

Tesis defendida por

**Olivia Cabanillas Bernal**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

Director del Comité

---

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Miembro del Comité

---

Dra. Blanca Claudia Farfán

Miembro del Comité

---

Dr. Fernando Díaz Herrera

Coordinador  
del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

Dr. Jesús Favela Vara

Director de la  
Dirección de Estudios de Posgrado

Febrero de 2014

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA  
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**Análisis comparativo de los niveles de expresión de fragmentos de anticuerpos  
recombinantes vNAR en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli***

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Olivia Cabanillas Bernal

Ensenada, Baja California, México

2014

Resumen de la tesis de Olivia Cabanillas Bernal, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con Orientación en Biotecnología Marina

Análisis comparativo de los niveles de expresión de fragmentos de anticuerpos recombinantes vNAR en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*.

Resumen aprobado por:

---

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

## Resumen

Los fragmentos de anticuerpo de dominio sencillo (~12 kDa), han mostrado ventajas sobre las moléculas de anticuerpo convencionales (~150 kDa) respecto a su aplicación clínica. La tecnología de ADN recombinante ha permitido la reducción al mínimo de los fragmento de anticuerpo que mantiene la afinidad parental de unión al antígeno. Un tipo distintivo de inmunoglobulina llamado IgNAR (nuevo receptor de antígeno) ha sido identificado en los peces cartilagosos como los tiburones. Las IgNAR's carecen de cadenas ligeras y tienen la región de unión al antígeno comprendida en un solo dominio de cadena pesada denominado vNAR. Los dominios vNAR tienen características particulares como un tamaño pequeño (12-15 kDa), su CDR3 largo (13-23 residuos de aminoácidos), estabilidad térmica, estabilidad química y resistencia a pH gástrico. En el presente trabajo se compararon dos modelos de expresión (*Escherichia coli* y *Pichia pastoris*) con la finalidad de determinar cual sistema produce el mayor rendimiento del anticuerpo vNAR denominado T43. Este vNAR tiene la capacidad de neutralizar al Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ), una citocina que al expresarse en altas concentraciones está implicada de manera negativa en algunas enfermedades inflamatorias agudas. Se utilizó la cepa Origami 2 (DE3) de *E. coli*, la cual posee mutaciones en los genes tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*), lo que mejora considerablemente la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma y favorece el plegamiento de proteínas. A demás se empleó la cepa SMD1168 de *P. pastoris*, que es deficiente de proteasas A. Previo a la expresión, se optimizaron las condiciones de inducción de la expresión del vNAR T43 en los dos microorganismos. Los rendimientos obtenidos fueron de 4.66 mg/L para *P. pastoris*, mientras que para *E. coli* se evaluaron dos vectores, el pET101/D y pComb3x que presentaron rendimientos de 0.90 mg/L y 0.27 mg/L respectivamente. Para verificar la capacidad de neutralización *in vivo* del efecto de TNF $\alpha$  por el vNAR T43 producido en ambos modelos de expresión, se empleó un modelo de choque endotóxico en ratones Balb/c. Existe un aumento en la supervivencia de al menos 12 horas en los ratones tratados con los anticuerpos vNAR respecto al control sin tratamiento. No se encontró diferencia entre la actividad del vNAR T43 expresado en la cepa SMD1168 de *P. pastoris* y la cepa Origami 2 (DE3) de *E. coli*. Estos resultados sugieren que los dos modelos de expresión empleados son capaces de producir el vNAR T43 de forma activa y funcional, siendo *P. pastoris* el modelo que proporciona el mayor rendimiento de expresión (hasta cinco veces mayor que el de *E. coli*).

Palabras clave: vNAR, *E. coli*, *P. pastoris*, TNF $\alpha$ , choque endotóxico.

Abstract of the thesis presented by Olivia Cabanillas Bernal, as a partial requirement to obtain the master in science in life sciences with orientation marine biotechnology.

Comparative analysis of expression levels of recombinant antibody fragments vNAR in *Pichia pastoris* and *Escherchia coli*.

