

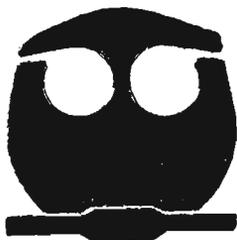


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS EN FAGO SELECCIONADOS POR 2F5: UN ANTICUERPO MONOCLONAL NEUTRALIZANTE DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA
P R E S E N T A :
FABIOLA MÚJICA GUZMÁN



MEXICO, D. F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

m. 345595



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

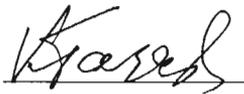
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

JURADO ASIGNADO

**Presidente:** Prof. Patricia Elvira Berrón Ruíz  
**Vocal** Prof. Enrique Ortega Soto  
**Secretario** Prof. Karlen Gazarian  
**1er suplente** Prof. Mónica Berenice Heras Chavarria  
**2o. Suplente** Prof. Sonia Mayra Pérez Tapia

Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología  
UNAM



Dr. Karlen Gazarian

Asesor



M.C. Tatiana Gazarian

Supervisor técnico



Fabiola Mújica Guzmán

Sustentante

## RECONOCIMIENTO

A la M. en C. **Yadira Palacios Rodríguez** quien formó parte activa en la asesoría de este trabajo, tanto en el desarrollo experimental como en la organización y revisión de la tesis escrita.

## AGRADECIMIENTOS

Al NIH-AIDS Research and Reference Reagent Program USA por los materiales proporcionados para el desarrollo de este trabajo (MAb 2F5 y péptidos sintéticos).

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada al proyecto IN210402.

Al Dr. Karlen Gazarian por su asesoramiento y apoyo en este trabajo; a la Dra. Tatiana Gazarian por las enseñanzas y conocimientos transmitidos en el desarrollo de la tesis; a la M. en C. Yadira Palacios Rodríguez por sus enseñanzas, paciencia y tolerancia infinita dentro del trabajo; a mis amigos y compañeros de laboratorio, Fernanda Valladares y Alberto Campillo por compartir un mismo espacio, por las ayudas brindadas durante el desarrollo experimental y por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

Al Dr. Enrique Ortega y a la QFB. Patricia Berrón por el tiempo empleado para la revisión de la tesis y por sus aportaciones para la mejora de la misma.

## DEDICATORIAS

Con infinito cariño y admiración a mis padres, **Juana y Marcelino**, por esos años de espera y sacrificio, por haber creído en mí, por compartir mis triunfos y fracasos, y por estar junto a mí en este momento.

A mis hermanos, **Rogelio y Misael**, por su tolerancia, por aguantar junto con migo un largo camino de espera, por ser los mejores hermanos.

Por los consejos de la vida basados en experiencias de años, a mis abuelos: **Juana y Alberto, Consuelo y Nicolas**.

A toda mi familia que en los momentos de declive estuvieron junto a mí, en especial a mi tía **Cata** por ser mi amiga, mi conciencia y por apoyarme siempre; y a mi tía **Maria Elena** por su apoyo incondicional para mi formación académica.

Al **Colectivo Extlacaelel** por motivarme a ser mejor y por enseñarme a dar una lucha social hoy y siempre: **Leonor, Consuelo, Olivia, Luis y Alberto**.

Con gran satisfacción a todos los compañeros del **Referente Alianza Tlalpan**, por los principios, honestidad y formación social para la mejora continua de esta sociedad, en especial a la **Lic. Alma Delia Velazco** y al **Sr. Ricardo Chávez**.

A mis amigos de generación que me enseñaron que más vale saber llegar que llegar primero: **Minerva, Tomas, Liz y Abraham**.

A mi gran familia de la escuela, los amigos del árbol: **Fernanda, Liz, Paula, Agustín, Alejandro, Sandra, Bertha, Enedina, Rosa, Maribel, Edgar**.

Con admiración a tres amigos que llegaron para quedarse pues su imagen siempre estará en mi mente y cada momento compartido: **Victor, Cesar Augusto, e Ismael.**

A todos los amiguitos del instituto de biomédicas, a **Margarita Vega** por saber ser amiga y sobre todo a los vecinos por esas ayudaditas: **Luis, Adan, Rocio, Paty, Lety y Bety.**

A mi amiga incondicional, confidente, y conciencia académica que siempre se preocupa por que mi vida marche bien: **Laura Valdez.**

Por todo lo compartido, por la irrealidad vivida, por las alegrías y sufrimientos, por luchar hasta el final, por estar con migo desde la vocacional y haber llegado de nuevo en el momento correcto, al **Ing. Adan M. Espinosa.**

A todos y cada uno de los amigos que tal vez no menciono pero que están presentes sin necesidad de mencionarlos, sobre todo a los amigos de la **vocacional 6** que ocupan un lugar muy especial en mi mente.

A **Dios** con infinita gratitud y a mis **angelitos, Geschik** (Inteligencia) y **Gudel** (Sabiduría) que me iluminan y fortalecen para que siga creciendo interiormente, los cuales guiaran y estarán siempre presentes en mi vida, por ellos luchare.

Sobre todo dedicada a mí, **Fabiola**, por no darme por vencida nunca, por volver al camino correcto cuando vi que era necesario, por mi fortaleza y por demostrar que si podía a pesar de tantos tropiezos.

TEN FE EN TUS PROPÓSITOS Y PERSEVERA  
EN ELLOS CON LA CONFIANZA DE HACERLOS REALIDAD.  
CUALQUIER ÉXITO SUMALO AL ESTIMULO DE TUS ESFUERZOS.  
CUALQUIER FRACASO ANOTALO EN EL CATÁLOGO DE TUS EXPERIENCIAS;  
PERO NUNCA ABANDONES TUS METAS, SUEÑOS O IDEALES,  
NI LOS EMPUDRESCAS CON TU DESALIENTO.

Fabiola M.G.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b>	iii
<b>I. Resumen</b>	1
<b>II. Introducción</b>	2
2.1. Generalidades del VIH	2
2.1.1. Epidemiología	2
2.1.2. Características biológicas del VIH	3
2.1.3. Estructura y características moleculares	4
2.1.4. Ciclo de infección	6
2.1.5. Historia natural de la infección	8
2.2. Anticuerpos neutralizantes	10
2.3. Anticuerpo monoclonal neutralizante 2F5	11
2.4. Bibliotecas de <i>phage display</i> y sus usos	13
<b>III. Justificación</b>	18
<b>IV. Hipótesis</b>	18
<b>V. Objetivos</b>	19
<b>VI. Materiales y métodos</b>	20
6.1. Anticuerpo monoclonal humano 2F5	20
6.2. Péptidos sintéticos	20
6.3. Biblioteca de péptidos expresados en fago	20
6.4. Proceso de <i>biopanning</i> para la selección de fagos con el anticuerpo monoclonal 2F5	20
6.5. Selección de clonas de fago individuales	23
6.6. Purificación de ADN	23
6.7. Secuenciación de ADN codificante de péptidos en las clonas de fago individuales	24
6.8. Esquema de inmunización	24
6.9. Análisis de la reactividad de clonas de fago mediante ensayo de ELISA	25

<b>VII. Resultados</b>	27
7.1. Reactividad del Mab 2F5 frente a péptidos sintéticos que contienen la región del epítipo ELDKWA de la gp41	27
7.2. Selección de clonas frente a una biblioteca de péptidos lineales de 12 aminoácidos expresados en el fago M13	29
7.3. Análisis de la reactividad de clonas de fago frente al Mab 2F5	33
7.4. Evaluación de los mimótopos como inmunógenos	34
<b>VIII. Discusión</b>	37
<b>IX. Conclusiones</b>	42
<b>X. Bibliografía</b>	43
<b>Anexo I</b>	49
A.1.1. Amortiguadores y soluciones para <i>biopanning</i>	49
A.1.2. Medios de cultivo para <i>biopanning</i>	50
A.1.3. Soluciones para obtención de ADN de cadena sencilla	51
A.1.4. Preparación del cultivo de <i>E.coli</i> <sub>ER2738</sub>	51
A.1.5. Gel de acrilamida para secuenciación de ADN	51
A.1.6. Gel de agarosa	51
A.1.7. Soluciones para ELISA	51
<b>Anexo II</b>	53
A.2.1. Eluatos de las rondas de <i>biopanning</i> con 2F5	53
A.2.2. Título de clonas de fago después de la amplificación individual	53

## ABREVIATURAS

gp	Glicoproteína
MAb	Anticuerpo monoclonal
MAb 2F5	Anticuerpo monoclonal 2F5
LTNP	Long term non progresors (Sujetos no progresores a SIDA)
RTL	Secuencias de repetición terminales largas
RQ	Receptores de quimiocina
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TR	Transcriptasa reversa
u.f.p.	Unidades formadoras de placa
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 2
VIS	Virus de inmunodeficiencia simia

## I. RESUMEN

La necesidad de desarrollar una vacuna de alta efectividad y potencia, basada en mecanismos inmunológicos humorales y celulares contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1), ha llevado a la generación e identificación de anticuerpos monoclonales (MAb's) con una potente capacidad neutralizante y a la caracterización de los epítomos que reconocen, tal es el caso del MAb 2F5.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar péptidos expresados en el fago M13 empleando el anticuerpo monoclonal 2F5, mediante la metodología *Phage display*. Para ello se empleó una biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos con secuencias al azar. Se identificaron 30 mimótopos del epítomo reconocido por el mAb 2F5: 662ELDKWA667, localizado en la gp41 del VIH-1.

El 100% de las clonas aisladas presentó alguna relación con el epítomo ELDKWA. Los péptidos seleccionados permitieron analizar las características estructurales requeridas por el anticuerpo para aislar secuencias que mimetizan al epítomo original. De esta manera se identificó que 1) los aminoácidos D<sub>664</sub> y W<sub>666</sub> no presentaron cambios; 2) K<sub>665</sub> varió por R ó P; 3) E<sub>662</sub> nunca se presentó y 4) L<sub>663</sub> y A<sub>667</sub> presentaron mayor variabilidad.

Los mimótopos obtenidos resultaron buenos inmunógenos en ratones.

La tecnología *phage display* aporta información en términos de propiedades antigénicas e inmunogénicas de la región reconocida por el mAb 2F5 de la gp41 del VIH-1.

## **II. INTRODUCCIÓN**

En 1981 se describió por primera vez una enfermedad que afectaba directamente al sistema inmune, causando un amplio espectro de manifestaciones clínicas que terminaron siendo letales para el individuo, se denominó Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En 1983, el grupo del doctor Luc Montagnier identificó el causante de esta enfermedad: el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Al año siguiente el grupo de R. Gallo, aisló un retrovirus similar en diversos pacientes y descubrió una línea celular que permitía su crecimiento in vitro (Regueiro y cols., 2003).

### **2.1. Generalidades del VIH**

#### **2.1.1. Epidemiología**

La ONUSIDA reportó en noviembre de 2004 que existen aproximadamente 39.4 millones de individuos de la población total a nivel mundial, que ha sido infectada con el VIH, de esta cifra se estimó que 37.2 millones corresponden a población adulta y los 2.2 millones restantes a población menor de 15 años de edad. Durante este año se presentaron un total de 4.9 millones de casos nuevos y 3.1 millones de defunciones por infección de VIH.

De acuerdo a los registros de la ONUSIDA, México ocupa el lugar 77 a nivel mundial y el 23 en América Latina, en función del número de personas infectadas (ONUSIDA, 2004).

Con base en datos de la Secretaría de Salud, en 2004 se registraron aproximadamente 4,800 casos nuevos en nuestro país. Se estima que existen seis hombres infectados por cada mujer infectada. Las entidades federativas con mayores tasas acumuladas de SIDA son Baja California Sur, Distrito Federal y Campeche; y las de menores tasas acumuladas son Zacatecas, Tabasco e Hidalgo. En el D.F. la Secretaría de Salud registró 3, 463 casos durante el año 2004 (SSA/Méx-Censida, 2004).

### 2.1.2. Características biológicas del VIH

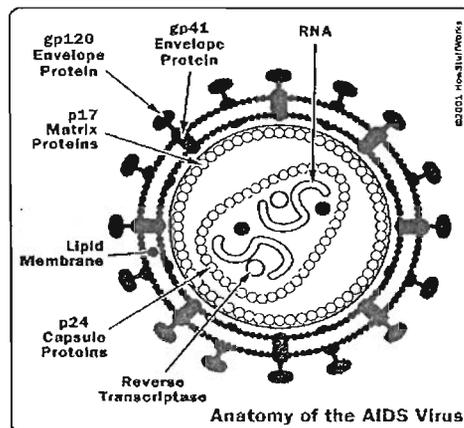
El VIH es un miembro de la familia de los lentivirus perteneciente al orden de los retrovirus animales. Se han identificado dos variantes íntimamente relacionadas de VIH, denominadas VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es la causa más frecuente de SIDA, pero el VIH-2, que se diferencia en su estructura genómica y en su antigenicidad respecto al VIH-1, causa un síndrome similar que afecta sobre todo población africana ( Abbas y cols., 2002).

Se ha propuesto que el VIH tiene su origen en la transmisión del virus de inmunodeficiencia simia (VIS) a varias especies de primates y posteriormente se transmitió a humanos, originando una gran diversificación del virus (Hillis, 2000). Gao y cols. (1999), reportaron que a partir de un grupo de chimpancés de la subespecie *Pan troglodytes troglodytes* localizados en África Central, se aisló por primera vez el virus de la inmunodeficiencia simia, por lo que proponen como hipótesis que la transmisión a los humanos se dio a partir de estos primates (Korber y cols., 2000).

