

Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de  
México



Departamento de Medicina Molecular y  
Bioprocesos

Producción de un fragmento de anticuerpo  
recombinante quimérico anti esfingomielinasa D  
contra la mordedura de la araña *Loxosceles*

T E S I S

QUE PARA TENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS PRESENTA:  
CLAUDIA LIZBETH MOCTEZUMA GONZÁLEZ

Director de tesis: Dr. Alejandro Alagón Cano  
Co-tutor: M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez

Cuernavaca, Morelos 2008



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.

## Agradecimientos

Al Dr. Alejandro Alagón y al M. en C. Alejandro Olvera por su confianza en mí y apoyo durante cada momento del desarrollo del proyecto. Gracias por su amistad.

A mis tutores el Dr. Baltazar Becerril y al Dr. Jorge Paniagua por sus comentarios y sugerencias.

A mis compañeros de laboratorio de quienes siempre recibí ayuda, atención y amistad (Hilda, Ari, Gaby, Felipe, Héctor C., Ale, Francia, Laura, Martha, Héctor G., Angélica, Melissa, Herli, Sra. Leo y Ricardo).

A mi papá y mamá quienes siempre han estado a mi lado apoyándome en cada nuevo proyecto.

A Toño, quien me ha acompañado, apoyado y brindado el amor que me mantiene esforzándome más cada día.

# Índice

## Resumen

<b>Introducción</b>	1
I. <i>Loxosceles</i> y loxoscelismo	1
Generalidades	1
<i>Loxosceles</i>	2
Distribución geográfica	3
Veneno	3
Loxoscelismo	4
Loxoscelismo cutáneo	4
Loxoscelismo sistémico	4
Diagnóstico	5
Tratamiento	5
II. Anticuerpos	6
Descripción general	6
Anticuerpos monoclonales	8
Anticuerpos recombinantes	9
III. Terapias recombinantes	10
Importancia clínica	10
IV. Sistemas de expresión	12
Bacterias	13
Levaduras	14
Células de mamífero	15
Células de insecto	15
Plantas	15
V. Antecedentes	16
<b>Justificación</b>	18
<b>Hipótesis</b>	18
<b>Objetivos</b>	19
General	19

---

---

Particulares	19
<b>Materiales y métodos</b>	20
I. Generación y caracterización de los fragmentos Fab murinos	21
Cultivo del hibridoma 5C10	21
Producción del AcM 5C10 en líquido ascítico	21
Purificación del AcM 5C10	21
Análisis de proteínas por SDS-PAGE	21
Digestión con papaína del AcM 5C10	21
Purificación de los fragmentos Fab	22
Ensayo Inmunoabsorbente conjugado a enzimas (ELISA)	22
Inhibición enzimática <i>in vitro</i>	23
Ensayos de neutralización de la letalidad	24
II. Generación y caracterización de los fragmentos Fab quiméricos	24
Kits	24
Oligonucleótidos (oligos)	24
Extracción de RNA	25
Electroforesis de material genético	25
Obtención de DNA complementario (cDNA)	25
Amplificación Rápida de los extremos de cDNA (RACE)	25
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
Clonación y secuenciación de las regiones variables del AcM 5C10	28
Subclonación de las regiones variables en el vector pSyn1	28
Expresión del Fab quimérico	29
Purificación del Fab quimérico	29
<b>Resultados y discusión</b>	30
I. Generación y caracterización de los fragmentos Fab murinos	30
Digestión del AcM 5C10 y purificación de los fragmentos Fab	30
Inmunoensayos por ELISA	33
Ensayos de inhibición enzimática <i>in vitro</i>	33
Ensayos de neutralización de la letalidad	34
II. Generación y caracterización de los fragmentos Fab quiméricos	35
Amplificación de segmentos de DNA codificantes para el Fab del	

---

AcM 5C10	35
Obtención de la secuencia de las regiones variables del AcM 5C10	36
Ensamblaje del vector de expresión	38
Expresión del fragmento Fab quimérico 5C10	40
<b>Conclusiones</b>	45
<b>Perspectivas</b>	45
<b>Bibliografía</b>	46
<b>Apéndice A</b>	49
<b>Apéndice B</b>	52

## Índice de figuras

Figura 1	1
Figura 2	3
Figura 3	4
Figura 4	6
Figura 5	7
Figura 6	8
Figura 7	10
Figura 8	12
Figura 9	13
Figura 10	16
Figura 11	17
Figura 12	17
Figura 13	23
Figura 14	27
Figura 15	28
Figura 16	30
Figura 17	31
Figura 18	31

---

Figura 19	32
Figura 20	32
Figura 21	33
Figura 22	33
Figura 23	34
Figura 24	35
Figura 25	36
Figura 26	38
Figura 27	38
Figura 28	40
Figura 29	40
Figura 30	41
Figura 31	42
Figura 32	42
Figura 33	43
Figura 34	44

## **Índice de tablas**

Tabla 1	4
Tabla 2	10
Tabla 3	11
Tabla 4	11
Tabla 5	16
Tabla 6	24

---

## Resumen

De las 38,000 especies de arañas descritas, la OMS considera sólo 4 géneros de importancia médica por las manifestaciones clínicas y letalidad de sus venenos: *Latrodectus*, *Loxosceles*, *Phoneutria*, y *Atrax*. Las arañas del género *Loxosceles*, conocidas como violinistas, son cosmopolitas, sin embargo aproximadamente el 85% de las especies se encuentran en el continente americano.

Los efectos del veneno de esta araña, dependen exclusivamente de la actividad de la esfingomielinasa D (SMD). Por esta razón y como parte de la investigación sobre la SMD, se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra las necrotoxinas recombinantes de varias especies de *Loxosceles*. Uno de estos anticuerpos, el 5C10, además de reconocer tanto a la toxina de *L. reclusa* (Oklahoma) como a la de *L. boneti* (Morelos) inhibe la actividad de ambas toxinas.

Por lo anterior, se propuso la generación de un fragmento Fab quimérico recombinante, derivado del anticuerpo monoclonal 5C10, para que posteriormente pudiera ser evaluado como una herramienta terapéutica.

La estrategia consistió en amplificar por PCR las secuencias variables del AcM a partir de RNA total obtenido del hibridoma correspondiente. Posteriormente dichos fragmentos fueron subclonados en el vector de expresión, pSyn1, el cual contenía los segmentos de las regiones constantes de un Fab humano. El vector fue diseñado para generar un RNA bi-cistrónico y enviar a ambas cadenas al espacio periplásmico de la bacteria, el cual presenta un ambiente favorable para la generación de los puentes disulfuro que une a la cadena pesada con la ligera. Además, en el extremo carboxilo de la cadena pesada se agregó una cola de histidinas que facilitó la purificación de la proteína recombinante.

Las características de reconocimiento y neutralizantes del Fab quimérico fueron comparadas con el Fab murino, generado y purificado a partir del anticuerpo monoclonal 5C10.

Tanto el anticuerpo monoclonal completo como el Fab reconocen a las toxinas de *L. reclusa* y *L. boneti in vitro*, además de prevenir eficientemente la muerte en ratones debido a la acción de las necrotoxinas. Por otro lado el Fab quimérico perdió la capacidad de reconocer e inhibir la actividad enzimática de dichas necrotoxinas.

---



# Producción de un fragmento de anticuerpo recombinante quimérico anti esfingomielinasa D contra la mordedura de la araña *Loxosceles*

## Introducción

### I. *Loxosceles* y loxoscelismo

#### Generalidades

Los arácnidos son animales ancestrales; los primeros fósiles de arácnidos se remontan al período devónico, hace aproximadamente cuatrocientos millones de años<sup>(27)</sup>. Las arañas pertenecen al phylum *Arthropoda*, subphylum *Chelicerata*, clase *Arachnida*, orden *Araneae*. Según la posición de sus quelíceros y ganchos inoculadores pueden clasificarse en dos grupos: *Orthognatha* o *Migalomorphos* (arañas primitivas o verdaderas) y *Labidognata* al cual pertenecen las tarántulas.

Los arácnidos son animales invertebrados, que presentan un exoesqueleto rico en quitina. El cuerpo de las arañas (Fig. 1) se encuentra formado por dos segmentos, el prosoma o cefalotórax y el opisoma o abdomen, los cuales se encuentran unidos por un delgado pedicelo. El cefalotórax corresponde a la parte frontal del cuerpo, en donde se localizan los ojos, normalmente situados en pares de tres a cuatro. También se encuentran los pedipalpos, extensiones que utiliza la araña para manipular a su presa. Los pedipalpos presentan estructuras con sensibilidad química teniendo una función equivalente al órgano del gusto.<sup>(14,18,28)</sup>

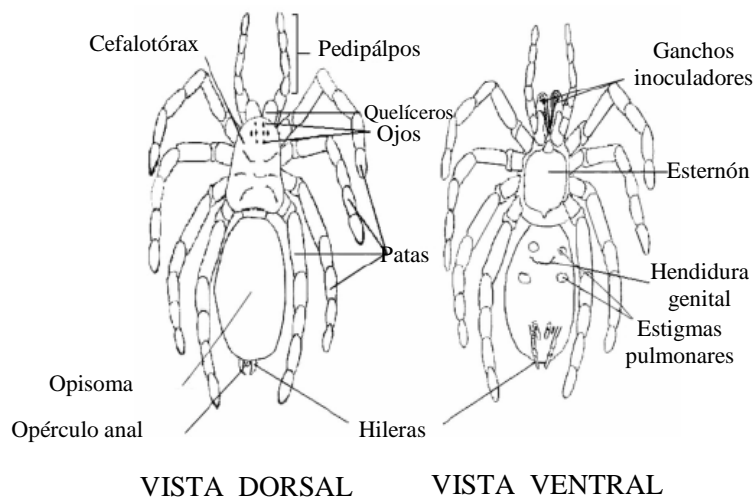


Figura 1. Morfología externa de una araña en la cual se pueden apreciar los dos segmentos principales que forman su cuerpo y algunos rasgos morfológicos característicos<sup>(32)</sup>.

Los quelíceros se localizan entre los pedipalpos y son utilizados para inyectar el veneno que se encuentra en las glándulas situadas en su base. Otras funciones de los quelíceros es ayudar a la araña a excavar su madriguera o para mover su oteca (saco de huevos).

Una de las características de los arácnidos son sus ocho patas que se encuentran unidas al cefalotórax. Las patas pueden poseer diferentes estructuras, como los órganos sensoriales, los dispositivos que permitan la emisión de sonidos o incluso los sistemas relacionados con el manejo de la seda o hilo que constituye la tela de araña.

El opisoma generalmente es liso; en él se encuentran los estigmas pulmonares, la hendidura genital, los órganos reproductores, las hileras por donde sale la seda y posteriores a éstas, el ano<sup>(14,18,27)</sup>.

Se han descrito aproximadamente 38,000 especies de arañas en todo el mundo<sup>(22)</sup>. La mayoría de las especies son inofensivas para los humanos, sin embargo existen algunas cuya mordedura puede ser de peligro considerable. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera cuatro géneros de arañas de verdadero interés médico por las manifestaciones clínicas y la letalidad de sus venenos; uno de ellos pertenece al género de interés médico, *Atrax*, pertenece al infraorden *Mygalomorphae*, familia *Hexathelidae*. Ésta se encuentra en Australia, Nueva Guinea y las islas Salomón. Los tres géneros restantes pertenecen al infraorden *Araneomorphae*: *Phoneutria*, familia *Ctenidae*; *Latrodectus*, familia *Theridiidae*; y *Loxosceles*, familia *Sicariidae*. *Phoneutria*, se distribuye en Brasil y desde Costa Rica hasta Bolivia. *Loxosceles* y *Latrodectus* son arañas cosmopolitas<sup>(32)</sup>.

### *Loxosceles*

Este término proviene del griego *loxos*: curvas y *kelos*: patas<sup>(11)</sup>. Las arañas del género *Loxosceles* son pequeñas, miden entre 1 y 4 cm de longitud, son de color marrón aunque la tonalidad puede variar dependiendo de la especie y el estadio de desarrollo, poseen en el dorso del cefalotórax una marca en forma de violín el cual es distintivo de este género por lo que se les conoce comúnmente como arañas violinistas (Fig. 2). También se le denomina araña café (brown spider) o café reclusa (brown recluse spider)<sup>(40)</sup>.

*Loxosceles* es una araña tímida, solitaria, sedentaria que desarrolla su actividad generalmente por la noche. Son de hábitos extra e intradomiciliarios. Suele encontrarse en lugares oscuros, en donde no hay mucho movimiento como debajo de las piedras, los hoyos y entre la corteza de los árboles. Dentro de las casas utiliza lugares como los guardarropas, detrás de los cuadros, los rincones oscuros, los muros divisorios y los entretechos. Esta araña no es agresiva y sólo muerde cuando se le molesta o se le presiona, por lo cual muchos accidentes ocurren cuando se encuentra escondida entre la ropa o los zapatos.



Figura 2. Fotografía de una araña *Loxosceles reclusa* en la cual se observa la forma de un violín en la parte superior del cefalotórax.

### Distribución geográfica

Las arañas del género *Loxosceles* son cosmopolitas, encontrándose en América 84 de las 100 especies descritas<sup>(31)</sup>. Encontrando 34 de estas en México.<sup>(31)</sup> En Estados Unidos, se ha reportado que *Loxosceles reclusa* es una de las especie más importantes a nivel clínico<sup>(32)</sup> aunque se encuentran otras especies como *L. deserta*, *L. arizonica* y *L. apachea*, que se distribuyen en la frontera sur de los Estados Unidos<sup>(20)</sup>. En México se han descrito 39 especies, un ejemplo es *L. boneti*. Los accidentes reportados predominan en la parte del oeste medio al sur del país, pero la araña se puede encontrar en todo el territorio.

### Veneno

Se ha reportado que el veneno de *Loxosceles* está constituido por diversos componentes protéicos, como la hialuronidasa, las proteasas, la colagenasa, las esterases, las fosfolipasas, la fosfatasa alcalina, la desoxiribonucleasa y la esfingomielinasa-D (SMD)<sup>(9,11,20,36,37)</sup>. Las variaciones en cuanto a la composición del veneno pueden asociarse a los diferentes métodos de obtención del mismo, los cuales pueden ser homogenado de glándulas, de cefalotórax o estimulación eléctrica<sup>(11)</sup>. A pesar de ello, se ha comprobado que el componente implicado en la actividad tóxica del veneno de *Loxosceles* es la SMD. Fernandes et. al., identificaron, purificaron y caracterizaron las toxinas del veneno de *L. intermedia* responsables de los efectos locales y sistémicos inducidos por el veneno completo. Dos proteínas fueron las responsables del cuadro de envenenamiento, ambas con actividad de SMD. Estas proteínas indujeron dermonecrosis en experimentos con animales y en cultivo presentaron a los eritrocitos humanos como susceptibles a lisis por el complemento<sup>(34)</sup>.

La SMD es una enzima con un peso molecular de 32-35 KDa que actúa cortando a la esfingomielina en 1-fosfoceramida y colina (Fig. 3). La esfingomielina es uno de los cuatro fosfolípidos predominantes en la membrana plasmática de muchas células eucarióticas. En la tabla 1 se presentan algunos ejemplos.

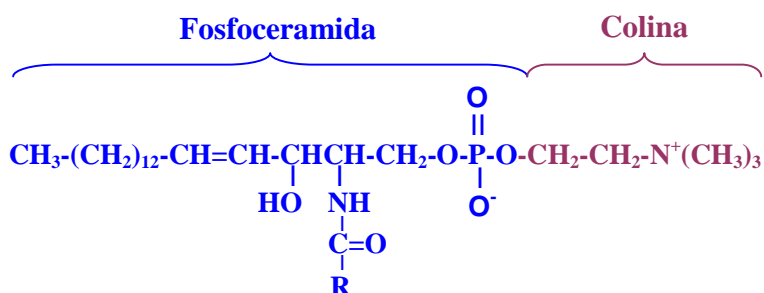


Figura 3. Estructura de la esfingomielina y productos liberados por corte de la SMD.

Tabla 1. Principales lípidos presentes en algunas membranas plasmáticas de eucariotes<sup>(2)</sup>

Lípidos	Porcentaje de lípidos totales por peso			
	Membrana plasmática del hígado	Membrana plasmática de eritrocitos	Mitocondria	Retículo endoplásmico
Colesterol	17	23	3	6
Fosfatidiletano-lamina	7	18	35	17
Fosfatidilserina	4	7	2	5
Fosfatidilcolina	24	17	39	40
Glicolípidos	19	18	0	5
Esfingomielina	7	3	Trazas	Trazas
Otros	22	13	21	27

### Loxoscelismo

La mordedura de esta araña puede causar un cuadro tóxico conocido como loxoscelismo, que puede presentarse en dos formas, cutáneo y viscerocutáneo o sistémico.

#### Loxoscelismo cutáneo <sup>(9,11,12,20,32,36)</sup>

Esta forma de loxoscelismo es la más común, y se presenta entre el 85-97% de los casos. Algunos de los síntomas más frecuentes son dolor, fiebre, prurito, edema y eritema, el cual puede evolucionar a una placa eritematosa y dar origen a la formación de una placa livedoide. La necrosis puede desarrollarse rápidamente en cuestión de horas o bien tardar varios días y formar la escara antes de 4-7 días. La ulceración sana lentamente dentro de 4-8 semanas, no obstante ocasionalmente puede demorar hasta 4 meses.

Aunque estas lesiones no conducen a la muerte, pueden ser muy dolorosas y el daño tisular puede requerir cirugía reconstructiva. Se ha visto que las lesiones más severas son en la piel sobre áreas con tejido graso abundante.

#### Loxoscelismo sistémico <sup>(9,11,20,32,36)</sup>

Sólo entre el 3% y 15% de los pacientes con loxoscelismo desarrollan síntomas sistémicos, los cuales pueden ser graves y llegar a provocar la muerte. Estas

reacciones no se correlacionan con la severidad de las manifestaciones cutáneas aunque siempre van asociadas a ellas.

Los síntomas usualmente inician dentro de las primeras 24 horas. Incluyen fiebre o febrículas, taquicardia, náuseas, vómitos, mialgias, artralgias, hemólisis, coagulación intravascular diseminada (CID), anemia aguda, ictericia, palidez, cianosis, hipotensión, hemoglobinuria, hematuria y compromiso de conciencia de grado variable, desde la obnubilación hasta el coma. Puede producir insuficiencia renal aguda y luego multiorgánica, cuadro que puede llevar a la muerte.

Hasta ahora no se sabe qué determina el que se desarrolle loxoscelismo cutáneo o sistémico. Se cree que la talla del paciente, la cantidad de veneno inoculado y la susceptibilidad individual contribuyen a la variabilidad de la lesión producida por la mordedura.

### Diagnóstico<sup>(36, 37)</sup>

Inicialmente la mordedura no presenta síntomas que la distingan de cualquier otra picadura de insecto o mordedura de una araña inofensiva, lo cual es una causa de tratamiento tardío del paciente. Cuando se presentan las reacciones que incomodan y preocupan al paciente éste se dirige al médico. La sintomatología puede confundirse con otras condiciones médicas, como síndrome de Steven-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, eritema nodoso, eritema multiforme, herpes simple o herpes zoster. No existen exámenes de laboratorio que confirmen el diagnóstico. En ciertos casos el paciente logra atrapar a la araña y en algunos lugares ésta puede identificarse y ayudar a definir el diagnóstico, pero en la mayoría de los casos esto no sucede y la confirmación se lleva a cabo por el cuadro clínico en etapas tardías, lo cual complica el tratamiento.

