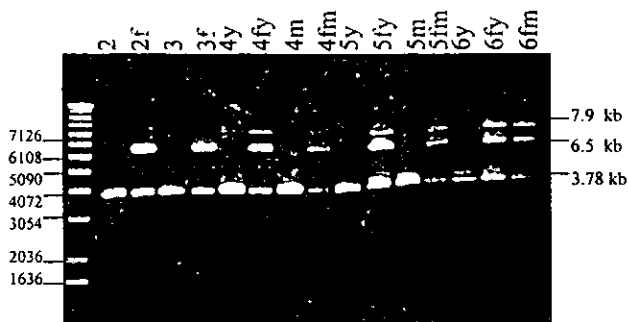


Fig. 8. Plásmidos/Fagemidos preparados a partir de alícuotas tomadas en las distintas etapas del proceso de recombinación. Todas fueron digeridas en un sitio único del plásmido (HindIII) y ausente en el fagemido. En los carriles con letra (f) se presentan las preparaciones de cultivos infectados. En los carriles con letra (y) se muestran las preparaciones de cultivos que crecieron en medio 2XYT después de la recombinación y con letra (m) las preparaciones de cultivos en medio mínimo M9. Los números representan las etapas del proceso de recombinación (Ver Tabla 1.)

Con el fin de corroborar los resultados del cultivo, se prepararon plásmidos a partir de colonias independientes crecidas en medio sólido con Cb/Km para cada etapa del proceso. Las preparaciones se digirieron con HindIII, y se analizaron en un gel de agarosa 0.8% (Fig. 9).

En todos los carriles se observa la banda de 3.7 kb correspondiente al plásmido linearizado mientras que en la mayoría de los carriles de muestras infectadas se observa una banda de 6.5 kb. En todos estos casos se presenta también una banda de ~2.8 kb (Fig. 9). La banda de 7.9 kb del plásmido/fagemido recombinante aparece, junto con la de 3.7 kb del plásmido en las muestras infectadas 4fm2, 4fm3, 4fm4, 5fm1, 5fm4 y 6fm3 (Fig. 9). A excepción de las muestras 3f-1 y 3f-2 obtenidas después del choque térmico, la presencia de la banda de 7.9 kb que corresponde al plásmido/fagemido recombinante, excluye la presencia de la banda de 6.5 kb. Por otra parte, las clonas 3f-1 y 3f-2 son las únicas que presentan una banda de aproximadamente 6 kb. (Fig. 9).

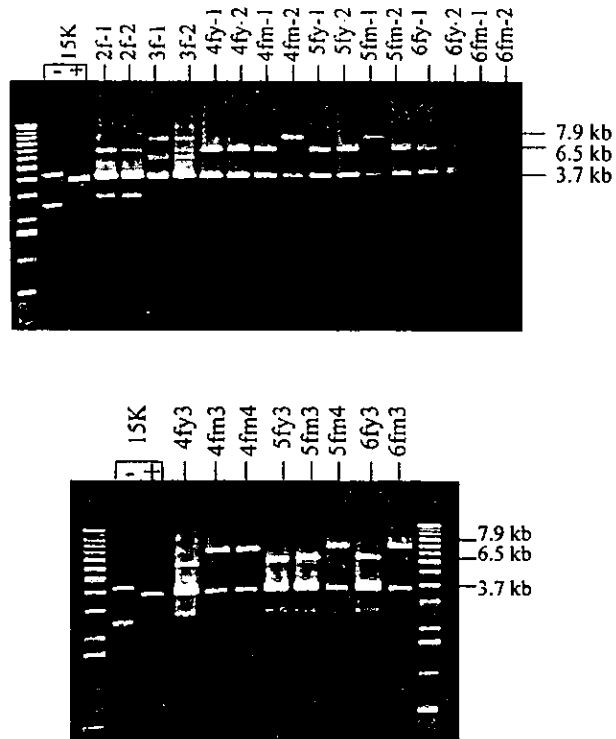


Fig. 9. Plásmido preparado a partir de colonias sembradas en medio sólido con Cb/Km después de cada etapa del proceso y digerido con HindIII, sitio único en el plásmido y ausente en el fagemido. El carril 15K corresponde al plásmido pM849/VkCk. Con letra (y) se muestran las preparaciones de cultivos que crecieron en medio 2XYT después de la recombinación y con letra (m), las preparaciones de cultivos en medio mínimo M9. Los números antes del guiñon representan las etapas del proceso de recombinación.

Se eligieron las preparaciones que presentaron al fagemido de 7.9 kb y al plásmido linealizado de 3.7 kb cuando se digirió con HindIII para su análisis por cortes en XhoI y en EcoRV/HindIII. En la Fig. 10 se presenta el mapa en donde se muestran las posiciones de tales sitios de restricción.

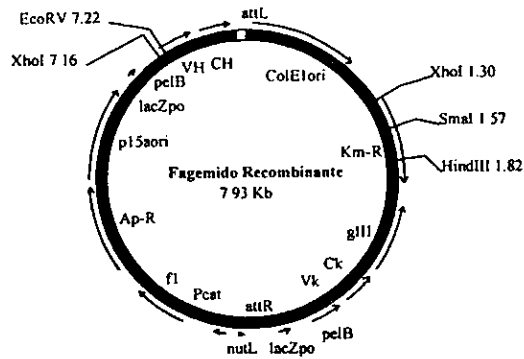


Fig. 10. Sitios utilizados para el análisis de restricción del fagemido recombinante.

En la Fig. 11 se muestra un gel de agarosa al 0.8% en donde se analizan las restricciones. El corte en XhoI originaría dos fragmentos del fagemido recombinante, uno de 5866 y otro de 2066, mientras que la doble digestión EcoRV/HindIII daría lugar a los fragmentos de 5405 y 2527. Todas las colonias seleccionadas presentan el patrón esperado y el plásmido original linearizado.

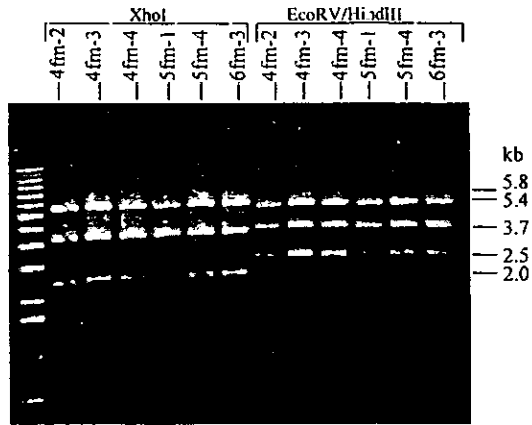


Fig. 11. Análisis de las clonas que al cortar con HindIII, presentaron dos bandas, la del plásmido original y la de 7.9 kb del fagemido recombinante. El corte en XhoI da lugar a dos fragmentos del fagemido recombinante, uno de 5866 y otro de 2066, mientras que la doble digestión EcoRV/HindIII origina los fragmentos de 5405 y 2527.

Hasta ahora hemos observado la presencia del fagemido recombinante mediante su patrón de restricción con tres diferentes enzimas. Para poder corroborar la identidad del vector mediante PCR y la determinación de su secuencia, resultaba necesario el aislamiento del fagemido recombinante puro y libre de alguno de los otros vectores, también necesario para la expresión del Fab de manera soluble en la cepa TOPP2 (Stratagene).

Se trató de aislar el vector recombinante mediante el rescate de los fagos recombinantes (Material y Métodos) a través de la infección con un fago "helper" y su reamplificación (Material y Métodos) en la cepa XL1blue. Se hizo un cultivo a partir de la clona 4fm-3 que contenía al fagemido recombinante de 7.9 kb y al plásmido original de 3.78 kb. Se infectó con el fago "helper" R408 a una MOI de 20:1 (Material y Métodos), se centrifugó el cultivo, se colectó el sobrenadante y los fagos se precipitaron con PEG/NaCl. (Material y Métodos). Se determinó el título de los fagos recombinantes en la cepa XL1Blue, siendo de 4×10^{11} pfu/ml. Los fagos recombinantes se usaron para infectar una cepa vacía de XL1Blue (Material y Métodos) con el propósito de obtener al fagemido recombinante amplificado y puro.

Después de la infección se tomaron alícuotas del cultivo que se sembraron en medio LB sólido con Cb/Km/Tc. Se eligieron 6 colonias individuales para hacer cultivos líquidos y preparar el fagemido recombinante. En la Fig. 12 se presenta el análisis de 5 de ellas. Las preparaciones de plásmido se analizaron mediante la restricción con SmaI, un sitio único en el fagemido recombinante. En 5 colonias se obtuvieron dos bandas después de la restricción con SmaI, una del tamaño del fagemido recombinante (7.9 kb) y otra de 5 kb (colonias #2, #3 y #5 de la Fig. 12). En una de las 6 colonias (colonia #4. Fig. 12) se observó una sola banda de aproximadamente 6.5 kb después de la digestión con SmaI. No se llevó a cabo un mayor análisis que pudiera identificar y explicar la aparición de la banda de 5 kb o la de 6.5 kb. Esta estrategia no llevó a la obtención del fagemido recombinante puro pero sí a observaciones interesantes que deben considerarse en el caso que se requiera utilizar el sistema de Pasteur-Merieux para la construcción de bibliotecas y su despliegue en fagos ya que la aparición de la banda de 5 kb y la de 6.5 kb podría ser indicativo de un evento de delección o de recombinación no específica.