Actualmente se presentan tres variantes del HIV-1: M, O, y N. La mayoría de las infecciones son causadas por virus del grupo M, del que se reconocen diez subtipos: A, B, C, D, E, F, G, H, J y K. La diversificación del grupo M pudo haber ocurrido en el Congo donde se tienen reportes tempranos de casos con infección de HIV-1, aproximadamente en los años 1950-60 (Hillis, 2000). Los virus del subtipo O están limitados a las personas que viven en África Central. De acuerdo a estudios filogénicos, las formas prevalentes del HIV-1 son los subtipos C, A y B. Las infecciones por el subtipo C se presentan por lo general en países del sur de África, los virus del subtipo A predominan en Camerun y en el centro y este de África. El subtipo B es la principal forma infecciosa en Europa, América y Australia. Otro subtipo menos prevalente es el D, distribuido principalmente en el este de África; el subtipo G se localiza en el oeste y centro de África (Fonjungo y cols.,2000; Tscherning-Casper y cols., 2000).

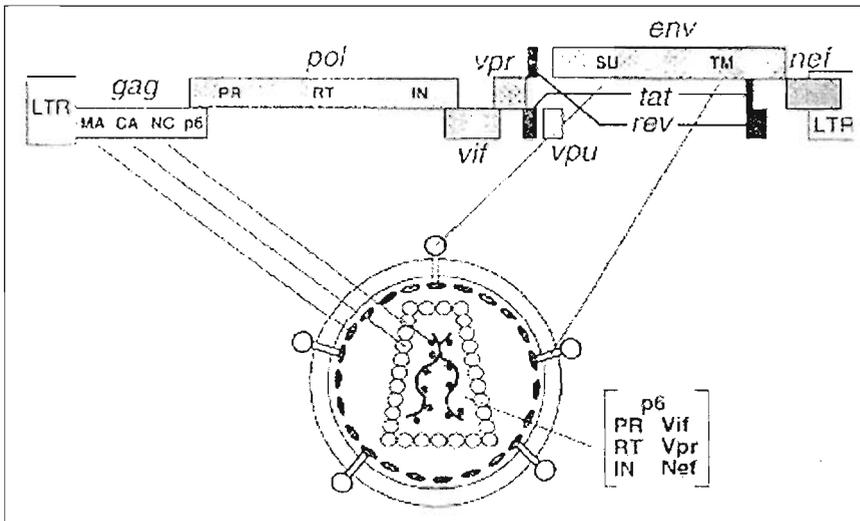
### 2.1.3. Estructura y características moleculares

Las partículas del VIH tienen forma esférica y están formadas por una membrana lipídica de origen celular. El gen env codifica para la glicoproteína 160 (gp160) que al ser procesada por una ruptura proteolítica genera dos proteínas virales asociadas, contenidas en la membrana: una glicoproteína externa (gp120) y una transmembranal (gp41). El trímero gp 120 es una molécula que interacciona no covalentemente con el trímero gp 41 en la superficie de las partículas virales, la gp 41 es una proteína transmembranal, que contiene una porción intracelular y una extracelular. Por debajo de la envoltura lipídica se encuentra una segunda capa proteica formada por la polimerización de monómeros de la proteína viral p17, dentro de la cual se encuentra la nucleocápside, constituida por la proteína p24 y dos moléculas de ARN viral de cadena sencilla y polaridad positiva, que son el material genético del virus. El ARN tiene asociada la enzima transcriptasa reversa (TR) (Figura 1). Durante el ciclo de replicación, la transcriptasa reversa se encarga de sintetizar una molécula de ADN de doble cadena empleando el ARN viral como molde. Al insertarse en el genoma de la célula, este ADN recién sintetizado constituye lo que se denomina provirus (Soler y cols., 1995; Frankel y cols., 1998).



**Figura 1.** Estructura del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Se muestran cada una de las proteínas que integran al virus: proteínas de envoltura: gp120 y gp 41, proteína de matriz: p17 y proteína de la cápside: p24. El material genético está conformado de dos cadenas de RNA, al que se asocia la enzima transcriptasa reversa.

El genoma del VIH presenta la forma básica del genoma de los retrovirus, los genes estructurales: *gag* y *env*, y el gen enzimático: *pol*; además de estos genes característicos, presenta genes regulatorios de la expresión viral: *Tat*, *Rev*, *Nef*, *Vif*, *Vpu* y *Vpr*. En sus extremos, el genoma, presenta las secuencias de repetición terminal largas (RTL), que contienen elementos reguladores de la expresión viral como un promotor y secuencias reguladoras de la transcripción. En la figura 2 se presenta la organización del genoma del VIH-1.



**Figura 2.** Organización del genoma del VIH-1. En la parte superior se observan los marcos de lectura y las proteínas codificadas por cada uno de los genes. En la parte inferior se señala la ubicación de cada una de las proteínas que conforman al virus: MA-proteína de matriz, CA-proteína de cápside, NC-proteína de nucleocápside, PR- enzima proteasa, RT-enzima transcriptasa reversa, IN-enzima integrasa, SU-glicoproteína de superficie gp 120, TM-glicoproteína transmembranal gp 41 (Frankel y cols., 1998).

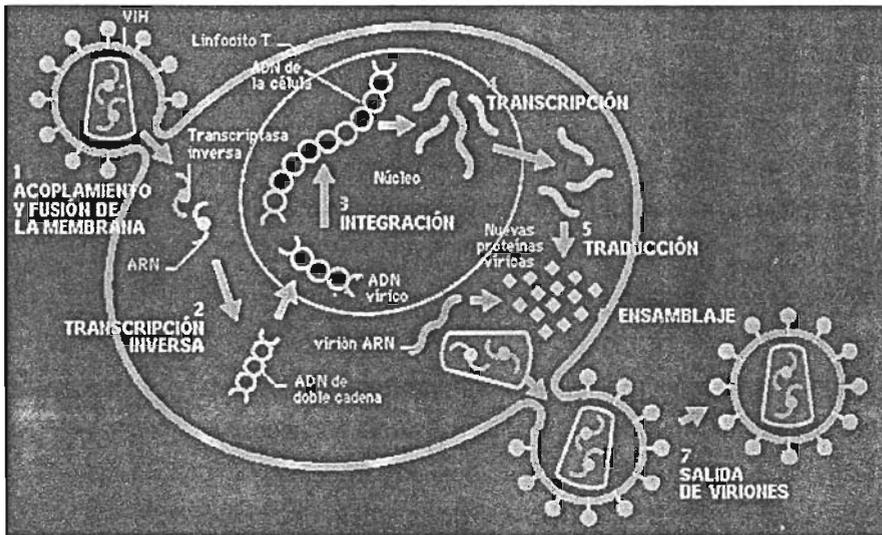
El gen *gag* codifica las proteínas estructurales del centro, nucleocápside y matriz (p24 y p17). El gen *env* codifica las glicoproteínas de envoltura viral (gp 120 y gp 41), que median la unión a la molécula CD4, al receptor de quimiocinas y la fusión con la membrana. El gen *pol* codifica las enzimas transcriptasa inversa, integrasa y proteasa viral, necesarias para la replicación viral. *Tat* es el denominado gen transactivador, dicho gen es un regulador positivo que incrementa la tasa de su

propia síntesis y la síntesis de todas las otras proteínas virales. Rev es el gen regulador de la expresión proteica viral, facilita la exportación de ARNm virales, del núcleo al citoplasma celular en cooperación con factores celulares. El gen Vpu codifica la proteína accesoria transmembranal vpu, que está implicada en el eficiente ensamblaje y gemación de las partículas virales. El gen nef codifica la proteína nef la cual es expresada tempranamente, es un factor regulatorio negativo de la expresión génica viral. El gen Vif codifica la proteína vif (factor de infectividad viral), que participa en la eficiencia de transmisión de la infección por el VIH-1 (Frankel y cols., 1998; Abbas y cols., 2002).

#### **2.1.4. Ciclo de infección**

El VIH infecta células CD4+, en su mayoría linfocitos T CD4+ y algunos monocitos que expresan ese marcador, ya que esta molécula es el receptor específico de gp120. Además, la célula diana debe expresar al menos alguno de los receptores de quimiocinas (RQ) que el virus utiliza como correceptor: CXCR4 (fusina) o CCR5. De hecho se distinguen dos tipos de cepas de virus VIH: los monotrópicos (más frecuentes al principio de la infección, que infectan monocitos y macrófagos, y los linfotrópicos (infectan linfocitos). Las cepas tempranas utilizan como correceptor CCR5 para infectar macrófagos, mientras que las tardías utilizan CXCR4 para infectar linfocitos (Gallo y cols., 2002). La unión de gp120 a CD4 causa cambios conformacionales en la gp 120 para facilitar la unión con receptores de quimiocina, este efecto de interacciones ocasiona que gp 41 sufra también cambios conformacionales. (Berger y cols., 1999; Haase y cols., 1999). La estructura de la gp41 está directamente relacionada con la fusión de las membranas vírica y celular. La gp41 forma una estructura trimérica transitoria que da lugar a la fusión de membranas. Esta estructura tiene la forma de una horquilla en la que interaccionan las tres hélices C-terminales ancladas en la membrana vírica, con las tres hélices N-terminales que se anclan a la membrana celular, permitiéndose la entrada del virus al interior de la célula (Medrano y cols., 2002). Una vez dentro de la célula huésped la maquinaria enzimática del virus convierte

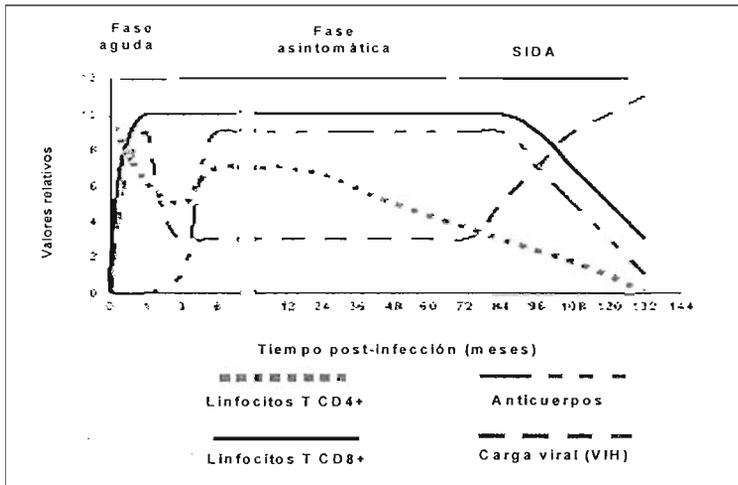
la hebra de RNA en una doble hebra de DNA, la cual se integra dentro del genoma celular. La copia del DNA viral puede permanecer integrada durante meses o años. La transcripción del genoma viral comenzará cuando la célula infectada se active, induciendo así la transcripción de las proteínas que forman los nuevos virus que saldrán al exterior para infectar nuevas células CD4+. El virus muta rápidamente lo cual puede explicar el paso de cepas monotrópicas (relativamente latentes) a linfotrópicas (mucho más agresivas) (Haase y cols., 1999; Regueiro y cols., 2004) (Figura 3).



**Figura 3.** Ciclo viral. Inicia con la unión entre una partícula viral y una célula susceptible de infectarse que exprese algún receptor de quimiocinas. Se da la interacción entre gp120-CD4 y receptores de quimiocina ocasionando cambios conformacionales tanto en gp120 como en gp41. Posteriormente se fusionan las membranas vírica y celular, gp41 esta directamente relacionada con dicha fusión. En el interior de la célula ocurre la síntesis de DNA a partir de RNA mediante la TR. En la etapa temprana de la expresión viral sólo se forman proteínas reguladoras y en la fase tardía se producen nuevos viriones mediante la expresión y ensamblaje de las proteínas estructurales y las enzimas virales.

### 2.1.5. Historia natural de la infección

Desde que se produce la infección por el VIH hasta que el paciente desarrolla el SIDA, se distinguen al menos tres fases evolutivas de la infección: **fase aguda**, **fase asintomática** y **fase crónica (SIDA)** (Figura 4). Durante la **fase aguda**, después de una oleada de replicación viral, el virus es diseminado desencadenando una viremia invasiva acompañada por lo general por fiebre, linfadenopatía, erupciones cutáneas y disminución de linfocitos T CD4+, por lo general se supera de manera espontánea. La baja en la viremia se atribuye a la actividad de linfocitos T CD8+. Los anticuerpos que se presentan en esta etapa tienen baja actividad neutralizante y pueden además contribuir con el secuestro de partículas virales por células dendríticas. Se ha reportado que la respuesta de anticuerpos aparece en un período que va de días a 2-3 meses después de la infección (seroconversión), etapa en la que pueden ser detectados en suero o plasma, en algunos casos se estima que hay anticuerpos específicos contra proteínas de envoltura 10 semanas después de la infección (Moore y cols., 1994). La respuesta de anticuerpos contra el VIH se desarrolla de manera lenta. Durante la **fase asintomática** de la enfermedad, se ha demostrado que la replicación viral continúa en los ganglios linfáticos, que se convierten en el nicho donde el virus permanece oculto, destruyendo lentamente el sistema inmunológico (Heath y cols., 1995); los niveles de anticuerpos se mantienen constantes así como también los niveles de linfocitos CD8+; las cuentas de CD4+ caen gradualmente, los pacientes suelen estar asintomáticos con o sin adenopatías, pero ocurre una disminución progresiva de anticuerpos conforme avanza la **etapa crónica**. La **etapa crónica (SIDA)** se caracteriza por un aumento de la replicación del VIH y paralelamente por una disminución de linfocitos CD4+ y CD8+, clínicamente se observa una profunda alteración del estado general del paciente, aparición de graves infecciones oportunistas, ciertas neoplasias y alteraciones neurológicas (Alimonti y cols., 2003).