### Tratamiento

Se han propuesto varios tratamientos, tales como el uso de analgésicos, oxígeno hiperbárico, escisión quirúrgica, corticosteroides, sulfonas (Dapsona) y antiveneno, además de la terapia de sostenimiento<sup>(15,37)</sup>. De todos ellos el único tratamiento específico es el uso de antiveneno.

En algunos países como Brasil, se fabrica un suero antiaracnídico que se obtiene por la inmunización de caballos con una mezcla de venenos de los escorpiones *Tityus serrulatus* y *T. bahiensis* así como las arañas *Phoneutria nigriventer* y *L. gaucho*. Dicho antiveneno, fabricado por el Instituto Butantan está formado por fracciones F(ab')<sub>2</sub> de inmunoglobulinas y es empleado tanto para casos de loxoscelismo cutáneo como sistémico<sup>(5)</sup>.

Con la finalidad de aumentar la eficiencia de dicho antiveneno, se realizaron estudios para el desarrollo y evaluación de un antiveneno monovalente contra el veneno de *L. intermedia*, el cual resultó ser más eficiente en comparación con el antiaracnídico<sup>(5)</sup>. En Perú también se produce un antiveneno anti *L. laeta* compuesto de inmunoglobulinas hiperinmunes.

En México, actualmente se evalúa un antiveneno polivalente en el cual se usan como inmunógenos las SMDs recombinantes (r) de *L. boneti*, *L. laeta* y *L. reclusa* para la inmunización en caballos<sup>(30)</sup>. El registro del nuevo antiveneno (Loxmyn) está en proceso y ha sido utilizado en pacientes muy graves por la Dra. Ma. del Carmen Sánchez en el hospital de La Raza con resultados excelentes (Comunicación personal).

## II. Anticuerpos

### Descripción general <sup>(4,15,23)</sup>

Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas son glucoproteínas producidas por linfocitos B. Dos de las funciones más importantes de los Acs son, la de unión al antígeno (Ag) y el reclutamiento de células y moléculas que participan en la degradación del agente infeccioso (opsonización).

Los Acs se encuentran formados por cuatro cadenas unidas entre sí por puentes disulfuro, dos pesadas (50 KDa) y dos ligeras (25 KDa). En la figura 4 se esquematiza la estructura de una inmunoglobulina. Las 4 cadenas se encuentran unidas por puentes disulfuro. La región bisagra es aquella en donde se encuentran los puentes disulfuro que mantienen unidas a las cadenas pesadas y es la encargada de dar flexibilidad a los brazos o fragmentos Fab (Fragment antigen binding) del anticuerpo.



Figura 4. Representación de una inmunoglobulina. a). Diagrama basado en la estructura de rayos X. b) Representación esquemática en la cual se muestra de color azul y verde a las cadenas pesadas, mientras que en rojo y morado se representan a las cadenas ligeras.

Los fragmentos Fab son los responsables de la unión Ag-Ac. Finalmente, el fragmento que se encuentra debajo de la región bisagra es la fracción cristalizante (Fc), la cual es responsable de activar la cascada de complemento e interactuar con células efectoras.

Las regiones constantes de la cadena pesada usualmente son tres y se denominan  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . La cadena ligera sólo tiene un dominio constante  $C_L$ . Las inmunoglobulinas se clasifican de acuerdo a la secuencia de las regiones constantes. Así en los humanos se encuentran 5 grupos o isotipos (A, D, E, G y M) dependiendo de la secuencia de las cadenas pesadas. Y dependiendo de la secuencia de las cadenas ligeras pueden ser lambda o kappa. Las regiones variables corresponden al dominio situado en el extremo amino de la proteína y son los responsables de la interacción Ag-Ac.

Cada dominio, variable o constante, está constituido por una estructura globular formada por hojas  $\beta$  antiparalelas unidas por un puente disulfuro, creando una estructura conocida como barril  $\beta$ . La estructura plegada del dominio de inmunoglobulina se le conoce como plegamiento de inmunoglobulina<sup>(23)</sup>. En la figura 5 se muestra la estructura de los dominios.

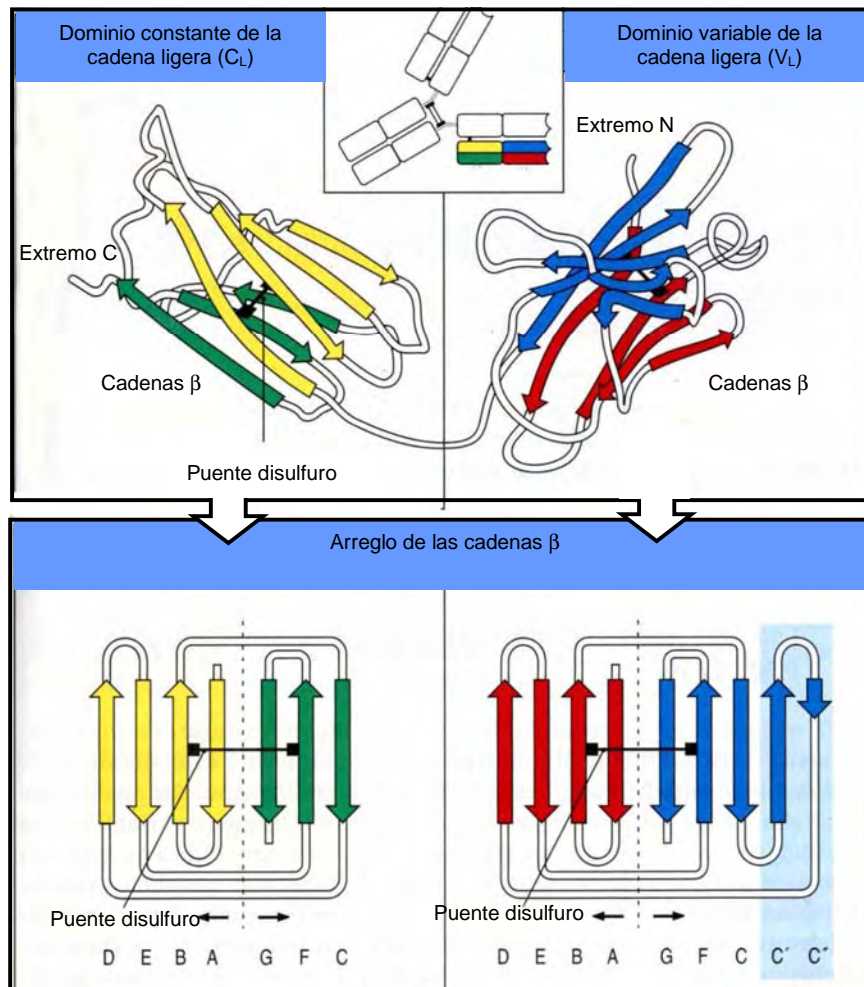


Figura 5. Esquema general del plegamiento de una inmunoglobulina <sup>(23)</sup>.

Los aminoácidos más conservados entre los dominios variable y constante de las inmunoglobulinas son los que se encuentran en el centro o el corazón de la proteína, y son los que brindan estabilidad a la estructura<sup>(23)</sup>.

En la figura 6 se observan tres asas en rojo, los cuales proporcionan una estructura tridimensional que sobresale del dominio. Esta es la región de sitio de unión al Ag. Cada uno de las asas se conoce como CDR (complementary-determining region). La combinación de los CDR de ambas cadenas es lo que forma la estructura tridimensional en donde encaja perfectamente en el Ag y por lo tanto le confiere

especificidad al Ac. Por esta razón, las secuencias de los CDR son las regiones hipervariables de la molécula.

Según la figura 6, la secuencia en amarillo es la encargada de proveer la estructura necesaria para exponer a los CDR, por lo tanto se conocen como “frameworks” (armazones). A pesar de que la secuencia de estas regiones no es constante, su variabilidad es menor que la de los CDR.

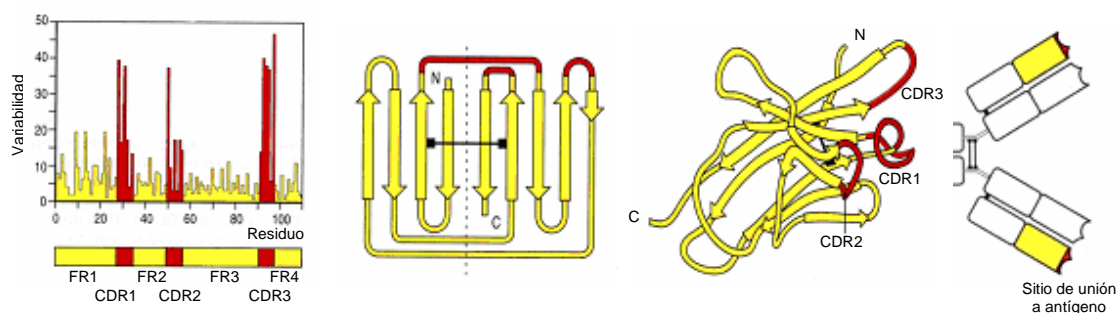


Figura 6. La región variable se encuentra formada por fragmentos hipervariables o CDR y “frameworks” (FR). Los CDR quedan expuestos gracias al plegamiento de los FR, quienes proporcionan el armazón. Los CDR forman el sitio de unión a antígeno.

Estas características nos hablan de la estructura de los Acs y nos permite clasificarlos de acuerdo a su secuencia y función. Sin embargo otra forma de clasificación se basa en el origen de los mismos. Así, los Acs pueden ser policlonales (como los utilizados en los antivenenos) y monoclonales. A continuación hablaremos un poco sobre los Acs monoclonales (AcM).

### Anticuerpos monoclonales

Los AcM son aquellos producidos por una sola clona celular<sup>(6)</sup>. En 1975 George Köhler y Cesar Milstein, mientras investigaban los mecanismos de control genético de la síntesis de inmunoglobulinas, hicieron una fusión entre una línea celular de mieloma murino y linfocitos provenientes de ratones BALB/c inmunizados. El resultado fue la generación de una línea híbrida (hibridoma) capaz de secretar Ac y mantenerse en cultivo indefinidamente<sup>(15)</sup>.

Los AcM reconocen a un sólo epítotope, lo cual les confiere una alta especificidad. Esta característica ha abierto una amplia gama de aplicaciones, entre las que destacan, su uso diagnóstico, terapéutico y como herramienta para la investigación.

Existen dos métodos principales para la producción de AcM, cultivo *in vitro* y producción *in vivo*. El primero, consiste en mantener el cultivo del hibridoma y purificar las inmunoglobulinas secretadas al medio de cultivo. Los rendimientos suelen ser muy bajos y los medios de cultivo muy caros. Como segunda alternativa se inyectan ratones en la cavidad intraperitoneal, dentro de la cual se acumula líquido ascítico, el cual se convierte en un medio muy rico para el crecimiento del hibridoma. Los rendimientos suelen ser considerablemente más altos.



Los principales usos de los AcM han sido en el área terapéutica, de diagnóstico y de investigación. Su uso *in vitro* no presenta ningún tipo de problema, pero en humanos implica algunas consideraciones.

El sistema inmune tiene la capacidad de diferenciar lo propio de lo externo y los AcM de origen murino se reconocen como una molécula externa y por lo tanto pueden despertar una respuesta inmune. La gravedad y los efectos secundarios dependerán de diversos factores, entre los que destacan la sensibilidad del paciente (farmacodinámica) y el tiempo durante el cual será expuesto al AcM.

Una de las alternativas para disminuir la respuesta inmune, es eliminar la fracción Fc y generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Sin embargo, las fracciones constantes restantes aún son de origen murino y aunque la antigenicidad disminuye considerablemente, aún puede reducirse más.

### Anticuerpos recombinantes

La ingeniería genética provee una alternativa más, ya que permite manipular la secuencia, la estructura, el tamaño y la valencia del Ac. De esta manera se consideró sustituir a las regiones constantes de los AcM murinos por secuencias constantes de inmunoglobulinas humanas. Estos Ac se conocen como inmunoglobulinas quiméricas. Aproximadamente el 75% de una inmunoglobulina son regiones constantes, por lo cual su inmunogenicidad se disminuye considerablemente.

Como ya se mencionó anteriormente, de la región variable, los únicos fragmentos responsables de la interacción con el Ag son los CDRs, por lo tanto los "frameworks" también pueden ser sustituidos por secuencias humanas. Estos Ac se conocen como humanizados.

Conforme se sustituyen secuencias murinas por humanas, la estructura tridimensional del anticuerpo se modifica y esto puede afectar considerablemente la afinidad del anticuerpo. Diversos grupos estudian como modificar de manera dirigida la secuencia de los anticuerpos sin perder la afinidad<sup>(10)</sup>.

Otra consiste en la generación de AcM 100% humanos. Para ello se utilizan ratones transgénicos, sin embargo la metodología es más costosa y complicada<sup>(25)</sup>. También se han inmortalizado linfocitos B humanos con el virus de Epstein-Barr, sin embargo los rendimientos son muy bajos<sup>(25,35)</sup>.

Otra característica que se puede modificar por ingeniería genética, es la estructura del Ac. La producción de un fragmento mayor aumenta la complejidad y la dificultad de su generación. Es por ello que aunque la valencia de un F(ab')<sub>2</sub> es mayor, cuando se recurre a la ingeniería genética, se piensa principalmente en fragmentos monovalentes.

Inicialmente se propusieron una serie de diseños entre los que se incluían dianticuerpos, tetra-minianticuerpos, (scFv)<sub>2</sub>, scFv-estreptavidina, tándem dianticuerpos, etc. Sin embargo, actualmente los más usados son los fragmentos Fab

y el fragmento de cadena sencilla Fv (scFv, single chain Fv), los cuales se muestran en la figura 7<sup>(25)</sup>.

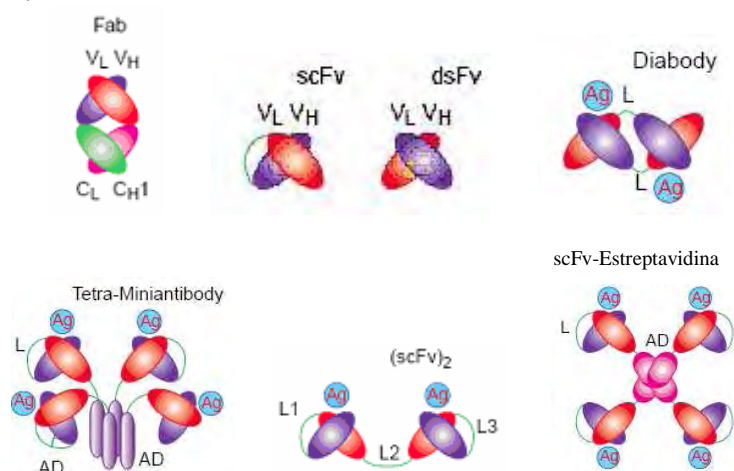


Figura 7. Algunos de los diseños propuestos para la construcción de anticuerpos recombinantes<sup>(4,6,17,25)</sup>. Los más utilizados son los fragmentos Fab, scFv y dsFv. En el caso de scFv, ambas regiones se encuentran unidas por un péptido unión, cuya secuencia usualmente es (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, mientras que en el dsFv ambas regiones están unidas por puentes disulfuro. Diferentes diseños como los tetra-minibodies incluyen dominios proteicos (AD) que incluso pueden ser regiones constantes de una inmunoglobulina como C<sub>H3</sub>, hélices anfipáticas o estreptavidina.

### III. Terapias recombinantes

#### Importancia clínica

Diez años después de la aportación de Köhler y Milstein, el AcM, muromonab-CD3, fue el primero en ser aprobado por la FDA<sup>(16,35)</sup>. Este anticuerpo, conocido como Orthoclone/OKT3, se usó para revertir el rechazo agudo en trasplantes de riñón. Desde entonces y hasta el 2000, la FDA aprobó únicamente 6 AcM de origen murino. En la tabla 2, se presenta el número de AcM que entraron a ensayos clínicos entre 1980 y 2000.

Inicio del ensayo clínico	Total de AcM	% éxito <sup>a</sup>
1980-1982	2	50
1983-1985	9	0
1986-1988	33	6
1989-1991	34	6
1992-1994	41	18
1995-1997	33	0
1998-2000	34	0
Todos los AcM (1980-2000)	186	9
AcM murinos	49	3
AcM quiméricos	23	24
AcM humanizados	59	25

<sup>a</sup> % de éxito. Es el porcentaje de AcM que completaron los ensayos clínicos y fueron aprobados por la FDA.

Desde 1984 comenzaron a aparecer reportes sobre la quimerización de los AcM. En 1987 entró en ensayos clínicos el primer AcM quimérico y en 1988 uno humanizado<sup>(35)</sup>. Desde entonces la tendencia a modificar la secuencia de los AcM se ha ido incrementando. En la tabla 3, se muestran las probabilidades de transición de los AcM murinos, quiméricos y humanizados.

La presencia de efectos secundarios no anticipados o farmacocinéticas deficientes en los estudios preclínicos son las causas de fallo en la fase I. La caída entre la fase II y III se debe a que la efectividad de los AcM. Finalmente el porcentaje de AcM quiméricos y humanizados aprobados es superior al de los murinos.

**Tabla 3. Probabilidades de transición para los AcM<sup>(35)</sup>**

	Fase I a Fase II	Fase II a Fase III	Fase III a Revisión	Revisión a aprobados
AcM murinos	77%	52%	45%	33%
AcM quiméricos	86%	40%	80%	100%
AcM humanizados	84%	72%	75%	100%

En la tabla 4, se presentan algunos de los AcM aprobados por la FDA.

**Tabla 4. Fármacos aprobados para el tratamiento de distintas patologías<sup>(7)</sup>**

Nombre del producto, anticuerpo y compañía	Estructura del anticuerpo	Antígeno
Orthoclone OKT3; muromonab-CD3 (Ortho Biotech Products, L.P.)	IgG2a murino	CD3
ReoPro; abciximab (Centocor, Inc.)	Fab quimérico	gpIIb-gpIIa y $\alpha_v\beta_3$ - integrina
Rituxan; rituximab (Genentech, Inc. y Biogen Idec Inc.); y MabThera (F.Hoffman-LaRoche Ltd)	IgG1 quimérico	CD20
Zenapax; daclizumab (F.Hoffman-LaRoche Ltd)	IgG1 humanizado	CD25
Simulect; basiliximab (Novartis AG)	IgG1 quimérico	CD25
Synagis; palivizumab (MedImmune Inc. y Abbott Laboratories)	IgG1 humanizado	RSV gpF
Remicade; infliximab (Johnson & Johnson y Schering Plough Corporation)	IgG1 quimérico	TNF
Herceptin; trastuzumab (Genetech, Inc. y F.Hoffman-LaRoche Ltd)	IgG1 humanizado	ERBB2
Mylotarg; gemtuzumab ozogamicin (Wyeth)	IgG4 humanizado, conjugado a caliquemicina	CD33
Campath; alemtuzumab (Genzyme Corporation y Schering AG)	IgG1 humanizado	CD52
Zevalin; ibritumomab tiuxetan (Biogen Idec Inc)	IgG1 murino marcado Y <sup>90</sup>	CD20
Humira; adalimumab (Abbott Laboratories)	IgG1 humano	TNF
Xolair; omalizumab (Genentech, Inc. y Novartis AG)	IgG1 humanizado	IgE
Bexxar; <sup>131</sup> I-tositumomab (GlaxoSmithKlein)	IgG2a marcado con I <sup>131</sup>	CD20
Raptiva; efalizumab (Genentech, Inc. y Serono S.A.)	IgG1 humanizado	CD11A
Erbix; cetuximab (ImClone Systems Inc. y Bristol-Myers Squibb Company)	IgG1 quimérico	EGFR
Avastin; bevacizumab (Genetech, Inc. y F.Hoffman-LaRoche Ltd)	IgG1 humanizado	VEGF
Tysabri; natalizumab (Biogen Idec Inc. y Elan Corporation, plc)	IgG4 humanizado	Subunidad $\alpha_4$ de la integrina $\alpha_4\beta_1$ y la integrina $\alpha_4\beta_7$

---

A continuación hablaremos un poco sobre el proceso para la obtención de Acs recombinantes.