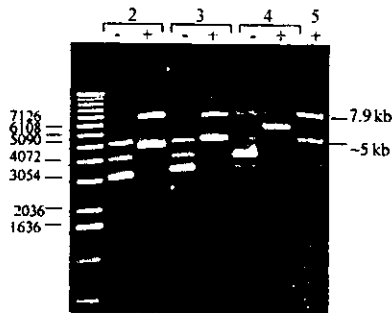


Fig. 12. Restricción en un sitio único del fagemido recombinante (*Sma*I) de vectores preparados a partir de colonias infectadas con los fagos recombinantes. En algunas colonias la digestión con *Sma*I dió lugar a dos bandas, una del tamaño del fagemido recombinante (7.9 kb) y otra de 5 kb. En una colonia, la digestión dió lugar a una sola banda de 6.5 kb (colonia #4).

El aislamiento del fagemido recombinante consistió en digerir la preparación de plásmido/fagemido de la clona 4fm-3 en el sitio único *Hind*III, purificar la banda de 7.9 kb a partir de un gel de agarosa, religarlo y transformar bacterias de la cepa TOPP2 (Stratagene).

Con el fagemido recombinante puro se hicieron reacciones de PCR para comprobar que las cadenas del Fab estaban presentes en el vector. Como controles positivos se hicieron PCRs utilizando las construcciones pM846/VH-CH y pM849/Vk-Ck. Las reacciones de PCR del fagemido recombinante resultaron en productos del mismo peso que los amplificados con las construcciones originales tanto para el fragmento VH-CH como para el Vk-Ck (Fig. 13) lo cual nos indica que las cadenas del Fab estaban presentes y completas en el fagemido recombinante.

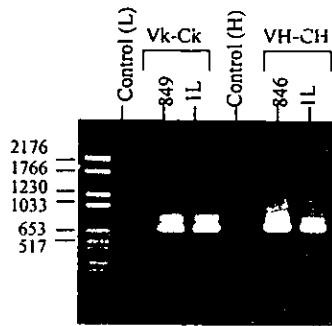


Fig. 13. Gel de agarosa en el que se muestran los productos de PCR correspondientes a las cadenas ligera y pesada del fragmento Fab quimérico. En los carriles 849 y 846 se observan los productos amplificados a partir del plásmido pM849/VkCk y el fagemido pM846/VHCH, respectivamente. En el carril 1L se muestran los productos amplificados a partir del fagemido recombinante.

Se determinó la secuencia nucleotídica de la región de cada cadena del Fab, así como de las porciones que las flanquean. Se observó que las dos cadenas del Fab estaban completas y en fase con el resto del vector, que estaban presentes los sitios *attL* y *attR* originados por la recombinación, la secuencia *pelB* y la de *lacZpo*.

D. Inducción de la expresión del fragmento Fab quimérico soluble.

La expresión de las cadenas del Fab en el fagemido recombinante está controlada por el promotor *lacZpo*, inducible por adición de IPTG. Las cadenas pesada y ligera son transportadas al periplasma de la bacteria debido a que están fusionadas al péptido señal PELB.

Se ensayaron dos protocolos distintos de expresión mediante la inducción con IPTG (Material y Métodos) con el propósito de examinar con cual se obtenía el mejor rendimiento de expresión. La diferencia entre los dos radica principalmente en que en uno de ellos (protocolo I.), las células son sometidas a un cambio drástico en las condiciones de crecimiento, retirando de inmediato toda la glucosa y agregando IPTG (Material y Método)

mientras que en el otro (protocolo II.), se va acondicionando a las células gradualmente a un medio carente de glucosa antes de agregar el agente inductor (IPTG) (Material y Método).

Después de la inducción de la expresión, se dejó crecer el cultivo por varias horas y se tomaron alícuotas (50 ml de cultivo) para su análisis a diferentes tiempos después de agregar el inductor. Se examinaron las fracciones periplásmicas (McCafferty et al, 1996) (Material y Método) y el medio de cultivo para observar la presencia del Fab quimérico. Todas las muestras se analizaron por SDS-PAGE (Sambrook et al, 1989) y por transferencias tipo Western (Material y Método), en las cuales el Fab quimérico se detectó con un anticuerpo monoclonal que reconoce cadenas ligeras tipo kappa de IgG1 humana.

En la Fig. 14 se muestra un Western blot en el que se analizaron muestras obtenidas con el protocolo I de expresión (Material y Método) después de 12 horas de haber adicionado IPTG. Se analizó la misma cantidad de proteína total (2.5 µg) del extracto periplásmico del cultivo inducido para la expresión, del cultivo no inducido y del cultivo de la cepa sin transformar. En el carril del periplasma del cultivo inducido se observa una banda por arriba de los 45 kD, correspondiente al Fab quimérico que tiene un peso de 50 kD. También se detecta un poco de Fab quimérico en el periplasma del cultivo no inducido. No se observa nada en las muestras de los medios de cultivo ni en aquellas del cultivo de la cepa sin transformar.

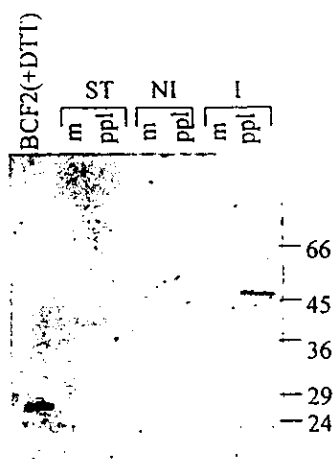


Fig. 14. Western blot en la que se analizaron muestras obtenidas a partir del protocolo I de expresión. Se analizaron el medio de cultivo (m) y las fracciones periplásmicas (ppl) de cultivos inducidos (I) y no inducidos (NI) para la expresión, así como de las células no transformadas (ST). En el periplasma del cultivo inducido se detectó una banda de 50 kD correspondiente al Fab quimérico. En el carril del extremo izquierdo se analizaron 5 ug del anticuerpo monoclonal BCF2 en condiciones reductoras (+DTT).

En la Fig. 15 se presenta un Western Blot en el que se analizaron muestras obtenidas con el protocolo II. Todas fueron tomadas después de 8 horas de haber agregado el inductor. Se analizaron las fracciones periplásmicas de los cultivos inducidos, no inducidos y de la cepa no transformada. Se analizó la misma cantidad de proteína total (4 μ g) para el caso de las muestras inducidas y no inducidas. Del cultivo de la cepa sin transformar se analizaron 2.4 μ g de proteína total. En los carriles de las muestras de los cultivos inducidos y no inducidos se detecta al Fab como una banda por arriba de los 45 kD. En estas muestras no se observa diferencia en el nivel de expresión después de 8 horas de haber agregado el inductor entre los cultivos inducidos y no inducidos.

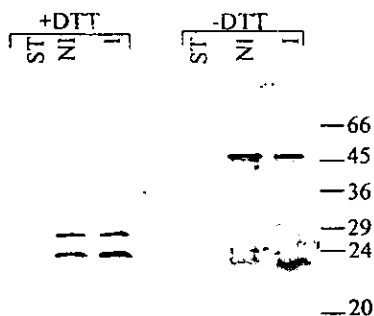
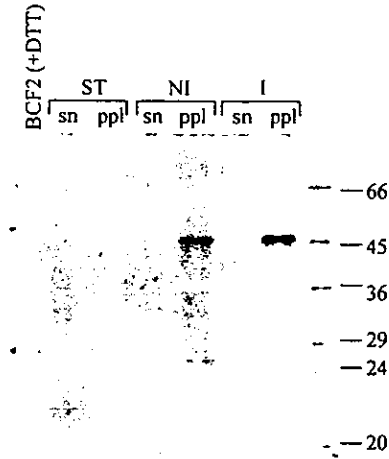


Fig. 15. Western Blot en el que se analizan en condiciones reductoras y no reductoras (+DTT, -DTT) las fracciones periplásmicas de los cultivos inducidos (I) y no inducidos (NI) para la expresión, así como de un cultivo no transformado (ST). Estas muestras fueron tomadas de cultivos procesados de acuerdo con el protocolo II después de 8 horas de haber agregado IPTG.

La comparación del rendimiento entre la Fig. 14 y la Fig. 15 (aún considerando la diferencia en la cantidad de proteína total aplicada) muestra que el protocolo II de expresión parece resultar en un mayor rendimiento de la expresión. Se efectuaron otros experimentos para determinar las condiciones y el tiempo óptimo de expresión ensayando con este protocolo. Algunos de los experimentos consistieron en analizar muestras tomadas a tiempos posteriores a 8 horas después de haber agregado el agente inductor.