Abstract approved by:

---

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

### **Abstract**

Single-domain antibody fragments (~12 kD), have shown advantages over conventional antibody molecules (~150 kD) in regards to their clinical application. Recombinant DNA technology has allowed the reduction to the minimal antibody fragment that maintains the parental union affinity to the antigen. A distinct type of immunoglobulin called IgNAR (new antigen receptor) has been identified in cartilaginous fish such as sharks. The IgNAR's lack light chains and have the antigen-binding fragments comprised in a single heavy chain domain termed vNAR. These vNAR domains have particular characteristics such as small size (12-15 kD), long CDR3 loop (13-23 aminoacids residues), thermal stability, chemical stability and resistance to gastric pH. In this study two expression models were compared (*Escherichia coli* and *Pichia pastoris*) with the objective of determining which system will provide the higher yield of a vNAR antibody called T43. This vNAR has the capacity to neutralize the Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF $\alpha$ ), a cytokine implicated in a negative way in some acute inflammatory diseases. An *E. coli* Origami 2 (DE3) strain was used, that has mutations in the thioredoxin reductase (*trxB*) and glutathione reductase (*gor*) genes, which considerably improve the formation of disulfide bonds in the cytoplasm and favor protein folding. The *P. pastoris* SMD1168 strain deficient in aspartyl proteases was also used. Previous to expression, induction conditions were optimized for expression of the vNAR in both microorganisms. The yields obtained were 4.66 mg/L for *P. pastoris*, while for *E. coli* two vectors were evaluated, pET101/D and pComb3x which presented yields of 0.90 mg/L and 0.27 mg/L respectively. To verify the *in vivo* neutralizing capacity of the TNF $\alpha$  by the T43 vNAR produced in both expression models, an endotoxic shock model was employed in Balb/c mice. There is an increase in survival of least 12 hours in mice treated with the vNAR antibody compared to the untreated control. No difference was found in T43 protein activity expressed in *P. pastoris* SMD1168 strain and *E. coli* Origami 2 (DE3) strain. These results suggest that both expression models are capable of producing active and functional T43 vNAR, being *P. pastoris* the expression model that provided a higher expression yield (up to five times that of *E. coli*).

**Keywords: vNAR, *E. coli*, *P. pastoris*, TNF $\alpha$ , endotoxic shock.**

## Dedicatoria

A mis padres Efrén y Olivia, porque a ustedes les  
debo todo lo que soy.

A Roberto, por ser mi compañero y mi mejor  
amigo en esta aventura llamada vida.

Los amo...

## **Agradecimientos profesionales**

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por la oportunidad de incorporarme al Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida.

A mi director de tesis, Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro por la confianza depositada en mí, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y darme la oportunidad de participar en este proyecto.

A mi comité de tesis, Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez y Dra. Blanca Claudia Farfán por su apoyo, valiosas críticas y correcciones durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón por su asesoría y consejos, por la capacitación y enseñanzas de diferentes técnicas durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas por compartir conmigo sus conocimientos, por su valiosa asesoría y revisiones a lo largo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría.

A las Dras. Tanya Camacho y Karla Cervantes, así como a los M.C. Samanta Jiménez y Pavel Lugo por su apoyo durante los experimentos con ratones.

Al personal académico del programa de posgrado en Ciencias de la Vida por sus valiosas clases y conocimientos compartidos.

A todo el personal administrativo de CICESE por su apoyo en los diferentes trámites a lo largo de mis estudios de maestría, especialmente a Adriana Mejía, por toda su atención y amabilidad durante estos dos años.

## Agradecimientos personales

A Dios, por llenarme de fe, por darme salud y fuerza para salir adelante, Gracias infinitas!

A mis padres, Efrén Cabanillas y Olivia Bernal, por su confianza, por su apoyo incondicional, por dar siempre lo mejor de ustedes para que yo salga adelante, los amo.

A Roberto Cruz, mi novio, mi mejor amigo, gracias por apoyarme siempre, por hacer de mis sueños también tus sueños, a tu lado soy inmensamente feliz, te amo.

A mi hermana, Brenda Isela Cabanillas Bernal, por todo el apoyo que me ha brindado a lo largo de mi vida, por quererme y aguantarme.

A mi amiga María Fernanda Lazo (Mafer), por todo su apoyo y consejos tanto en lo personal como en lo profesional, por estar siempre ahí a pesar de la distancia. Tu amistad es única.

Al Dr. Fernando Lledías Martínez, por haber despertado en mí el gusto por la investigación científica y por el apoyo y motivación que siempre me ha brindado.

A mis amigos y compañeros de maestría, sobre todo a Monse, Constanza, Itzel y Sergio por todos los buenos momentos compartidos estos años, fue un placer coincidir con ustedes.