#### IV. Sistemas de expresión

La generación de una proteína recombinante puede verse desde un esquema general como el que se presenta en la figura 8. Cada bloque representa múltiples posibilidades y cada una de ellas debe analizarse cuidadosamente.

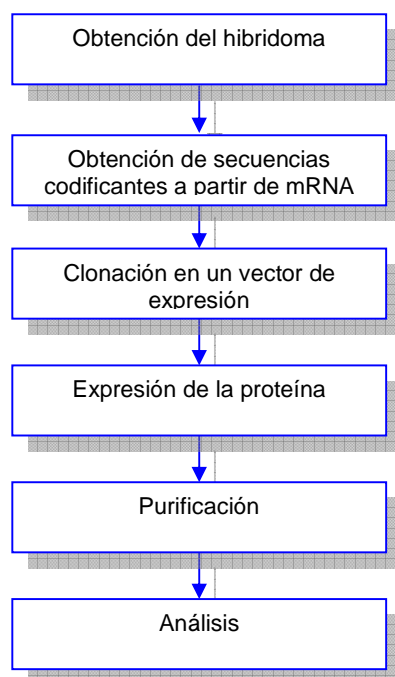


Figura 8. Esquema general para la generación de un anticuerpo recombinante.

Inicialmente se debe de contar con una línea celular productora del AcM, la cual usualmente es un hibridoma murino. Sin embargo no es la única fuente productora, también se cuenta con linfocitos humanos inmortalizados<sup>(26)</sup> y heterohibridomas. Por lo tanto, es muy importante considerar las características de la fuente productora.

Las secuencias codificantes que se desean expresar se amplifican a partir de RNA mensajero (mRNA) obtenido del hibridoma de interés. Sobre estas secuencias se realizan los cambios de estructura o secuencia de acuerdo al diseño que se desee expresar.

Se debe considerar optimizar diferentes condiciones de acuerdo al sistema de expresión elegido. Finalmente se purifica la proteína y se realizan experimentos comparativos que demuestren la funcionalidad de la misma.

Cada una de estas etapas representa un reto distinto, sin embargo, un punto crucial es la elección del sistema de expresión. A continuación se presentan los sistemas más utilizados y algunas de sus características más importantes.

**Bacterias.** La primera proteína recombinante, producida por Eli Lilly's, fue la insulina en 1982 y se hizo en *Escherichia coli*<sup>(39)</sup>. Aunque la insulina ya se comercializaba anteriormente, los grandes volúmenes de producción, combinando con su alta efectividad y siendo un proceso escalable, la llevaron a una reducción de costos y la opción más viable hasta el momento.

El cultivo de microorganismos presenta diversas ventajas muy importantes, tales como la gran velocidad de crecimiento que en consecuencia permite la obtención de grandes cantidades de proteína en tiempos relativamente cortos, la facilidad de manejo, son fácilmente transformables y la gran experiencia en los procesos de escalamiento industrial<sup>(24,39)</sup>.

Sin embargo, las bacterias tienen una limitación que impide la expresión de una gran cantidad de proteínas, las modificaciones post-traduccionales. *E. coli* al igual que otras bacterias, realiza modificaciones sencillas tales como metilaciones, sin embargo la gran mayoría de las proteínas importantes por su uso terapéutico poseen modificaciones post-traduccionales muy complejas y que tienen implicaciones importantes en la funcionalidad de las proteínas<sup>(4,41)</sup>.

Para el caso de los Acs, las glucosilaciones que poseen se localizan en el fragmento Fc sobre el dominio C<sub>H</sub>2 y participan en funciones efectoras. Por lo tanto, si se desea activar dichas funciones, la correcta colocación de estos azúcares es importante, por otro lado si se desean expresar fragmentos de Acs, el sistema de bacterias es una excelente opción.

La estructura de los fragmentos de Ac a expresar en este sistema se limitan a Fab y Fv (scFv y dsFv). En cuanto a las estrategias de expresión, básicamente son dos, la primera, enviar la proteína a espacio periplásmico y la segunda permitir que se quede en citoplasma. A continuación se describen las principales características de cada estrategia.

**Espacio periplásmico.** Un elemento crucial en la estabilidad de los Acs o fragmentos de ellos es la correcta formación de los puentes disulfuro. El ambiente reductor del citoplasma propicia la formación de agregados proteícos cuyo plegamiento dista del funcional. Por otro lado el espacio periplásmico (Fig. 9) posee un ambiente oxidante que unido a las moléculas tipo chaperoninas y las isomerasas de puentes disulfuro aumentan la probabilidad de un correcto plegamiento<sup>(4,39)</sup>.

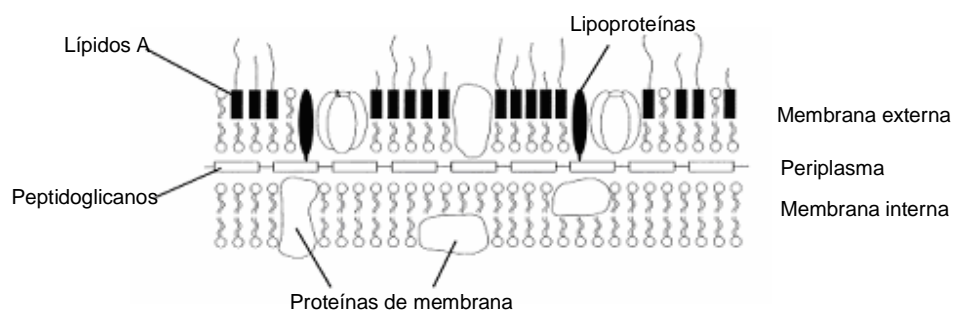


Figura 9. Espacio periplásmico de una bacteria gram negativa <sup>(41)</sup>.

La secuencia de cada cadena debe tener un péptido señal al periplasma. Uno de los péptidos más utilizados es el pelB de la pectato liasa de *Erwinia carotovora*. Es muy importante mantener siempre en mente que cada molécula es única y lo que funciona para una no necesariamente funcionará para otra. Esta regla se aplica para cualquier sistema.

Algunos de los rendimientos más altos que se han alcanzado con este sistema son: 10 mg/L de un Fv anti lisozima<sup>(41)</sup>, 700 mg/L de un Fab anti-CD3<sup>(41)</sup> y más de 2 g/L del Fab humanizado HuMab4D5-8 Fab<sup>(41)</sup>.

*Proteína citoplasmática.* Como ya se mencionó, si el fragmento de Ac se queda en el citoplasma es muy probable que se formen agregados proteicos. Por lo tanto se necesita un proceso posterior, el cual consiste en hacer un replegamiento *in vitro*. Aunque existen diferentes protocolos, la estrategia general consiste en aislar los agregados proteicos o los cuerpos de inclusión, posteriormente solubilizar la proteína recombinante y finalmente renaturalizarla en un ambiente propicio para la formación de puentes disulfuro<sup>(41)</sup>.

Para la solubilización pueden usarse agentes caotrópicos (urea y cloruro de guanidinio), detergentes suaves o agentes reductores. El ambiente oxidante se puede suplementar con oxígeno, glutatión oxidasa o isomerasas<sup>(41)</sup>.

Uno de los principales problemas en los procesos de replegamiento *in vitro* son los agregados, ya que las fuerzas que los mantienen unidos provienen de los residuos hidrofóbicos de las proteínas mal plegadas. Una forma de reducir este problema es bajando la concentración de la mezcla de replegamiento.

No existe un protocolo de replegamiento universal, algunas proteínas no presentan mayor problema en este proceso y otras necesitan un poco más de trabajo. Existe un componente muy importante asociado a la secuencia de cada proteína que determinará el grado de dificultad para clonar, expresar e incluso plegar correctamente.

*Levaduras.* Una de las ventajas que comparten las levaduras con las bacterias, es que ambos son microorganismos, por lo tanto no necesitan de medios complejos con costos elevados, alcanzan altas densidades ópticas en un tiempo corto y el proceso de escalamiento es relativamente sencillo. Con los eucariotes comparte algunos procesos post-traduccionales, secreción al medio de cultivo y una maquinaria más compleja<sup>(29,41)</sup>.

A diferencia de *E. coli*, en este sistema se han expresado Acs completos. Cuando los rendimientos en bacterias son muy bajos o existen problemas de plegamiento, la siguiente opción es el sistema de levaduras. Un scFv anti-CD7 expresado en *E. coli*, alcanzó un rendimiento de 250 mg/L y en *Pichia pastoris* de 60 mg/L. El Fab anti-HBs alcanzó un rendimiento de 50 mg/L y fue secretado al medio de cultivo sin necesidad de replegamiento *in vitro*<sup>(29)</sup>.

*Células de mamífero*<sup>(5,8,28)</sup>. La principal ventaja de usar células de mamífero, es que las señales de síntesis, procesamiento y secreción son reconocidas apropiadamente. Mientras más cercana sea la relación filogenética entre la especie productora de la proteína silvestre y del sistema recombinante existirán menos problemas en cuanto a estructura y procesamiento. Las desventajas de este sistema es que los medios de cultivo son muy caros y debido a que la mayoría de éstos utilizan suero fetal bovino, los procesos de purificación deben de ser muy estrictos para evitar contaminaciones por micoplasma.

El escalamiento es más complicado que para el de microorganismos, ya que son más susceptibles al esfuerzo de corte y el mezclado y suministro de aire se convierten en un problema. Por esta razón, los volúmenes de fermentación son mucho más pequeños que los de microorganismos.

Algunos fragmentos de anticuerpo han sido expresados tanto en células procarióticas como de mamífero, permitiendo una comparación en cuanto a productividad. El fragmento Fv del anticuerpo B72.3 fue expresado en *E. coli*, obteniendo 40 mg/L en frascos de cultivo agitados y 450 mg/L en fermentadores. El mismo fragmento en células CHO alcanzó un rendimiento de 4mg/L.

*Células de insecto*<sup>(21,41)</sup>. Este sistema es una alternativa prometedora que ha surgido en los últimos años. Al ser células de eucariotas superiores, el sistema lleva a cabo una variedad mayor de modificaciones post-traduccionales, como formación de puentes disulfuro, fosforilación, glucosilación (aunque características de insectos), oligomerización y un plegamiento adecuado. Además, la capacidad de soporte para el tamaño de los insertos es mucho mayor que el de microorganismos, soporta fragmentos arriba de 15 Kb. Las desventajas del sistema no exceden a las de un cultivo de células de mamífero y son principalmente, un medio de cultivo caro, tiene una considerable demanda de oxígeno y su velocidad de crecimiento es baja comparada con la de un microorganismo.

*Plantas*<sup>(25,38)</sup>. El éxito de la expresión de proteínas recombinantes en plantas se sugiere como un sistema de expresión a escala comercial. La primera generación de estas proteínas (Acs, vacunas, hormonas humanas y reguladores de crecimiento) está alcanzando un estatus comercial.

Entre las principales ventajas destaca que es un sistema eucariote complejo y puede ser usado para producir en escala de agricultura posiblemente a un décimo del costo de otros sistemas, ya que el escalamiento no presenta costo alguno. Además no comparte patógenos con los humanos ni con los animales. El sistema tiene la capacidad de expresar Acs completos o fragmentos tales como Fab, scFv y Acs fusionados a proteínas.

Finalmente la elección del sistema dependerá de la naturaleza de la proteína, el uso que tendrá la recombinante, la cantidad y la calidad con que se necesita, la experiencia en los diferentes sistemas con la que se cuente en el laboratorio y los recursos propios del laboratorio. De cualquier manera ninguno de los sistemas garantiza ser el mejor para la proteína de interés ya que cada una de ellas es única y tiene sus propios requerimientos.

## V. Antecedentes

Una de las áreas de investigación en el laboratorio del Dr. Alagón es el veneno de la araña violinista. Como parte de esta investigación se decidió generar una batería de AcM contra la SMD con la finalidad de producir un inmunoensayo que ayude a diagnosticar loxoscelismo.

Así, usando un protocolo modificado de Khöler y Milstein, generaron tres AcM (Fig. 10) contra la toxina recombinante de *L. boneti* (*rL. boneti*), 2C4/F4/G7/C3 (2C4), 5C10/G5/H5 (5C10) y 13C7/F4/G9 (13C7).

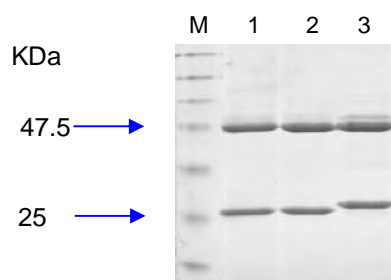


Figura 10. Migración electroforética de los AcM . M. Marcador de peso molecular. Carril 1, 13C7, carril 2, 2C4 y carril 3, 5C10. Condiciones reductoras.

Se demostró que los tres reconocen epítopes diferentes de la toxina con un ensayo de competencia, usando un ELISA tipo "sandwich". En la tabla 5, se presentan las características de los AcM.

	AcM 2C4	AcM 5C10	AcM 13C7
Isotipo	IgG1 ( $\lambda$ )	IgG1 ( $\kappa$ )	IgG1 ( $\kappa$ )
Reconocimiento de SMD	<i>rL. boneti</i>	<i>rL. boneti</i> y <i>rL. reclusa</i>	<i>rL. boneti</i>
Inhibición de la actividad enzimática	-	+++	-

Para las pruebas de reconocimiento se usaron las rSMDs de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*. Tanto *L. reclusa* como *L. boneti* son representativas de Norte América, mientras que *L. laeta* de Sudamérica. La distancia filogenia entre *L. reclusa* y *L. boneti* es menor que la que existe con *L. laeta*, incluso la SMD de *L. laeta* presenta una mayor actividad que la de *L. reclusa* y la de *L. boneti*<sup>(30,34)</sup>.

El que los AcM 2C4 y 13C7 sólo reconozcan a *rL. boneti*, indica que ambos epítopes son exclusivos de esta toxina. Dada la especificidad de estos dos Acs no es de sorprender que ninguno reconozca a *rL. laeta*.

El AcM 5C10 reconoce tanto a *rL. boneti* y *rL. reclusa*, por lo cual el epítope que reconoce debe de encontrarse conservado en ambas SMD y no es compartido por



*rL. laeta*. En la figura 11 se muestran las gráficas de reconocimiento de las toxinas *rL. boneti* y *rL. reclusa*.

Las pruebas de inhibición mostraron que los epítopes reconocidos por los AcM 2C4 y 13C7 no tienen ninguna relación con la actividad de la enzima. Sin embargo el AcM 5C10, sí inhibe la actividad de ambas toxinas. En la figura 12 se muestra el ensayo de inhibición del AcM 5C10 con las toxinas *rL. boneti* y *rL. reclusa*.

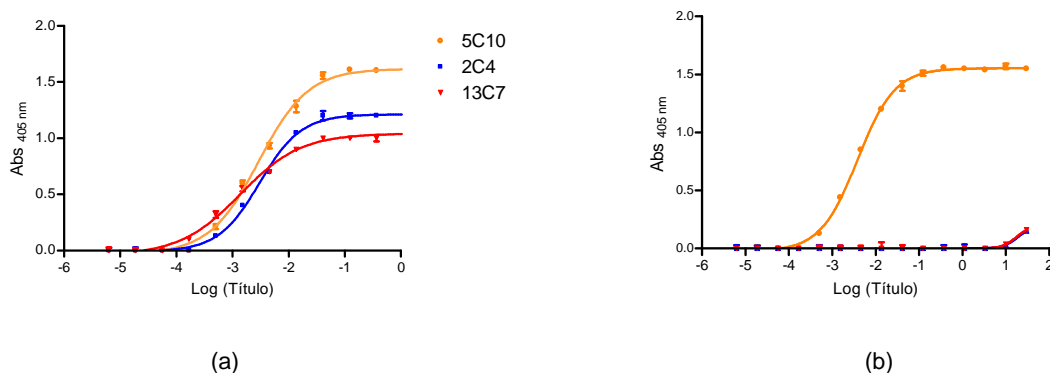


Figura 11. Ensayo de reconocimiento de los AcM 2C4, 5C10 y 13C7 contra las toxinas recombinantes de (a) *L. boneti* y (b) *L. reclusa*. Se usó líquido ascítico de cada Ac con una dilución inicial 1:30 para el primer pozo y posteriormente se hicieron diluciones seriadas 3X. Las placas fueron sensibilizadas con 5 µg/mL de toxina.

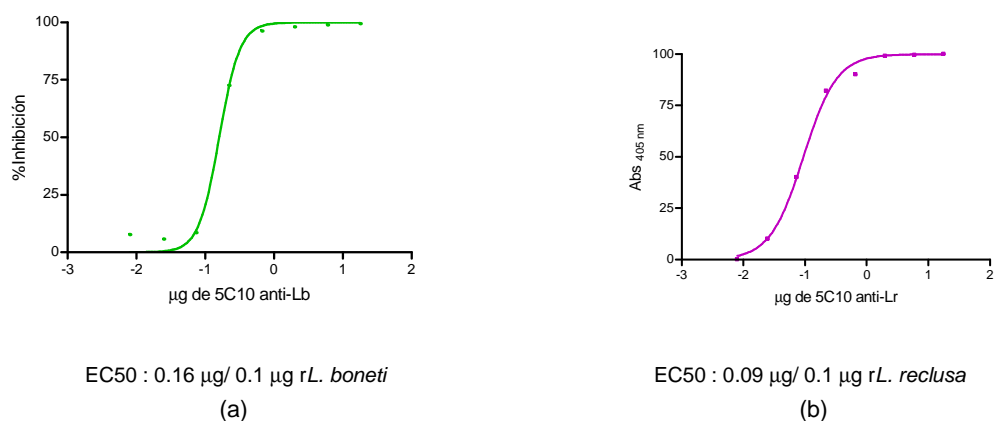


Figura 12. Ensayos de actividad enzimática del AcM 5C10 contra las toxinas recombinantes de (a) *L. boneti* (el 95% de confianza para el valor de EC50 cae dentro del intervalo de 0.1490 a 0.1725) y (b) *L. reclusa* (el 95% de confianza para el valor de EC50 cae dentro del intervalo de 0.08930 a 0.1004). Las pruebas se realizaron con el Kit Amplex™ Red para esfingomielinasa de Molecular Probes.

Sólo el AcM 5C10 es capaz de inhibir la actividad enzimática de la SMD. Esta característica única del AcM, abre una serie de posibilidades, entre las que se destaca la evaluación terapéutica del Ac.

## **JUSTIFICACIÓN**

La complejidad de la mayoría de los venenos requiere la neutralización de distintos componentes, por lo tanto, los antivenenos utilizados actualmente son de origen policlonal.

El veneno de *Loxosceles*, se caracteriza por tener un solo componente tóxico y por lo tanto, sólo se requiere la neutralización de la esfingomielinasa D para detener los efectos tóxicos de este veneno.

El anticuerpo monoclonal 5C10 posee la capacidad de inhibir eficientemente la actividad enzimática de dos especies distintas de *Loxosceles* (*reclusa* y *boneti*), por lo tanto, esto nos llevó a proponer la generación de un anticuerpo recombinante quimérico derivado de este anticuerpo, para que posteriormente pueda ser evaluado como una herramienta terapéutica.

## **HIPÓTESIS**

El fragmento Fab quimérico, recombinante, proveniente del anticuerpo monoclonal 5C10 tendrá una eficiencia de reconocimiento y comportamiento equivalente a la presentada por el anticuerpo monoclonal murino.