En la Fig. 16 se presentan dos transferencias tipo Western en las que se analizan las fracciones periplásmicas y el medio de cultivo de alícuotas tomadas después de 12 hrs (Fig. 16A) y 18 hrs (Fig. 16B) después de haber adicionado IPTG. Se presentan las muestras de cultivos inducidos, no inducidos y de la cepa no transformada. Para el caso de las muestras tomadas después de 12 horas (Fig. 16A), se aplicaron 3 µg de proteína total en los carriles de las fracciones periplásmicas de los cultivos inducidos y no inducidos. En el caso de las muestras tomadas después de 18 horas (Fig. 16B) se aplicaron 13 µg de proteína total para las fracciones periplásmicas de los cultivos inducidos y no inducidos.

A.



B.

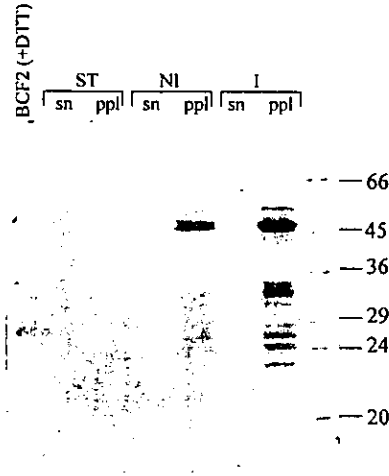


Fig. 16. Western Blot de fracciones periplásmicas (ppl) y del medio (sn) de cultivos inducidos (I), no inducidos (NI) y de la cepa sin transformar (ST). En (A) se presentan muestras tomadas después de 12 horas de haber agregado el inductor (3 μ g de proteína total). En (B) se presentan las muestras tomadas después de 18 horas de haber adicionado IPTG (13 μ g de proteína total). En cada blot también se analizaron 10 μ g del monoclonal BCF2 en condiciones reductoras (+DTT)

En la Fig. 17 se analizan por western blot, muestras periplásicas preparadas después de 23 horas de haber adicionado IPTG. También se analizan muestras de cultivos no inducidos y de la cepa sin transformar. En la Fig. 18 se presenta el análisis por SDS-PAGE de las mismas muestras periplásicas. En todos los casos se aplicaron 13 μ g de proteína total.

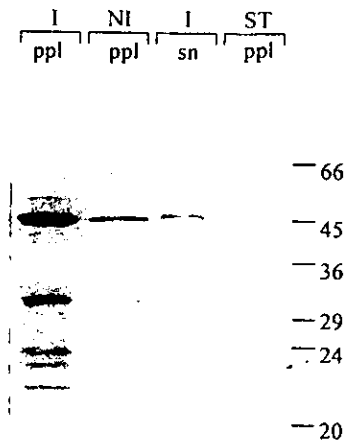


Fig. 17. Western Blot de las fracciones periplásicas (ppl) de cultivos inducidos (I), no inducidos (NI) y de un cultivo no transformado (ST). Se incluye también una muestra del medio condicionado (sn) del cultivo inducido para la expresión.

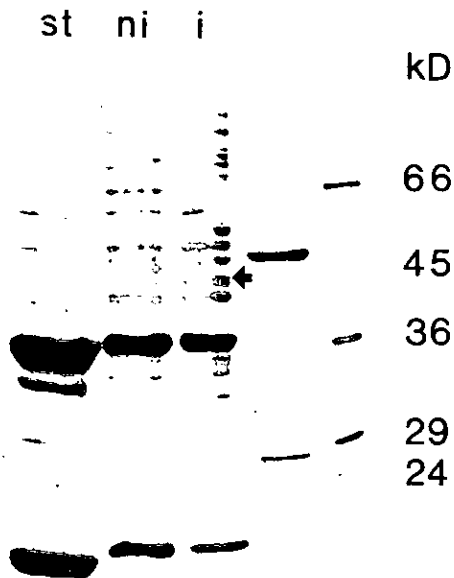


Fig. 18. SDS-PAGE de muestras periplásmicas tomadas después de 23 horas de haber adicionado IPTG. Se analizan muestras de cultivos inducidos (I) y no inducidos (NI), así como de un cultivo de la cepa sin transformar (ST). En todos los casos se analizan 13 μ g de proteína total. Con una flecha se indica la banda correspondiente al Fab quimérico.

En todas las transferencias se observa para las fracciones periplásmicas de las muestras inducidas y no inducidas (tomadas después de 8,12,18 y 23 horas de haber agregado IPTG) una banda principal de 50 kD que corresponde al Fab quimérico, así como productos de degradación menores a 45 kD. No se observa ninguna banda en los carriles de los cultivos no transformados. Por otro lado, al comparar los Western blots en los que se analizan las muestras tomadas después de 12 horas de haber suplementado IPTG (Figs. 14 y 16A), se observa que se obtiene un mayor rendimiento en la expresión del Fab quimérico mediante el protocolo II que con el protocolo I.

A partir de 12 horas después de la inducción ya es posible detectar al Fab en el medio de cultivo, como se observa en el carril del medio condicionado de las muestras inducidas (Fig 16A). Por otro lado, a partir de las 12 horas de haberse agregado el inductor ya es posible

detectar que el nivel de expresión en los cultivos con IPTG es varias veces mayor que en los cultivos que no tienen el agente inductor.

Resulta interesante la presencia de una banda de un peso mayor que la que se observa para el Fab quimérico en las fracciones periplásmicas preparadas después de 18 y 23 hrs de iniciada la inducción (Fig.16B y 17). Esta banda podría indicar la formación de oligómeros entre las cadenas del Fab con algún producto de degradación o entre estos mismos productos.

En la Fig. 18 se muestra el patrón general de proteínas periplásmicas en un gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie. En esta figura se muestran las fracciones periplásmicas preparadas después de 23 hrs de haber inducido la expresión. En el carril de las muestras inducidas se observa una banda muy tenue por arriba de los 45 kD que corresponde al Fab quimérico. Esta banda no se observa en los carriles de los cultivos no inducidos ni en los cultivos no transformados.

Se hizo un Western blot (Fig. 19) en el que se aplicó la misma cantidad de proteína total para las fracciones periplásmicas y el medio de cultivo de muestras tomadas después de 8 y 18 horas de iniciada la inducción. Esta transferencia se hizo para examinar si se observaba degradación a tiempos menores de 12 horas después de la inducción, si a tiempos mayores después de adicionar IPTG se producía mayor cantidad de proteína recombinante y si la presencia del oligómero de peso mayor que el Fab quimérico podía detectarse a tiempos menores después de la inducción.

En la transferencia de la Fig. 19, se observa que a partir de 8 horas después de la inducción, ya puede detectarse al Fab quimérico en el medio de cultivo. Adicionalmente, después de 8 horas ya se detectan productos de degradación en el periplasma, así como la presencia del producto de mayor peso que el Fab quimérico. En esta transferencia es evidente que hay una mayor concentración de proteína recombinante en periplasma y en el medio de cultivo a las 18 que a las 8 horas después de agregar IPTG.

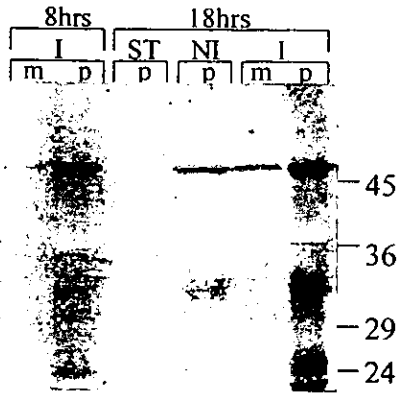


Fig. 19. Western Blot en el que se analizan el medio condicionado (m) y la fracción periplásmica (p) de muestras tomadas después de 8 y 18 horas de haber agregado IPTG. Se incluyen también las muestras periplásmicas de los cultivos no inducidos (NI) y no transformados (ST) tomados luego de 18 horas de haber suplementado con IPTG.

Se examinó si el nivel de expresión era afectado cuando se disminuyó la concentración de IPTG a 0.1 mM analizando las fracciones periplásmicas después de 18 horas de haberse adicionado el inductor. En la Fig. 20 se presenta el Western blot de los periplasmas provenientes de los cultivos inducidos con 0.1 mM y 1 mM. En ambos carriles se aplicaron 6 µg de proteína total. No se observa diferencia en el nivel de expresión cuando se usan 10 veces menos de IPTG para inducir la expresión del Fab quimérico recombinante.

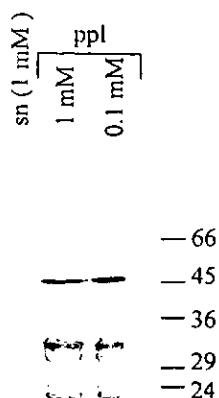


Fig. 20. Transferencia tipo Western en la que se analiza si la concentración de IPTG (inductor) afecta los niveles de expresión del Fab quimérico. Se analizan muestras del medio de cultivo condicionado (sn) y de las fracciones periplásmicas (ppl) cuando se emplean 1 mM y 0.1 mM de IPTG.