A todo los integrantes de la unidad de desarrollo biomédico (estudiantes, técnicos y administrativos), por compartir conmigo sus conocimientos y hacer agradable cada momento en laboratorio.

A todas las personas, familia, amigos, investigadores entre otros, que han puesto su confianza en mí y que me han apoyado y alentado de diferentes maneras a seguir adelante.

¡Gracias!

## Contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos profesionales.....	v
Agradecimientos personales.....	vi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tablas.....	xiv
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Anticuerpos.....	3
2.1.1 Anticuerpos recombinantes.....	5
2.1.2 Anticuerpos de dominio sencillo.....	5
2.2 Sistemas de expresión.....	7
2.2.1 Expresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.2.2 Expresión de proteínas en <i>Pichia pastoris</i> .....	8
2.3 Factor de necrosis tumoral alfa.....	9
3. Justificación e Hipótesis.....	13
3.1 Justificación.....	13



	Página
3.2 Hipótesis.....	14
4. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos particulares.....	15
5. Materiales y métodos.....	16
5.1 Aislamiento del dominio vNAR.....	16
5.2 Vectores y Cepas.....	16
5.3 Expresión de la proteína en <i>P. pastoris</i> .....	19
5.3.1 Transformación en <i>E. coli</i> TOP10 con pPICZ $\alpha$ A + la secuencia de <i>t43</i> optimizada para <i>P. pastoris</i> (pPICZ $\alpha$ A + <i>t43</i> ).....	19
5.3.2 Purificación del ADN plasmídico.....	20
5.3.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	20
5.3.4 Digestión del plásmido pPICZ $\alpha$ A+ <i>t43</i> .....	20
5.3.5 Purificación del plásmido digerido.....	21
5.3.6 Transformación en <i>P. pastoris</i> (X-33 y SMD1168).....	21
5.3.7. PCR de colonia.....	22
5.3.8 Optimización de las condiciones de síntesis de la proteína T43 en la cepa SMD1168.....	23
5.3.9 Optimización de las condiciones de síntesis de la proteína T43 en la cepa X-33.....	24
5.3.10 Optimización de las condiciones preseleccionadas de síntesis de la proteína recombinante.....	25

	Página
5.3.11 Análisis de la proteína recombinante.....	25
5.3.11.1 Preparación de las muestras.....	25
5.3.11.2 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes Tricina-SDS-PAGE.....	25
5.3.11.3 Inmunodetección de las proteínas recombinantes.....	26
5.3.12 Expresión de la proteína en la cepa SMD1168.....	27
5.3.13 Purificación del fragmento de anticuerpo recombinante por cromatografía de afinidad.....	27
5.3.14 Diálisis.....	28
5.3.15 Cuantificación de las muestras.....	28
5.4 Expresión de la proteína en <i>E. coli</i> .....	28
5.4.1 Purificación del plásmido pComb3x+t43.....	28
5.4.2 Clonación del gen <i>t43</i> en pET101/D partiendo de la secuencia <i>t43</i> optimizada (pET101/D+t43).....	28
5.4.3 Transformación en <i>E. coli</i> (Origami 2 (DE3)).....	30
5.4.4 Optimización de las condiciones de producción de la proteína recombinante en la cepa Origami 2 (DE3) de <i>E. coli</i> .....	31
5.4.5 Extracción citoplasmática de la proteína recombinante.....	32
5.4.6 Expresión de la proteína recombinante en células Origami 2 (DE3) transformadas con pET101/D o pComb3x.....	32
5.5 ELISA de reconocimiento a TNF $\alpha$ .....	32
5.6 Ensayos de neutralización de TNF $\alpha$ en ratones con modelo de choque endotóxico.....	33