## **OBJETIVOS**

### *General*

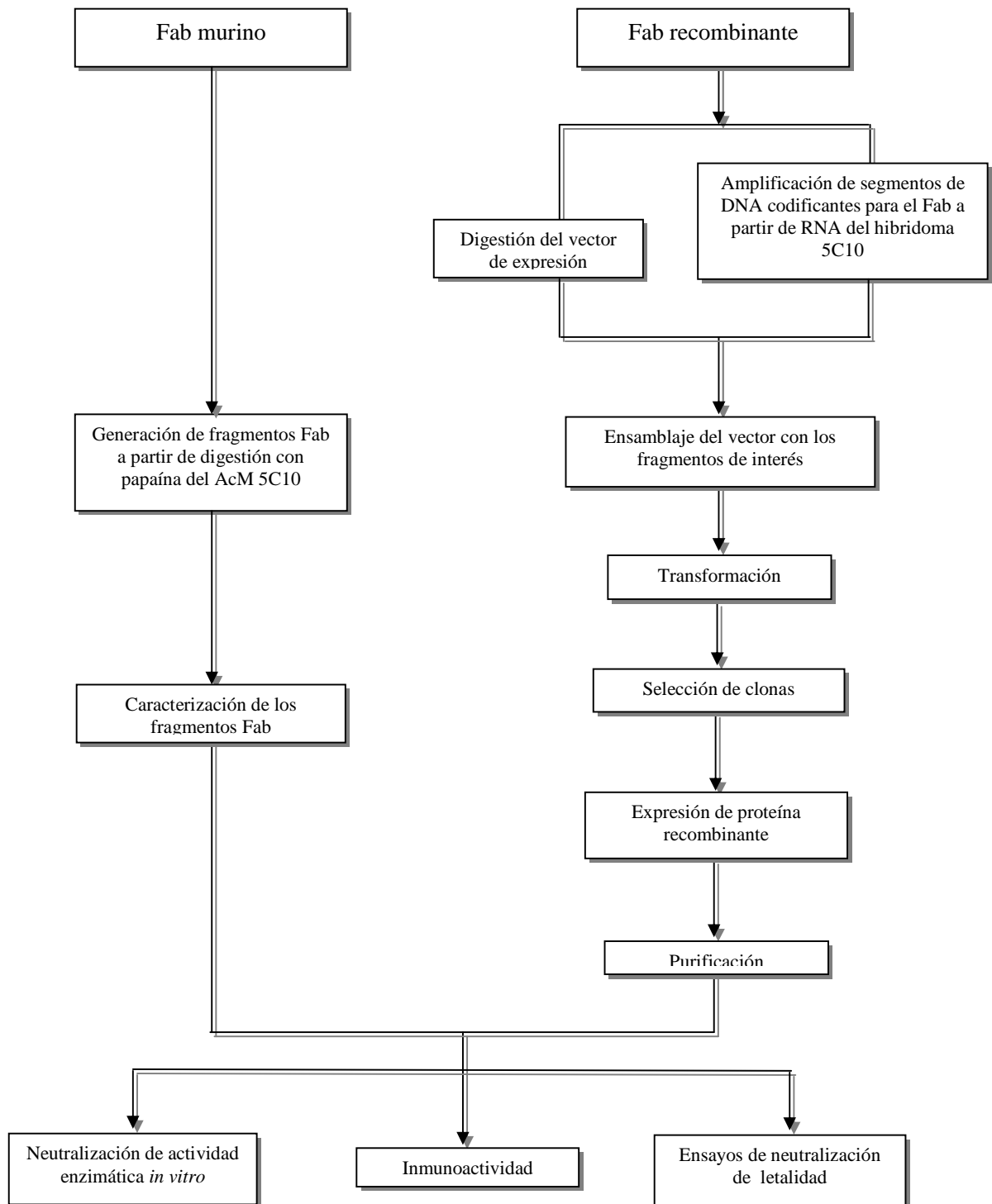
Producir el fragmento Fab recombinante quimérico contra la esfingomielinasa D de la araña *Loxosceles* y comparar su capacidad neutralizante con el Fab de origen murino.

### *Particulares*

- Generar y purificar el fragmento Fab a partir del anticuerpo monoclonal murino.
- Amplificar y clonar los segmentos de DNA complementario correspondientes a las regiones variables del anticuerpo monoclonal contra esfingomielinasa D.
- Realizar la construcción correspondiente para la expresión del fragmento Fab quimérico.
- Encontrar las condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante.
- Comparar la capacidad de neutralización de la actividad enzimática *in vitro* del Fab quimérico recombinante y el Fab murino.
- Determinar la capacidad de neutralización de la letalidad en ratones Balb/c del fragmento Fab quimérico y del Fab murino para comparar su eficiencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama general de la estrategia experimental.



## I. Generación y caracterización de los fragmentos Fab murinos.

**Cultivo del hibridoma 5C10.** Se descongeló un vial del hibridoma 5C10 colocándolo en baño María a 37°C. Se transfirieron las células a un tubo de 15 mL y se diluyeron lentamente con 20 mL de medio DEMEM (Gibco) precalentado a 37°C. Las células se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y las células fueron transferidas a un frasco de 75 cm<sup>2</sup> con 20 mL de medio completo B (Apéndice A). Cada 24 horas se cambió el medio hasta que las células se recuperaron por completo.

**Producción del AcM 5C10 en líquido ascítico.** Se inyectaron ratones BALB/c por vía intraperitoneal con 250 µL de 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (Pristano, Sigma). Después de 15 días fueron inyectados con 500,000 células del hibridoma 5C10 contenidas en un volumen de 500 µL de medio DMEM. Cuando fue visible un aumento de la cavidad intraperitoneal de los ratones se drenó el líquido ascítico mediante una punción con agujas G18X1 1/2 mm (BD Plastipak), colectando en un tubo de 50 mL. El líquido ascítico fue centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm y almacenado a -20°C.

**Purificación del AcM 5C10.** El AcM 5C10 se purificó a partir de líquido ascítico utilizando una columna empacada con Sepharosa 4B acoplada a Proteína A (Zymed). El volumen de columna (VC) fue de 1 mL de resina. El buffer de lavado fue 50 mM Tris-HCl pH8 + 150 mM NaCl, y el buffer de elución 100 mM ácido acético. La columna se equilibra con 4 VC con el buffer de lavado, se pasaron 10 mL de líquido de ascitis y posteriormente se lavó la columna con 30 VC de buffer de lavado. La elución de la muestra se realizó 15 VC colectando fracciones de 1 mL en tubos con 100 µL de 2 M Tris-HCl pH8.

Se determinó la absorbancia a cada una de las fracciones eluidas a 280 nm en un espectrofotómetro (Biophotometro, Eppendorf). Las fracciones con una absorbancia superior a 0.07 se reunieron y dializaron contra PBS 1X. Finalmente se llevaron a una concentración de 1.5 mg/mL en una cámara de AMICON usando membranas de ultrafiltración (Milipore) con un corte de 30 KDa. El anticuerpo fue almacenado a 4°C con 0.02 % de azida de sodio. La concentración se determina dividiendo el valor de la absorbancia a 280 nm por el coeficiente de extinción de 1 mg/mL (1.4).

**Análisis de proteínas por SDS-PAGE.** La separación y el análisis de las diferentes proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12.5 % (Apéndice A) en una cámara MiniProtean (BioRad). Se utilizó el marcador de proteínas Prestain Protein Marker Broad Range de New England BioLabs.

**Digestión con papaína del AcM 5C10<sup>(1,3)</sup>.** El anticuerpo se diluyó a una concentración de 1 mg/mL y se dializó contra el buffer de reacción (Apéndice A). La papaína (Worthington) se diluyó en buffer de activación (Apéndice A) a 0.65 mg/mL y se activó a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente se mezcló un volumen de anticuerpo por cada volumen de papaína y se incubó a 37°C durante

2 horas. Finalmente se detuvo la reacción adicionando la cantidad necesaria del inhibidor de proteasas E-64 (ROCHE) para quedar a una concentración 40  $\mu$ M.

**Purificación de los fragmentos Fab.** La separación de los productos de digestión del AcM 5C10 con papaína se realizó por una cromatografía de intercambio iónico. Se emplearon dos columnas ensambladas en tándem, la primera de intercambio aniónico (Hi-Trap Q FF; Amersham Pharmacia Biotech) y la segunda de intercambio catiónico (Hi-Trap SP FF; Amersham Pharmacia Biotech). El VC para cada una de ellas fue de 1 mL. Las columnas se equilibraron con 4 VC del buffer A (25 mM Tris-HCl pH8). Se inyectó la muestra y posteriormente se lavaron las columnas con 30 VC de buffer A. La elución de la muestra se realizó con 4 VC del buffer B (25 mM Tris-HCl pH8 + 2 M NaCl) desconectando las columnas y colectando por separado. La velocidad de flujo fue de 1 mL/minuto.

Posteriormente se eliminó el fragmento F(ab)<sub>2</sub> que co-eluyó con el Fab en la cromatografía de intercambio iónico por una cromatografía de exclusión por tamaños. La muestra se dializó contra PBS 1X. Se utilizó una columna de 150 cm de longitud y 1.8 cm de diámetro. La resina fue Sephacryl S-300 (Pharmacia) con un flujo de 0.5 mL/minuto. El volumen de las fracciones fue de 5 mL y para colectarlas se utilizó el colector automático de BioRad, modelo 2128. Se determinó la absorbancia a cada una de las fracciones a 280 nm para graficar el cromatograma. Las fracciones que se unieron se llevaron a una concentración de 1.5 mg/mL en una cámara de AMICON usando membranas de ultrafiltración (Millipore) con un corte de 10 KDa. El anticuerpo fue almacenado a 4°C con 0.02 % de azida de sodio. La concentración se determinó dividiendo el valor de la absorbancia a 280 nm por el coeficiente de extinción que para las inmunoglobulinas es de 1.4.

**Ensayo Inmunoabsorbente conjugado a enzimas (ELISA).** Para sensibilizar la placa de ELISA, se usaron 5  $\mu$ g/mL de la toxina *rL. reclusa* en solución S (Apéndice A). La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la placa con 200  $\mu$ L/pozo de solución L (Apéndice A). Los lavados se realizaron por triplicado y al término de cada incubación.

Para el bloqueo se utilizaron 200  $\mu$ L/pozo de solución B (Apéndice A) y se incubó durante 2 horas a 37°C.

Partiendo de una concentración conocida del AcM o Fab, se hicieron diluciones seriadas 1:3 en solución R (Apéndice A). El volumen por pozo fue de 100  $\mu$ L y la incubación de 1 hora a 37°C.

El segundo anticuerpo fue uno de cabra anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Zymed) en una dilución 1:1000 en solución R. El volumen por pozo fue de 100  $\mu$ L y el tiempo de incubación de 1 hora a 37°C.

Finalmente se reveló la placa con 100  $\mu$ L/pozo de sustrato, ABTS (Roche). La reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se detuvo con 25  $\mu$ L de SDS al 20 %. La lectura de la placa se realizó en un lector de ELISA a

405 nm (Magellan). El tratamiento de los datos se realizó en el programa PRISM® [GraphPad, San Diego, CA].

**Inhibición enzimática *in vitro*.** Este método permite medir la actividad de la esfingomielinasa D, mediante una cascada acoplada de tres reacciones (Fig. 13). La primera consiste en la hidrólisis de la esfingomielina en colina y fosfoceramida; posteriormente la colina oxidasa (ChOx) oxida a la colina, generando betaína y peróxido de hidrógeno. Finalmente, el peróxido reacciona con el reactivo de Amplex red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) en presencia de la peroxidasa (HRP) y genera un compuesto colorido conocido como resorufina.

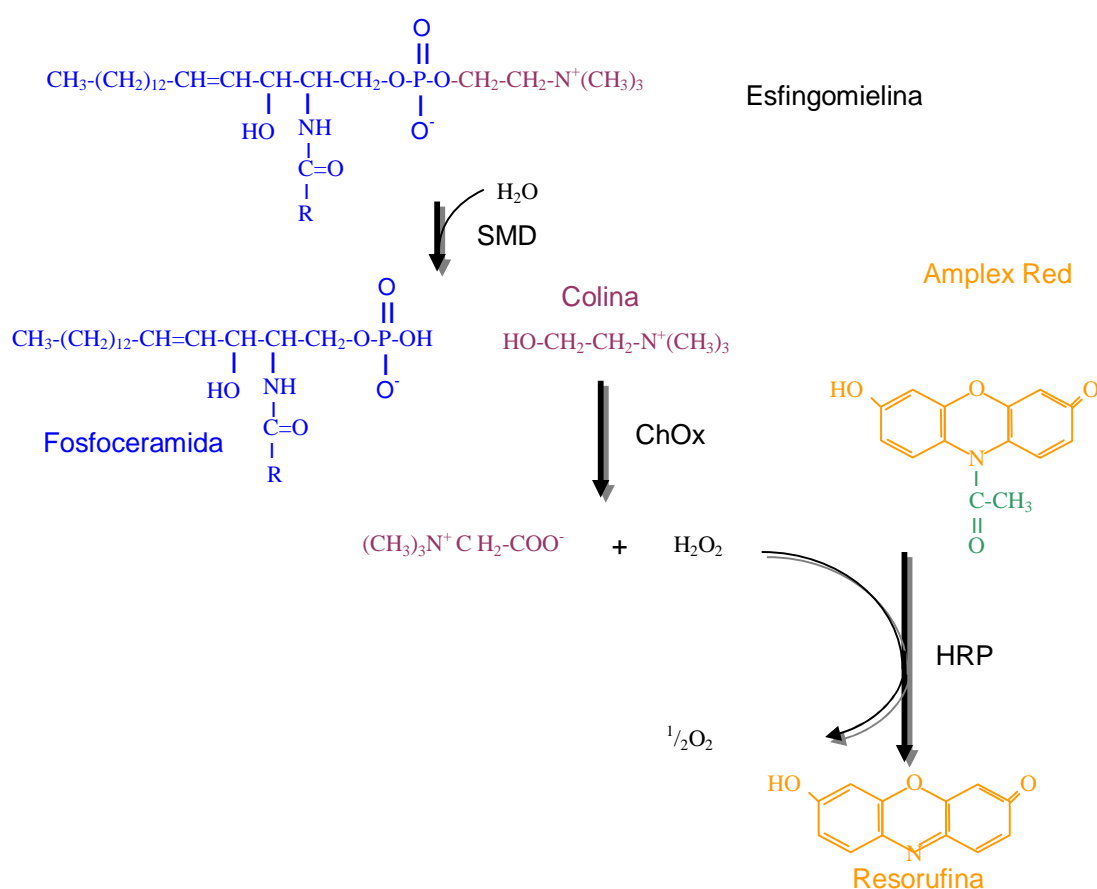


Figura 13. Mecanismo de acción del método del Kit Amplex™ Red (Molecular Probes)

La preparación de los reactivos se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (Molecular Probes). El ensayo se llevó a cabo en placas Nunc™ de 96 pozos.

Inicialmente se incubaron 15 ng de la toxina *rL. reclusa* con diferentes concentraciones del AcM en un volumen de 100  $\mu$ L/pozo. Como diluyente se emplea el buffer 100mM Tris-HCl pH7.5 + 4 mg/mL de BSA y la incubación fue de 30 minutos a 37°C. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L/pozo del sustrato (Tabla 6) y la placa se incubó durante 30 minutos a 37°C. Finalmente se determinó la absorbancia a 570 nm en el lector de placas.

Tris-HCl pH 7.5 (100 Mm)	2175 $\mu$ L
Esfingomielina (5 mM)	250 $\mu$ L
Colina oxidasa (20 U/mL)	25 $\mu$ L
Peroxidasa (200 U/mL)	25 $\mu$ L
Amplex red (10 mM)	25 $\mu$ L

Para el procesamiento de los datos, se consideró la absorbancia del control positivo como 100 % de actividad o 0 % de inhibición. El porcentaje de inhibición para cada pozo se calculó proporcionalmente al del control positivo. Se promediaron los duplicados. En el programa PRISM® se graficaron los  $\mu$ g de anticuerpo en el pozo contra el porcentaje de inhibición. De la sigmoide resultante se obtuvo el valor de la dosis efectiva media (DE50).

**Ensayos de Neutralización de la letalidad.** La dosis efectiva media se refiere a la cantidad de Ac necesaria para evitar la muerte de la mitad de una población. La dosis letal media (DL50) se refiere a la cantidad de toxina necesaria para matar a la mitad de una población. La determinación de la DE50 se realizó en grupos de 5 ratones Balb/c de 18 a 20 g. Se prepararon diferentes mezclas con 12  $\mu$ g que equivalen a 3 DL50<sup>(30)</sup> de la toxina *rL. reclusa* y diferentes concentraciones de anticuerpo. Se incubaron durante 1 hora a 37°C y posteriormente con cada mezcla se inyectó, intraperitonealmente, un grupo de ratones. Las lecturas se realizaron 72 horas después de la inyección. Para el tratamiento de los datos se utilizó el programa PRISM®.

## II. Generación y caracterización de los fragmentos Fab quiméricos.

**Kits.** La obtención de DNA plasmídico se realizó con el kit High Pure Plasmid Purification de ROCHE.

Los fragmentos de DNA producto de una digestión o de PCR, se purificaron con el kit High Pure PCR Product Purification de ROCHE.

**Oligonucleótidos (oligos).** Los siguientes oligos se sintetizaron en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.



Oligo	Secuencia	Posición de alineamiento
OSL5C10	GAY ATH YTG YTG ACH CA	Extremo 5' de la cadena ligera de 5C10
OAL5C10	ACA CTC ATT CCT GTT GAA	Extremo 3' de la cadena ligera de 5C10
BisH5C10	TAC ATA TGC AAG GCT TAC AA	Región bisagra de la cadena pesada de 5C10
OPLH5C10	ACT TTT TCA TTC TTG CTA CTG	Péptido señal de la cadena pesada de 5C10
Sfil 5C10	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAC ATA TTG TTG ACC CAG TCT	Introduce el sitio de restricción Sfil en el extremo 5' de la cadena ligera de 5C10
RsrII 5C10	GTC GCG GCG GTC CGC CGC TTC AGC TCC AGC TT	Introduce el sitio de restricción RsrII en el extremo 3' de la cadena ligera de 5C10
MluI 5C10	GTA CGA CGC GTA CGC TCA GGT TAC TCT GAA AGA G	Introduce el sitio de restricción MluI en el extremo 5' de la cadena pesada de 5C10
Apal 5C10	GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC	Introduce el sitio de restricción Apal en el extremo 3' de la cadena pesada de 5C10

**Extracción de RNA.** Las células de un cultivo del hibridoma 5C10 se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1.2 mL de trizol. Con un homogeneizador se lisaron las células en trizol y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se agregaron 250 µL de cloroformo y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se formaron dos fases, se recuperó la fase superior y se transfirió a un tubo limpio. Se le adicionó un volumen de isopropanol y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 10 minutos, se decantó el isopropanol y se lavó dos veces la pastilla con 500 µL de etanol al 75 %. Se dejó evaporar el etanol residual y se resuspendió la pastilla en agua con DEPC. El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

**Electroforesis de material genético.** Se emplearon geles de agarosa al 1 % con 0.5 g/mL de bromuro de etidio. El buffer de corrida fue TAE 1X (Apéndice A). Las cámaras usadas fueron Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad).