Se analizó la presencia del Fab en un lisado celular obtenido por sonicación. Se examinó en un Western blot (Fig. 21) la misma cantidad de proteína (12 μ g) de muestras periplásmicas y de lisados totales después de 8 horas de haber adicionado el agente inductor. También se incluyeron muestras de cultivos no inducidos. En el carril de los lisados totales del cultivo inducido, se observan tres bandas principales, una correspondiente al Fab, otra de un peso mayor que el del Fab y otra alrededor de los 36 kD. Esta última banda podría corresponder a oligómeros que se formaron entre las cadenas inmaduras o productos de degradación del Fab en el citoplasma celular. También se observa un pequeño barrido de degradación por debajo de los 29 kD. En el carril correspondiente a la fracción periplásmica del cultivo inducido se observan muchas bandas de productos de degradación por debajo a 45 kD, la banda mayoritaria por arriba de 45 kD que corresponde al Fab y una banda por arriba del tamaño del Fab. En los carriles de las muestras del cultivo no inducido se observa el mismo patrón que en aquellos de las muestras inducidas, con excepción de la banda de tamaño mayor al Fab. En estos carriles la intensidad de las bandas es varias veces menor que en las muestras inducidas.

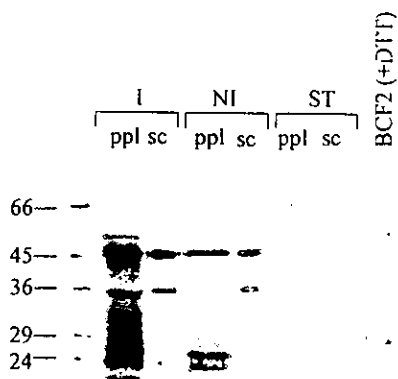


Fig. 21. Western Blot en el que se examinan muestras periplásmicas (ppl) y de lisados totales (sc) después de 8 horas de haber adicionado el agente inductor (I). También se incluyen muestras de cultivos no inducidos (NI) y no transformados (ST). En el carril del extremo derecho se analizan 12 ug del monoclonal BCF2 en condiciones reductoras (+DTT).

Se hizo un ensayo de ELISA (Material y Métodos) usando como antígeno a la toxina Cn2 de *C. noxius Hoffmann* con las muestras obtenidas después de 19 horas de haber inducido la expresión. El Fab quimérico se reveló utilizando un F(ab')₂ comercial anti-cadenas kappa de IgG1 de humano. Los valores de absorbancia en el ELISA se muestran en la Tabla 2. Las muestras en cuestión se utilizaron en las diluciones que se indican en la Tabla.

	Periplasma (A _{405nm})	Medio Cultivo (A _{405nm})
Inducido	(dilución 1:10) 1.677	0.168
	(dilución 1:50) 0.685	
No Inducido	(dilución 1:10) 0.961	0.042
Sin Transformar	0.006	0.039

Tabla 2. Resultados del ELISA en el que se analizaron las muestras periplásmicas de los cultivos inducidos y no inducidos para la expresión, así como de los cultivos no transformados. Se examinó la actividad del Fab quimérico por la toxina Cn2 de los extractos periplásmicos provenientes de cultivos inducidos para la expresión.

Los resultados del ELISA muestran que el Fab quimérico se expresa bien plegado y activo ya que es capaz de reconocer y unirse a la toxina Cn2. No se observó reacción con la fracción periplásmica de la cepa TOPP2 sin transformar. La comparación entre los datos presentados por el cultivo inducido y no inducido (así como resultados de Western Blot) indican que existe una expresión basal del Fab ya que éste es detectado aún cuando no se ha inducido con IPTG. El dato presentado por el medio del cultivo inducido indica que después de un cierto tiempo después de la inducción existe una salida del Fab del espacio periplásmico hacia el medio de cultivo.

Se llevó a cabo un ensayo de ELISA aplicando distintas concentraciones del anticuerpo murino BCF2 purificado y usando como antígeno a la toxina Cn2. La placa se reveló con un anticuepo que reconoce cadenas ligeras kappa de IgG de ratón (Material y Métodos). Cabe mencionar que los anticuerpos comerciales que se utilizaron en los ensayos de ELISA y Western blot no presentan reacción cruzada, es decir, el anti-humano no reconoce al BCF2 y el anti-ratón no reconoce al Fab quimérico. A partir de los datos de absorbancia que mostraron un comportamiento lineal, se hizo una comparación con aquellos obtenidos en los ensayos de ELISA en los que se analizaron los extractos periplásmicos de los cultivos inducidos. Dicha comparación permitió hacer una aproximación del rendimiento de la expresión del Fab quimérico. En la Fig. 22 se muestra la curva de los datos obtenidos del ELISA en el que se aplicaron distintas concentraciones de BCF2.

A partir de la ecuación de la recta correspondiente a la parte lineal de la curva, se determinó la concentración de anticuerpo a la que le correspondía un determinado valor de absorbancia. Para obtener la concentración de Fab, se consideró que el anticuerpo acoplado a peroxidasa se une a dos cadenas ligeras cuando reconoce al BCF2 en la placa de ELISA y que solo se une a una cadena ligera cuando reconoce al Fab en la placa. El valor obtenido para la concentración de anticuerpo, se multiplicó por 100 (peso molecular de un Fab) y se dividió por 150 (peso molecular de anticuerpo completo) para obtener un valor aproximado de la concentración de Fab químérico que se aplicó a la placa de ELISA. El rendimiento aproximado de la expresión del Fab químérico fue de 50 $\mu\text{g/litro}$ de cultivo.

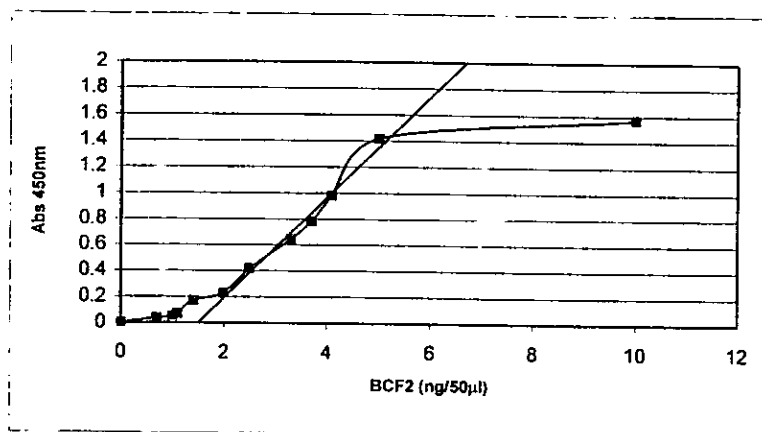


Fig. 22. Curva estándar del ELISA en el que se aplicaron distintas concentraciones de BCF2. En línea punteada se indica la región de la curva que muestra un comportamiento lineal.

Discusión.

En el presente trabajo se obtuvo activo y de manera soluble, un fragmento Fab quimérico humano-murino usando los vectores del sistema de despliegue en fagos Pasteur-Merieux. De esta manera se cumplió con los siguientes objetivos: la clonación de los genes quiméricos correspondientes, la recombinación específica de los vectores y la expresión del Fab soluble y activo. Por otra parte también se dieron los primeros pasos para probar la factibilidad del empleo del sistema de Pasteur-Merieux así como para aumentar la eficiencia de la expresión. De esta manera se abrió el camino hacia la obtención de material puro y suficiente para posteriormente cristalizar la proteína y determinar su estructura tridimensional así como para determinar la afinidad y la capacidad neutralizante del fragmento hacia la toxina Cn2 del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann y eventualmente hacia venenos de otros alacranes del género *Centruroides*. El fragmento Fab quimérico de BCF2 puede representar el primer componente de un anti-veneno "policlonal" bien caracterizado, puro y altamente eficiente.

El sistema de despliegue en fagos de Pasteur-Merieux fue diseñado para la construcción de bancos grandes de fragmentos Fab de anticuerpos que se pudieran acercar al repertorio natural humano de anticuerpos el cual está entre la cifra teórica de 10^{16} anticuerpos que un individuo es capaz de generar y alrededor de 10^9 correspondiente al número de linfocitos B en circulación (10^{12}) dividido por un número estimado de la representación de cada célula (10^3)⁶ (Sodoyer et al. 1997). En este trabajo se empezó a estudiar la factibilidad del empleo de este sistema para la construcción de bancos en nuestro laboratorio. El sistema se basa en la infección combinatoria en la cual *E. coli* es transformada con un banco de plásmidos que codifican para la cadena ligera y luego es infectada con un banco de fagemidos que codifican para la región pesada. Después de la recombinación entre plásmido y fagemido se obtiene un sólo vector (fagemido recombinante) en el cual están presentes las regiones ligera y pesada del fragmento Fab. Usando un protocolo en el que la infección de *E. coli* se hizo a 30°C y el choque térmico a 42°C durante 30 minutos, se obtuvo un porcentaje de infección del 23% y un porcentaje de sobrevivencia al choque térmico del 60%. El empleo de distintas temperaturas para la infección (30°C) y choque térmico (42°C) se hizo con el propósito de obtener el mejor porcentaje de infección pero que a la vez evitara la activación de la recombinasa antes del choque térmico; esto con el fin de tener un mayor control sobre el proceso de recombinación, así como para asegurar la activación efectiva de la recombinasa aceptando el riesgo de la muerte celular, ya que en este caso importaba la obtención de un solo tipo de clona que presentara al vector recombinante. Por otro lado definimos un punto

de partida para futuras pruebas necesarias para aumentar la eficiencia de la infección, y para disminuir el porcentaje de muerte celular. La situación ideal sería la de obtener un 100% en infección y supervivencia para asegurar que todas las variantes estén incluidas en el banco. En otros estudios y usando otra generación de los vectores de Pasteur-Merieux (Sodoyer et al., 1996) se ha probado la infección a 30°C ó 37°C variando el tiempo de la infección entre 60min y 120min así como el choque térmico a 40°C disminuyendo el tiempo hasta 15min. Estos rangos deben ser probados en futuros experimentos.