**Figura 4.** Cinética de la infección por VIH. El pico inicial de carga viral en la fase aguda está acompañado por un incremento en linfocitos T citotóxicos y una disminución en el número de linfocitos T CD4+. Dentro de 1 a 2 meses la carga viral se reduce, en esta etapa hay un incremento en linfocitos T CD4+ y en 2 a 3 meses ocurre la seroconversión mediada por la aparición de anticuerpos VIH específicos. Este estado asintomático se mantiene por varios años. Gradualmente las cuentas de CD4+ caen a niveles menores de 200 cels/mm<sup>3</sup> y aumenta la susceptibilidad a enfermedades oportunistas, la carga viral incrementa paralelamente a una disminución de linfocitos T citotóxicos y de anticuerpos neutralizantes (Alimonti y cols., 2003).

## 2.2. Anticuerpos neutralizantes

La necesidad de desarrollar una vacuna de alta efectividad y potencia, basada en mecanismos inmunológicos humorales y celulares, contra el VIH-1, ha llevado a la generación e identificación de anticuerpos monoclonales (MAB's) con una potente capacidad neutralizante contra el VIH y a la caracterización de las regiones que tienen como blanco dichos anticuerpos (Poignard y cols., 1999). La actividad neutralizante está mediada por la unión de anticuerpos al virión o a productos de éste, para bloquear la interacción del virus con la célula blanco (Klasse y cols., 2002).

La importancia del papel de los anticuerpos se estableció al observar que había sujetos infectados por el VIH que no progresaban a SIDA (LNTP del inglés *long term non progressors*) en los que existía un título alto de anticuerpos neutralizantes en circulación (Cao y cols., 1995), lo que sugirió que su respuesta inmune daba un alto grado de protección contra el progreso de la enfermedad (Scala y cols., 1999).

Hasta la fecha las investigaciones se han centrado en las propiedades que presentan cinco anticuerpos monoclonales con potente actividad neutralizante contra aislados primarios del VIH-1. Dos de ellos, 2G12 y b12 actúan directamente en la gp 120. Los otros tres anticuerpos, 2F5, 4E10 y Z13 actúan sobre la gp 41. El Mab 2G12 es considerado como el anticuerpo de mayor potencia neutralizante seguido por 2F5 (Parren y cols., 1998; Zwick y cols., 2003; Ofek y cols., 2004).

Se ha sugerido que los epítomos reconocidos por estos anticuerpos neutralizantes son pobres inmunógenos, ya que in-vivo producen cantidades mínimas de anticuerpos para neutralización (Poignard y cols., 1999).

Los actividad neutralizante de los anticuerpos debe ser esencial en la función de una vacuna frente al VIH, la cual debe de estimular también una respuesta celular frente al virus. Los métodos de inducir anticuerpos que reconozcan los aislados primarios de VIH deben ser perfeccionados, de modo que sean capaces de neutralizar los múltiples subtipos y recombinantes de VIH-1 que se generen (Medrano y cols., 2002).

### 2.3. Anticuerpo monoclonal neutralizante 2F5 (MAb 2F5)

El anticuerpo monoclonal 2F5 (MAb 2F5) fue aislado por primera vez de un paciente LTNP VHI-1 positivo (Buchacher y cols., 1992; Muster y cols. 1993).

El epítipo reconocido por el MAb 2F5, inicialmente fue propuesto como una secuencia lineal de seis aminoácidos, **Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala (ELDKWA)**, ubicados en las posiciones 662-667 de la proteína transmembranal gp41 (Figura 5). Presenta una alta conservación, hasta de un 72% en diferentes cepas virales. Se sugirió también que los aminoácidos **LDKW** corresponden a la parte nuclear del epítipo, presentando un grado de conservación del 82% en diferentes cepas virales (Muster y cols. 1993; 1994; Purtscher y cols., 1996).

A partir de que se observó que la secuencia **ELDKWA** era altamente conservada y la aparente simplicidad estructural, su accesibilidad en gp41 y sobre todo, la propiedad de generar el anticuerpo neutralizante 2F5, se desarrollaron diversas estrategias para emplear la secuencia ELDKWA como inmunógeno, sin embargo, pocos casos han sido exitosos en modelos de laboratorio, lo que ha evidenciado la baja inmunogenicidad que presenta esta secuencia. Por otra parte en los casos en los que se han logrado obtener buenos títulos de anticuerpos anti-ELDKWA éstos han presentado actividad neutralizante solamente frente a cepas de laboratorio pero no frente a aislados virales (Muster y cols., 1993; Conley y cols., 1994; Purstcher y cols., 1996; Eckhart y cols., 1996).

Lo anterior conllevó a pensar que el epítipo tal vez era más complejo de lo que se proponía y que quizás por ello, se tenía que presentar en un contexto más amplio para poder llevar acabo la inducción de anticuerpos neutralizantes.

En 2001, Zwick y cols. realizaron un mapeo más detallado del epítipo empleando la metodología *phage display*; en ese mismo año Parker y cols., mediante análisis de digestión enzimática del complejo gp140 (construcción recombinante de gp120 y el dominio extracelular de gp41 unidos por un puente disulfuro)-2F5 y espectrometría de masas para determinar la parte resistente a la digestión, definen con ello una región más grande para la interacción con el anticuerpo. Prácticamente ambos grupos de trabajo concluyeron que el epítipo involucra la secuencia <sup>656</sup>NEQELLELDKWASLWN<sub>671</sub>. Hasta la fecha, esta secuencia se



Desde 1993 se empleó *phage-display* en distintos formatos de expresión de péptidos para mapear el epítipo reconocido por 2F5 (Muster y cols., 1993; Conley y cols., 1994). En 2004 Menéndez y cols. emplearon una serie de bibliotecas *phage display* para realizar un mapeo del epítipo más detallado, propusieron que DKW constituye la región de mayor especificidad e invariable, mientras que las secuencias alrededor de ésta son multiespecíficas hacia el tripéptido, especialmente hacia la región C-terminal sobre la que reside la actividad biológica.

#### **2.4. Bibliotecas *Phage-display* y sus aplicaciones**

En 1985, George Smith de la Universidad de Misuri, Columbia, desarrolló un sistema de expresión de proteínas ajenas fusionadas a la proteína de superficie de un fago filamentoso. En este sistema la secuencia de DNA que codifica para el péptido de interés se inserta dentro de una región en el genoma del fago filamentoso para conseguir su expresión. De esta manera es posible crear millones de combinaciones de aminoácidos como fuente de secuencias peptídicas para el mapeo de epítipos (Smith, 1985, Scott y cols., 1990; Gazarian, 2005).

En el uso de anticuerpos para la selección de péptidos mediante el procedimiento de *biopanning*, se obtienen secuencias con regiones consenso similares a las de la secuencia original que indujo la producción del anticuerpo, es decir, con algunas diferencias entre el péptido expresado en el fago y el epítipo que reconoce el anticuerpo. En estos casos, esas variaciones se pueden considerar como regiones tolerantes de múltiples sustituciones que también permiten la unión por el anticuerpo. Es por ello que a estas secuencias se les denomina mimótopos, ya que pueden mimetizar la función del epítipo aún sin presentar la misma secuencia (Geysen y cols., 1986; Smith y Scott, 1993).

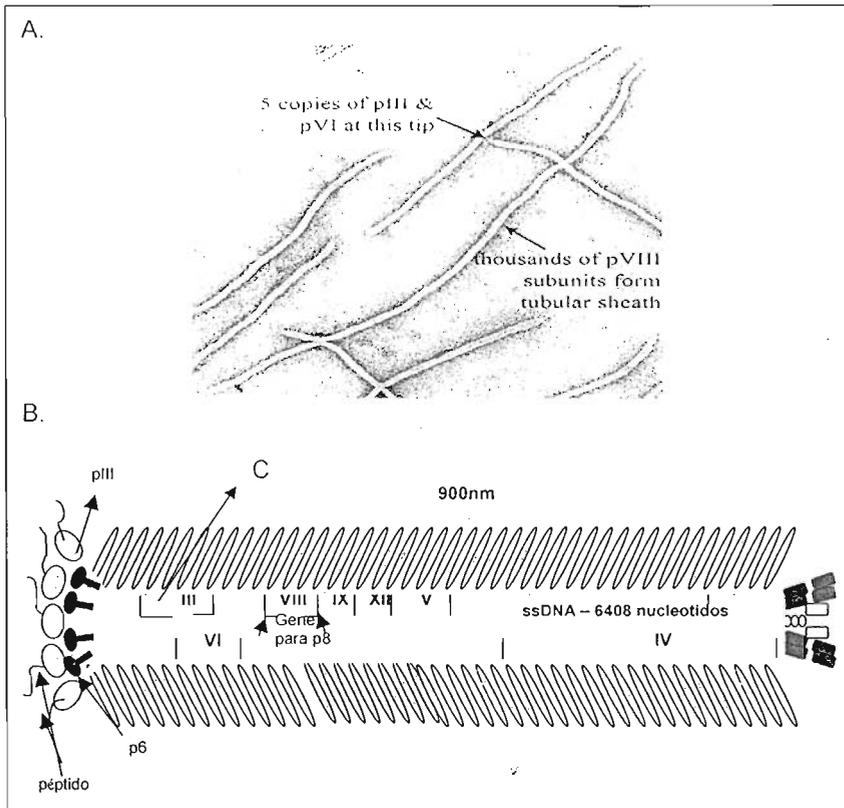
Hasta la fecha han sido varios los grupos de trabajo que han adoptado dicha metodología como herramienta de trabajo para el mapeo de epítipos y en el estudio de interacciones proteína-proteína, como ejemplo se tienen resultados en el modelo de neurocisticercosis humana y de cisticercosis porcina para evaluar la identificación y caracterización de epítipos inmunogénicos de *T.solium* (Gazarian

K. y cols., 2000; 2001); también se aplicó en el mapeo de epítopos de noxiotoxinas del escorpión *Centruroides noxius* (Gazarian T. y cols., 2001; 2003), entre otros.

La tecnología *phage display* se basa por lo tanto en el uso de bibliotecas de hasta  $10^{10}$  diferentes secuencias peptídicas recombinantes expresadas en la superficie de fagos filamentosos, capaces de producir la unión de cualquier molécula de alta importancia fisiológica, por ejemplo anticuerpos, enzimas, hormonas, etc. (Barbas y cols., 2001).

Los fagos filamentosos principalmente estudiados son el fl, fd y M13, los cuales comparten 98% de homología en su genoma. En general los fagos filamentosos miden aproximadamente 6.5 nm de diámetro y 930 nm de longitud. El genoma está constituido por una molécula de DNA de cadena sencilla y covalentemente cerrada de cerca de 6,400 nucleótidos, el DNA del fago se encuentra empaquetado en un cilindro flexible de proteínas, estas proteínas han sido denominadas: pIII (con 4 o 5 copias expresadas en uno de los extremos del fago), pVI, pVII, pVIII, pIX. El fago M13 es el más utilizado en los procesos de *phage display* (Figura 6) (Azzazy y cols, 2002; Santamaria y cols., 2003; Kishchenko y cols., 1994).

Los pasos que implica la técnica *phage display* son: infección, amplificación, purificación y un proceso clave dentro de la metodología, la bioselección o *biopanning* (Figura 7). Durante esta bioselección se prueba la afinidad de unión y reconocimiento de los fagos hacia moléculas blanco, se lleva a cabo enfrentando la colección de las variantes de péptidos expresados en fago (biblioteca) con la molécula blanco de interés que fue previamente inmovilizada en una placa, se lava para eliminar los fagos que no fueron reconocidos y mediante un cambio de pH se eluyen aquellos que fueron seleccionados. El fago eluido es amplificado en *E. coli*. Este proceso de selección se realiza generalmente de tres a cuatro veces (rondas) para asegurar y mejorar la especificidad de las clonas de los fagos seleccionados desde la primera ronda y así, enriquecer la población de fagos específicos (New England BioLabs, Ph-12; Stephen y cols., 1995; Santamaria y cols., 2003).



**Figura 6.** A) Micrografía electrónica del fago filamentosos M13. B) Representación esquemática del fago filamentosos M13 mostrando su estructura y las proteínas que lo integran. C) La región señalada en el marco de lectura de la pIII representa el sitio de inserción de ADN que codifica para el péptido que se expresará sobre la pIII (Petrenko y cols., 2003).

En el campo de estudio con VIH, se ha empleado la metodología para analizar la respuesta inmune en pacientes infectados por el virus.

El grupo de Scala y cols. (1999) logró aislar péptidos mediante el uso de anticuerpos de un sujeto LTNP. Estos péptidos fueron inmunogénicos en ratones y los anticuerpos generados presentaron actividad neutralizante frente a aislados virales. Por otro lado Enshell-Seijffer y cols. (2001), emplearon esta metodología para estudiar el epítipo inmunodominante de gp41. En la actualidad son

numerosos los trabajos que emplean *phage display* para el estudio del VIH, aportando nuevos conocimientos sobre la patogénesis del virus, algunos de ellos se mencionaron anteriormente.

En el grupo del Dr. Karlen Gazarian (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) se han estudiado aspectos específicos de la respuesta inmune frente al VIH-1. Se analizaron 5 pacientes mexicanos infectados con el virus, candidatos a recibir terapia antirretroviral altamente activa. Se lograron aislar 21 péptidos miméticos del epítipo inmunodominante de la gp41:CSGKLIC, identificando con ello el alto grado de variabilidad de esta región (Palacios-Rodríguez Y., 2003). Esto se aplicó para evaluar el potencial de las secuencias que se obtuvieron, en el desarrollo de una estrategia que brinde mayor sensibilidad para el análisis de la respuesta inmune contra el virus en individuos infectados (Arnaud y cols., 2004). Por todo lo anterior, resulta claro que el potencial que presenta *phage display* es de gran utilidad para continuar con el estudio de los complejos mecanismos que desarrolla el VIH para evadir el sistema inmune.