	Página
5.6.1 Medición de TNF $\alpha$ sérico.....	34
6. Resultados.....	35
6.1 Expresión de la proteína en <i>P. pastoris</i> .....	35
6.1.1 Transformación en <i>E. coli</i> (TOP10).....	35
6.1.2 Transformación en <i>P. pastoris</i> (X-33 y SMD1168).....	36
6.1.2.1 PCR de colonia ( <i>P. pastoris</i> ).....	36
6.1.3 Optimización de las condiciones de producción de proteína recombinante.....	38
6.1.4 Condiciones preseleccionadas de expresión del dominio vNAR recombinante.....	40
6.1.5 Expresión de la proteína recombinante en la cepa SMD1168.....	43
6.1.6 Purificación del anticuerpo T43.....	43
6.1.7 Análisis del anticuerpo T43.....	44
6.1.7.1 Análisis del anticuerpo en SDS-PAGE al 12%.....	44
6.1.7.2 Inmunodetección del anticuerpo recombinante.....	45
6.1.8 Cuantificación y rendimiento del anticuerpo T43 expresado en la cepa SMD1168 de <i>P. pastoris</i> .....	45
6.2 Expresión de la proteína en <i>E. coli</i> .....	46
6.2.1 Purificación del plásmido pComb3x+t43.....	46
6.2.2 Clonación del gen <i>t43</i> optimizado en pET101/D.....	47
6.2.3 Transformación en la cepa de <i>E. coli</i> Origami 2 (DE3).....	50
6.2.4 Optimización de las condiciones de síntesis de la proteína	

	Página
recombinante en <i>E. coli</i> Origami 2 (DE3).....	52
6.2.5 Expresión de la proteína recombinante en células Origami 2 (DE3) transformadas con pET101/D o pComb3x.....	55
6.2.6 Cuantificación y rendimiento de la proteína T43 expresada en células Origami 2 (DE3) de <i>E. coli</i> .....	57
6.3 ELISA de reconocimiento a TNF $\alpha$ .....	58
6.4 Ensayos de neutralización de TNF $\alpha$ en ratones con modelo de choque endotóxico.....	59
6.4.1 Medición de TNF $\alpha$ sérico.....	60
7. Discusión.....	62
Conclusiones.....	68
Conclusiones particulares.....	68
Conclusión general.....	68
Perspectivas.....	69
Referencias bibliográficas.....	70

## Lista de Figuras

Figura		Página
1	Molécula de un anticuerpo convencional.....	4
2	Molécula IgNAR.....	6
3	Estructura cristalina de TNF $\alpha$ .....	10
4	Diagrama de las estructuras moleculares de 5 antagonistas de TNF $\alpha$ .....	12
5	Vector de expresión pPICZ $\alpha$ A de 3.6kb.....	17
6	Vector de expresión pET101/D de 5753pb.....	18
7	Vector pComb3x de 3300pb.....	19
8	ADN plasmídico purificado (pPICZ $\alpha$ A+t43).....	35
9	Plásmido linearizado.....	36
10	Productos de PCR de colonia.....	37
11	Alineación de la secuencia consenso de las clonas analizadas de X-33 y SMD1168 (SeqCon) y la secuencia del gen t43 optimizado (TNFopt)....	38
12	Western blot de la proteína sintetizada por PS-1 en medio BMMY.....	39
13	Western blot de la proteína sintetizada por PS-1 en medio BMMH.....	39
14	Western blot de la proteína sintetizada por PX-1 en medio BMMY.....	40
15	Western blot de la proteína sintetizada por PX-1 en medio BMMH.....	40
16	Western blot día 0 de inducción.....	41
17	Western blot día 1 y 2 de inducción.....	42
18	Western blot de cepas sin transformar.....	43
19	SDS-PAGE al 12%, proteína T43 expresada en <i>P. pastoris</i> .....	44

	Página
20	Inmunodetección por Western blot de la proteína T43..... 45
21	Curva estándar de BSA, cuantificación de proteína expresada en <i>P. pastoris</i> ..... 46
22	ADN plasmídico purificado, pComb3x+t43..... 47
23	Productos de PCR en gradiente..... 47
24	ADN plasmídico purificado, pET101/D+t43..... 48
25	Productos de PCR, pET101/D+t43..... 49
26	Resultados de secuenciación de plásmido pET101/D+t43..... 50
27	Productos de PCR de colonia, pET101/D+t43..... 51
28	Productos de PCR de colonia, pComb3x+t43..... 51
29	Evaluación de concentraciones de IPTG..... 53
30	Evaluación de medio de cultivo..... 54
31	Western blot anti-Histidinas..... 55
32	Análisis de la proteína purificada expresada en Origami 2 (DE3) + pET101/D+t43..... 56
33	Análisis de la proteína purificada expresada en Origami 2 (DE3) + pComb3x+t43..... 57
34	Curva estándar de BSA, cuantificación de proteína expresada en <i>E. coli</i> . 58
35	ELISA de reconocimiento a TNF $\alpha$ ..... 59
36	Supervivencia de ratones tratados con 2DL <sub>100</sub> de LPS..... 60
37	Reconocimiento de TNF $\alpha$ sérico..... 61

## Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.....	22
2	Condiciones de PCR de colonia ( <i>P. pastoris</i> ) para amplificar dominios vNAR.....	23
3	Condiciones de PCR con gradiente.de temperaturas.....	29
4	Reacción de Clonación pET101/D+ <i>t43</i> .....	30
5	Condiciones de PCR de colonia ( <i>E. coli</i> ) para amplificar dominios vNAR.....	30

## 1. Introducción

---

Las moléculas de anticuerpo (Ab) reciben mucha atención por parte de la industria farmacéutica, debido a su capacidad para proteger al organismo contra infecciones, células malignas y moléculas tóxicas. Sin embargo, su naturaleza compleja, su gran tamaño e inmunogenicidad forman un obstáculo importante para su uso inmediato como compuesto terapéutico (Saerens *et al.*, 2008). Con el objetivo de mejorar las propiedades de estas moléculas, se han desarrollado diferentes formatos de anticuerpo por ejemplo los anticuerpos de dominio sencillo que conservan la capacidad parental de unión al antígeno. Como respuesta a esta tendencia de minimizar los formatos de anticuerpo se ha encontrado en los peces cartilagosos como los tiburones, un tipo distintivo de inmunoglobulina llamado IgNAR (Nuevo Receptor del Antígeno) cuya región de unión al antígeno está comprendida en un sólo dominio de cadena pesada denominado vNAR (Conrath *et al.*, 2003). Estos dominios vNAR poseen características especiales como tamaño pequeño (~14-15 kDa), CDR3 largo, estabilidad térmica y química, entre otras, que los hacen candidatos idóneos para fines biotecnológicos. Sin embargo, un factor que puede limitar la aplicabilidad de estas moléculas, es la capacidad de expresar grandes cantidades de proteína de forma activa.

Los reportes sobre la expresión de anticuerpos de dominio sencillo de tiburón o sus fragmentos son escasos. En el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE Camacho, (2007) obtuvo un fragmento de anticuerpo tipo vNAR nombrado T43, capaz de neutralizar al Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ). TNF $\alpha$ , es una citocina proinflamatoria cuya principal función es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activar a éstas células para que erradiquen a los microorganismos. Sin embargo, en las infecciones graves TNF $\alpha$  se sintetiza en grandes cantidades pudiendo producir alteraciones clínicas como choque endotóxico, artritis reumatoide y artritis reumatoide juvenil, entre otras (Abbas *et al.*, 2008). Actualmente, existen cinco anticuerpos monoclonales aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de enfermedades donde se busca neutralizar las altas concentraciones de TNF $\alpha$ . El gran tamaño de los anticuerpos utilizados para erradicar a esta citocina, que oscila entre los 150 kDa, provoca la reacción del sistema inmunológico del paciente, creando anticuerpos contra éstos medicamentos y disminuyendo la efectividad de la terapia (Thalayasingam *et al.*, 2011).



Un fragmento de Ab tipo vNAR anti-TNF $\alpha$  podría representar una opción potencial para mejorar la terapia contra esta citocina. Sin embargo, son necesarias grandes cantidades de estas moléculas activas para el estudio biológico de las mismas. Conociendo las propiedades y usos potenciales de los dominios vNAR, en este trabajo se evaluaron dos modelos de expresión, *Escherichia coli* y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* con la finalidad de determinar cuál de los dos microorganismos proporciona el mayor rendimiento del vNAR anti-TNF $\alpha$ , de forma activa y funcional.