Por otra parte, en lo que respecta a la obtención del fagemido recombinante, cabe mencionar que el análisis del proceso de infección y recombinación por restricción de los plásmidos preparados directamente del cultivo. muestra que solo en etapas posteriores a 17 horas de haber adicionado antibióticos (etapa 4f) es que se observa al vector recombinante del tamaño esperado de 7.9 kb (Fig. 8) y que en todas las preparaciones de las muestras infectadas aparece una banda de 6.5 kb. El análisis por restricción de los plásmidos/fagemidos de colonias individuales resistentes a Cb/Km de las etapas 2 (infección) a 6 (24 horas después de haber adicionado antibióticos) muestra dos patrones excluyentes a excepción de las colonias 3f-1 y 3f-2 (etapa 3-después de inducción de recombinación). Las colonias 3f-1 y 3f-2 presentan al fagemido de 7.9, la banda de 6.5, el plásmido de 3.7 y una banda de 6.0 kb. El análisis de las colonias de la etapa 2 (infección), así como algunas de las etapas 4-6 (varias horas después de recombinación) muestra al plásmido de 3.7 kb, una banda de 6.5 kb y otra de ~2.8 kb. El análisis de algunas colonias de las etapas 4-6 muestran el fagemido recombinante de 7.9 kb y el plásmido de 3.7 kb (Fig. 9). La aparición del fagemido recombinante de 7.9 kb excluye la presencia de la banda de 6.5 kb en las colonias analizadas de las etapas 4-6. No se determinó la identidad ni el origen de la banda de 6.5 kb debido a que el objetivo principal del trabajo era la obtención de un solo tipo de clona que presentara al fagemido recombinante para la expresión del Fab soluble. Resulta interesante mencionar la posibilidad de que la banda de 6.5 kb pudiera tratarse de una isoforma del fagemido original o incluso de un producto intermediario de recombinación entre los vectores, sin embargo es necesaria una caracterización de este producto para poder hacer cualquier aseveración.

Resulta interesante el hecho de que en ninguna colonia analizada proveniente de la dilución en medio 2XYT (después del choque térmico) se detectó al fagemido de 7.9 kb y que en la mitad de las colonias que se analizaron que provenían de la dilución en medio mínimo M9 se observó la presencia del fagemido recombinante de 7.9 kb. Lo anterior podría deberse a que la

presión que recibieron las células en un medio con los mínimos requerimientos para su crecimiento, haya favorecido ya sea la formación del fagemido recombinante o la supervivencia de aquellas colonias que lo presentaron. Sin embargo es necesario el análisis de un mayor número de colonias que sea estadísticamente significativo para poder hacer cualquier aseveración con respecto a una presión selectiva.

El rescate de fagos y su reamplificación en la cepa XL1Blue que se realizó como una de las alternativas para obtener al fagemido recombinante puro, llevó también a observaciones interesantes sobre el sistema de Pasteur-Merieux. Se analizaron por restricción en el sitio único SmaI los plásmidos preparados a partir de seis colonias infectadas con el fagemido recombinante. La restricción de cinco preparaciones resultó en dos bandas una de 7.9 kb y otra de aproximadamente 5 kb (Fig.12). Sólo en la clona #4 se observó la aparición de una banda única de 6.5 kb cuando se digiere con SmaI. La aparición de bandas de peso menor que 7.9 kb podría ser indicativa de eventos de recombinación y deleción que se hubieran llevado a cabo durante la producción de fagos recombinantes a partir del fagemido o durante su reamplificación en la cepa XL1Blue.

Con respecto a la comparación de los niveles de expresión obtenidos a partir de los dos protocolos que se probaron mostró que el protocolo II resultó en un mayor rendimiento (Figs. 14 y 16A). El Fab quimérico se detectó por Western Blot principalmente en los extractos periplásmicos como una banda ligeramente arriba del marcador de 45 kDa. En el protocolo II de expresión se reduce gradualmente la glucosa del medio de cultivo antes de agregar el inductor de modo que las células se van adaptando progresivamente a un medio carente de glucosa y con IPTG, lo cual suponemos favoreció la expresión del Fab. En todas las muestras periplásmicas se observaron productos de degradación por debajo de los 45 kDa. Se analizaron muestras después de 8, 12, 18 y 23 horas de haber adicionado el inductor y a partir de las 8 horas ya se detectan productos de degradación en los extractos periplásmicos (Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17). Por otra parte, después de 18 y 23 horas de la inducción resulta muy evidente la presencia de una banda ligeramente mayor que el Fab. La presencia de esta banda se detecta también después de 8 horas de haber inducido la expresión (Fig. 19) pero en muy baja proporción. Esta banda podría indicar la presencia de agregados o de oligómeros entre moléculas de Fab o entre el Fab y algún producto de degradación o intermediario del plegamiento del Fab. Durante la expresión de fragmentos de anticuerpos que son guiados al periplasma, la etapa limitante es el plegamiento de la proteína en el espacio periplásmico por lo que algunos fragmentos de anticuerpos pueden seguir un proceso

de agregación (Knappik and Plückthun, 1995; Weill and Plückthun, 1999) que compite con la ruta correcta de plegamiento *in vivo*. La asociación entre intermediarios del plegamiento o entre especies parcialmente plegadas es la base para la formación de agregados proteicos *in vitro* y para la formación de cuerpos de inclusión (Georgiou and Valax, 1996). Sin embargo, la eficiencia en el plegamiento depende en gran medida del fragmento de anticuerpo que está siendo expresado (Knappik and Plückthun, 1995; Forsberg et al., 1997; Jung and Plückthun, 1997).

Después de 8 horas de haber agregado IPTG, ya es posible detectar la presencia del Fab en el medio de cultivo (Fig. 19). La salida del Fab hacia el medio de cultivo no resulta ser importante ya que la mayor proporción de Fab recombinante se observa en los extractos periplásmicos incluso para las muestras tomadas después de 23 horas de haberse inducido la expresión (>90% del Fab está en el periplasma). En todos los casos se observa una inducción real por IPTG ya que la intensidad y el grosor de las bandas en los carriles de las muestras periplásmicas inducidas son mayores que en las no inducidas. No se observó diferencia en el nivel de expresión cuando se utilizaron para la inducción diez veces menos de IPTG (0.1 mM) (Fig. 20).

Se hizo un lisado total por sonicación en paralelo con la extracción de fracciones periplásmicas después de 8 horas de haber inducido la expresión para analizar la presencia del Fab en el interior celular y compararla con la del periplasma. Se observaron tres bandas principales en el carril del lisado celular; la del Fab, una ligeramente mayor al Fab y otra de 36 kDa. En el lisado celular no se observa el patrón de degradación presentado por las muestras periplásmicas (Fig. 21) debido muy probablemente a que durante la sonicación se agregó el inhibidor de proteasas PMSF (Material y Métodos). La degradación del Fab en las muestras periplásmicas puede deberse a la actividad de proteasas en el espacio periplásmico o al hecho que con el método empleado para preparar fracciones periplásmicas ocurra lisis celular y que junto con la liberación del Fab quimérico del espacio periplásmico también se liberen proteasas citoplásmicas que degradan al Fab. Sería interesante probar otros protocolos de preparación de la fracción periplásmica como por ejemplo utilizar lisozima para degradar la pared celular así como el empleo de inhibidores de proteasas. El periplasma bacteriano presenta varias ventajas sobre el citoplasma para la expresión heteróloga de proteínas tales como un ambiente oxidante que permite el correcto plegamiento de proteínas (Makrides, 1996), un bajo contenido de proteínas (4% de proteína total) (Nossal, et al 1966) que facilita la purificación de la proteína expresada, así como un bajo contenido de proteasas (Makrides, 1996). Sin embargo, existe evidencia que la proteólisis en el espacio periplásmico puede ser tan severa como en el citoplasma (Anba et al.

1988 ; Gentz et al, 1988 ; Baneyx and Georgiou, 1989). Algunas enzimas proteolíticas asociadas con la envoltura celular de *E. coli* y cuyos genes ya han sido clonados y caracterizados son : DegP, OmpT, Proteasa III y Proteasa IV (Baneyx and Georgiou, 1992 ; Lazdunski, 1989). Se ha encontrado que la degradación de proteínas secretadas durante su expresión heteróloga en *E. coli* se ve reducida mediante la utilización de cepas deficientes en proteasas secretadas tales como OmpT y Proteasa III (Baneyx and Georgiou, 1992).