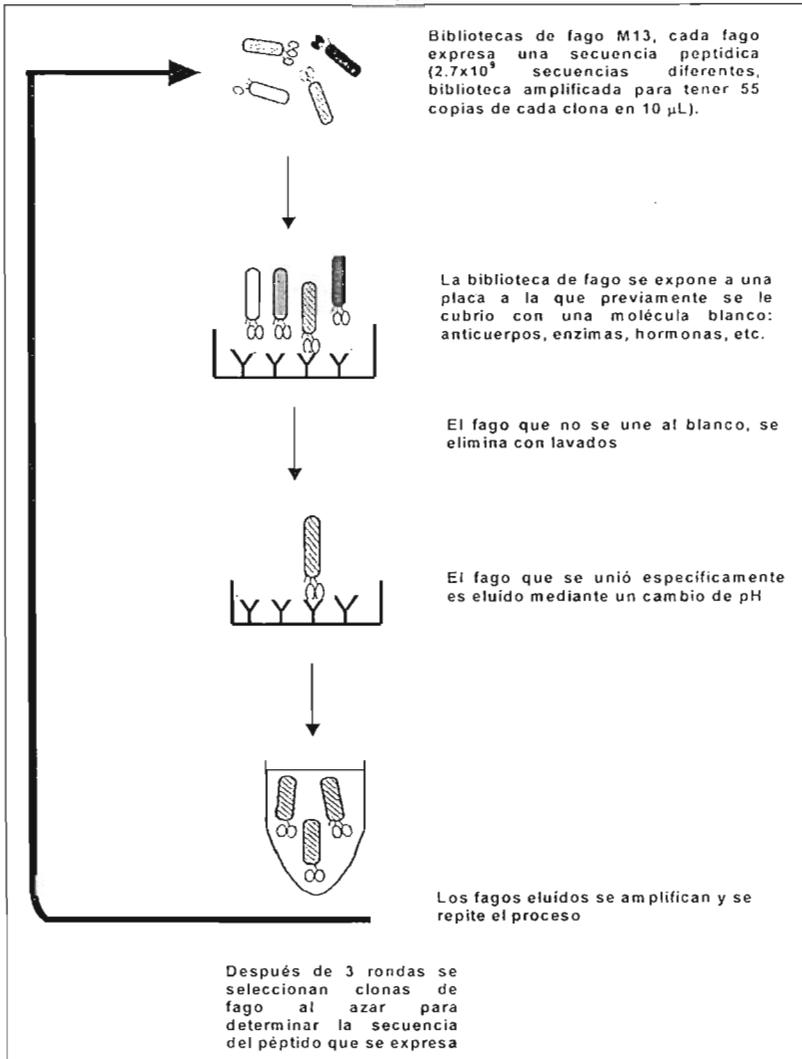


Figura 7. Representación esquemática del proceso de selección (*biopanning*), empleando una biblioteca de péptidos expresados en el fago M13. (Modificado de New England BioLabs Phage-Display Peptide Library Kit "Panning with the Ph. D. peptide library"; Azzazy y cols., 2002).

### III. JUSTIFICACIÓN

Se han desarrollado numerosos esfuerzos para comprender los mecanismos de evasión del sistema inmune que el VIH desarrolla, sin embargo, pese a las numerosas investigaciones que se llevan a cabo, cerca de 40 millones de personas a nivel mundial están infectadas.

Actualmente existe consenso respecto a que una vacuna efectiva debe conseguir estimular de manera eficiente tanto la respuesta inmune celular como la humoral (McMichel y cols., 2003; Burton y cols., 2003, 2004; Zolla-Pazner, 2004). Respecto a esta última, ha sido difícil poder inducir anticuerpos neutralizantes dada la gran variabilidad que el virus presenta. Por lo anterior, es prioritario en el estudio de estos anticuerpos una clara definición molecular de los epítomos que reconocen, que contribuya a incrementar la inmunogenicidad de estas estructuras. La expresión de péptidos en la superficie de fagos filamentosos ha resultado una estrategia que permite enfrentar la variabilidad del virus y comprender algunas de las propiedades estructurales de los epítomos virales, es además una herramienta útil en el mapeo de epítomos. Por lo anterior, el presente trabajo se centra en el estudio del epítomo  ${}_{662}\text{ELDKWA}_{667}$  situado en la gp41 del VIH, ya que se trata de una región compleja en términos de sus propiedades inmunogénicas y antigénicas, cuya importancia radica en su capacidad de generar anticuerpos neutralizantes potentes como es el caso del anticuerpo monoclonal 2F5.

### IV. HIPÓTESIS

El uso de una biblioteca combinatoria (*phage display*) permitirá aislar e identificar mimótopos seleccionados por el anticuerpo monoclonal neutralizante 2F5, e investigar la inmunogenicidad que éstos presentan.

## V. OBJETIVOS

### General

1. Identificar péptidos expresados sobre la proteína pIII del fago M13 seleccionados por el anticuerpo monoclonal 2F5, mediante el uso de bibliotecas combinatorias con una complejidad de hasta  $10^{10}$  y emplear los mimótopos seleccionados como inmunógenos en ratones para inducir anticuerpos similares a 2F5.

### Particulares

1. Seleccionar mimótopos reconocidos por el MAb 2F5 mediante el empleo de una biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos expresados en la pIII del fago M13.
2. Analizar la secuencia y homología de los péptidos seleccionados y su relación con el epítipo nativo
3. Evaluar la inmunogenicidad de los mimótopos en ratones y analizar la existencia de anticuerpos específicos en los sueros de ratones frente al epítipo nativo.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

En el anexo 1 se describen las soluciones y medios de cultivo que se emplearon.

### 6-1. Anticuerpo monoclonal humano 2F5 (MAb 2F5)

Anticuerpo monoclonal humano recombinante 2F5 (mAb 2F5; HIV-1 gp-41), producido en células CHO adquirido del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. USA. Concentración: 11.61 mg/ mL; disuelto en amortiguador: 45 µL de maltosa al 10%, acetatos 2mM, pH 4-5.

### 6.2. Péptidos sintéticos

Se obtuvieron a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. USA. Péptidos que se traslapan cubriendo la región 652-682 de la gp41 del VIH-1, subtipo B (15mer). Péptidos: 6372 QQEKNEQELLEELDKW, 6373 NEQELLEELDKWASLW, 6374 LLEELDKWASLWNWFD, 6375 DKWASLWNWFDITNW y 6376 SLWNWFDITNWLWYI.

### 6.3. Biblioteca de péptidos expresados en fago

Se trabajó con una biblioteca de péptidos lineales de 12 aminoácidos (New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA, PhD-12<sup>TM</sup>) con secuencias al azar fusionados a la región N-terminal de la proteína III (pIII) del fago filamentoso M13 a través de la secuencia Gly-Gly-Gly-Ser. La biblioteca presentó una complejidad de  $2.7 \times 10^9$  y fue amplificada una vez ( $10^{11}$ ) para generar al menos 55 copias de cada secuencia en 10 µl.

### 6.4. Proceso de *biopanning* para la selección de fagos con el anticuerpo monoclonal 2F5

El procedimiento se basó en trabajos previos (Gazarian y cols., 2001; 2003; Scott y cols., 1990) y en recomendaciones del fabricante (New England BioLabs).

## Día 1

a) En la primera ronda se usó una concentración del MAb de 15  $\mu\text{g}$  en 100 $\mu\text{l}$  de PBS 1X. Ésta preparación se colocó en un pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos (Inmulón, Dynatech Lab. Inc., USA). La placa se incubó toda la noche a 4°C, en cámara húmeda y agitación suave.

## Día 2

b) Se desechó el sobrenadante y posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS-T (PBS-Tween 20 al 0.1 % v/v), añadiendo 200  $\mu\text{L}$  durante 2 minutos en cada lavado. A continuación se bloqueó con PBS-BSA al 1% añadiendo 300  $\mu\text{L}$  e incubando a 4°C durante una hora. Al término de la incubación se realizaron seis lavados bajo las condiciones antes mencionadas.

c) Preparación de la biblioteca: se diluyeron 10  $\mu\text{L}$  de la biblioteca original que contienen  $4 \times 10^{10}$  fagos en 100  $\mu\text{L}$  de PBS-T (tween-20 al 0.1%).

d) *Biopanning* (Selección o tamizado de la biblioteca por afinidad). Se añadieron los 100 $\mu\text{L}$  al pozo sensibilizado con el anticuerpo y se incubó una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente se realizaron diez lavados para eliminar el fago que no se unió.

d) Elución: el fago que se unió al anticuerpo 2F5 se eluyó con 100 $\mu\text{L}$  de amortiguador de elusión (glicina-HCl pH 2.2), incubando durante diez minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Transcurrido el tiempo se ajustó inmediatamente a pH 7 con Tris-HCl 1M (pH 9.1).

e) Titulación: se determinó el número de clonas recuperadas, para ello se realizaron tres diluciones seriadas (1:1000) del fago en medio LB líquido, partiendo de 1 $\mu\text{l}$  del eluato de fago. Previamente se preincubaron a 37°C cajas con LB-tet/Xgal/IPTG. Por otro lado, se fundió Agarosa-Top y se colocaron 3 ml en un tubo estéril que se mantuvo a 45°C hasta su uso. Se colocaron 200  $\mu\text{l}$  del cultivo de E.coli<sub>ER2738</sub> en un tubo eppendorf y se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de la tercera dilución de fago. Se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 1-5 minutos para que se llevara a cabo la infección. Las células infectadas se

transfirieron al tubo que contenía Agarosa-Top, después de homogenizar por inversión el contenido se colocó inmediatamente en la placa de LB-tet/Xgal/IPTG. Se incubó durante toda la noche a 37°C. Después de la incubación se determinaron las Unidades Formadoras de Placa (u.f.p) por mL cuantificando únicamente las placas azules y se calculó el título de fago en el eluato tomando en cuenta las diluciones realizadas

### Día 3

f) Amplificación del eluato de la primera ronda: a una dilución 1:100 de E.coli (ER 2738) en 30 mL de 2xYT, se adicionó el 70-75% del volumen del eluato de la primera ronda, manteniendo en agitación (230 rpm) durante 4.5 horas a 37°C

g) Precipitación del fago: El cultivo anterior con fago se transfirió a un tubo y se centrifugó diez minutos a 4°C y 10,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se le añadió la cantidad correspondiente a  $\frac{1}{4}$  del volumen total de PEG-NaCl. Se incubó a 4°C toda la noche.

### Día 4

h) Se centrifugó en las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de PBS 1x. Nuevamente se centrifugó en microfuga (ependorf) durante 5 minutos, a 10,000 rpm y 4°C.

i) Reprecipitación: el sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía  $\frac{1}{4}$  de volumen de PEG-NaCl y se incubó en hielo durante 1 hora. Se centrifugó en microfuga como en las condiciones anteriores. Se desechó el sobrenadante y al precipitado se le adicionaron 200  $\mu$ L de PBS-NaN<sub>3</sub> al 0.02%. Nuevamente se centrifugó por dos minutos y el sobrenadante (fago purificado) se transfirió a un tubo eppendorf limpio. Se conservó como eluato amplificado de la primera ronda.

A partir del eluato de la primera ronda se realizaron otras dos rondas del *biopanning* como se describió anteriormente. Cabe señalar en la segunda ronda (II) se incrementó la concentración de Tween 20 en la solución de lavado (PBS-T) a 0.5% (v/v).

La cantidad de anticuerpo usado en la segunda ronda fue de 7.5ug y para la tercera fue de 3.75.

Al concluir la tercera ronda se procedió a usar este eluato sin amplificar para aislar clonas individuales a partir de las placas de titulación en LB-tet/X-gal/IPTG.

### **6.5. Selección de clonas de fago individuales**

A partir de las placas de titulación en LB-Tet/X-gal/IPTG se seleccionaron al azar clonas de fago individuales, para posteriormente ser secuenciadas y caracterizadas. El proceso de aislamiento y purificación de cada clona se desarrolló como se describe a continuación:

a) Amplificación del fago: del cultivo de E.coli en 2xYT (dilución 1:100) se tomaron 3 mL para cada clona individual (una placa por cada tubo de rosca, tomada por picadura). Se incubaron durante 4.5 hrs, a 37°C, con agitación constante, se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm y 4°C. Del sobrenadante se tomó 1 mL para realizar la purificación de ADN y el resto se usó para la purificación del fago.

b) Purificación del fago: al sobrenadante (2 mL) se le añadió ¼ de volumen de PEG-NaCl, se incubó a 4°C toda la noche. Nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm y 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 200 µL de PBS 1x. Posteriormente se centrifugó en microfuga (eppendorf), 5 minutos, a 10,000 rpm y 4°C, se recolectó el sobrenadante que se transfirió a un tubo eppendorf con 50 µL de PEG-NaCl. Se mezcló perfectamente y se incubó 1 h a 4°C. Posterior a la hora se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado se resuspendió en 80 µL de PBS-NaN<sub>3</sub> 0.02%, se mezcló perfectamente, se centrifugó por 2 minutos y el sobrenadante se colectó en un tubo limpio. Esta solución concentrada de fago se conservó a 4°C.

### **6.6. Purificación de ADN**

El segundo sobrenadante (1 mL) se transfirió a un tubo eppendorf que contenía 400 µL de PEG-NaCl, se mezcló y se incubó por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 13,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante con vacío, se resuspendió el precipitado con amortiguador de yoduro de sodio y se agregaron 250 µL de etanol absoluto para precipitar el ADN. Se dejó reposar por 10 minutos

a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante se eliminó con vacío y se adicionaron 300  $\mu$ L de etanol al 70% para lavar el precipitado. Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante con vacío. Por último el precipitado se secó por centrifugación al vacío y se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua destilada estéril, conservando a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La efectividad del proceso de purificación de ADN se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, empleando 1  $\mu$ L de la solución de ADN en agua, de cada una de las clonas de fago. Se visualizaron las bandas características para cada una de las clonas.