**Obtención de DNA complementario (cDNA).** Se mezclaron 900 ng de RNA con 10 pmoles del oligo poli-dT y se ajustó el volumen a 12 µL de agua DEPC. La solución se incubó a 70°C durante 10 minutos y posteriormente se colocó el tubo en hielo. Se adicionaron 2 µL de buffer PCR 10X, 1 µL de dNTP (2.5 mM) y 2 µL de ditiotreitól (DTT) 0.1 M. La mezcla se incubó a 42°C durante 5 minutos y sin sacarlo del baño se agregó 1 µL de la enzima retro-transcriptasa (RT) superscript II, mezclando rápidamente y dejando incubar a 42°C durante 50 minutos. Al término de la incubación se inactivó la enzima a 70°C durante 15 minutos. Se pasó a hielo y se agregó 1 µL de RNAsa H, se incubó a 37°C durante 20 minutos. El material se guardó a 4°C hasta su uso.

**Amplificación Rápida de los Extremos de cDNA (RACE).** El kit RACE de GibcoBRL es un procedimiento para la amplificación de material genético a partir de mRNA del cual se desconoce la secuencia de uno de los extremos.

La variante 3' RACE se utiliza cuando se desconoce el extremo 3' de la secuencia y por lo tanto se usa un oligo poli dT para generar el cDNA y para la reacción de PCR (Fig. 14).

En el caso del 5' RACE, después de generar el cDNA se agrega una secuencia mononucleotídica en el extremo 5' con la ayuda de una transferasa terminal (TdT). Para la amplificación por PCR se utiliza un oligo complementario a la secuencia mononucleotídica agregada (Fig. 14).

Para la amplificación del fragmento Fd del AcM 5C10 se usó una mezcla de ambas variantes del método RACE, en la figura 14, se muestra un esquema de la estrategia utilizada.

Se realizó la retrotranscripción como se menciona anteriormente, con el oligo poli dT que se alinea con la cola poli A del mRNA. Se purificó el material con el kit High Pure PCR Product Purification de ROCHE, agregando directamente al cDNA el buffer de unión.

Una vez limpio el material, se mezclaron 5  $\mu$ L del cDNA, 2  $\mu$ L del buffer 5X de la deoxi transferasa terminal (TdT), 1  $\mu$ L de dGTP 1 mM, 1  $\mu$ L de agua y 1  $\mu$ L de la enzima TdT y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se volvió a purificar con el kit High Pure PCR Product Purification de ROCHE. Finalmente se amplificó el fragmento de interés por PCR usando los oligos poli dC y BisH5C10.

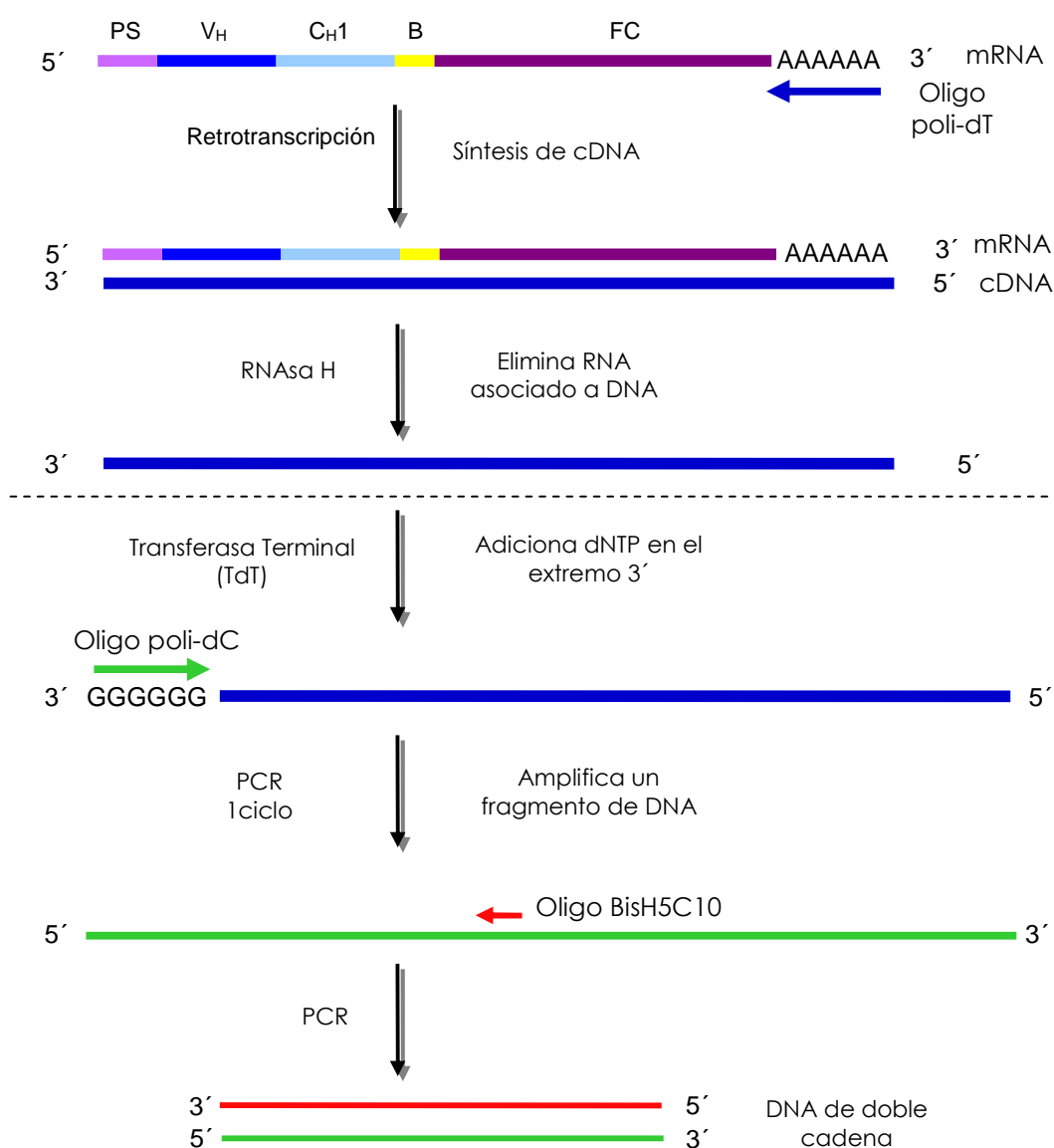


Figura 14. Esquema de la estrategia para la amplificación del fragmento Fd del AcM 5C10. Se sintetizó cDNA utilizando un oligo poli-dT; posteriormente se eliminó el mRNA y se adicionaron guaninas en el extremo 3' del cDNA. Finalmente se amplificó por PCR el fragmento Fd utilizando los oligos poli-dC y BisH5C10. La línea punteada delimita en la parte superior 5' RACE y en la inferior 3' RACE

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** La mezcla de reacción consistió en 20 pmoles del oligo sentido, 20 pmoles del oligo antisentido, 0.5 µL de Taq DNA Polimerasa, 5 µL de buffer 10X para PCR, 4 µL de dNTP (BioLabs) 2.5 mM y DNA. El volumen fue ajustado a 50 µL con agua.

Las temperaturas de alineamiento para la PCR se determinaron con el programa Oligo 6.1.

El perfil de temperaturas y los tiempos usados fueron:

94°C	2 minutos	}	1 ciclo
94°C	1 minutos		
T. alineamiento	2 minutos	}	25 ciclos
72°C	2 minutos		
72°C	10 minutos		1 ciclo
4°C	α		

**Clonación y secuenciación de las regiones variables del AcM 5C10.** Los fragmentos amplificados de las regiones variables del AcM fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO (TOPO) de Invitrogen de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El vector se encuentra linearizado y presenta en cada extremo una timidina sobresaliente la cual se encuentra unida covalentemente a una topoisomerasa I que aprovecha la adenina sobresaliente que deja la Taq Polimerasa para ligar el fragmento amplificado por PCR.

Se transformaron células XL1-Blue con las construcciones en TOPO de acuerdo a las recomendaciones del proveedor y se cultivaron en medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Para la purificación de plásmido se utilizó el Kit High Pure Plasmad Isolation (Roche). La determinación de clonas positivas se llevó a cabo digiriendo el vector con la enzima de restricción EcoRI. El material genético de las clonas positivas se envió a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

**Subclonación de las regiones variables en el vector pSyn1.** El vector pSyn1 es un vector de expresión para Fab quiméricos. Su diseño incluye la secuencia de las regiones constantes C<sub>H1</sub> y C<sub>L</sub> de una inmunoglobulina humana IgG1 kappa. Las regiones variables (Fig. 15) se encuentran delimitadas por sitios de restricción únicos en el vector lo cual facilita la sustitución de las regiones variables. Para la cadena ligera los sitios son en el extremo 5' *SfiI* y *RsrII* en el 3', mientras que para la cadena pesada en el 5' se encuentra *MluI* y *ApaI* en el 3'<sup>(33)</sup>.

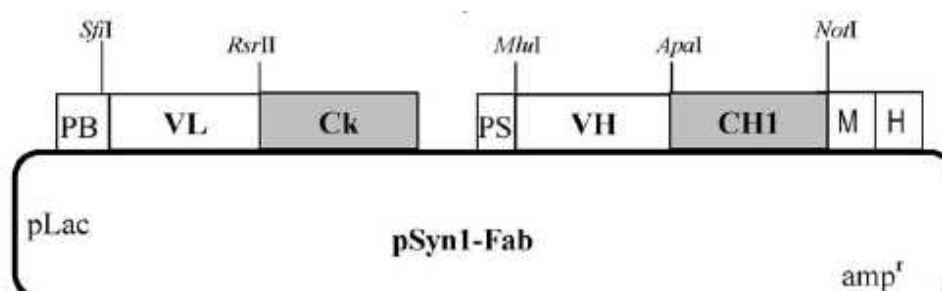


Figura 15. Representación del diseño de la región codificante de un Fab quimérico en el vector pSyn1. PB, es el péptido señal pelB de la cadena ligera; VL, la región variable de la cadena ligera; Ck, la región constante kappa; PS, el péptido señal STII de la cadena pesada; VH, la región variable de la cadena pesada; CH1, la región constante de la cadena pesada; M, la secuencia C-Myc; H, una cola de 6 histidinas. El promotor es pLac y el vector presenta el gen de resistencia a ampicilina.

El vector posee dos marcos de lectura, el primero corresponde al de la cadena ligera, mientras que el segundo al de la cadena pesada. Al término de C<sub>H1</sub> continúa la secuencia de C-Myc y una cola de 6 histidinas. Cada una de las cadenas presenta un péptido señal diferente para transporte a espacio periplásmico<sup>(33)</sup>.

**Expresión de Fab quimérico**<sup>(33)</sup>. Se inoculó medio YT2X (ampicilina 100 µg/mL y 2 % de glucosa) con la cepa con la construcción pSyn-5C10. Se dejó crecer durante toda la noche a 35°C con agitación constante de 250 rpm. Al día siguiente se inoculó un matraz con medio YT2X suplementado con 0.1 % de glucosa y ampicilina a 100 µg/mL con un centésimo del volumen de cultivo y se dejó crecer a 37°C. Al alcanzar una densidad óptica de 0.7 se indujo el cultivo con 1 mM de IPTG y se redujo la temperatura a 30°C. Después de 12 horas, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El botón celular se resuspendió en buffer PPB (Apéndice A), se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y el precipitado se resuspendió en 5 mM de MgSO<sub>4</sub>. Nuevamente se incubó durante 20 minutos a 4°C y se centrifugó a 5000 rpm. Finalmente, tanto el sobrenadante de PPB como de MgSO<sub>4</sub> se centrifugaron a 15000 rpm a 4°C. Ambos sobrenadantes se recuperaron y mezclaron.

Para estandarizar las concentraciones de expresión de Fab quimérico, se utilizaron volúmenes de cultivo de 50 mL. Los extractos de proteína periplásmica se mezclaron con buffer de carga para geles de poliacrilamida en una proporción de 12.5 µL de buffer de carga por cada 50 µL de extracto periplásmico.

**Purificación del Fab quimérico.** El volumen de cultivo fue de 500 mL y el extracto periplásmico dializado contra PBS 1X. Se empleó 1 mL de resina de Ni<sup>2+</sup>-NTAgarose (QIAGEN), la cual se equilibró con 5 VC de buffer 20 mM de imidazol en PBS 1X. Después de cargar la muestra la columna se lavó con 5 VC de buffer 35 mM de imidazol en PBS 1X y las muestras se eluyó en 1 VC de buffer 250 mM de imidazol en PBS 1X.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### I. Generación y caracterización de los fragmentos Fab murinos.

**Digestión del AcM 5C10 y purificación de los fragmentos Fab.** La papaína es una cisteín-proteasa que en presencia de agentes reductores puede ser usada para digerir Acs en tres fragmentos, dos Fab y un Fc. La optimización de esta reacción consistió en determinar la concentración de cisteína y la proporción de papaína con respecto al AcM 5C10.

El AcM 5C10 se obtuvo a partir de líquido ascítico de ratones Balb/c, y se purificó por una columna de afinidad obteniendo un rendimiento de 1.4 mg de AcM por mL de líquido de ascitis.

En la figura 16 se muestra el patrón electroforético de la digestión del AcM 5C10. Los fragmentos generados, Fab y Fc, comparten un peso molecular aproximado de 50 KDa, sin embargo al reducir los puentes disulfuro se presentan como proteínas de 25 KDa. La papaína, tiene un peso molecular de 23 KDa. En la figura 16a se distingue fácilmente el Fab generado a partir de la digestión como una banda de aproximadamente 50 KDa. En la parte inferior del mismo carril se observan bandas de menor peso molecular que corresponden a la papaína y Fc. En condiciones reductoras, los tamaños de papaína y Fab son muy cercanos, por esta razón se puede observar un patrón de bandeado en el que se encuentran todos los componentes de reacción en la misma zona.

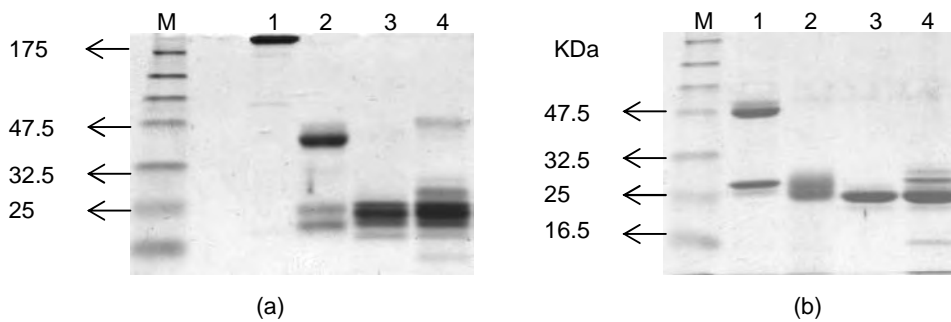


Figura 16. Análisis electroforético de la digestión del AcM 5C10 con papaína en condiciones (a) no reductoras y (b) reductoras. M. Marcador de peso molecular; 1. AcM 5C10; 2. Fab estándar de caballo; 3. Papaína; 4. Digestión del AcM 5C10.

Para la purificación de los fragmentos Fab se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico en FPLC utilizando dos columnas acopladas en tándem. En la figura 17 se puede observar el cromatograma correspondiente. La columna Hi-Trap SP FF retuvo a la papaína (Fig 18a), la Hi-Trap Q FF al Fc (Fig 18b) mientras que el Fab pasó libremente a través de ambas (Fig. 18c).

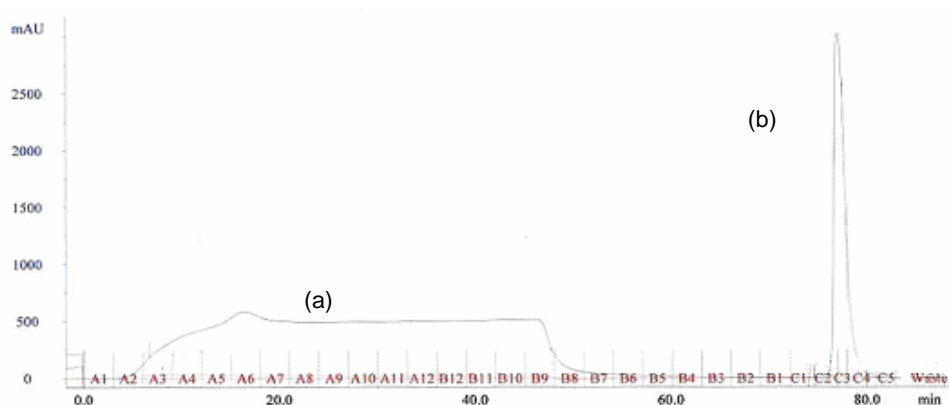


Figura 17. Cromatograma de la purificación por FPLC del Fab a partir de la mezcla de reacción con papaína. Columnas utilizadas: Hi-Trap Q FF y Hi-Trap SP FF. Las fracciones de la curva (a) pertenecen al material que no se unió a la columna, es decir, al Fab. Las fracciones de la curva (b) corresponden a la elución de las columnas, Hi-Trap Q FF y Hi-Trap SP FF.

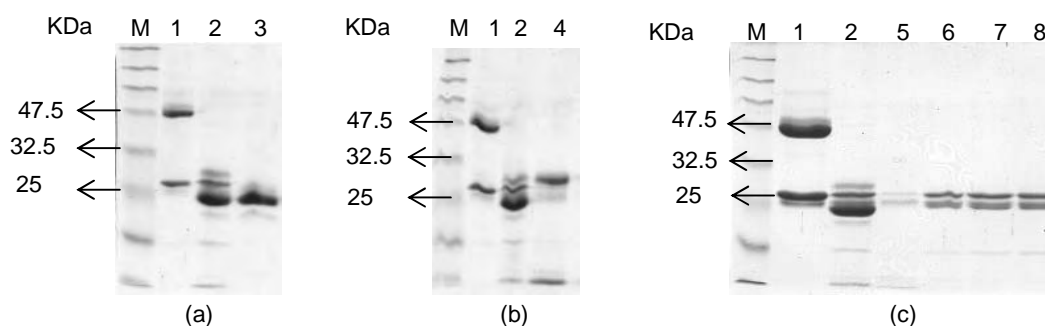


Figura 18. Análisis electroforético de las fracciones de la purificación del Fab por FPLC. (a) Proteína eluida de la columna Hi-Trap Q FF. (b) Proteína eluida de la columna Hi-Trap SP FF. (c) Proteína que no se retuvo en ninguna columna. M. Marcador de peso molecular 1; AcM 5C10; 2. Mezcla de reacción que fue inyectada en el FPLC; 3. Papaína; 4. Fc; 5-8. Fracciones de Fab.

Una vez identificadas las fracciones correspondientes al Fab, se dializaron contra PBS 1X y se concentraron a 1 mg/mL. En la figura 19 se muestra la migración electroforética de la muestra, en donde se observan un par de bandas de alto peso molecular, las cuales corresponden a una pequeña porción de Ac que no fue digerido apropiadamente. La papaína puede generar fragmentos Fab o  $F(ab)_2$  dependiendo de las condiciones en las cuales se realice la digestión. En ausencia de algún agente reductor se generan un fragmento  $F(ab)_2$  y el Fc. Debido al tamaño de alrededor de 100KDa de las bandas de alto peso molecular éstas podrían corresponder a fragmentos  $F(ab)_2$ . Por otro lado las bandas de bajo peso molecular pueden corresponder a fragmentos de Fc.

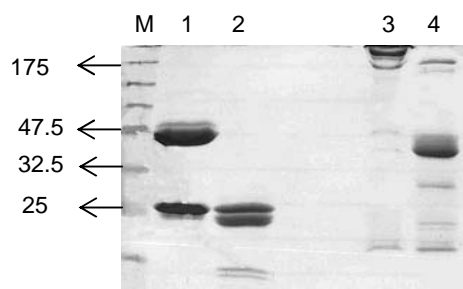


Figura 19. Análisis electroforético de la purificación del Fab del AcM después del FPLC. Muestras cargadas en cada carril. M. Marcador de peso molecular; 1. AcM 5C10 en condiciones reductoras; 2. Fab 5C10 en condiciones reductoras; 3. AcM 5C10 en condiciones no reductoras; 4. Fab 5C10 en condiciones no reductoras.