## 2. Antecedentes

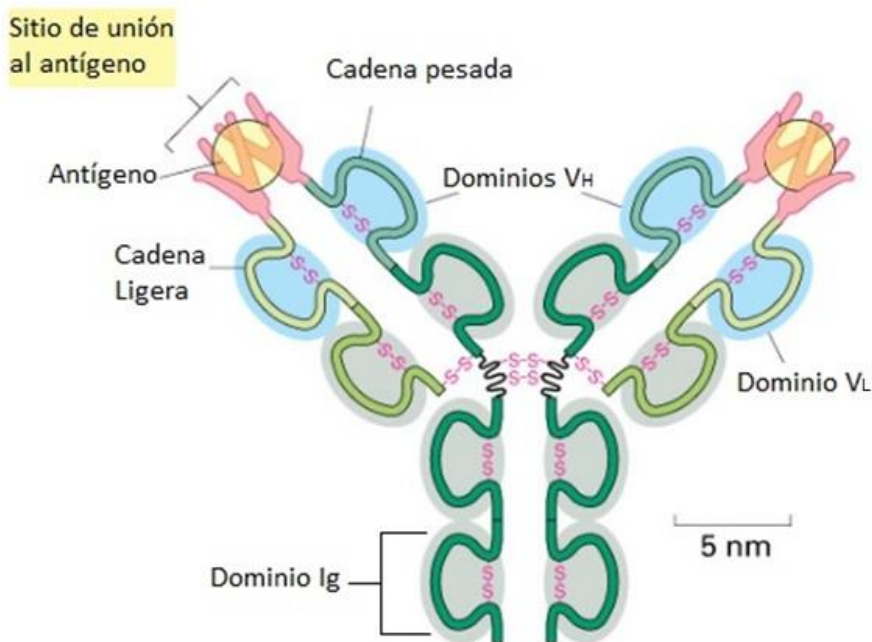
---

### 2.1 Anticuerpos

Los anticuerpos (Ab) también conocidos como inmunoglobulinas (Ig), son proteínas circulantes producidas en los vertebrados en respuesta a la exposición a estructuras extrañas conocidas como antígenos. Los anticuerpos son muy diversos y específicos en su capacidad para reconocer diferentes antígenos. Se unen a un espectro muy amplio de estructuras antigénicas y muestran una gran capacidad para discriminar entre diferentes antígenos uniéndose a ellos con gran fuerza (Abbas *et al.*, 2008).

Las inmunoglobulinas pueden aparecer en dos formas: como anticuerpos unidos a membrana sobre la superficie de los linfocitos B donde actúan como receptores para los antígenos y como anticuerpos solubles que residen en el plasma (porción líquida de la sangre), los tejidos y las mucosas, donde se unen a los antígenos, neutralizan las toxinas e impiden la entrada y propagación de patógenos (Abbas *et al.*, 2008).

Un anticuerpo convencional tiene una estructura básica simétrica compuesta por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas, también idénticas, unidas por enlaces disulfuro. Tanto las cadenas ligeras como las pesadas contienen una serie de unidades homólogas que se repiten, cada una de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud que se repliegan de forma independiente en una estructura globular denominada dominio Ig. Las cadenas ligeras y pesadas constan de regiones variables amino terminales (V) que participan en el reconocimiento del antígeno y de regiones constantes carboxi terminales (C); las regiones C de las cadenas pesadas son las que median las funciones efectoras (lisis celular, citotoxicidad). En las cadenas pesadas la región variable se compone de un dominio Ig y la región C de tres o cuatro dominios Ig, mientras que cada cadena ligera está compuesta por un dominio Ig en la región V y un dominio Ig en la región C (Abbas *et al.*, 2008) (Figura 1).



**Figura 1. Molécula de un anticuerpo convencional.  $V_H$  (Variable pesado);  $V_L$  (Variable ligero) (Modificada de Essential Cell Biology, 2da. Edición, Garland Scienc, 2004. 150.**

Las Ig, son moléculas únicas en una amplia gama de especificidades de unión y están acopladas a diferentes funciones efectoras, estas características las hacen potencialmente muy útiles en una variedad de regímenes terapéuticos. El desarrollo exitoso de la tecnología del hibridoma por Köhler y Milstein (1975) y la capacidad resultante para producir anticuerpos monoclonales (mAbs) inició una nueva era para la ciencia. Los hibridomas son una de las fuentes principales de anticuerpos, pero debido a que la mayoría de estos anticuerpos han sido de origen murino han inducido una respuesta anti-inmunoglobulina cuando se administran *in vivo* a humanos (Furebring *et al.*, 1997), además, su naturaleza compleja y su gran tamaño, aunados a su inmunogenicidad forman obstáculos importantes para su desarrollo inmediato como compuestos terapéuticos (Saerens *et al.*, 2008).