Los resultados del ELISA mostraron que el Fab quimérico recombinante tiene afinidad por la toxina Cn2, lo cual indica que se expresa bien plegado y activo en *E. coli* (Tabla 2). El cambio de las regiones constantes murinas por humanas aparentemente no representó ningún cambio importante en la conformación de las regiones variables que pudieran afectar el reconocimiento y unión a la toxina Cn2. Sin embargo, en el futuro se va a determinar la afinidad del Fab quimérico puro en comparación con la del Fab de BCF2 por la toxina Cn2. Por otra parte, el dato del ELISA para el medio del cultivo condicionado coincide con el observado en el Western el cual indica cierta salida del Fab del espacio periplásmico al medio de cultivo. Los datos en el ELISA también muestran que existe una expresión basal en las células no inducidas pero transformadas con el fagemido recombinante.

Se hizo una aproximación del rendimiento de la expresión del Fab quimérico a partir de la comparación de los datos de un ELISA en el que se aplicaron concentraciones conocidas de BCF2. La comparación de los datos se hizo tomando en cuenta que el anticuerpo acoplado a peroxidasa reconoce dos veces más de cadenas ligeras para el anticuerpo completo (BCF2) que para el Fab quimérico. El rendimiento aproximado de la expresión fue de 50 µg/litro de cultivo lo cual resulta ser muy bajo si comparamos con rendimientos reportados de la expresión de fragmentos Fab hasta de 700 mg/l (Rodríguez et al, 1992) y 2 g/l (Carter et al, 1992) por lo cual resulta necesario optimizar las condiciones de expresión para lograr el máximo rendimiento. En general, el factor limitante de la expresión heteróloga en *E. coli* es el plegamiento *in vivo*, aún más que la síntesis misma del polipéptido (Wall and Plückthun, 1995). Algunas de las condiciones para optimizar el plegamiento del Fab quimérico en el periplasma consiste en mantener el crecimiento del cultivo a una temperatura no mayor de 30°C (Georgiou and Valax, 1996), así como adicionar al medio de cultivo carbohidratos no metabolizables como la sacarosa (Georgiou and Valax, 1996). Se ha observado que los compuestos hidroxilados aumentan la estabilidad termodinámica de proteínas *in vitro* por un mecanismo conocido como hidratación preferencial (Lee and Timasheff, 1981 ; Arakawa and Timasheff, 1981). La sacarosa y otros

carbohidratos no metabolizables se difunden libremente al espacio periplásmico pero no son transportados a través de la membrana interna por lo que no ejercen una influencia directa sobre las proteínas citoplásmicas (Georgiou and Valax, 1996). Se ha visto que la adición de sacarosa al medio de cultivo inhibe la formación de agregados así como de cuerpos de inclusión en el espacio periplásmico, favoreciendo así el plegamiento correcto de la proteína (Parsell and Sauer, 1989). Por otra parte, para disminuir el fenómeno de degradación, sería interesante probar condiciones de pH ácidas durante el crecimiento del cultivo ya que se ha observado que a pH bajos ($5.5 \leq \text{pH} \leq 6.0$) disminuye la actividad proteolítica en el periplasma durante la expresión de la proteína de fusión proteína A- β -lactamasa en *E.coli* (Decad and Nikaido, 1976 ; Baneyx et al, 1991). También podría examinarse la expresión del Fab en una cepa deficiente en proteasas asociadas a la envoltura celular tales como OmpT y la Proteasa III (Baneyx and Georgiou, 1992). Las condiciones mencionadas podrían probarse de manera independiente o en conjunto dependiendo de los resultados obtenidos.

Conclusiones.

- El presente trabajo representa un antecedente de la utilización del sistema de Pasteur-Merieux para la construcción de un banco de variantes de fragmentos Fab basados en el anticuerpo BCF2. En este trabajo se corroboró que mediante este sistema es posible generar el vector recombinante específico, sin embargo, se observaron vectores de un peso distinto al esperado tanto después de la infección y del choque térmico que induce la recombinación específica, como después de que se rescataron y amplificaron los fagemidos recombinantes en la cepa XLBlue. Este tipo de eventos hacen del sistema poco eficiente para la construcción de bancos ya que favorecen la pérdida de variantes. Antes de un posible empleo de los vectores pM849/pM846 del Sistema Pasteur Merieux para la generación de un banco, resulta importante optimizar las condiciones de infección y recombinación, determinar la identidad y origen de la banda observada de 6.5 kb así como elucidar si la observación de deleciones durante la producción y reamplificación de fagos recombinantes es un fenómeno que se presenta solamente en la cepa XLBlue o es una característica inherente del vector.
- A través de este trabajo se obtuvo de manera soluble el Fab quimérico humano-murino de un anticuerpo capaz de neutralizar el veneno del alacrán *C. noxius* Hoffmann. El Fab quimérico se obtuvo a partir de la fracción periplásmica de células TOPP2 de *E. coli*. Se prefirió el empleo del protocolo II para inducir la expresión. Se sugiere que para obtener un Fab recombinante de mejor calidad, la extracción de fracción periplásmica no debe hacerse después de 18 horas que se agregó el inductor. Para incrementar el rendimiento de la expresión sería interesante examinar el efecto que sobre el plegamiento del Fab tiene la adición de carbohidratos no metabolizables como la sacarosa al medio de cultivo, así como el crecimiento del cultivo a un pH ácido (5.5-6.0). Por otra parte considero necesaria la optimización de la preparación de fracción periplásmica de modo que se asegure la obtención de solo el contenido periplásmico. También podría examinarse el empleo de inhibidores de proteasas durante la preparación de fracción periplásmica con el objeto de obtener un Fab intacto. Finalmente, para obtener grandes cantidades de proteína recombinante que permitiera su purificación con el propósito de llevar a cabo ensayos biológicos así como pruebas de cristalización, considero necesario el establecimiento de las condiciones apropiadas para su producción en fermentadores. El Fab quimérico obtenido fue capaz de reconocer y unirse a la toxina Cn2. La expresión funcional del Fab quimérico de un anticuerpo capaz de neutralizar el veneno del alacrán *C. noxius* Hoffmann representa un antecedente importante en la obtención

de antisueros humanizados que pudieran ser producidos en *E. coli* a la vez que marca una ruta hacia la obtención de cantidades suficientes de Fab que pueda ser utilizado para su purificación y cristalización que permitan eventualmente determinar su estructura tridimensional.

Perspectivas.

- Sistema de despliegue en fagos de Pasteur-Merieux.
Ensayar otras condiciones de temperatura y tiempo de tratamiento para alcanzar altos porcentajes de infección y de supervivencia al choque térmico durante el proceso de recombinación. Probar el efecto de crecer el cultivo en medio mínimo para favorecer la formación del vector recombinante específico. Amplificar fagos recombinantes en D1210 para probar si aparecen vectores con deleciones como los observados con la utilización de la cepa XL1Blue.
- Optimizar las condiciones de expresión para obtener el mejor rendimiento, así como escalar la expresión a volúmenes de cultivo mayores que permitan la obtención de grandes cantidades.
- Estudiar si con el método empleado para la preparación de fracción periplásmica sucede lisis celular que libera proteasas intracelulares que degradan al Fab quimérico. Si este es el caso, optimizar el protocolo de preparación de fracciones periplásmicas que resulte en la extracción de sólo el contenido periplásmico.
- Purificación del Fab quimérico y pruebas de cristalización.
- Realizar ensayos biológicos con el Fab quimérico puro y comparar los resultados con aquellos obtenidos con el Fab de BCF2.

de antisueros humanizados que pudieran ser producidos en *E. coli* a la vez que marca una ruta hacia la obtención de cantidades suficientes de Fab que pueda ser utilizado para su purificación y cristalización que permitan eventualmente determinar su estructura tridimensional.

Perspectivas.

- Sistema de despliegue en fagos de Pasteur-Merieux.
Ensayar otras condiciones de temperatura y tiempo de tratamiento para alcanzar altos porcentajes de infección y de supervivencia al choque térmico durante el proceso de recombinación. Probar el efecto de crecer el cultivo en medio mínimo para favorecer la formación del vector recombinante específico. Amplificar fagos recombinantes en D1210 para probar si aparecen vectores con deleciones como los observados con la utilización de la cepa XL1Blue.
- Optimizar las condiciones de expresión para obtener el mejor rendimiento, así como escalar la expresión a volúmenes de cultivo mayores que permitan la obtención de grandes cantidades.
- Estudiar si con el método empleado para la preparación de fracción periplásmica sucede lisis celular que libera proteasas intracelulares que degradan al Fab quimérico. Si este es el caso, optimizar el protocolo de preparación de fracciones periplásmicas que resulte en la extracción de sólo el contenido periplásmico.
- Purificación del Fab quimérico y pruebas de cristalización.
- Realizar ensayos biológicos con el Fab quimérico puro y comparar los resultados con aquellos obtenidos con el Fab de BCF2.