### **6.7. Secuenciación de ADN codificante de péptido en las las clonas de fago**

La determinación de los fragmentos de ADN codificantes para cada péptido se llevó a cabo mediante el método di-deoxinucleótido (Sanger y cols., 1997), siguiendo el protocolo del kit de secuencia de AMERSHAM; que involucra iniciadores de secuencia para la región de inserción del péptido (-28pIII) y la secuencia T7. La secuencia de aminoácidos de los péptidos fue deducida de la secuencia de nucleótidos obtenida del ADN.

### **6.8. Esquema de inmunización**

Se emplearon 15 ratones hembra de la cepa C57/LB6. Se les realizó una toma de sangre antes de iniciar el esquema de inmunización (suero preinmune) que sirvió como control en los ensayos de ELISA. La inmunización se realizó vía intra peritoneal con una dosis de  $2.5 \times 10^{11}$  ufp por ratón, con base en resultados previos, se ha reportado que la inmunización con fago no requiere el uso de adyuvantes debido a que el fago es un potenciador de la respuesta inmune (Gazarian y cols., 2001; 2003; Barbas y cols., 2001).

Se inmunizaron tres ratones por cada clona, el vehículo empleado fue PBS 1X estéril. Las clonas elegidas para la inmunización se indican en la tabla 1.

Se realizaron cuatro estímulos en intervalos de 15 días, el mismo día que se tomó la muestra de sangre posteriormente se dió el estímulo. Las sangrías se realizaron de la vena de la cola.

De la sangre obtenida se separó el suero, incubando a 37°C por 30 minutos para contraer el coágulo y posteriormente centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero obtenido se dividió en alícuotas y se conservó a -20°C hasta su uso.

Tabla 1. Clonas de fago ( $2.5 \times 10^{11}$  ufp) empleadas para la inmunización de ratones.

Grupo	No. ratón	Clona	Secuencia
1	1	Eluato 3ª.ronda	Mezcla de todas las clonas
	2		
	3		
2	4	21	ALSE <u>D</u> KWASTAS
	5		
	6		
3	7	22	ASSL <u>D</u> KWALYTS
	8		
	9		
4	10	23,39	NMDKWA <u>A</u> VFQSK
	11		
	12		
5	13	43	QTMD <u>R</u> WASLRWS
	14		
	15		

## 6.9. Análisis de la reactividad de clonas de fago mediante ensayo de ELISA

### a) Reactividad de péptidos sintéticos

Se emplearon placas de 96 pozos (Nunc-Inmuno plate). Los pozos se sensibilizaron agregando 100  $\mu$ L/pozo de la solución de los péptidos sintéticos (20  $\mu$ g/mL), diluidos en amortiguador de carbonatos (0.2 M, pH 9.5). Se incubó durante toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados con 200  $\mu$ L de PBST (Tween-20 0.1% v/v) durante 2 minutos, a continuación se realizó el bloqueo de los pozos con 300  $\mu$ L de PBS-BSA 1% durante 1 h a 37°C. Posteriormente se realizaron 5 lavados. Se prepararon las diluciones correspondientes de anticuerpo

(MAb 2F5) en PBS-BSA 0.2%-Tween 20 0.2% obteniendo las siguientes concentraciones: 0.01, 0.05, 0.1, 1.0 y 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se colocaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de dichas concentraciones en los pozos correspondientes, se incubó por una hora a 37°C. Se realizaron 6 lavados. Se agregó el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (anti-human Zymed Laboratories Inc., USA) 1:1000 en PBS-BSA 0.2%-Tween 20 0.2%, se incubó durante 1 h a 37°C. Se lavó seis veces y por último se agregó el sustrato para fosfatasa alcalina (p-Nitrofenilfosfato; SIGMA) diluido en amortiguador de dietanolamina 1M. Se incubó 10 minutos a 37°C para que se llevara a cabo la reacción y posteriormente se determinó densidad óptica en un lector automático a 405 nm. Cada determinación se realizó por duplicado.

#### b) Reactividad de clonas de fago frente al 2F5

Se sensibilizó la placa con una solución de fago ( $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$  ufp/ mL en PBS-BSA 50 ng/100  $\mu\text{L}$ ) 100  $\mu\text{L}$ /pozo, se incubó toda la noche a 4°C. Se realizó el mismo procedimiento que en el ensayo para péptidos, sólo que en éste caso se probaron dos concentraciones del 2F5: 1.0 y 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### c) Reactividad de sueros de ratones frente al fago

En términos generales el ensayo se desarrolló de la manera descrita. Como anticuerpo primario se agregaron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de las diluciones de los sueros (preinmunes: 1:500, inmunes: 1:20,000), diluidos en PBS-BSA 0.2%-Tween 20 0.2%. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (anti-mouse Zymed Laboratories Inc., USA) 1:1000 en PBS-BSA 0.2%-Tween 20 0.2%.

#### d) Reactividad del suero de los animales frente al péptido sintético 6373

Se realizó como en el inciso a, con la diferencia de que se realizaron las diluciones correspondientes de los sueros de los ratones como anticuerpos primarios: 1:50, 1:100, 1:300 en PBS-BSA 0.2%-Tween 20 0.2%.

Cabe mencionar que en todos los ensayos de ELISA realizados en este trabajo se colocó un blanco, cuyo valor obtenido fue restado al valor promedio de las muestras.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Reactividad del MAb 2F5 frente a péptidos sintéticos que contienen la región del epitopo ELDKWA de la gp41

Se ha documentado que el anticuerpo monoclonal 2F5 es uno de los que presenta mayor capacidad neutralizante frente a diferentes cepas virales y aislados primarios (McMichael y cols., 2002). Originalmente, se reportó que este anticuerpo reconoce la secuencia lineal <sup>662</sup>ELDKWA<sup>667</sup>, de la gp41 del VIH-1 (Muster y Cols., 1993).

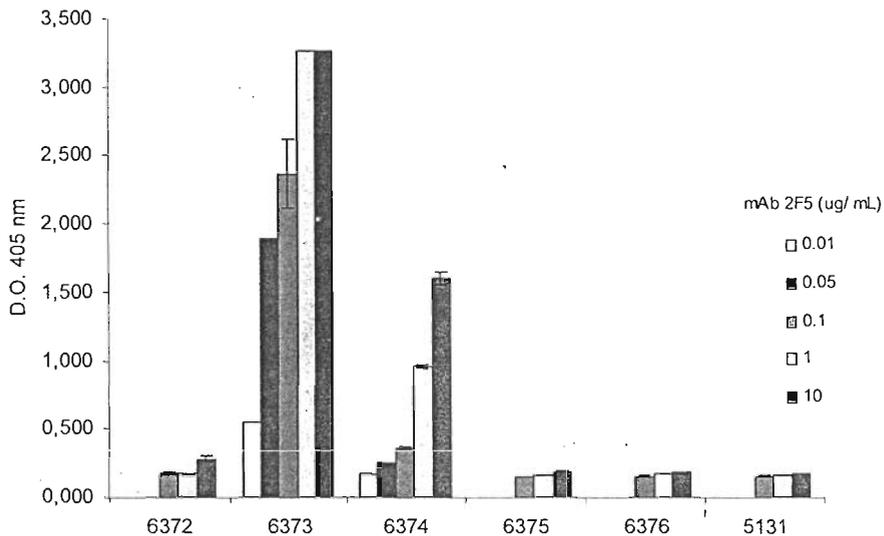
Con el objetivo de identificar la región reconocida por el MAb 2F5 se realizó un mapeo con péptidos sintéticos que se traslapan y que cubren la región 653-683 de la gp 41: <sup>652</sup>QKEKNEQELLEELDKWASSLWNWFDITNWLWYI<sup>682</sup> en donde se encuentra la secuencia ELDKWA. Cada péptido estuvo conformado por 15 aminoácidos. Como control se empleó el péptido de una proteína no relacionada a la superficie viral: Tat, que presenta funciones diferentes a gp41 y cuya secuencia fue <sup>73</sup>PASQPRGDPTGPKES<sup>87</sup>. En la figura 8A se muestran las secuencias de los péptidos sintéticos empleados.

Los resultados en el ensayo de ELISA mostraron que el péptido 6373 con secuencia NEQELLEELDKWASSLW es el que mejor reconocimiento tuvo (Figura 8B), seguido del péptido 6374 LLEELDKWASSLWNWFD. Aunque en ambos casos se encuentra la región ELDKWA, existen aminoácidos en los extremos amino y carboxilo terminal que evidentemente ofrecen un mejor contexto para el reconocimiento del anticuerpo con el péptido 6373. Los péptidos 6372 QKEKNEQELLEELDKW y 6375 DKWASSLWNWFDITNW contienen parcialmente aminoácidos de la región ELDKWA, pero en ambos casos no hubo reconocimiento. El péptido 6376 SLWNWFDITNWLWYI no presentó reactividad, se observa que no tiene ninguno de los aminoácidos que conforman el motivo ELDKWA.

A.

Proteína	Péptido	Secuencia	
		N-terminal 652	C-terminal 682
gp 41	6372	QQEKNEQELLELDKW	
	6373	NEQELLELDKWASLW	
	6374	LLELDKWASLWNWFD	
	6375	DKWASLWNWFDITNW	
	6376	SLWNWFDITNWLWYI	
Tat	5131	<sub>73</sub> PASQPRGDPTGPKES <sub>87</sub>	

B.



**Figura 8.** Reactividad en ELISA de péptidos sintéticos frente al MAb 2F5. A) Secuencia de los péptidos sintéticos empleados. Como control se usó el péptido 5131 correspondiente a la secuencia <sub>73</sub>PASQPRGDPTGPKES<sub>87</sub> de la proteína Tat. En todos los casos se usaron 20 µg/ mL de péptido por pozo. B) Reactividad con diferentes concentraciones de 2F5. El ensayo se realizó por duplicado. A cada muestra se le restó el valor del blanco.

## 7.2. Selección de clonas frente a una biblioteca de péptidos lineales de 12 aminoácidos expresados en el fago M13

Una vez comprobada la especificidad y la reactividad del MAb 2F5, se decidió emplear una biblioteca de péptidos con secuencias al azar de 12 aminoácidos expresados en el fago M13, específicamente en la proteína de superficie III (pIII). Se realizaron tres rondas de selección (tamizado de la biblioteca ó *biopanning*) empleando como blanco el MAb 2F5. Las secuencias de las clonas obtenidas se presentan en la tabla 2.

Se debe mencionar en primer término que después de 3 rondas de selección se encontró que las 30 clonas aisladas (100% de las secuencias) presentaron relación con el epitopo ELDKWA.

Analizando los aminoácidos de los mimótopos con respecto al motivo original ELDKWA se encontró que:

- a) Glutamato (E), no se presentó en ninguna de las secuencias, pero pudo ser sustituido por treonina (T), asparagina (N), serina (S), alanina (A), valina (V), aspartato (D), leucina (L), histidina (H), glicina (G) y lisina (K).
- b) El 40% de las secuencias presentó leucina (L) como ocurre en el epitopo original, pero ésta pudo ser sustituida por prolina (P), metionina (M), tirosina (Y), fenilalanina (F), serina (S), glutamato (E) e isoleucina (I).
- c) Aspartato (D) no presentó variaciones.
- d) El 77% de las secuencias presentó lisina (K) la cual puede ser sustituida por arginina (R) y sólo en una ocasión se encontró prolina (P).
- e) Triptofano (W) no presentó variaciones.

- f) EL 53% de las secuencias presentó alanina (A) la cual pudo ser sustituida por serina (S), valina (V), asparagina (N), glutamina (Q), tirosina (Y) y glicina (G).
- g) El 23% de las secuencias presentó serina (S) ó treonina (T) al final del motivo.

A partir del análisis anterior y de los resultados de la tabla 2 es posible ordenar los mimótopos en 6 grupos de acuerdo a la longitud del motivo que presentan. El primero de ellos está representado por 3 secuencias con el motivo LDKWA (Tabla 3 A). El segundo grupo, contiene 7 secuencias con el motivo LDKW (Tabla 3B). En el tercer grupo se presentan 7 secuencias con el motivo DKWA (Tabla 3C). En el cuarto grupo la **lisina (K)** pudo ser sustituida por **arginina (R)**, en 6 de las secuencias (Tabla 3D). El quinto grupo presentó 5 secuencias con el motivo DKW (Tabla 3E). Finalmente se encontró una sola secuencia, en la cual la **prolina (P)** sustituyó a **lisina (K)**; se agrupó de esta forma debido a que esta variante es poco común, hecho que le confiere propiedades diferentes al motivo por ejemplo que en este caso se encuentra en el extremo amino terminal del péptido (Tabla 3F). Dicho ordenamiento permite visualizar la región mínima reconocida por el anticuerpo, de igual manera sirvió como referencia para seleccionar una clona representativa de cada grupo y llevar a cabo la inmunización de los ratones.