Posteriormente, el uso de la tecnología del ADN recombinante y el creciente conocimiento de la genética y estructura de las Ig, ha permitido la manipulación genética de las moléculas de anticuerpo. Esto permite que sus propiedades sean alteradas creando nuevas moléculas mejoradas

(Verma *et al.*, 1988), como los anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o fragmentos de los mismos.

De acuerdo con un reporte reciente de la sociedad de anticuerpos (Antibody Society, 2013), actualmente existen 36 mAbs terapéuticos aprobados o en revisión, ya sea por la Unión Europea o por Estados Unidos. Los formatos más comunes de mAbs son quiméricos, humanizados, completamente humanos y de origen murino. Otros nuevos formatos terapéuticos, como fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) y subtipos, están en desarrollo o están siendo sometidos a pruebas clínicas (Malpiedi *et al.*, 2013).

En contraste con el bioproceso industrial bien establecido para la producción de mAbs, la producción de fragmentos (como scFv) o dominios de anticuerpos (dAbs) todavía presenta algunas limitaciones impuestas por las tecnologías, equipos o instalaciones disponibles. En este contexto, se han desarrollado varios sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos con el objetivo de reducir los costos de materia prima y el consumo de tiempo, así como desarrollar metodologías de plataforma que aseguren la producción de una amplia gama de moléculas funcionales. En las fases iniciales de estas investigaciones se utilizan preferentemente cultivos en matraz con agitación, debido a los bajos costos y a la posibilidad de cribar un mayor número de transformantes, posteriormente el proceso se escala a nivel de fermentadores, con la finalidad de obtener mayores rendimientos de la proteína, de manera más controlada (Gorlani *et al.*, 2012).

### **2.1.1 Anticuerpos recombinantes**

La manipulación de las moléculas de anticuerpo mediante ingeniería de proteínas y la tecnología del ADN recombinante ha permitido la reducción al mínimo de fragmentos que siguen manteniendo la afinidad parental de unión al antígeno, así como la expresión de diferentes anticuerpos recombinantes o sus partes (Holliger y Hudson, 2005).

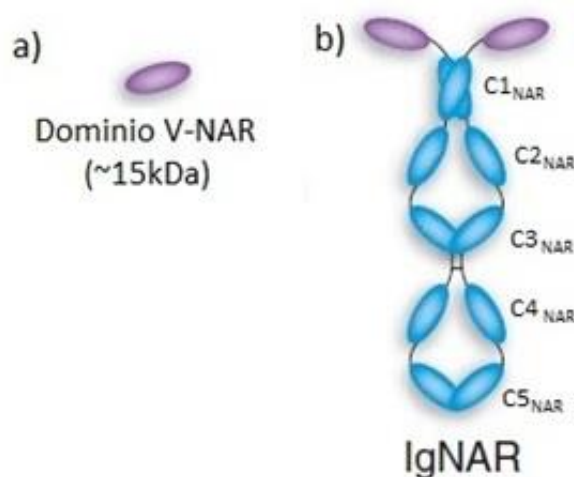
### **2.1.2 Anticuerpos de dominio sencillo**

Aparte de los esfuerzos realizados en laboratorio para reducir el tamaño de los anticuerpos a fragmentos de anticuerpo con capacidad de unión al antígeno, se han identificado dos isotipos de

anticuerpos únicos, los cuales constan de dominios sencillos de unión al antígeno (sdAb). Uno de estos isotipos, se encuentra presente en el suero de los camélidos (dromedarios, camellos, llamas y alpacas), contiene naturalmente la cadena pesada de los anticuerpos (HCAb) que carece del primer dominio constante de la cadena pesada (CH1) y del total de cadenas ligeras. Los fragmentos de unión al antígeno de estos anticuerpos, están comprendidos en un sólo dominio (HCAb) y se les conoce como  $V_{HH}$  o “nanocuerpos” (Nb por sus siglas en inglés) (Conrath *et al.*, 2003).

Un formato alternativo de sdAb fue descrito en peces cartilaginosos, como los tiburones. Este nuevo y probablemente ancestral isotipo de inmunoglobulina fue denominado “nuevo receptor de antígeno” (IgNAR) (Saerens *et al.*, 2008).