Referencias

- Alagón-Cano, A. and González-Juárez, C. 1998. Foro Silanes. Atención a la salud en México. Año 2.(4): 8-9.
- Amann, E.J. ; Brosius, J. and Ptashne, M. 1983. *Gene*. 25. 167.
- Anba, J.; Bernadac, A.; Lazdunski, C. and Pages, J.M. 1988. *Biochimie*. 70 :1830-1833.
- Anthony, J.; Near, R.; Wong, S.L., et al.1992. *Mol. Immunol.* 29:1237-1247.
- Arakawa, T. and Timasheff, S.N. 1981. *Biochemistry*. 21 :6536-6544.
- Aujame, L.; F. Geoffroy, F. and odoyer, R. 1997. *Human Antibodies*. 8(4):15-168.
- Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, R.E.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. 1992. *A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. John Willey and Sons. USA.
- Balozet, L. 1971. Scorpionism in the old world. *In: Venomous Animals and their venoms*. (Bucherl, W. and Buckley, E.E. (eds.) (3):349-371. Academic Press. N.Y. USA.
- Baneyx, F. and Georgiou, G. 1989. *Enzyme Microb Technol* 11 :559-567.
- Baneyx, F. and Georgiou, G. 1992. *Ann N Y Acad Sci*. 13(665):301-8.
- Baneyx, F. and Georgiou, G. 1992. *In : Stability of Protein Pharmaceuticals*. Chemical an Physical Pathways of protein Degradation. Plenum, N.Y.
- Baneyx, F.; Ayling, A.; Palumbo, T; Thomas, D. and Georgiou, G. 1991. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 :14-20.
- Becerril, B.; Vázquez, A.; García, C.; Corona, M.; Bolívar, F. and Possani, L.D. 1993. *Gene*. 128:165-171.
- Bei, R.; Scholm, J. and Kashmiri, S.V. 1995. *J. Immunol. Methods*. 186, 245.
- Berry, M.J.; Davies, J. J. *Chromatogr.* 1992; 597:239-245.
- Better, M.; Chang, C.P.; Robinson, R.R. and Horwitz, A.H. 1988. *Science* 40, 1041.
- Bird, R.E.; Hardman, K.D. and Jacobson, J.W. et al 1988. *Science* 242, 423.
- Bon, C. *In: Envenomings and their Treatments*. eds. C. Bon and M. Goyffon. 1996. Fondation Marcel Merieux, Lyon. pp 3-12
- Boulianne, G.L.; Hozumi, N. and Schulman, M.J.1984. *Nature* 312, 643.
- Buchner, E. and Rudolph, R. 1991. *BioTechnology* 9:157-162.
- Calderon-Aranda, E.S., Hozbor, D. and Possani, L.-D. 1993. *Toxicon*. 31(3):327-337.
- Calderon-Aranda, E.S.; Selisko, B.;York, E.J.;Gurrola, G.B.; Stewart, J.M. and Possani, L.D. *Eur. J Biochem.* 1999; in press.
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. and Maelicke, A. 1982. *Nature* 296. 90-91.
- Carter, P.;Kelley, R.F.; Rodrigues, M.L. et al 1992. *Biotechnology*. 10,163.
- Cartledge, C., Maclean, C. and Landon, J. 1992. *J. Immunoass.* 13, 339-352.
- Caterall, W.A. 1977. *J. Biol. Chem.* 252, 8669-8676.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Condra, J.H.; Sardana, V.V.; Tomassini, J.E.; Schlabach, A.J.; Davies, M.E.; Lineberger, D.W. Graham, D.J.; Gotlib, L. and Colonno, R.J. 1990. *J. Biol. Chem.* 265:2292-2295.
- Daniels, D.L.; Schroeder, J.L.; Szybalski, W.; Sanger, F.; Coulson, A.R.; Hong, G.F.; Hill, D.F.; Petersen G.B. and Blattner, F.R. 1983. *In: Lambda II.* Eds. Hendrix, R.W.; Roberts, J.W.; Stahl, F.W. and Weisberg, R.A. pp 519-676. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y. USA.
- Dart, R.C. and Horowitz, R.S. *In: Envenomings and their Treatments.* Eds. C. Bon and M. Goyffon. 1996. Fondation Marcel Merieux, Lyon. pp 3-12
- Dart, R.C. and Horowitz, R.S. *In: Envenomings and their Treatments* Eds. C.Bon and M. Goyffon. 1996. Fondation Marcel Merieux, Lyon. pp 83-94.
- Davis, G.T.; Bedzyk, W.D.; Voss, E.W. and Jacobs, T.W. 1991. *BioTechnology* 9,165.
- de Boer, H.A. ; Comstock, L.J. and Vasser, M. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 21.
- DeBin, J.A., Maggio, J.F. and Strichartz, G.R. 1993. *American J. Physiol.* 264, C361-C369.
- Decad, G.M. and Nikaïdo, H. 1976. *J. Bacteriol.* 128 :325-336.
- Dehesa-Dávila, M. 1989. Epidemiological characteristic of scorpion sting in Leon, Guanajuato, Mexico. *Toxicon.* 27, 281-286.
- Dehesa-Dávila, M. and Possani, L.D. 1994. *Toxicon.* 32(9), 1015-1018
- Dehesa-Dávila, M.; Ramírez, A.N.; Zamudio, F.; Gurrola-Briones, G.; Liévano, A.; Darszon, A. and Possani, L.D. 1996. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B(2): 331-339.
- Dent, M.A.R., Possani, L.D., Ramírez, G.A. and Fletcher, P.L. Jr. 1980. *Toxicon.* 18:343-350.
- Derman, A.I.; Prinz, W.A.; Belin, D and Beckwith, J. 1993. *Science.* 262 :1744-1747.
- Dorai, H.; McCartney, J.E.; Hudziak, R.M. et al 1994. *BioTechnology* 12, 890.
- Emery, S.C. and Harris, W.J. 1995. *In : Antibody Engineering.*(Borrebaeck,C.A.K. Eds) pp 159-183. Oxford University Press. USA.
- Ferenci, T. and Silhavy, T.J. 1987. *J. Bacteriol.* 169, 5339.
- Forsberg, G.; Forsgren, M.; Jaki, M.; Norin, M.; Stersky, C.; Enhorning, A.; Larsson, K.; Ericsson, M. and Bjork, P. 1997. *J. Biol. Chem.* 272(9) :12430-12436.
- Garcia, C.; Becerril, B.; Selisko, B.; Delepierre, M.; Possani, L.D. 1997. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* Mar;116(3):315-22.
- Gentz, R.; Kuys, Y.; Zwiëb, C.; Taatjes, D.; Taatjes, H.; Bannwarth, W.; Stueber, D. and Ibrahimi, I. 1988. *J. Bacteriol.* 170 :2212-2220.
- Geoffroy, F.; Sodoyer, R. and Aujame, L. 1994. *Gene* 151, 109-113.
- Gerogiou, G. and Valax, P. 1996. *Current Opinion in Biotechnology.* 7(2) :190-197.
- Glockshuber, R.; Malia, M.; Pfitzinger, I. and Pluckthun, A. 1990. *Biochemistry* 29, 1362.
- Glockshuber, R.; Schmidt, T. and Pluckthun, A. 1992. *Biöchemistry* 31:1270-9