Para separar estos contaminantes se corrió una cromatografía de exclusión molecular (Fig 20). La primera fracción corresponde a los componentes de alto peso molecular. Dentro del pico de mayor tamaño (Fig. 20c) se puede observar un pequeño hombro (Fig 20b, tubos 36 a 39) que corresponden a la fracción  $F(ab)_2$  que se observa en la figura 19; el pico mayor corresponde al Fab. Para eliminar por completo al  $F(ab)_2$ , se seleccionaron los tubos 41 a 44. Finalmente se puede observar una última fracción, la cual corresponde a los fragmentos de bajo peso molecular.

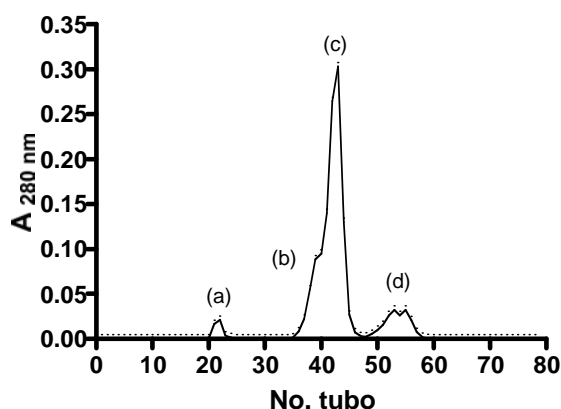


Figura 20. Cromatograma de la purificación por filtración en gel del Fab para eliminar al  $F(ab)_2$ . (a) Componentes de alto peso molecular. (b)  $F(ab)_2$  (c) Fab (d) Componentes de bajo peso molecular.

Después de la filtración en gel se concentró el Fab a 1 mg/mL usando una cámara de AMICON. En la figura 21 se puede observar su migración electroforética. Tanto en condiciones reductoras como no reductoras se observan ligeras bandas de bajo peso molecular, las cuales no se eliminaron en la cromatografía de filtración en gel, sin embargo esta contaminación se consideró despreciable. El rendimiento de la purificación del Fab fue del 20.5%.



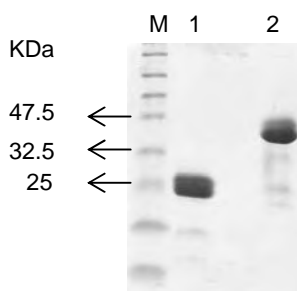


Figura 21. Análisis electroforético después de la purificación del Fab 5C10. M. Marcador de peso molecular; 1. Fab 5C10 en condiciones reductoras; 2. Fab 5C10 en condiciones no reductoras.

**Inmunoensayos por ELISA.** La determinación de la estabilidad del Fab murino 5C10 con respecto al AcM 5C10 se realizó con un ensayo de ELISA. Para ello se sensibilizó la placa con 5  $\mu$ g de la toxina *rL. reclusa* por pozo y se hicieron diluciones seriadas 1 a 3 a partir de 200 ng/pozo para el AcM 5C10 y su correspondiente Fab. En la figura 22 se observan las gráficas de reconocimiento tanto del AcM como del Fab.

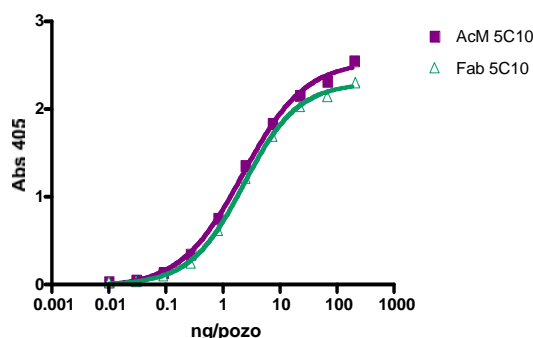
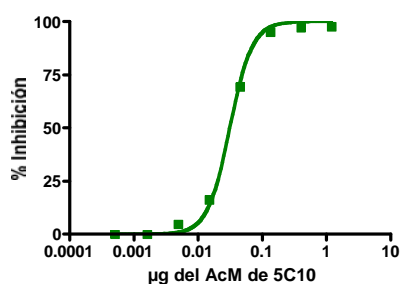


Figura 22. Ensayo de reconocimiento del AcM y Fab 5C10 contra la toxina recombinante *rL. reclusa*. Los valores de EC50 fueron de 2.2 (El intervalo de 95% de confianza cae dentro de 2 a 2.5) para el AcM y 2.3 para el Fab (El intervalo de 95% de confianza cae dentro de 2 a 2.7).

Tanto la curva del AcM completo como del Fab presentan el mismo comportamiento y los valores de EC50 son esencialmente los mismos. Por esta razón se concluyó que el fragmento Fab conserva tanto su estabilidad como la afinidad por la toxina *rL. reclusa*.

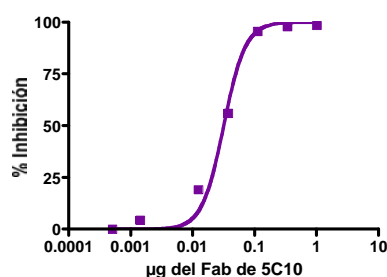
**Ensayos de inhibición enzimática *in vitro*.** Por un ensayo de inhibición *in vitro* (método Amplex™ Red) se determinó la capacidad neutralizante del Fab murino 5C10 y del AcM 5C10. En la figura 23 se muestran las curvas de inhibición enzimática. Se usaron 15 ng/pozo de la toxina *rL. reclusa* y se hicieron diluciones seriadas 1 a 3 comenzando con 1.2  $\mu$ g del AcM 5C10 y 1  $\mu$ g del Fab murino 5C10.

El AcM 5C10 presenta una EC50 de 0.031, lo cual corresponde a que 1 mg de AcM inhiba a 0.5 mg de Tx. Para el caso del Fab la EC50 es de 0.032, lo cual indica que 1 mg de Fab inhibe a 0.5 mg de Tx.



0.5 mg toxina son inhibidos por mg de AcM 5C10

(a)



0.5 mg toxina son inhibidos por mg de Fab murino 5C10

(b)

Figura 23. Ensayos de inhibición de la actividad enzimática de la toxina *rL. reclusa* por el (a) AcM 5C10 y el fragmento (El intervalo de 95% de confianza cae dentro de 0.02824 a 0.03439) (b) Fab 5C10 (El intervalo de 95% de confianza cae dentro de 0.02370 a 0.04181). Las pruebas se realizaron con el Kit Amplex™ Red.

Las relaciones molares Tx-Ac son: para el AcM de 1 a 0.5 y para el Fab de 1 a 1.4. El AcM es una molécula tres veces más grande que el Fab y presenta dos sitios de unión a antígeno, lo cual se traduce en el doble de avididad. La relación molar 1 a 0.5 indica que se une una molécula de toxina a cada sitio de unión del AcM. Esta proporción confirma la alta eficiencia de inhibición del AcM 5C10. Por otro lado la relación molar del Fab es mayor con respecto a la del AcM completo. Es importante recordar que el Fab es una molécula monovalente, por lo tanto si consideramos que el AcM tiene dos sitios de unión que está utilizando para dos moléculas de Tx, la diferencia entre el Fab y el AcM no es tan distinta.

Se necesita la misma cantidad de AcM y Fab para inhibir la misma cantidad de Tx (*rL. reclusa*), lo cual indica que el Fab funciona prácticamente de la misma manera que el AcM tanto para reconocer a la toxina como para inhibir su actividad.

Ensayos de neutralización de la letalidad. Dado que la actividad de la toxina está directamente relacionada con la letalidad, estos ensayos también miden la neutralización de la toxina pero en un sistema completamente distinto.

Se emplearon diferentes grupos de ratones los cuales se inyectaron con una mezcla previamente incubada de 3DL50 de la toxina *rL. reclusa* con diferentes concentraciones del AcM 5C10 o de su correspondiente Fab.

En la figura 24 se muestran las gráficas de mortalidad en ratones inyectados. Para el AcM, la DE 50 es de 84 µg, mientras que para el Fab es de 23 µg. Las relaciones molares toxina-Ac son: para el AcM de 1 a 1.5, mientras que para el Fab de 1 a 1.3.

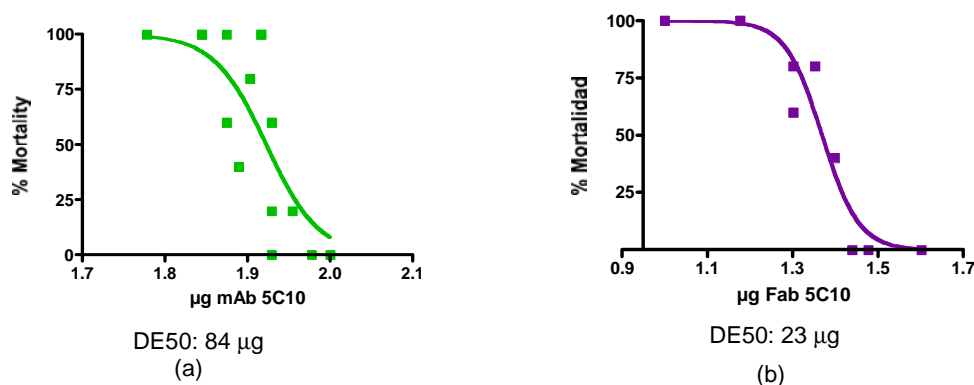


Figura 24. Determinación de la dosis efectiva media del (a) AcM 5C10 y el fragmento (El intervalo de 95% de confianza cae dentro del intervalo de 80 a 88) (b) Fab 5C10 (El intervalo de 95% de confianza cae dentro del intervalo de 22 a 25). Se usaron 3DL50 de *rL. reclusa* en ratones Balb-C de 18-20 g.

En términos de masa, se necesita una mayor cantidad de AcM que de Fab para inhibir la misma cantidad de toxina, sin embargo al comparar las proporciones molares, tanto el AcM como el Fab oscilan al rededor de 1.5.

Las diferencias entre los ensayos *in vitro* e *in vivo* se pueden atribuir a las características de cada sistema, sin embargo las diferencias se encuentran dentro de un rango altamente aceptable.

Este resultado reafirma que el Fab murino 5C10 es un fragmento de Ac estable que mantiene equiparablemente las características del AcM 5C10.

## II. Generación y caracterización de los fragmentos Fab quiméricos.

Amplificación de segmentos de DNA codificantes para el Fab del AcM 5C10. La estrategia consistió en diseñar los oligos antisentido en función de las secuencias reportadas para inmunoglobulinas IgG1 de ratón con cadenas ligeras tipo kappa. En el apéndice B se muestran las secuencias para las regiones constantes y el lugar de alineamiento tanto para el oligo de la cadena pesada (BisH5C10), como para el de la cadena ligera (OAL5C10).

Para los oligos sentido fue necesario obtener la secuencia del amino terminal de la proteína y en función de ella diseñar oligos degenerados. La secuencia fue obtenida por la técnica de degradación de Edman por el Dr. Fernando Zamudio.

Para la cadena ligera, la secuencia es:

D I L L T Q S P A I L S V S P G

En función de esta secuencia se diseñó el oligo OSL5C10 con un grado de degeneración de 72 el cual abarca los primeros seis aminoácidos del amino terminal.

Para la cadena pesada no fue posible obtener la secuencia del amino terminal, posiblemente el primer aminoácido se encuentra bloqueado, impidiendo la reacción de degradación de Edman. Por lo tanto, la estrategia para obtener la secuencia de esta cadena se sustituyó por un 5' y 3' RACE, con la cual se obtuvo el fragmento de DNA correspondiente a la cadena pesada que abarca desde el péptido señal hasta la región bisagra. En la figura 14 se presenta un esquema sobre la estrategia utilizada para la amplificación de esta cadena.

En ambos casos se extrajo RNA a partir de un cultivo del hibridoma 5C10. Para la cadena ligera se hizo una RT-PCR con los oligos OSL5C10 y OAL5C10. Para la cadena pesada se recurrió al 3' y 5' RACE (Fig. 14). En la figura 25a se muestra la amplificación para la cadena ligera y en la 25b de la cadena pesada.



Figura 25. Amplificación de las cadenas (a) ligera y (b) pesada del AcM 5C10. Para la cadena ligera se esperaba un fragmento de al rededor de 650 pb, mientras que para la pesada un fragmento de aproximadamente 750 pb.

Para la amplificación de la cadena pesada fue necesario recurrir a un recurso de PCR conocido como “hot start”, el cual consiste en adicionar la Taq polimerasa a la mezcla de reacción una vez que se alcanza la temperatura de desnaturalización para evitar la extensión de secuencias inespecíficas y aumentar un poco la temperatura de alineamiento.

**Obtención de la secuencia de las regiones variables del AcM 5C10.** El fragmento amplificado correspondiente a la cadena ligera se clonó en el vector TOPO. La secuencia correspondiente es:

```
GACATATTGT TGACCCAGTC TCCAGCCATC CTGTCTGTGA GTCCAGGAGA AAGAGTCAGT
TTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGCATACT ACTGGTATCA GCAAAGAACA
AATGGTTCTC CAAGGCTTCT CATAAAGTAT GTTTCTGAGT CTATCTCTAG GATCCCTTCT
AGGTTTAGTG GCAGTGGATC AGGGACAGAT TTTACTCTTA GCATCAACAG TGTGGAGTCT
GAAGATATTG CAGATTATTA CTGTCAACAG AGTTATAGCT GGCCAACCAC GTTCGGTGCT
GGGACCAAGC TGGAGCTGAA GCGGGCTGAT GCTGCACCAA CTGTATCCAT CTTCCCACCG
TCCAGTGAGC AGTTAACATC TGGAGGTGCC TCAGTCGTGT GCTTCTTGAA CAACTTCTAC
CCCAAAGACA TCAATGTCAA GTGGAAGATT GATGGCAGTG AACGACAAAA TGGCGTCTG
AACAGTTGGA CTGATCAGGA CAGCAAAGAC AGCACCTACA GCATGAGCAG CACCCTCACG
TTGACCAAGG ACGAGTATGA ACGACATAAC AGCTATACCT GTGAGGCCAC TCACAAGACA
TCAACTTCAC CCATTGTCAA GAGCTTCAAC AGGAATGAGT GT
```

Las secuencias obtenidas se compararon con las regiones constantes reportadas en el NCBI (Apéndice B) para inmunoglobulinas con cadena ligera tipo kappa de ratones Balb/c. Para el análisis de las secuencias se utilizaron los programas Gene Construction y ClustalW. Con esta información fue posible determinar la región variable  $V_L$  (en rosa) y la constante  $C_L$  (en negro). El tamaño del fragmento clonado fue de 642 nucleótidos.

En la correspondiente traducción de la secuencia anterior se observa que los primeros aminoácidos corresponden con los obtenidos por secuenciación directa del amino terminal del AcM 5C10, lo cual confirma que el fragmento amplificado corresponde al de este Ac.

**DILLTQSPAILSVPGERVFSRCSRASQSIGTSHHWYQQRINGSPRLLIKVSEISIRIPSRFSGSGSGTDFT  
LSINSVESEDIADYYCQQSYSWPTTFGAGTKLELKR**ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDI  
NVKWKIDGSRQNGVLNSWTNQDSKDYMSSTLTLYDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVYSFNRNEC

En cuanto a la cadena pesada, no fue posible clonar el fragmento amplificado en el vector TOPO. Posiblemente alguno de los extremos o ambos formaron alguna estructura que escondía las adeninas sobresalientes del fragmento de PCR, las cuales son indispensables para la clonación en TOPO. Por esta razón se secuenció directamente el producto de PCR. La secuencia que se obtuvo fue:

**ATGGGCAG** GCTTACTTTT TCATTCTTGC TACTGATTGT CCCTGCATAT GTCCTGTGCC  
AGGTTACTCT GAAAGAGTCT GGCCCTGGGA TATTGCAGCC CTCCCAGACC CTCATTCTGA  
CTTGTCTGT CTCTGGGTTT TCAGTGAGCA CTTCTACTTT GGGTGTAGGC TGGATTCTGC  
AGCCTTCAGG GAAGGGTCTG GAGTGGCTTT CACACATTTT GTGGAATGAG AGTCAGTTCT  
TTAACCCAAC CCTGAAGAGC CGGCTCACA TCTCCAAGGA TACCCACAAC GACCAGGTTT  
TCCTCAAGAT CGCCAATGTG GACTACTGAG ATAGTGCCAC ATATTACTGT GCTCGAAAAG  
CTGGGACTGG CTGGTACTTC GATGTCTGGG GCGCAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG  
CCAAAACGAC ACCCCCATCT GTCTATCCAC TGGCCCCTGG ATCTGCTGCC CAAACTAACT  
CCATGGTGAC CCTGGGATGC CTGGTCAAGG GCTATTTCCC TGAGCCAGTG ACAGTGACCT  
GGAACCTGAG ATCCCTGTCC AGCGGTGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTCTG CAGTCTGACC  
TCTACTCT GAGCAGCTCA GTGACTGTCC CCTCCAGCAC CTGGCCCAGC GAGACCGTCA  
CCTGCAACGT TGCCACCCG GCCAGCAGCA CCAAGGTGGA CAAGAAAATT **GTGCCAGGG**  
**ATTGTGGTTG TAAGCCTTGC ATATGTA**

Del análisis de la secuencia, se encontró que dentro del fragmento amplificado se localiza la región constante de la cadena pesada ( $C_H1$ ) y un fragmento de la bisagra de una inmunoglobulina de ratón. También se identificó el péptido señal (secuencia en verde) en donde se puede ubicar al codón de inicio "ATG". En naranja se marca la región variable del AcM 5C10, en negro la región  $C_H1$  y finalmente el fragmento en rojo pertenece a la región bisagra.

En función de la secuencia obtenida, se diseñó un oligo específico (OPLH5C10) para el extremo 5' de la cadena pesada, el cual se alinea en la región del péptido señal. Usando los oligos OPLH5C10 y BisH5C10 se amplificó la cadena pesada y se clonó en el vector TOPO.

El tamaño del fragmento de la cadena pesada desde la región variable hasta la región bisagra es de 788 pb.

**Ensamblaje del vector de expresión.** El vector pSyn-1 fue proporcionado por el laboratorio del Dr. Baltazar Becerril y está diseñado para la expresión del Fab quimérico BCF2, el cual inhibe al componente Cn2 del veneno de *C. noxius*<sup>(33)</sup>. Más adelante se presentan las secuencias de los marcos de lectura abiertos de la cadena ligera y pesada.

Para subclonar las regiones variables del AcM 5C10 se diseñaron oligos con los sitios de restricción *SfiI* y *RsrII* para la cadena ligera y *MluI* y *ApaI* para la cadena pesada. En la figura 26 se pueden observar las bandas amplificadas por PCR tanto de la cadena pesada como ligera con los sitios de restricción que se agregaron. Como templado se usaron las secuencias de cada cadena clonadas en TOPO.