Tabla 2. Secuencias de las clonas seleccionadas por el mAb 2F5 frente a la biblioteca lineal de 12 aminoácidos

Clona/Frecuencia	Epítipo		
		<u>E</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	
	Motivo		
3/2	T T L Q	T <u>L</u> <u>D</u> R <u>W</u> S	Q L
23/2		N M <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	A V F Q S K
1/1	M	D <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> N	M K S L T
2/1	Y	L P <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	T P Q M I
4/1	T N	L F <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> S	Y L A S
5/1	S H P	G P <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> Q	T L P
7/1	K H L	A <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> S	I L A
8/1	L	V P <u>D</u> R <u>W</u> <u>A</u>	F L Q M S
9/1	L P	H <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> S	S I T P
10/1		S <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> V	L A P L A Y
11/1		<u>D</u> P <u>W</u> <u>A</u>	F R W P S G P M
12/1	A L	V S <u>D</u> R <u>W</u> S	W M H Q
13/1	M P	D P <u>D</u> R <u>W</u> <u>A</u>	L W P L
19/1	A A M T N H	V <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	
21/1	A L	S E <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	S T A S
22/1	A S	S <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	L Y T S
24/1	E H	A Y <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	Q R N
25/1		T P <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> S	Y L S N L Q
26/1	Y	K <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	P S L S K
38/1	Q S	H Y <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	S W G F
40/1	Y P	N I <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> V	A L Y H
41/1	A T	N Y <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	L P Y T
42/1		T P <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> Y	G L A P Y R
43/1	Q	T M <u>D</u> R <u>W</u> <u>A</u>	S L R W S
44/1	N G L D I	S <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> G	V
45/1	I T P	A <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> S	T R F
46/1	Y P	T <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	M W M H
47/1		T P <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>	L P H P T L

Tabla 3. Grupos de secuencias de acuerdo a la longitud del motivo que presentan. A)Secuencias con el motivo LDKWA. B)Secuencias con el motivo LDKW. C)Secuencias con el motivo DKWA. D)Secuencias en las que K varía por R. E)Secuencias con el motivo DKW. F)Secuencia en la que K varía por P.

A.	
	Epitopo
	<u>E</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>
Clona/Frecuencia	Motivo
19/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>
22/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>
26/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>

B.	
1/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
7/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
9/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
10/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
44/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
45/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
46/1	<u>L</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>

C.	
23/2	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>
2/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>
21/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>
24/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>
38/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>
41/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>
47/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u>

D.	
3/2	<u>L</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>W</u>
8/1	<u>D</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>A</u>
12/1	<u>D</u> <u>R</u> <u>W</u>
13/1	<u>D</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>A</u>
43/1	<u>D</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>A</u>

E.	
4/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
5/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
25/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
40/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>
42/1	<u>D</u> <u>K</u> <u>W</u>

F.	
11/1	<u>D</u> <u>P</u> <u>W</u> <u>A</u>

### 7.3. Análisis de la reactividad de clonas de fago frente al MAb 2F5.

Dado que los grupos de secuencias aportan diferente información en términos estructurales, se eligieron algunas clonas representativas de los grupos anteriores para enfrentarlas al MAb 2F5 en un ensayo de ELISA y de esta manera evaluar su reactividad de forma individual. Se observó que en general hay un bajo nivel de reactividad, incluso con el eluato de la tercera ronda que presenta un alto contenido de secuencias (100%) con las variantes del motivo (Figura 9). La baja reactividad puede deberse a diversos factores técnicos, entre ellos a que el formato del ensayo de ELISA que se llevó a cabo no es el adecuado para hacer la evaluación de las clonas con este anticuerpo, por lo anterior se debe seguir trabajando en esto.

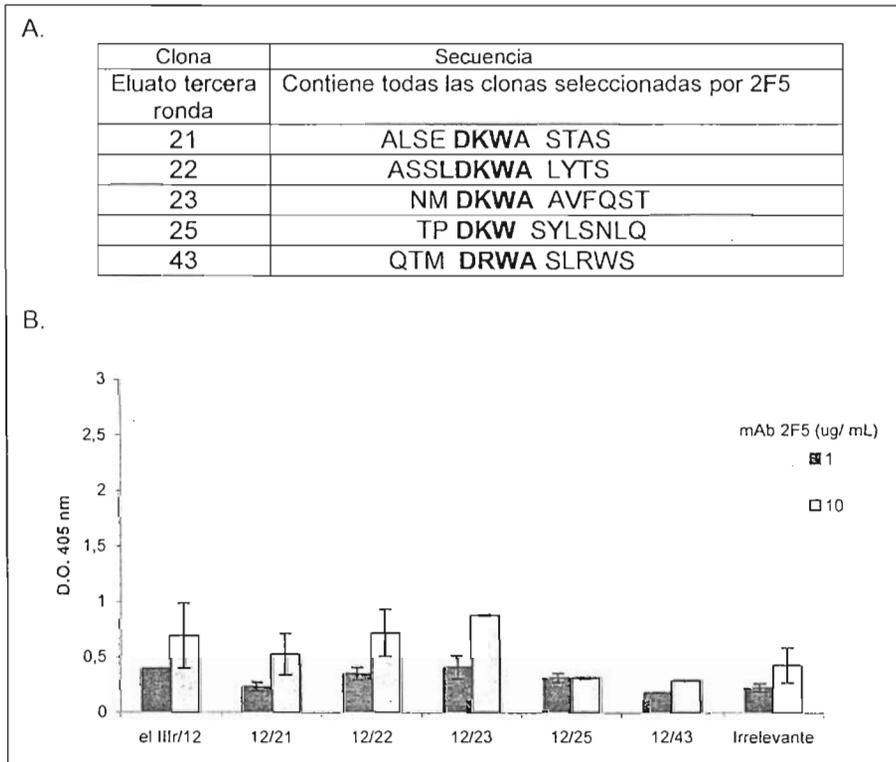


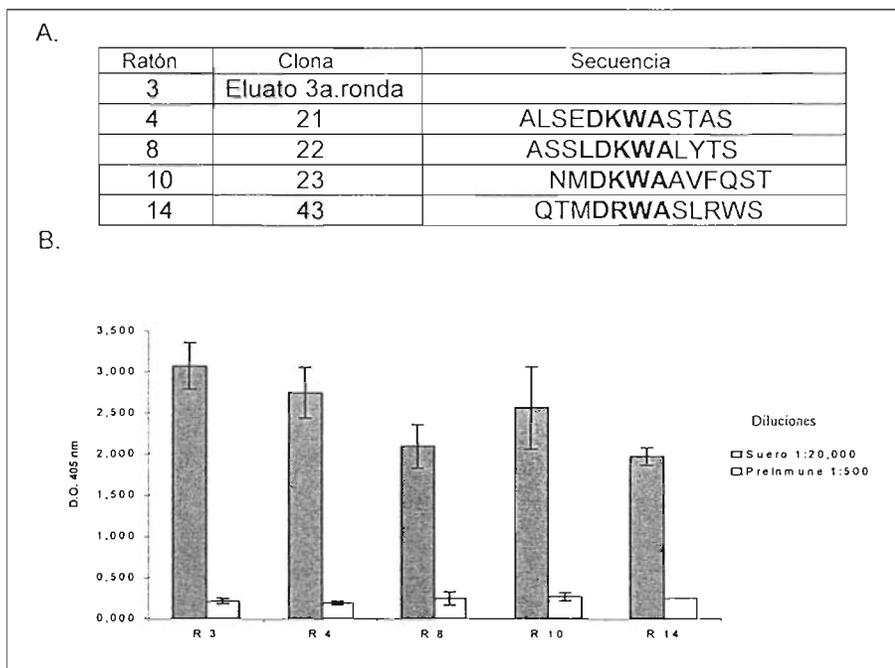
Figura 9. Reactividad en ELISA de mimótopos frente al MAb 2F5. A) Secuencias de los mimótopos elegidos para el ensayo. B) Reactividad de los mimótopos frente a dos concentraciones del MAb 2F5. Como control se enfrentó el anticuerpo a una clona irrelevante con secuencia GSWSVHSPVKPA. A cada muestra se le restó el valor del blanco.

#### 7.4. Evaluación de los mimótopos como inmunógenos

Uno de los principales problemas en el estudio de la región reconocida por 2F5 ha sido la baja inmunogenicidad que presenta la secuencia ELDKWA en experimentos con péptidos sintéticos (Muster y cols., 1994, Eckhart y cols., 1996; Lu y cols., 2000). En trabajos publicados previamente, los mimótopos en fago seleccionados no fueron utilizados como inmunógenos (Muster y cols., 2003; Conley y cols., 1994; Zwick y cols., 2001; Menéndez y cols., 2004), es por ello que se decidió evaluar la propiedad que podían presentar como inmunógenos algunos de los mimótopos obtenidos en el presente estudio. Para ello se inmunizaron ratones, eligiendo cuatro clonas individuales y el eluato de la tercera ronda como inmunógenos.

Para la inmunización se usaron 15 ratones (tres ratones por cada clona), se aplicaron cuatro estímulos con las clonas elegidas por vía intraperitoneal, en intervalos de 15 días aproximadamente (de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos). Después del último estímulo se realizó punción cardíaca a cada animal. Las secuencias de las clonas de fago que se emplearon para inmunizar a los ratones se muestran en la figura 10 A.

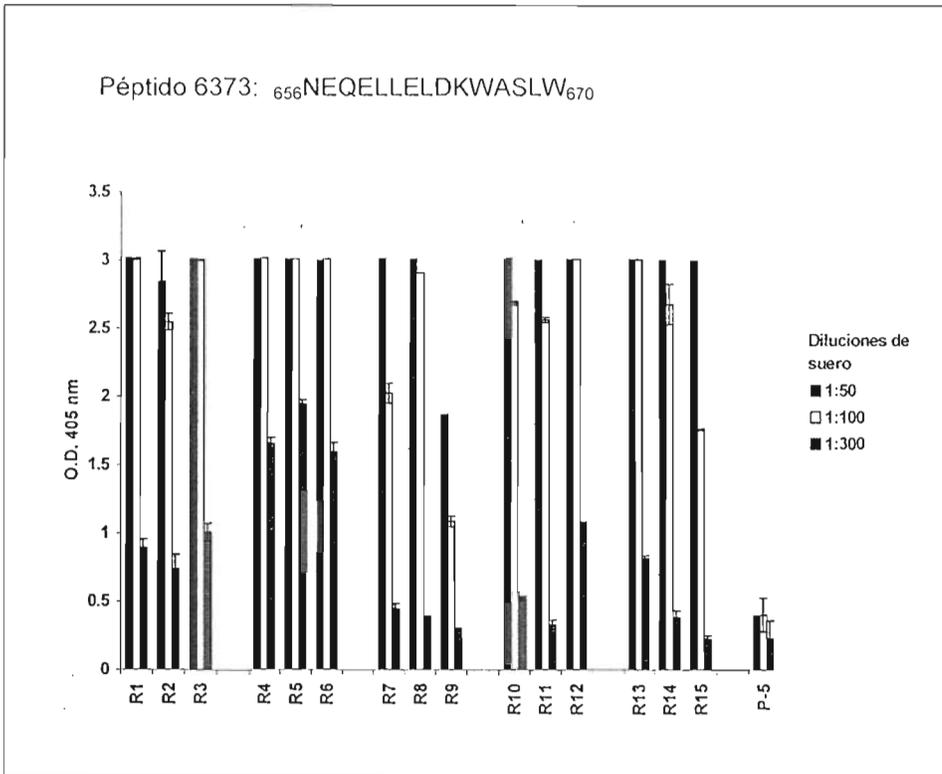
Para evaluar la respuesta generada en los animales, en primer lugar se realizó un ensayo de ELISA frente a las clonas con las que fueron inmunizados (Figura 10 B). Se observó que en todos los casos, los ratones generaron buen título de anticuerpos contra el fago (mayor a 1:20,000). Se debe enfatizar que en este ensayo se evaluó la reactividad hacia todas las proteínas del fago lo cual puede incluir también a la secuencia peptídica que se expresa.



**Figura 10.** Reactividad en ELISA de los sueros de ratones (R) frente a las clonas de fago. A) Secuencias de las clonas con las que fueron inmunizados los ratones. B) Reactividad de los sueros inmunes (1:20,000, barras sombreadas) y preinmunes (1:500, barras blancas) frente a clonas de fago. Sólo se presenta un ratón de cada uno de los cinco grupos. A cada muestra se le restó el valor del blanco.

Una vez comprobado el nivel de anticuerpos contra el fago generado en los ratones para cada clona, se analizó la especificidad de los sueros frente al péptido 6373, el cual presentó la mayor reactividad frente al mAb 2F5 (Figura 8 B). Se observó que todos los sueros de los ratones presentaron altos niveles de reactividad frente al péptido (Figura 11).

Este resultado demuestra que a pesar de las variaciones estructurales observadas en los diferentes mimótopos aislados, estas secuencias son capaces de generar un buen título de anticuerpos específicos para el reconocimiento de la región ELDKWA, de la misma manera que lo hace 2F5.



**Figura 11.** Reactividad en ELISA de los sueros inmunes de ratones (R) frente al péptido sintético 6373: R1, R2 y R3 anti- eluato de la tercera ronda; R4, R5 y R6 anti-ALSEDKWASTAS; R7, R8 y R9 anti- ASSLDKWALYTS; R10, R11 y R12 anti-NMDKWAAVFQST; R13, R14 y R15 anti-QTMDRWASLRWS; P-5 corresponde al suero preinmune del ratón 5 que se usó como control. A cada muestra se le restó el valor del blanco.

## VIII. DISCUSIÓN

Los primeros estudios que se realizaron para identificar al epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 2F5 se llevaron a cabo mediante mapeo con péptidos sintéticos, proponiendo al epítipo como una secuencia lineal de seis aminoácidos **Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala (ELDKWA)**, ubicados en las posiciones 662-667 de la gp 41 del VIH-1. Se sugirió también que la parte nuclear de esta secuencia estaba constituida por **DKW** siendo necesaria e indispensable para el reconocimiento por el anticuerpo (Muster y cols., 1993; 1994; Conley y cols., 1994). En trabajos desarrollados por Purtscher y cols., (1996) mediante estudios de variabilidad antigénica mostraron que los cambios en los aminoácidos glutamato (E) y alanina (A) no producían una reducción significativa a la unión del mAb 2F5, tampoco leucina (L) y triptofano (W) presentaron variación alguna, pero la variabilidad en los aminoácidos aspartato (D) y lisina (K) era capaz de revocar la unión con el MAb.