- Gold, L.; Pribnow, D.; Schneider, T.; Shinedling, D.; Singer, B.S. and Stormo, G. 1981. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 365.
- Gordon, D. 1997. In *Toxins and Signal Transduction* (Gutman, Y. And Lazarowici, P. Eds.) pp 119-149. Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- Hasan, N. and Szybalski, W. 1987. *Gene* 56, 145-151.
- Hoffmann, C. 1938. Nuevas consideraciones acerca de los alacranes en México. *An. Inst. Biol.* 9,317.
- Hoogenboom, H.R.; Raus, J.C.M. and Volckaert, G. 1990. *The Journal of Immunology.* Vol. 144. No. 8. 3211-3217.
- Horn, U. ; Strittmatter, W. ; Krebber, A. ; Knupfer, U. ; Kujau, M. ; Wenderoth, R. ; Muller, K. ; Matzku, S. ; Pluckyhun A. and Riesenber, D. 1996. *Appl Microbiol Biotechnol* 46 :524-532.
- Horwitz, A.H.; Chang, C.P.; Better, M., Hellstron, K.E. and Robinson, R.R. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8678.
- Hurlle, M.R. and Gross M. 1994. *Current Opinion in Biotechnology.* 5:428-433.
- Huston, J.S.; George, A.J.T.; Tai, M-S.; McCartney, J.E.; Jin, D.; Segal, D.M.; Keck, P. and Oppermann, H. 1995. In: Borrebaeck, C. (Ed.) *Antibody Engineering.* 2nd Ed. Oxford University Press. Oxford. P 185.
- Huston, J.S.; Levinson, D.; Mudgett-Hunter, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988; 85:5879-5883.
- Jones, P.T.; Dear, P.H.; Foote, J.; Neuberger, M.S. and Winter, G. 1986. *Nature* 321, 522.
- Jost, C.R.; Kurucz, I.; Jacobus, C.M.; Titus, J.A.; George, A.J.T. and Segal, D.M. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 26267.
- Jurkovich, G.J., Luterman, A., McCullar, K., Ramenofsky, M.L. and Curreri, P.W. 1988. *J. Trauma.* 28, 1032-1036.
- Jung, S. and Plückthun, A. 1997 *Protein Engng,* 10, 959-966.
- King, D.J.; Byron, O.D.; Mountain, A. et al. 1993. *J Biochem.* 290, 723.
- Kipriyanov, S.M.; Moldenhauer, G. and Little, M. 1997. *J Immunol Methods.* 200, 69.
- Knappik, A. and Pluckthun, A. 1995. *Protein Eng.* 8,81.
- Landon, J., Chardon, T. and Coxon, R.D. 1995. An Introduction to the clinical applications of antibodies. In: Landon, J. and Chardon, T. eds. *Therapeutic Antibodies,* N.Y. Springer-Verlag, pp 1-32.
- Lazarowici, P. and Zlotkin, E. 1982. *Comp. Biochem. Physiol.* 71:177-181
- Lazdunski, A.M. 1989. *FEMS Microbiol Rev.* 63:265-276.
- Lee, J.C. and Timasheff, S.N. 1981. *J. Biol. Chem.* 256 :7193-7201.
- Lei, S.P.; Lin, H.C.; Wang, S.S; Callaway, L. and Wilcox, G. 1987. *J. Bacteriol.* 169, 4379.
- Licea, A.; Becerril, B. and Possani, L.D. 1996. *Toxicon.* Vol. 34. No. 88 pp 843-847.
- Luckow, V.A. and Summers, M.D. 1988. *Virology.* 170, 31.
- Makrides, S. 1996. *Microbiol Reviews* 60(3):512-538.

- Maiasit, P., Warrell, D.A., Chanthavanich, P., Viravan, C., Mongkolsapaya, J., Singthong, B. and Supich, C. 1986. *Br. Med. J.* 292, 17.20.
- Master, R.W.S.; Rao, S. And Soman, P.D. 1963. *Biochem. Biophys. Acta.* 71:422-428
- McCafferty, J. and Johnson, K.S. 1996. *In*: Kay, B.K.; Winter, J. and McCafferty, J. (eds) "Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual." Academic Press. USA.
- McCafferty, J.; Griffiths, A.D.; Winter, G. and Chiswell, D.J. 1990. *Nature* 348, 552.
- Monroy-Velasco, J. (1961) Alacranes Venenosos de México. El suero anticalacrán, su titulación y dosificación. *Revta. Mex. Cienc. Méd. Biol.* 6,41-46.
- Morrison, S.L.; Johnson, M.J.; Herzenberg, L.A. and Oi, V.T. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 6851.
- Neuberger, M.S.; Williams, G.T.; Mitchell, E.B.; Jouhal, S.S.; Flanagan, J.G. and Rabbits, T.H. 1985. *Nature* 314, 268.
- Nicholls, P.J.; Johnson, V.G.; Andrew, S.M.; Hoogenboom, H.R.; Raus, J.C. and Youle, R.J. 1993. *J. Biol. Chem.* 268, 5302.
- Nossal, N.G. and L.A. Heppel. 1966. *J. Biol. Chem.* 241:3055-3062
- Otsuji, E.; Yamaguchi, T.; Matsumura, H.; Yamamoto, K.; Tsuruta, H.; Yata, Y.; Nishi, H.; Okamoto, K.; Kitamura, K. And Takahashi, T. 1996. *Br. J. Cancer* 74(4):597-602.
- Parsell, D.A. and Sauer, R.T. 1989. *J. Biol. Chem.* 264 :7590-7595.
- Pintar, A.; Possani, L. and Delepierre, M. 1999. *J. Mol Biol.* 287, 359-367.
- Possani, L.D. 1984. Structure of scorpion toxins. *In*: Handbook of Natural Toxins. (Ed. Tu, A.T.) Marcel Dekker. N.Y., USA. (2):513-550.
- Possani, L.D.; Dent, M.A.R.; Martin, B.M. and Maelicke, A. 1981. *Carlsberg Res. Commun.* Vol.46 , 207-214, 1981.
- Possani, L.D.; Fletcher, Jr. P.L.; Alagón, A.B.C.; Alagón, A.C. and Juliá, J.Z. 1980. *Toxicon* 18:175-183.
- Proba, K.; Ge, L. and Pluckthun, A. 1995. *Gene.* 159 :203-7.
- Reverter, J.C.; Beguin, S.; Kessels, H.; Kumar, R.; Hemker, H.C. and Collier, B.S. 1996. *J Clin Invest* 98(3):863-74.
- Ridder, R.; Schmitz, R.; Legay, F. and Gram, H. 1995. *Biotechnology* 13, 255.
- Riechmann, L.; Clark, M.; Waldman, H. And Winter, G. 1988. *Nature.* 332:323-327.
- Rodrigues, M.L.;Shalaby, M.R.; Werther, W.; Presta, L. and Carter, P. 1992. *Int. J. Cancer Suppl.* 7,45.
- Sadler, J.R.; Tecklenburg, M and Betz, J.L. 1980 *Gene* 279-300.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Schermann, J-M. 1994. *Clinical Toxicology* 32 (4), 363-375.
- Selisko B, Garcia C, Becerril B, Delepierre M, Possani LD. 1996. *Eur J Biochem.* Dec 1:242(2):235-42.

- Selisko B, Licea AF, Becerril B, Zamudio F, Possani LD and Horjales E. 1999. *Proteins* Oct 1:37(1):130-143.
- Shibui, Y.; Munakata, K.; Matsumoto, R.; Ohta, K.; Matsushima, R.; Morimoto, Y. And Nagahari, K. 1993. *Appl. Microbiol Biotechnology* 38 :770-775.
- Skerra, A. and Pluckthun, A. 1988. *Science* 240, 1038.
- Skerra, A. 1994. *Gene* 141, 79.
- Sodoyer, R.; Aujame, L.; Geoffroy, F.; Pion, C.; Peubez, I.; Montégue, B.; Jacquemot, P. and Dubayle. J. In: *Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual*. Eds. Kay, B.; Winter, J. and McCafferty, J. 1996. Academic Press. USA. pp 215-226.
- Sodoyer, R. et al 1997. *Hum Antib* 8(1) :37-42.
- Sullivan, J.B., Jr. (1987). *Ann. Emergency Med.* 16, 938-944.
- Sullivan, J.B., Jr. and Russell, F.E. 1982. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 25, 185–189.
- Suominen, I.; Karp. M.; Lahde, M.; Kopio, A.; Glumoff, T.; Meyer, P. and Mantsala, P. 1987. *Gene* 61, 165.
- Tu, A.T. 1977. *Scorpion Venoms. In: Venoms.Chemistry and Molecular Biology*. A.T. Tu (Ed.) John Wiley and Sons. N.Y. pp 459-483.
- Valdivia, H.H. and Possani, L.D. 1998. *Trends in Cardiovascular Medicine* 8, 111-118.
- Valdivia, H.H.; Martin, B.M.; Ramírez, A.N.; Fletcher, P.L. and Possani, L.D. 1994. *J. Biochem.* 116:13893-1391.
- Vázquez, A.; Becerril, B.; Martin, B.M.; Zamudio, F.; Bolívar, F. and Possani, L.D. 1993. *FEBS.* 320(1):43-46.
- Verma, R.; Boleti, E. and George, A.J.T. 1998. *J Immunol Methods* 216:165-181.
- Wall and Pluckyhun. 1999. *Protein Eng* 12(7) :605-11
- Wall and Pluckyhun. 1995. *Curr Opin Biotechnol* 1995. 6(5) :507-516.
- Ward, E.S.; Gussow, D.; Griffiths, A.D.; Jones, P.T ;Winter, G. 1989. *Nature.* 341, 544.
- Weir, R.C. and Porter, R.R. 1966. *Biochem. J.* 100, 53-58.
- Whitelam, G.C.; Cockburn, W.; Owen, M.R.1994. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 940.
- Wood, C.; Boss, M.A.; Kenten, J.H.; Calvert, J.E.; Roberts, N. A; and Emtage, J.S: 1985. *Nature* 314, 446.
- York, E.J.; Stewart, J.M.; Calderon-Aranda E.S. and Possani, L.D. 14th American Peptide Society Meeting, 1995. Columbus OH. Poster P726.
- Zamudio, F.; Saavedra, R.; Martin, B.; Gurrola-Briones, G.; Héron, P. and Possani, L.D. 1992. *Eur. J. Biochem.* 204, 281-292.
- Zlotkin, E.; Miranda, F. and Rochat, H. 1978. *Chemistry and Pharmacology of Buthidae scorpion venoms. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Arthropod Venoms.* Bettini, S. (Ed.) Springer-Verlag. Berlin. pp 317-369.