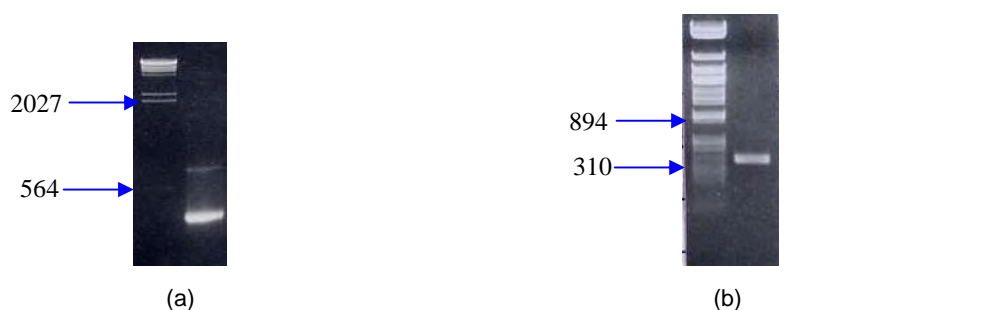


Figura 26. Amplificación por PCR de las regiones variables del AcM 5C10. (a) Cadena ligera con los sitios de restricción *SfiI* y *RsrII*. El tamaño esperado es de 371 pb. (b) Cadena pesada con los sitios de restricción *ApaI* y *MluI*. El tamaño esperado es de 400 pb.

Estos fragmentos se clonaron en el vector TOPO y el análisis de las clonas se realizó con las enzimas de los sitios de restricción introducidos (Fig. 27). La construcción en TOPO con la cadena ligera libera dos fragmentos, ya que el vector cuenta con un sitio interno *RsrII*.

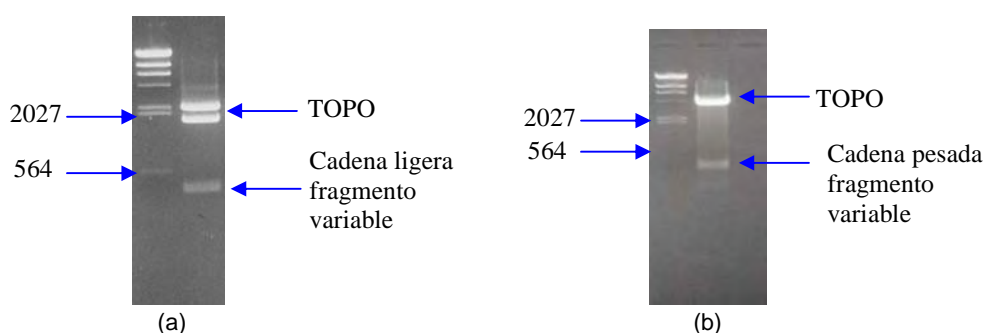


Figura 27. Análisis de las regiones variables del AcM 5C10 clonadas en TOPO. (a) Cadena ligera liberada al cortar con *SfiI* y *RsrII*. (b) Cadena pesada liberada al cortar con *ApaI* y *MluI*.

Los fragmentos se liberaron, se purificaron y se subclonaron en el vector pSyn-1. A continuación se muestra la secuencia de pSyn-5C10:

**ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC CCAGCCGGCC**  
**ATGGCCGACA TATTGTTGAC CCAGTCTCCA GCCATCCTGT CTGTGAGTCC AGGAGAAAGA**  
 GTCAGTTTCT CCTGCAGGGC CAGTCAGAGC ATTGGCACAA GCATACACTG GTATCAGCAA  
 AGAACAAATG GTTCTCCAAG GCTTCTCATA AAGTATGTTT CTGAGTCTAT CTCTAGGATC  
 CCTTCTAGGT TTAGTGGCAG TGGATCAGGG ACAGATTTTA CTCTTAGCAT CAACAGTGTG  
 GAGTCTGAAG ATATTGCAGA TTATTACTGT CAACAGAGTT ATAGCTGGCC AACCACGTTT  
 GGTGCTGGGA CCAAGCTGGA GCTGAAAGCGG CGGACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC  
 TTCCC GCCAT CTGATGAGCA GTTGAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT  
 AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT  
 AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC  
 ACCCTGACCG TGAGCAAAG AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CAAGTCACC  
 CATCAGGGCC TGAGCTCGCC GCTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTAAGCTGAT  
 CCTCTACGCC GGACGCATCG TGGCCCTTGT ACACAAGTTC ACGTAAAAAG GGTATCTAGA  
 GGTGAGGTG ATTTT**ATGAA AAAGAATATC GCATTTCTTC TTGCATCTAT GTTCGTTTTT**  
**TCTATTGCTA CAAACGCGTA CGCTCAGGTT ACTCTGAAAG AGTCTGGCCC TGGGATATTG**  
 CAGCCCTCCC AGACCCTCAT TCTGACTTGT TCTGTCTCTG GGTTCCTCAGT GAGCACTTCT  
 ACTTTGGGTG TAGGCTGGAT TCGTCAGCCT TCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GCTTTTCACAC  
 ATTTTGTGGA ATGAGAGTCA GTTCTTTAAC CCAACCCTGA AGAGCCGGCT CACAATCTCC  
 AAGGATACCC ACAACGACCA GGTTCCTC AAGATCGCCA ATGTGGACAC TGCAGATAGT  
 GCCACATATT ACTGTGCTCG AAAAGCTGGG ACTGGCTGGT ACTTCGATGT CTGGGGCGCA  
 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA  
 CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC  
 TTCCC GAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCC TGACCAGCGG CGTGCACACC  
 TTCCC GGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC  
 TCCAGCAGCT TGGGCACCCA GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC  
 AAGGTCGACA AGAAAGTTGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CGCCGCGGAA  
 CAAAACTCA TCTCAGAAGA GGATCTGAAT GGGGCCGCAC ATCACCATCA TCACCATTAA

La secuencia en rojo corresponde al péptido señal pelB y STII; en rosa la región variable de la cadena ligera de 5C10; en azul la región constante de la cadena ligera humana; en negro el sitio de unión a ribosomas; en naranja la región variable de la cadena pesada de 5C10; en verde la región C<sub>H1</sub> de la cadena humana y en morado la secuencia de C-Myc, cola de histidinas y codón de paro. A continuación se presenta la secuencia de las proteínas que se generaron a partir de esta secuencia:

Cadena ligera:

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADILLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTSHHWYQQR TNGSPRLLIK  
 VSEISIRIPSRFSSSGTDFTL SINSVESEDIADYYCQQSYSWPTTFGAGTKLELKRRTVAAPSVFIFPPSD  
 EQLKSGTASVVCLLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQEVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACE  
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC•

Cadena pesada:

MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYAQVTLKESGPGILQPSQTLILTCSVSGFSVSTSTLGVGWIRQPSGKLEW  
 LSHILWNESQFFNP TLKSRLTISKDTHNDQVFLKIANVDTADSATYYCARKAGTGWYFDVWGAGTTVTVSSA  
 STKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS  
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCAAEQKLI SEEDLNGAHHHHHH•

El código de colores de las secuencias proteicas corresponde al de las secuencias nucleotídicas. Las cisteínas, responsables de la formación de los puentes disulfuro, se encuentran marcadas en negro. La cola de 6 histidinas permitió la purificación por afinidad de la proteína recombinante usando una columna de Ni-NTA. Los péptidos señal permitieron el transporte de las proteínas al espacio periplásmico, en donde se

cortaron, dejando a ambas cadenas en un ambiente que favoreció la formación de los puentes disulfuro.

La cadena ligera tiene una longitud de 237 aminoácidos, de los cuales 22 corresponden al péptido señal, 109 a la región variable y 106 a la constante. Por otro lado, la cadena pesada tiene 274 aminoácidos, de los cuales 23 pertenecen al péptido señal, 120 a la región variable, 111 a la región constante y 20 a C-Myc y la cola de histidinas.

**Expresión del fragmento Fab quimérico 5C10.** Debido a la experiencia del laboratorio del Dr. Becerril con el Fab quimérico BCF2, la construcción pSyn-5C10 se transformó en células competentes de *E. coli* cepa TG1. Para el análisis de expresión se liberaron las proteínas de espacio periplásmico por un choque osmótico y se corrió un gel de SDS-PAGE. Se analizaron entre 30 y 40 clonas, en la figura 28 se muestran algunas de las clonas utilizadas para esta inducción. Sin embargo no fue posible distinguir la sobreexpresión de ninguna proteína.

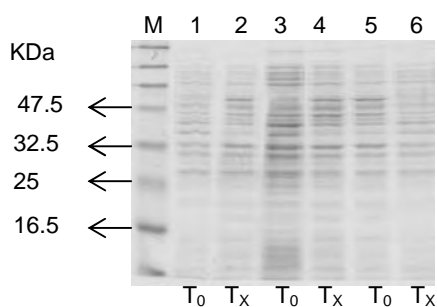


Figura 28. Análisis electroforético por SDS-PAGE de la expresión del Fab quimérico 5C10. M. Marcador de peso molecular; Carriles 1 y 2 clona 1 con pSyn-5C10; Carriles 3 y 4 clona 2 con pSyn-5C10; Carriles 5 y 6 Clona 3 con pSyn-5C10; T<sub>0</sub> corresponde a la toma de muestra en el momento de la inducción y T<sub>x</sub> al término de la misma.

Como técnica alternativa se empleó el Western blot, utilizando como Ac primario un suero de conejo anti-IgG humano. Se utilizaron, como controles, dos cultivos de *E. coli* cepa TG1, uno de ellos sin transformar (carriles 1 y 2) y otro transformado con la construcción de BCF2 (carriles 5 y 6)

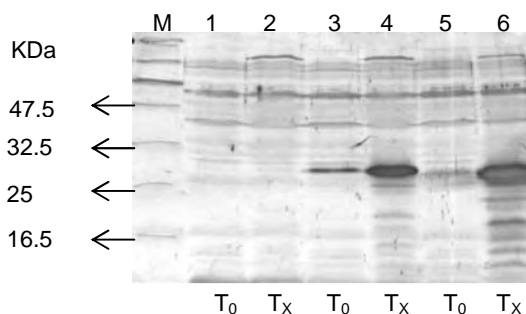


Figura 29. Análisis por Western blot de la expresión del Fab quimérico 5C10 en la cepa de *E. coli* TG1. M. Marcador de peso molecular. Las muestras corresponden a las proteínas de espacio periplásmico. En los carriles 1 y 2 se presenta la expresión de la cepa TG1 sin transformar. En los carriles 3 y 4 la expresión de pSyn-5C10 y



en los carriles 5 y 6 de pSyn-1. T<sub>0</sub> corresponde a la toma de muestra en el momento de la inducción y T<sub>x</sub> al término de la misma.

En el carril 4 se distingue una proteína sobre-expresada de un peso aproximado a 29 KDa, la cual corresponde a la cadena pesada del Fab quimérico. A pesar de que la cadena ligera no se distingue en el Western blot no significa que no esté, ya que el suero puede estar enriquecido de Acs contra la cadena pesada y no contra la ligera.

También se distingue una expresión basal de la cadena pesada (carril 3) tanto para la construcción de pSyn-5C10 como de pSyn-1. La expresión del Fab quimérico de 5C10 es inferior que la del control, por lo cual el rendimiento será menor a 1.1 mg/L<sup>(33)</sup> de cultivo.

Un parámetro que puede influenciar drásticamente en el nivel de expresión de una proteína recombinante es la cepa que se utiliza, por lo cual también se probaron las cepas de *E. coli* M15 y BL21 pLys y BL21 GOLD. Para todas las cepas se analizaron por lo menos 30 clones. Sin embargo en los resultados se presenta sólo un ejemplo representativo en cada caso.

No hubo expresión de la proteína recombinante en ninguna cepa de BL21. Por otro lado en la cepa M15 sí se detectó expresión de la proteína, pero el nivel de expresión no aumentó en comparación con la cepa TG1. En la figura 30, se muestra la comparación entre la expresión en las cepas TG1 y M15.

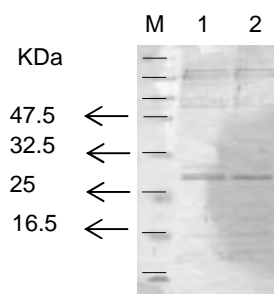


Figura 30. Análisis por Western blot de la expresión del Fab quimérico 5C10 en la cepa M15 (carril 1) y TG1 (carril 2). M. Marcador de peso molecular.

Debido a la experiencia previa del Fab quimérico BCF2<sup>(33)</sup> se eligió trabajar con la cepa TG1.

La temperatura óptima es otro parámetro importante de establecer. *E. coli* es una bacteria cuya temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, sin embargo para la expresión de proteínas recombinantes se disminuye. Esto se debe a que al bajar su metabolismo la velocidad de síntesis de proteína es más lenta y se favorece el correcto transporte y/o plegamiento. Por esta razón se expresó la proteína a 30 °C y a 25 °C (Fig 31).

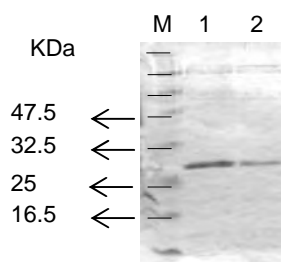


Figura 31. Análisis por Western blot de la expresión del Fab quimérico 5C10 en la cepa TG1 a 30°C (carril 1) y 25°C (carril 2). M. Marcador de peso molecular.

La expresión fue mayor a 30°C que a 25°C, por lo cual se manejó esta temperatura para el resto de las inducciones.

Finalmente el último parámetro por estandarizar fue la concentración de IPTG, para lo cual se emplearon cuatro condiciones distintas, 1 mM, 0.6 mM, 0.3 mM y 0.1 mM.

En la figura 32 se puede observar que la mejor expresión se logró a 1 mM de IPTG.

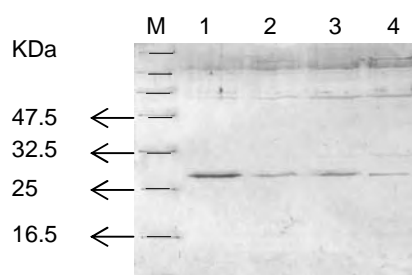


Figura 32. Análisis por Western blot de la expresión del Fab quimérico 5C10 en la cepa TG1 a 30°C con diferentes concentraciones de IPTG. M. Marcador de peso molecular; 1. Inducción con 1 mM IPTG; 2. Inducción con 0.6 mM IPTG; 3. Inducción con 0.3 mM IPTG; 4. Inducción con 0.1 mM IPTG.

Finalmente, las condiciones de expresión fueron, para la cepa TG1, a 30°C con una concentración de IPTG de 1 mM.

La purificación de proteína se hizo por cromatografía de afinidad utilizando una resina de Ni<sup>2+</sup>-NTA (Fig. 33). La cadena pesada es la única con cola de histidinas por lo tanto la aparición de ambas cadenas indica que se formó el puente disulfuro que las mantiene unidas.

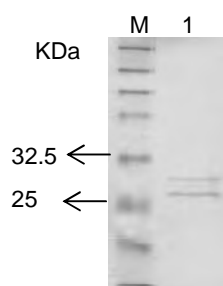


Figura 33. Análisis por SDS-PAGE del Fab quimérico 5C10 por una columna de Ni-NTA (QUIAGEN) M. Marcador de peso molecular; 1. Fab quimérico.

Los rendimientos fueron aleatorios, siendo el máximo de 62  $\mu\text{g/L}$ . El rendimiento reportado para el Fab quimérico BCF2, proveniente del mismo vector de expresión es de 1.1 mg/L<sup>(33)</sup>, por lo que aún para este sistema el rendimiento es muy pobre.

Algunos de los factores que podrían causar este rendimiento tan bajo son:

- Al analizar la expresión de proteína total y la que llega a periplasma fue notorio que gran parte de proteína recombinante se queda en el citoplasma (resultados no mostrados), lo cual reduce significativamente los rendimientos.
- Que se expresara en menor proporción alguna de las dos cadenas, reduciendo también la cantidad de Fab que pudieran formarse en periplasma. Este análisis podría llevarse a cabo montando un Western blot cuantitativo y utilizando un Ac que reconociera específicamente a la cadena ligera.
- Para la expresión de algunos Fab quiméricos, en el laboratorio del Dr. Becerril, se ha corregido el uso de codones preferenciales para *E. coli*, encontrando un incremento en la producción. Sin embargo, esto depende de cada proteína, ya que para el caso de otras proteínas aún sin realizar esta corrección se presentan rendimientos mayores.

Como seguimiento del análisis del Fab quimérico obtenido se realizó un análisis por Western blot con diferentes Acs. Se usó un Ac de cabra anti- IgG de ratón (Fig 34a), el cual, como se esperaba reconoció ambas cadenas. La intensidad fue muy baja debido a que la porción murina del Fab se limita a las regiones variables, las cuales son las menos conservadas. Otro Ac fue un Ac cabra anti-C-Myc (Fig 34b), el cual sólo reconoció a la cadena pesada, ya que es la que posee dicho péptido. Y al usar el suero de conejo anti- IgG humana (Fig 34c), sólo reconoció a la cadena pesada, lo cual confirma que el suero está enriquecido con Acs contra la cadena pesada y no reconoce a la cadena ligera aún cuando está presente.

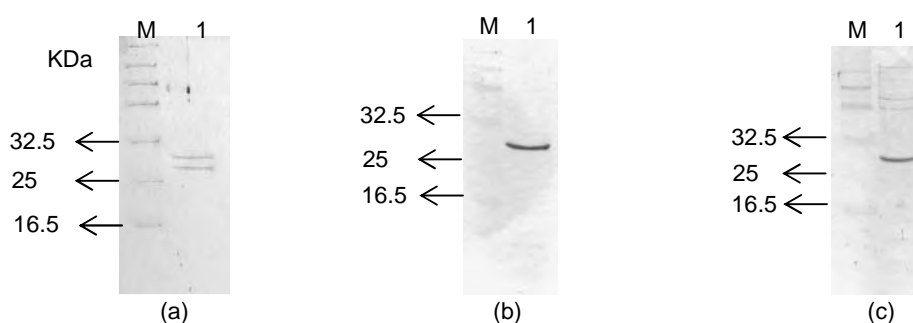


Figura 34. Análisis del Fab quimérico 5C10 por Western blot. Se usaron diferentes Acs primarios, (a) cabra anti-ratón (b) cabra anti-C-Myc y (c) suero de conejo anti-humano. M. Marcador de peso molecular.

A pesar de los bajos rendimientos se demostró que el Fab producido es una proteína quimérica cuya secuencia se correlacionó con su migración electroforética y fue reconocida por diferentes Acs en ensayos de Western blot. Por esta razón se continuó con un ensayo de inhibición *in vitro*.

Se utilizó 1  $\mu$ g de Fab quimérico y 15 ng de toxina rL. *reclusa*. Del ensayo de inhibición previo con el Fab murino, se determinó que con 1 mg de Fab se inhiben 0.5 mg de la toxina. Si el Fab quimérico conservara las propiedades del Fab murino, con 30 ng de proteína se inhibirían 15 ng de toxina. Aún cuando su capacidad inhibitoria fuera la décima parte de la del murino se necesitarían 300 ng de Fab quimérico. Sin embargo, no se detectó inhibición alguna.

El Fab quimérico 5C10 expresado en estas condiciones no fue capaz de inhibir la actividad enzimática de la SMD. Aún cuando sólo ha sido substituida la secuencia de los dominios constantes, quienes no participan en la interacción Ag-Ac, la exposición de las regiones hipervariables o CDR pudo verse afectada de tal manera que la proteína recombinante fue incapaz de inhibir a la SMD. A pesar de que las secuencias de las regiones constantes ya fueron utilizadas para la expresión de un Fab quimérico<sup>(33)</sup> el cual conservó su capacidad de inhibición, la secuencia de la región variable de este Fab es diferente lo cual la convierte en otra proteína y por lo tanto las interacciones requeridas para un correcto plegamiento son distintas.

La expresión de proteínas recombinantes es un proceso que se ha ido desarrollando y elucidando poco a poco, sin embargo aún quedan muchos detalles que no se comprenden por completo. Por ejemplo, un sistema puede funcionar muy bien para una proteína y no así para otra aún cuando compartan gran parte de su secuencia. Para el caso particular del AcM 5C10, el sistema de expresión en *E. coli* con transporte de la proteína a periplasma y bajo las condiciones de expresión que se probaron provee muy bajos rendimientos y la proteína pierde funcionalidad.