En el presente trabajo se empleó como herramienta la metodología *phage display* para aportar resultados en términos del epítipo que reconoce el MAb 2F5. El anticuerpo se empleó para aislar péptidos miméticos de la región <sup>662</sup>ELDKWA<sub>667</sub> de la gp 41 bajo el formato de secuencias péptidicas lineales de 12 aminoácidos al azar. Se observó que 2F5 es eficiente para la selección de mimótopos en este tipo de biblioteca ya que después de tres rondas de *biopanning* el 100% de las clonas aisladas mostró alguna homología con el epítipo original.

Se obtuvieron seis grupos de mimótopos los cuales se pueden identificar de acuerdo a la longitud del motivo y a la frecuencia con que fueron seleccionados, las secuencias más abundantes fueron las que presentaron los motivos **LDKW** y **DKWA**, seguidos por los grupos que presentaron los motivos **DRWA** y **DKW**, en menor proporción se encontraron los mimótopos con el motivo **LDKWA** que integran la secuencia más completa con respecto al epítipo original, ELDKWA.

Solamente se aisló un mimótopo con el motivo DPWA. Esta agrupación de secuencias permitió identificar la mínima región que es capaz de seleccionar el anticuerpo: DK(R)W. Del análisis anterior, se sugiere una serie de ocho variantes que permiten identificar los residuos críticos para la unión del anticuerpo con los péptidos: LDKWA, LDKW, DKWA, LDRW, DRWA, DRW, DKW y DPWA. El patrón general de todas las secuencias coincide con los trabajos desarrollados anteriormente (Muster y cols., 1993; 1994; Conley y cols., 1994; Menéndez y cols., 2004). La triada DKW predomina en todos los casos permitiendo la variación de lisina (K) por arginina (R), y solamente se encontró una variante de lisina (K) por prolina (P) hecho reportado con anterioridad únicamente por Menendez y cols. (2004) pero los autores no presentaron la secuencia del péptido. Se debe señalar que en ningún caso se obtuvo completa la secuencia completa del epitopo original <sup>662</sup>ELDKWA<sub>667</sub>.

Diversas investigaciones han aportado información para comprender la importancia y prevalencia de los residuos DKW. Mediante estudios de cristalografía de rayos X en donde 2F5 se acopló a un péptido sintético con la secuencia ELDKWA se determinó que los residuos DKW son críticos para dar una estructura conformacional tipo  $\beta$ -turn (Pai, 2000) importante para la interacción con el anticuerpo. De hecho, esta conformación está presente únicamente en el virus intacto y solamente bajo esta condición es posible la unión de 2F5 y la consecuente neutralización del virus. Por lo tanto, la conformación en  $\beta$ -turn es una necesidad funcional para el proceso de infección del virus (Sattenau y cols., 1995; Barbato y cols., 2003).

En el trabajo desarrollado por Ofek y cols., 2004 se determinaron las distancias de interacción entre el péptido <sup>657</sup>EQELLELDKWASLW<sub>670</sub> y 2F5 (Tabla 4). Reportaron que los aminoácidos <sup>664</sup>DKW<sub>666</sub> presentan las distancias más cortas frente al anticuerpo, de hecho, el triptofano (W) 666 tiene la mayor fuerza de unión, seguido del aspartato (D) 664, es por ello quizás que en la selección de los mimótopos

estos aminoácidos nunca variaron. Respecto a la lisina (K) 665 la unión también es fuerte pero en esta posición hubo variaciones en los mimótopos, probablemente debido a que la arginina (R) y la prolina (P) permiten mantener la conformación de  $\beta$ -turn. Debe señalarse además que en los mimótopos prevalecieron también la leucina (L) 663 en un 40% y la alanina (A) 667 en un 53%, lo cual coincide con que ambos aminoácidos presenten una fuerza de interacción media con el anticuerpo. Por otro lado, se ha reportado que las leucinas (L) 661 y 669 altamente conservadas en aislados virales, presentan fuerte afinidad por el anticuerpo generando un ambiente hidrofóbico alrededor de DKW (Parker y cols., 2001; Tian y cols., 2002; Barbato y cols., 2003; Menendez y cols., 2004), este hecho también se reflejó en los mimótopos aislados dado que la leucina (L) 661 se presentó en el 13% de las clonas y la leucina (L) 669 en el 33% de las mismas. Finalmente, en el mismo estudio de Ofek y cols., se identificó que la serina (S) 668 no interacciona directamente con el anticuerpo sin embargo el 13% de las clonas seleccionadas presentaron serina (prácticamente el mismo porcentaje de clonas que presentaron la leucina 661) lo anterior podría sugerir que la serina 668 sí juega un papel importante en la interacción con el anticuerpo.

En el ensayo de ELISA la reactividad del MAb frente a clonas de fago fue baja, por lo que en términos generales este análisis no permitió identificar alguna diferencia de afinidad entre los diferentes mimótopos obtenidos. Lo anterior puede estar relacionado con el análisis de reactividad frente a los péptidos sintéticos, donde se observó que se requiere de una secuencia más grande que ELDKWA y en un contexto de aminoácidos definido, para que el anticuerpo presente una buena reactividad en el ensayo de ELISA. Respecto al mapeo con péptidos sintéticos sólo el 6373 NEQELLELDKWASLW presentó la mayor reactividad frente al anticuerpo. Este péptido representa la secuencia que es protegida por el paratopo de 2F5 frente a digestión enzimática (Parker y cols., 2001).

Tabla 4. Distancias de unión de los residuos de gp 41 con el MAb 2F5 obtenidas mediante estudios de cristalografía de rayos X (Ofek y cols., 2004); % de cada uno de los residuos presentes en las secuencias seleccionadas.

Residuos de gp 41	Distancia de unión (Å <sup>2</sup> )	% presentado en las secuencias seleccionadas
(E)Glu <sub>657</sub>	16.77	0
(Q)Gln <sub>658</sub>	19.80	0
(E)Glu <sub>659</sub>	24.26	0
(L)Leu <sub>660</sub>	0	7
(L)Leu <sub>661</sub>	68.18	13
(E)Glu <sub>662</sub>	56.52	0
(L)Leu <sub>663</sub>	35.65	40
(D)Asp <sub>664</sub>	64.80	100
(K)Lys <sub>665</sub>	63.63	77
(W)Trp <sub>666</sub>	99.84	100
(A)Ala <sub>667</sub>	27.98	53
(S)Ser <sub>668</sub>	0	13
(L)Leu <sub>669</sub>	51.60	33
(W)Trp <sub>670</sub>	34.40	3

Comparando los resultados obtenidos entre el ELISA y el *biopanning* se observa una gran diferencia ya que en el *biopanning* el anticuerpo tiene la capacidad de seleccionar clonas que presenten la región mínima del epítipo (DKW o su variante DRW) mientras que en el ELISA no se presenta esa capacidad debido a que el anticuerpo 2F5 requiere de una adecuada presentación del epítipo el cual integra una secuencia más larga que ELDKWA (Zwick y cols., 2001; Parker y cols., 2001; Tian y cols., 2002; Menendez y cols., 2004). En el *biopanning* empleando una biblioteca de péptidos lineales de 12 aminoácidos sólo es necesario que los péptidos presenten una pequeña región de anclaje, **DK(R)W**, suficiente para ser reconocida por 2F5.

La aparente simplicidad estructural que fue propuesta para el epítipo reconocido por este anticuerpo ha llevado a diversos intentos para inducir anticuerpos con la misma actividad neutralizante, sin embargo, aunque en algunos casos se ha logrado inducir buenos títulos de anticuerpos capaces de reconocer la secuencia ELDKWA en péptidos sintéticos o en proteínas recombinantes no se logra neutralizar aislados virales. En términos generales, ninguna de las estrategias de inmunización desarrolladas ha generado anticuerpos que presenten una actividad neutralizante comparable a la de 2F5 (Muster y cols., 1994, Eckhart y cols., 1996; Lu y cols., 2000). En nuestro trabajo por primera vez fueron empleados los mimótopos seleccionadas por 2F5 como inmunógenos y se logró generar un buen título de anticuerpos específicos para el reconocimiento de la secuencia NEQELLELDKWASLW, no se puede asegurar que dichos anticuerpos sean capaces de neutralizar aislados virales, para ello deberán realizarse análisis subsecuentes que definan su potencial como anticuerpos neutralizantes.

## CONCLUSIONES.

- El MAb 2F5 fue eficiente para seleccionar mimótopos del epítopo  ${}_{662}\text{ELDKWA}_{667}$  de una biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos pues el 100% de las clonas aisladas presentó alguna relación con la secuencia.
- El análisis de los mimótopos con respecto al epítopo original, mostró que el 100% de las secuencias no presentó cambios en el ácido aspártico (D<sub>664</sub>) y el triptofano (W<sub>666</sub>). Por otro lado el ácido glutámico (E<sub>662</sub>) no se presentó en ninguna de las secuencias. Respecto a la lisina (K<sub>665</sub>) se encontró que solamente pudo ser substituida por arginina (R) y solamente en una ocasión se encontró prolina (P). Finalmente la leucina (L<sub>663</sub>) y la alanina (A<sub>667</sub>) mostraron mayor variabilidad de aminoácidos.
- Con base en su secuencia, los mimótopos se pudieron organizar en seis grupos diferentes: LDKWA, LDKW, DKWA, DKW, (L)DRW(A) y DPWA.
- Por primera vez se mostró que los mimótopos seleccionados presentaron una alta inmunogenicidad en ratones ya que generaron anticuerpos específicos capaces de reconocer la secuencia  ${}_{652}\text{NEQELLELDKWASLW}_{670}$ , hacia la que 2F5 también presenta alta reactividad.

## REFERENCIAS

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. 2002. *Inmunología celular y molecular*. 3a. Edc. España: Iteramericana McGraw-Hill. p.472-484.
2. Alimonti J.B., Ball B., Fowke K.R. 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J. Gen. Virol.* **84**:1649-1661.
3. Arnaud M.C., Gazarian T., Palacios-Rodriguez Y., Gazarian K., Sakanyan V. 2004. Array assessment of phage-displayed peptide mimics of Human immunodeficiency virus type 1 gp41 immunodominant epitope: binding to antibodies of infected individuals. *Proteomics*. **4**:1959-1964.
4. Azzazy H.M., Highsmith W.E. 2002. Phage display technology clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*. **35**:425-445.
5. Barbas III C.F., Burton D., Scott J., Silverman G. 2001. *Phage Display. A laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
6. Barbato G., Bianchi E., Ingallinella P., Hurni W.H., Miller M.D., Ciliberto G., Cortese R., Bazzo R., Shiver J.W., Pessi A. 2003. Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. *J. Mol. Biol.* **330**:1101-1115.
7. Berger E., Murphy P., Farber J. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Ann. Rev. Immunol.* **17**:657-700.
8. Buchacher A., Predl R., Tauer C., Purtscher M., Gruber G., Steindl F., Trkola A., Jungbauer A., Katinger H. 1992. Human monoclonal antibodies against gp41 and gp120 potential agent for passive immunization. *Vaccines*. **92**:91-195.
9. Burton D. 2003. Immunofocusing: antigen engineering to promote the induction of HIV-neutralizing antibodies. *TRENDS in mol medicine*. **9**:468-473.
10. Burton D., Desrosiers R., Doms R., Koff W., Kwong P., Moore J., Nabel G., Sodrosky J., Wilson I., Wyatt R. 2004. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nature immunology*. **5**:233-236.
11. Cao Y., Qin L., Zhang L., Safrit J., Ho D.D. 1995. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **332**:201-208.

12. Conley A.J., Kessler J.A.I., Boots L.J., Tung J.-S., Arnold B.A., Keller P.M., Shaw A.R., Emini E.A. 1994. Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 3348–3352.
13. Eckhart L., Raffelsberg W., Ferko B., Klima A., Purtscher M., Katinger H., R ker F. 1996. Immunogenic presentation of a conserved gp41 epitope of human immunodeficiency virus type 1 on recombinant surface antigen of hepatitis B virus. *J Gener. Virol.* **77**:2001-2008.
14. Enshell-Seijffer D., Smelyanski L., Vardinon N., Yust I., Gershoni J. 2001. Dissection of the humoral immune response toward an immunodominant epitope of HIV: a model for the analysis of antibody diversity in HIV+ individuals. *FASEB J.* **15**:2112-2120.
15. Fonjungo PN, Mpoudi E.N., Torimiro J.N., Alemnji G.A., Eno L.T., Nkengasong J.N., Gao F., Rayfield M., Folks T.M., Pieniazek D., Lal R.B. 2000. Presence of diverse human immunodeficiency virus type 1 viral variants in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **16**:1319-1324.
16. Frankel S., Steinman R., Michael N., Kim S., Bhardwaj J., Pope M., Louder M., Ehrenberg P., Parren P., Burton D., Katinger H., Vancott T., Robb M., Birk D., Mascola J. 1998. Neutralizing monoclonal antibodies block Human Immunodeficiency Virus type 1 infection of dendritic cells and transmission to T cells. *J. Virol.* **72**:9788-9794.
17. Gallo R.C. 2002. Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control. *Immunological reviews.* **185**:236-265.
18. Gao F., Bailes E., Robertson D.L., Chen Y., Rodenburg C.M., Michael S.F., Cummins L.B., Arthur L.O., Peeters M., Shaw G.M., Sharp P.M., Hahn B.H. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature.* **397**:436-441.
19. Gazarian K., Gazarian T. Solis C. 2000. Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Immunol. Lett.* **72**:191-195.
20. Gazarian K; Rowley M., Gazarian T., Sotelo J., Garc a-Mendoza E., Hern andez R. 2001. Post-panning computer-aided analysis of phagotype collections selected with neurocysticercosis patient polyclonal antibodies: separation of disease-relevant

- and irrelevant peptide sequences. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. **4**:165-179.
21. Gazarian K., Caldwell G.W., Atta-ur-Rahman, Springer B.A. 2005. Drug discovery and design *Via* high throughput screening of combinatorial phage display protein-peptide libraries. In: *frontiers in drug design and discovery*. Bentham Science Publishers. USA. **1**:29-67.
  22. Gazarian T.G., Selisko B., Héron P., Gazarian K. 2001. Isolation and structure-functional characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius*. *Mol. Immunol.* **37**:755-766.
  23. Gazarian T.G., Selisko B., Gurrola B.G., Hernández R., Possani L.D., Gazarian K.G. 2003. Potential of peptides selected from random phage-display libraries to mimic conformational epitopes: a study on scorpion toxin Cn2 and the neutralizing monoclonal antibody BCF2. *Comb. Chem. High. Throughp. Screen.* **6**:109-122.
  24. Geysen M., Rodda S., Mason T. 1986. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* **23**:709-715.
  25. Haase A. 1999. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Ann. Rev. Immunol.* **17**:625-656.
  26. Hillis D.M. 2000. Origins of HIV. *Science*. **288**:1757-1759.
  27. Kishchenko G., Batliwala H., Makowski L. 1994. Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. *J. Mol. Biol.* **241**:208-213.
  28. Klasse P.J., Sattentau Q.J. 2002. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J. Gen. Virol.* **83**:2091-2108.
  29. Korber B., Muldoon M., Theiler J., Gao F., Gupta R., Lapedes A., Hahn B., Wolinsky S., Bhattacharya T. 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*. **288**:1789-1795.
  30. Lu Y., Xiao Y., Ding J., Dierich M.P., Chen Y.H. 2000. Multiepitope vaccines intensively increased levels of antibodies recognizing three neutralizing epitopes on human immunodeficiency virus-1 envelope protein. *Scand J Immunol.* **51**:497-501.
  31. McMichael A., Hanke T. 2002. The quest for an AIDS vaccine: is the CD8+ T-cell approach feasible?. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:283-291.
  32. McMichael A., Hanke T. 2003. HIV-Vaccines 1983-2003. *Mat. Med.* **9**:874-880.