## Conclusiones

Se generaron y purificaron fragmentos Fab a partir del AcM 5C10. Como parte de la evaluación de la estabilidad de este fragmento se determinó su capacidad neutralizante tanto *in vitro* como *in vivo*. Su comportamiento es muy parecido al del AcM y la relación molar del Fab con respecto a la toxina rL. *reclusa* oscila al rededor de 1.5. De estos resultados se puede concluir que el Fab es un fragmento estable que mantiene las propiedades del AcM.

También se amplificaron y clonaron las regiones correspondientes a los fragmentos variables del AcM 5C10 a partir de un cultivo del hibridoma. Aunque se logró la expresión del Fab quimérico 5C10 el proceso es aleatorio y el mayor rendimiento alcanzado fue de 62 µg/L. Al medir su capacidad neutralizante se encontró que el Fab quimérico perdió esta capacidad.

La expresión del Fab quimérico de 5C10 en el sistema de *E. coli* con migración de la proteína al espacio periplásmico, no fue un sistema eficiente para la expresión de este fragmento de anticuerpo.

## Perspectivas

- La secuencia obtenida a partir del hibridoma no fue corregida para el uso preferencial de codones para *E. coli* y aunque se pueden citar ejemplos en los que los rendimientos de expresión no dependen de dicha corrección también se pueden citar otros en los que se ha visto un aumento en los rendimientos. Por ello esta es una estrategia que puede implementarse.
- Si se expresan por separado ambas cadenas dejándolas en citoplasma, pueden recuperarse para hacer un replegamiento *in vitro* y controlar la proporción de ambas cadenas para favorecer el correcto plegamiento. Además existen diferentes sistemas de replegamiento para Fab ya reportados.
- Otra opción consiste en el cambio de sistema. Por ejemplo tanto la expresión en células de mamífero como en baculovirus permiten la clonación de fragmentos mayores y hay reportes de expresión de anticuerpos completos. Sin embargo hay que considerar colaboraciones con otros grupos que cuenten con mayor experiencia.

## Bibliografía

1. Adamczyk M, Gebler JC, Wu J. 2000. Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry. *Journal of Immunological Methods*; 237:95–104
2. Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Watson James. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. Fourth edition. New York.
3. Bennett KL, Smith SV, Truscott RJW, Sheil MM. 1997. Monitoring Papain Digestion of a Monoclonal Antibody by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*; 245:17–27
4. Borrebaeck, C. A. K., *Antibody Engineering*. Oxford. Second edition.
5. Braz Adriana, Minozzo Joao, Abreu José C., Gubert Ida C. and Chávez-Olórtegui Carlos. 1999. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon*; 37: 1323-1328.
6. Breedveld F. C. 2000. Therapeutic monoclonal antibodies. *The lancet*; 355: 735-740.
7. Carter PJ. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*. 6(5):343-357.
8. Chu L., Robinson D. K. 2001. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current opinion in Biotechnology*. 12: 180-187.
9. Da Silva PH, da Silveira RB, Appel MH Mangili OC, gremski W, Veiga SS. 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*; 44: 693-709
10. Davies DR, Cohen GH. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93:7-12.
11. De Roodt, A.R., Salomón, O.D., Lloveras, C.S. & A.T. Orduña. 2002. Envenenamiento por arañas del género *Loxosceles*. Artículo especial, *Medicina (Buenos Aires)*; 62: 83-94
12. Dyachenko P., etc, Epidemiological and clinical manifestations of patients hospitalized with brown recluse spider bite.
13. Fernandes-Pedrosa, M.F., Junqueira de Azevedo, I.L., Gonçalves de Andrade, R.M., van den Verg, C.W.; Ramos, C.R., HO, P.L. & D.V. Tambourgi. 2002. Molecular cloning and expresion of a functional dermonecrotic and hemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 298: 638-645
14. Foelix Rainer. *Biology of spiders*. Oxford University Press. Second edition. NewYork, 1996.
15. Gavilondo Jorge V. *Anticuerpos monoclonales. Teoría y Práctica*. Elfos Scientiae, la Habana, 1995.
16. Glennie M.J.; Johnson P.W.M. 2000. Clinical trials of antibody therapy. *Immunology Today*. 21(8):403-410

17. Hayden M. S., Gililand L. K., Ledbetter J. A. 1997. Antibody engineering. *Current opinion in immunology*. 9: 201-212.
18. Hoffmann Anita. El maravilloso mundo de los arácnidos. Fondo de cultura económica. Colección La ciencia para todos, 116. Segunda edición. México, D.F., 1999.
19. Humphreys DP, Carrington B, Bowering LC, Ganesh R, Sehdev M, Smith BJ, King LM, Reeks DG, Lawson A, Popplewell AG. 2002. A plasmid system for optimization of Fab' production in *Escherichia coli*: importance of balance of heavy chain and light chain synthesis. *Protein Expression and Purification*; 26 : 309-320
20. Hurtado Jaime G., Sotelo Norberto, Ibarra Rodrigo. 2005. Envenenamiento por *Loxosceles reclusa* (araña "parda"). *Revista Mexicana de Pediatría*; 72(2): 85-88.
21. Invitrogen. 2002. Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques. 1-30.
22. Jana S., Deb J. K. 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 289-298.
23. Janeway Charles, Travers Paul, Walport Mark, Shlomchik Mark. *Inmunobiology*. Oxford. Sixth edition.
24. Lee MH, Kwak JW. 2003. Expression and functional reconstitution of a recombinant antibody (Fab') specific for human apolipoprotein B-100. *J Biotechnol.* 101(2):189-198.
25. Little M, Kipiriyarov S.M., Gall Le F., Moldenhauer. 2000. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunology today*. Review; 21 (8): 364-370.
26. Maeda F., Nagatzuka Y., Ihara S., Aotsuka S., Ono Y., Inoko H., Takekoshi M. 1999. Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody Fab fragment against Hepatitis B surface antigen. *Journal of medical Virology*. 58: 338-345.
27. Masiac Yves. 1996. *Las arañas*. Editorial Vecchi. Barcelona 1996.
28. National Center for Biotechnology Information.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>
29. Ning D, Junjian X, Xunzhang W, Wenyin C, Qing Z, Kuanyuan S, Guirong R, Xiangrong R, Qingxin L, Zhouyao Y. 2003. Expression, purification, and characterization of humanized anti-HBs Fab fragment. 134(6):813-817.
30. Olvera Alejandro, Ramos-Cerrillo Blanca, Estévez Judith, Clement Herlinda, De Roodt Adolfo, Paniagua-Solís Jorge, Vázquez Hilda, Zavaleta Alfonso, Salas María, Stock Roberto P., Alagón Alejandro. 2006 North and South American *Loxosceles* spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant Sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon*; 48(1):64-74
31. Platnick, N.I. 2003. The world spider catalog, version 6.5. American Museum of Natural History, on line at: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog81-87/index.html>

32. Quintana Juan C., Otero Rafael. 2002. Envenenamiento aracnídico en las Américas. MEDUNAB; 5 (13): 14-22.
33. Quintero-Hernández V., Juárez-González V. R., Ortíz-León M., Sánchez R., Lourival D. P., Becerril B. 2007. The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies. *Molecular Immunology*; 44(6):1307-1315.
34. Ramos-Cerrillo Blanca, Olvera Alejandro, Odell George V., Zamudio Fernando, Paniagua-Solís Jorge, Alagón Alejandro, Stock Roberto P. 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North America fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon*; 44: 507-514.
35. Reichert Janice M. 2001. Monoclonal antibodies in the clinic. *Nature Biotechnology*; 19(9):819-822.
36. Ríos Juan, Pris M. Enrique, Werner, Ristori Leonardo, Ramírez Gloria. 2004. Guía clínica para el manejo de mordedura de la araña del rincón *Loxosceles laeta*. *Revista médica de Chile*; 1-8.
37. Sams HH, Dunnick CA, Smith ML, King LE Jr. 2001. Necrotic arachnidism. *J. Am Acad Dermatol.*; 44(4): 561-573.
38. Schillberg S., Fischer R., Emans N. 2002. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and molecular life sciences*. 60: 433-445.
39. Swartz JR. 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12(2):195-201.
40. Ubick D., Paquin P., Cushing P.E., Roth V.(eds). 2005. Spiders of North America: an identification manual . American Arachnological Society
41. Verma R., Boleti E., George A. J. T. 1998. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of immunological methods*. 216: 165-181.



## Apéndice A

### Soluciones y reactivos

Buffer de fosfatos (PBS 10X). Disolver 80 g de NaCl (1.36 M), 2 g de KCl (26.8 mM), 14.4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (101.4 mM) y 2.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (17.6 mM) en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 10 N. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Esterilizar la solución en autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq en ciclo líquido.

Buffer Tris-acetato(TAE 1X). Disolver 4.84 g de Tris-(hidroxi)- aminometano en 500 mL de agua destilada, agregar 2 mL de una solución de EDTA 0.5 M pH 8. Aforar a 1 L con agua destilada.

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins). Cada gel está compuesto por un gel concentrador y uno separador. A continuación se muestra la composición de cada uno.

#### Gel concentrador.

Buffer superior	630 µL
Solución de acrilamida	330 µL
Agua	1.54 mL
TEMED*	2.5 µL
Persulfato de amonio	12.5 µL

#### Gel separador.

Buffer inferior	1.5 mL
Solución de acrilamida	2.5 mL
Agua	2 mL
TEMED*	5 µL
Persulfato de amonio	20 µL

TEMED – N,N,N',N'-terametiletilendiamina

*Solución de acrilamida* (30 % acrilamida + 0.8 %bisacrilamida). Disolver 49.5 g de acrilamida más 1.32 g de bis N,N'-metilen-bis-acrilamida en 165 mL de agua destilada.

*Buffer superior* (0.5 M de Tris + 0.4 % SDS). Disolver 6.06 g de Tris-(hidroxi)- aminometano en 50 mL de agua destilada y adicionar 2 mL de SDS 20 %. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL.

*Buffer inferior* (1.5 M de Tris + 0.4 % de SDS). Disolver 18.7 g de Tris base en 50 mL de agua destilada y adicionar 2 mL de SDS al 20 %. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL.

*Dodecil sulfato de sodio* (SDS – 20 %). Disolver 10 g de SDS en 100 mL de agua destilada.

*Persulfato de amonio* (10 %). Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada.

*Buffer de corrida 10 X* (0.25 M Tris + 0.19 M glicina + 0.1 % SDS). Disolver 15.2 g de Tris-(hidroxi)- aminometano y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua destilada y adicionar 25 mL de SDS 20 %. Ajustar el pH a 8.6 con 10 M NaOH. Aforar a 500 mL.

*Buffer de muestra desnaturalizante 2X* (10 % glicerol + 2.5 % SDS + 50 mM Tris-HCl pH 6.8 + 5 % 2-β-mercaptoetanol + 0.002 % azul de bromofenol). Mezclar 1 mL de glycerol, 1.25 mL de SDS 20 %, 0.5 mL de 1 M Tris-HCl pH 6.8, 0.5 mL de 2-β-mercaptoetanol y 0.2 mL de 1 % azul de bromofenol. Aforar a 10 mL con agua destilada.

*Solución de Coomassie para tenciór* (50 % metanol + 10 ácido acético + 0.2 % de azul de Coomassie G250). Disolver 1 g de azul de Coomassie G250 en 250 mL de metanol, 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con agua destilada.

*Solución para desteñir* (10 % metanol + 10 % ácido acético). Mezclar 50 mL de metanol y 50 mL de ácido acético. Aforar a 500 mL de agua destilada.

Digestión de un anticuerpo monoclonal con papaína.

La solución de cisteína debe de ser preparada el día en que se va a utilizar.

*Buffer de reacción (1 mM EDTA + 50 mM buffer de fosfatos + 10 mM cisteína).* Mezclar 10 mL de EDTA 10 mM, 5 mL de un buffer de fosfatos 1 M pH6.3 y 10 mL de cisteína 100 mM. Aforar a 100 mL con agua destilada.

*Buffer de activación(1 mM EDTA + 50 mM buffer fosfatos + 10 mM cisteína).* Mezclar 2 µL de EDTA 10 mM, 1 µL de buffer de fosfatos 1 M pH 7 y 2 µL de cisteína 100 mM. Aforar a 200 µL con agua destilada.

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

*Solución S (100 mM NaHCO<sub>3</sub>).* Disolver 4.2 g de NaHCO<sub>3</sub> en 450 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 9.5 con NaOH 10 N. Aforar a 500 mL.

*Solución L(150 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl + 0.05 % Tween 20).* Disolver 1.46 g de NaCl en 700 mL de agua destilada. Agregar 50 mL de Tris-HCl pH8 1 M y aforar a 1 L. Agregar 500 µL de Tween 20.

*Solución B (0.5 % gelatina + 50 mM Tris-HCl + 0.05 % Tween).* Disolver 2.5 g de gelatina en 350 mL de agua destilada. Agregar 25 mL de Tris-HCl pH 8 1 M y aforar a 500 mL. Agregar 250 µL de Tween 20.

*Solución R (500 mM NaCl+ Tris-HCl+ 0.1 % gelatina + 0.05 % Tween 20).* Disolver 0.5 g de gelatina y 14.61 g de NaCl en 350 mL de agua destilada. Agregar 25 mL de Tris-HCl pH8 1 M. Aforar a 500 mL y agregar 250 µL de Tween 20.

Cultivo del hibridoma 5C10.

*Medio DMEM.* Se disuelve el contenido de un sobre en 1 L de agua destilada estéril con agitación, se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio y se ajusta el pH a 7 burbujeando CO<sub>2</sub>, la medición se rehace con un papel de pH. Se esteriliza por filtración y se almacena a 4°C en frascos estériles de 500 mL.

*Medio completo A.* Se agrega a 889 mL de medio DMEM, 10 mL de glutamina 100X y 1 mL de antibióticos 1000X. Se afora a 1000 mL con agua destilada.

*Glutamina 100X.* Se prepara L-glutamina a una concentración 200 mM con agua destilada y se esteriliza por filtración.

*Antibióticos 1000X.* Se disuelve 1 g de ampicilina y 1 g de estreptomina en 10 mL de agua destilada y se esteriliza por filtración.

Cultivo de células bacterianas.

*Medio YT2X.* Disolver 5 g de NaCl, 10 g de extracto de levadura y 16 g de triptona en 900 mL de agua destilada. Aforar a 1 L y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq en ciclo líquido.

*Medio SOC.* En 900 mL de agua destilada se disolver 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 0.5 g de NaCl. Agregar 10 mL de una solución 250 mM de KCl. Aforar a 1 L y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq en ciclo líquido. Agregar 20 mL de de glucosa estéril 20 mM.

*Medio Luria-Bertani (LB)*. Disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 900 mL de agua destilada. Aforar a 1 L y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq en ciclo líquido. Para preparar medio sólido, agregar 15 g/L de agar y vaciar en cajas Petri.

Soluciones para expresión de Fab quimérico recombinante.

*Buffer PPB (200 mg/L sacarosa+1 mM EDTA+30 mM Tris-HCl)*. Se disuelven 100 g de sacarosa en 50 mL de una solución de EDTA 10 mM y agregar 15 mL de una solución de Tris-HCl pH8 1 M. Aforar a 500 mL.

## Apéndice B

Secuencias utilizadas en los alineamientos para el diseño de oligonucleótidos.

Extremo carboxilo de la cadena ligera.

DEFINITION Mus musculus clone 25-D1.16 immunoglobulin kappa light chain mRNA, complete cds. ACCESSION AY704179

661 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag

DEFINITION Mus musculus anti-human platelet glycoprotein GPIIBIIIA monoclonal antibody kappa light chain VC region mRNA, partial cds. ACCESSION AY672134

601 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt

DEFINITION Mus musculus anti-glycophorin A type N immunoglobulin light chain constant region mRNA, partial cds. ACCESSION DQ140176

241 cgacataaca gctatacctg tgaggccact cacaagacat caacttcacc cattgtcaag  
301 agcttcaaca ggaatgagt t

DEFINITION Mus musculus monoclonal antibody BBK-2 light chain mRNA, complete cds. ACCESSION AF466770

661 acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca tcaacttcac ccattgtcaa  
721 gagcttcaac aggaatgagt gttagagaca aaggctctga gacgccacca ccagctcccc

DEFINITION Mus musculus mRNA for immunoglobulin kappa light chain, partial cds, anti-malathion monoclonal antibody MLT40-4. ACCESSION AB097850

601 aacagctata cctgtgaggc cactcacaag acatcaactt cacccattgt caagagcttc  
661 aacaggaatg agtgtagag acaaaggtcc tgagacgcca ccaccagctc cccagctcca

Alineamiento:

```
AY704179      GAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG 321
AB097850      GAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG 321
AF466770      GAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG 325
AY672134      GAGCTTCAACAGGAATGAGTGT--- 321
DQ140176      GAGCTTCAACAGGAATGAGTGT--- 321
*****
```

Región bisagra.

✧ DEFINITION Mus musculus immunoglobulin G heavy chain constant region mRNA, partial cds.  
 ACCESSION AY244557

61 cctgcaacgt tgcccaccg gccagcagca ccaagtgga caagaaaatt **gtgccagg**  
 121 **attgtggtt taagccttg atatgtaca** tcccagaagt atcatctgtc ttcattctc

✧ DEFINITION Mus musculus mRNA for immunoglobulin gamma-1 heavy chain, complete cds, anti-malathion monoclonal antibody MLT40-4.  
 ACCESSION AB097849

721 acctgcaacg ttgcccacc ggccagcagc accaagtgga acaagaaaat **gtgccagg**  
 781 **gattgtggtt gtaagccttg catatgtaca** gtcccagaag tatcatctgt cttcatctc

✧ DEFINITION Mus musculus monoclonal antibody BBK-1 heavy chain mRNA, complete cds.  
 ACCESSION AF466767

721 agcagcacca aggtggaca gaaaatt**gtg cccagggatt gtggtt**gtaa **gccttgcata**  
 781 **tgtaca**gtcc cagaagtatc atctgtctc atcttcccc caaagccaa ggatgtgctc

✧ DEFINITION Mus musculus rearranged IgG-1 heavy chain (H21C5) mRNA, constant and variable regions.  
 ACCESSION L35037

601 tgcaacggtt gccaccggc cagcagcacc aagtggaaca agaaaatt**gt gccagggat**  
 661 **gtggtt**gtta **agccttgcat atgtaca**gtc ccagaagtat catctgtctt catcttcccc

✧ DEFINITION Mus musculus immunoglobulin rearranged gamma-1 chain mRNA, partial cds.  
 ACCESSION U56408

661 gacaagaaaa **ttgtgccag ggattgtgt** **tgtaagcctt gcatatgtac** agtcccagaa

Alineamiento:

AY244557	GTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACA	39
AB097849	GTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACA	39
AF466767	GTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACA	39
MMU56408	GTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACA	39
MUSH21C	GTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACA	39
	*****	

# Índice de figuras

Figura 1	1
Figura 2	3
Figura 3	4
Figura 4	6
Figura 5	7
Figura 6	8
Figura 7	10
Figura 8	12
Figura 9	13
Figura 10	16
Figura 11	17
Figura 12	17
Figura 13	23
Figura 14	27
Figura 15	28
Figura 16	30
Figura 17	31
Figura 18	31

---

# Índice de tablas

Tabla 1	4
Tabla 2	10
Tabla 3	11
Tabla 4	11
Tabla 5	16
Tabla 6	24