33. Medrano S.L., Pérez L., Thomson M., Nájera R. 2002. Avances en el desarrollo de vacunas frente al sida. Pub. of. SEISIDA. **13**: 520-525.
34. Menéndez A., Chow K.C., Pan O.C.C., Scott J.K. 2004. Human Immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 is multispecific for sequences flanking the DKW core epitope. J. Mol. Biol. **338**:311-327.
35. Moore J.P., Cao Y., Ho D.D., Koup R.A. 1994. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. **68**:5142-5155.
36. Muster T., Steindl F., Purtscher M., Trkola A., Klima A., Himmler G., Rüber F., Katinger H. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of Human Immunodeficiency Virus type 1. J. virol. **67**:6642-6647.
37. Muster T., Guinea R., Trkola A., Purtscher M., Klima A., Steindl F., Palese P., Katinger H. 1994. Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. J. Virol. **68**:4031-4034.
38. New England Bio Labs, Ph-12. Phage display peptide library kit. Instruction manual. Catálogo 8100:1-21.
39. Ofek G., Tang M., Sambor A., Katinger H., Mascola J.R., Wyatt R., Kwong P. 2004. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. J. Virol. **78**:10724-10737.
40. Pai J. 2000.  $\beta$ -turn. Patente WO-00/61618. World Intellectual Property Organization.
41. Palacios-Rodríguez Y. 2003. Investigación de la respuesta inmune contra un epitopo inmunodominante de la gp41 del VIH-1 en pacientes infectados, antes y durante tratamiento antirretroviral. Un estudio con *Phage display*. Tesis de maestría. Escuela nacional de ciencias biológicas. Departamento de inmunología. IPN.
42. Parker C., Deterding L., Hager-Braun C., Binley J., Schülke N., Katinger H., Moore J., Tomer K. 2001. Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5. J. Virol. **75**:10906-10911.

43. Parren P., Wang M., Trkola A., Binley J., Purtscher M., Katinger H., Moore J., Burton D. 1998. Antibody neutralization-resistant primary isolates of Human Immunodeficiency Virus type 1. *J. Virol.* **72**:10270-10274.
44. Petrenko V.A., Vodyanoy V.J. 2003. Phage display for detection of biological threat agents. *J. Microbiol. Met.* **53**:253-262.
45. Pognard P., Sabbe R., Picchio G., Wang M., Gulizia R., Katinger H., Parren P., Mosier D., Burton D. 1999. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity.* **10**:431-438.
46. Purtscher M., Trkola A., Grassauer A., Schulz P., Klima A., Döpfer S., Gruber G., Buchacher A., Muster T., Katinger H. 1996. Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS.* **10**:587-593.
47. Regueiro J.R., López C., González S., Martínez E. 2003. *Imunología. Biología y patología del sistema inmune.* 3ª. Ed. España: Medica Panamericana. p. 143-147.
48. Sanger F., Niklen S., Coulson A. 1977. DNA sequencing with Chain termination inhibitors. *PNAS USA.* **74**:4619-4623.
49. Santamaria H. 2003. Phage display y su aplicación en el diagnóstico clínico. *Rev. invest. clín.* **55**:711-7118.
50. Sattenau Q., Zolla-Pazner S., Pognard P. 1995. Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1. *Virology.* **206**:713-717.
51. Scala G., Chen X., Liu W., Telle J.N., Cohen O., Vaccarezza M., Igarashi T., Fauci A. 1999. Selection of HIV –specific iogenetic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1 positive sera. *J. Immunol.* **162**:6155-6161.
52. Scott J. M., Smith G.P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science.* **249**:386-390.
53. Smith G.P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **228**:1315-1317.
54. Smith G.P., Scott J.M. 1993. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Met. Enzimol.* **217**:228-257.
55. Soler C., Gudiño J. 1995. A 11 años del descubrimiento del virus del virus de inmunodeficiencia humana. *Salud pública de México.* **37**:499-509.
56. Stephen C. W., Helminen P., Lanen D.P. 1995. Characterization of epitopes on human p53 using phage display peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J. Mol. Biol.* **248**:58-78.

57. Tscherning-Casper C, Dolcini G., Mauciere P., Fenyo E.M., Barre-Sinoussi F., Menu A.E. 2000. Evidence of the existence of a new circulating recombinant form of HIV type 1 subtype *AJ* in Cameroon. The European Network on the Study of In Utero Transmission of HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **16**:1313-1318.
58. Tian Y., Ramesh C.V., Ma X., Naqvi S., Patel T., Cenizal M., Tiscione M., Diaz K., Crea T., Arnold E., Arnold G.F, Taylor J. W. 2002. Structure- affinity relationships in the gp41 ELDKWA epitope for the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5: effects of side-chain and backbone modifications and conformational constraints. *J. Pep. Res.* **59**:264-276.
59. [www.onusida.com](http://www.onusida.com)
60. [www.ssa.org.mx/censida](http://www.ssa.org.mx/censida)
61. Zolla-Pazner S. 2004. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nature Reviews*. **4**:199-210.
62. Zhang M., Xiao X., Sidorov I., Choudhry V., Cham F., Zhang P., Bouma P., Zwick M., Choudhary A., Montefiori C., Broder C., Burton D., Quinnan G., Dimitrov D. 2004. Identification and characterization of a new cross-reactive Human Immunodeficiency Virus type 1-neutralizing human monoclonal antibody. *J. Virol.* **78**:9233-9242.
63. Zwick M.B., Labrijn A.F., Wang M., Spennleauer C., Ollmann-Saphire E., Binley J.M., Moore J.P., Stiegler G., Katinger H., Burton D., Parren P. 2001. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J. Virol.* **75**:10892-10905.
64. Zwick M.B., Komori H.K., Stanfield R. L., Church S., Wang M., Parren P.W., Kunert R., Katinger G., Wilson I.A., Burton D.R. 2003. The long third complementary-determining region of the heavy chain is important in the activity of the broadly neutralizing anti-human Immunodeficiency Virus type 1 antibody 2F5. *J. Virol.* **78**:3155-3161.

## ANEXO I

### SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

#### A.1.1. Amortiguadores y soluciones para *Biopanning*

1. Solución concentrada de tetraciclina

20 mg/mL en etanol/agua. Conservar a -20°C en oscuridad. Homogenizar en vórtex antes de usar.

2. IPTG/Xgal

Mezclar 1.25 g de IPTG (isopropil β-D-galactósido) en 25 mL de dimetilformamida. Conservar a -20°C en oscuridad.

3. PEG/NaCl

Polietilenglicol 8000 al 20%, NaCl 2.5 M. Esterilizar en autoclave por separado y mezclar. Conservar a temperatura ambiente.

4. PBS 10X (1 litro)

6.1 g de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 1.9 g de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 80g de NaCl, 2 g de cloruro de potasio (KCl). Ajustar a pH 7.4. Esterilizar en autoclave. Realizar la dilución correspondiente para obtener PBS 1X.

5. Amortiguador de elución

Glicina 0.2 M/HCl en BSA 1mg/ mL, pH 2.2.

6. Amortiguador para ajustar pH de los eluatos

Tris 1 M/HCl, pH 9.1.

7. PBS/Azida (NaN<sub>3</sub>) al 0.02%

1 mL de NaN<sub>3</sub> en 49 mL de PBS 1X.

**A.1.2. Medios de cultivo para *Biopanning***

1. LB (Luria Bertani) 1L

10 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl. Esterilizar en autoclave y conservar a temperatura ambiente.

2. 2x YT1L

10 g de NaCl, 10 g de extracto de levadura, 16 g de triptona. Esterilizar en autoclave y conservar a temperatura ambiente.

3. Agarosa Top 1L

10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 g de MgCl<sub>2</sub>, 7 g de agarosa. Esterilizar en autoclave, conservar sólido a temperatura ambiente, fundir para su uso.

4. LB-tetraciclina en placas

Adicionar al medio LB 15 g/L de agar. Esterilizar en autoclave, enfriar a 70°C y adicionar 1mL de la solución concentrada de tetraciclina, homogenizar y vaciar en cajas Petri. Conservar en oscuridad a 4°C. Concentración final: 20 µg/ mL .

5. Cajas con LB/IPTG/X-gal

Adicionar al medio LB 15 g/L de agar. Esterilizar en autoclave, enfriar a 70°C y adicionar 1 mL de la solución concentrada de IPTG/X-gal, homogenizar y vaciar en cajas Petri. Conservar en oscuridad a 4°C. Concentración final: 50 µg/mL IPTG; 40 µg/mL X-gal.

### **A.1.3. Soluciones para obtención de ADN de cadena sencilla (ss-form)**

#### **1. Amortiguador de yoduro**

10 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 4 M NaI. Se conserva a temperatura ambiente en oscuridad.

### **A.1.4. Preparación del cultivo de E.coli<sub>ER2738</sub> en fase logarítmica**

Se inoculan 50 mL del medio líquido LB-tetraciclina (30 µL de la solución concentrada de tetraciclina), con una solución de E.coli cepa ER2738 (BioLabs), se incuba a 37°C con agitación suave durante toda la noche o hasta obtener un crecimiento en fase log (D.O.<sub>600</sub> 0.5).

### **A.1.5. Gel de acrilamida (6%) para secuenciación de ADN**

Se mezclan 33.6 g de Urea, 11.6 mL de poliacrilamida (40%), 16 mL de Tbe 5X, 28 mL de agua destilada y desionizada. La mezcla se filtra y se desgasifica con vacío. Para polimerizar se añaden 640 µL de persulfato de amonio (10%) y 16 µL de TEMED (0.1 mg/µL de H<sub>2</sub>O). Se debe trabajar de preferencia en campana.

### **A.1.6. Gel de agarosa**

Se agregan 0.4 g de agarosa en 49 mL de H<sub>2</sub>O, se hierve y se añade 1 mL de TAE 50X más 8 µL de bromuro de etidio.

### **A.1.7. Soluciones para ELISA**

- 1. Dilución del péptido:** Buffer de carbonatos 0.2M, pH 9.5.
- 2. Dilución del fago:** PBS/BSA 50 ng/100 µL.

3. Solución bloqueadora: PBS/BSA 1%.
4. Dilución de anticuerpos: PBS/BSA 0.2%/Tween-20, 0.2%.
5. Solución de lavado para péptidos: PBS/Tween-20, 0.1%.
6. Solución de lavado para fago: PBS/Tween-20, 0.2%.
7. Amortiguador de Dietanolamina: 100 mL de dietanolamina, 102 mg de  $\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 g de  $\text{NaN}_3$ . Se ajusta pH a 9.8 con HCl. Se ajusta a 1 litro con agua destilada. Se conserva a temperatura ambiente y en frasco ámbar.

**ANEXO II**  
**Títulos de fago**

A.2.1. Eluatos de las rondas de *Biopanning* con 2F5

ELUATO	TÍTULO UNIDADES FORMADORAS DE PLACA (u.f.p.)/mL
Primera ronda	$5.9 \times 10^6$
Primera ronda amplificada	$8.39 \times 10^{14}$
Segunda ronda	$2.6 \times 10^{10}$
Segunda ronda amplificada	$9 \times 10^{12}$
Tercera ronda	$2.5 \times 10^{10}$

A.2.2. A partir del eluato de la tercera ronda se seleccionaron las clonas individuales

Título de algunas clonas de fago después de la amplificación individual (solución concentrada de fago)

No.CLONA	Secuencia de la clona	TÍTULO UNIDADES FORMADORAS DE PLACA (u.f.p.)/mL
2	YLPDKWATPQMI	$6 \times 10^{11}$
3	TTLQTLDRWSQL	$7 \times 10^{13}$
11	DPWAFRWPSGPM	$1.18 \times 10^{13}$
22	ASSLDKWALYTS	$2.1 \times 10^{12}$
47	TPDKWALPHPTL	$2.6 \times 10^{12}$