El IgNAR, es un homodímero de dos cadenas pesadas idénticas, unidas por enlaces disulfuro, que carece de cadenas ligeras. Cada cadena pesada contiene un dominio variable (vNAR) y cinco dominios constantes (Saerens *et al.*, 2008). Las moléculas IgNAR pueden ser manipuladas por ingeniería molecular para producir el dominio variable de una sola cadena polipeptídica pesada (vNARs) (Figura 2). Sus características especiales, como el tamaño pequeño, CDR3 largo y extendido y su estabilidad térmica y química, los hacen candidatos idóneos para fines biotecnológicos (Juárez *et al.*, 2011).



**Figura 2. Molécula IgNAR. a) vNAR: Dominio variable. b) C1<sub>NAR</sub>-C5<sub>NAR</sub>: Dominios constantes. Modificada de Holliger y Hudson, 2005. 1127.**

## 2.2 Sistemas de expresión

Cada proteína presenta problemas únicos en su expresión, debido a su secuencia única de aminoácidos. Aunque se pueden extraer conclusiones generales a partir del estudio de una proteína, la expresión tiene que ser optimizada para cada nueva proteína. Mientras el término 'anticuerpo' abarca una clase de proteínas, cada anticuerpo tiene una secuencia diferente, por lo tanto la expresión de cada anticuerpo o sus fragmentos tiene sus propios problemas (Verma *et al.*, 1988).

Un sistema de expresión que puede ser adecuado para la expresión de un anticuerpo puede no ser adecuado para otro. El sistema óptimo dependerá del tipo de molécula que se expresa (IgG, Fab, sFv, diacuerpo), del anticuerpo individual y de otros factores, como la cantidad y la pureza necesarias del producto final (Verma *et al.*, 1988). Varios sistemas de expresión están disponibles para la producción de fragmentos de anticuerpo y anticuerpos completos, los cuales incluyen bacterias, levadura, plantas, células de insectos y células de mamíferos. Cada uno tiene sus ventajas, aplicaciones potenciales y limitaciones (Little *et al.*, 2000).

### 2.2.1 Expresión de proteínas en *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es uno de los huéspedes de expresión más ampliamente utilizados para las proteínas recombinantes (Jafari *et al.*, 2011). Una ventaja de éste sistema es su capacidad para producir proteínas en grandes cantidades. *E. coli* crece a un ritmo muy rápido en comparación con las células eucariotas. Además, la transformación de *E. coli* con ADN extraño es fácil y requiere cantidades mínimas de ADN (Verma *et al.*, 1988).

La expresión de anticuerpos por medio de *E. coli* tiende a ser barata. Estas razones explican la popularidad de los sistemas bacterianos. Sin embargo, *E. coli* no es capaz de realizar modificaciones post-traduccionales, como las glucosilaciones. Por lo tanto, si se requiere expresar moléculas completas de Ig, las cuales están glucosiladas en el dominio CH2, es necesario utilizar otros sistemas de expresión (Verma *et al.*, 1988).

Con el fin de lograr una expresión exitosa, el gen que codifica la molécula de anticuerpo debe ser colocado en el contexto de las secuencias adecuadas que permitan la transcripción y traducción de la proteína. Los promotores comúnmente utilizados en *E. coli* incluyen el promotor lac, el

promotor *trp* y su híbrido (el promotor *tac*) que es regulado por el represor *lac* y es inducido por isopropil- $\beta$ -galactosidasa (IPTG) (de Boer *et al.*, 1983). Un segundo factor importante para la traducción eficiente en *E. coli* es la existencia de un sitio de unión al ribosoma procariota (RBS). Este se compone de un codón de iniciación (ATG), la secuencia Shine-Dalgarno (SD), formada por 3-9 nucleótidos, situado a 3-11 pares de bases (pb) río arriba del codón de iniciación. El último elemento de control importante es el terminador de la transcripción, que impide la transcripción más allá del gen deseado y añade estabilidad al ADN (Verma *et al.*, 1988; Sorensen *et al.*, 2005).

Aunque han sido reportados altos niveles de expresión de algunos fragmentos de anticuerpos recombinantes de manera solubles con *E. coli*, sigue existiendo una gran problemática para la producción de muchos otros fragmentos de anticuerpos (Jafari *et al.*, 2011) ya que debido al ambiente reductor del citoplasma bacteriano, los fragmentos de anticuerpos recombinantes tienden a generar cuerpos de inclusión en *E. coli* que contienen a la proteína desplegada (Habibi *et al.*, 2012). Esto requieren pasos adicionales de replegamiento *in vitro* a fin de lograr una cantidad suficiente de anticuerpos solubles, activos y funcionales (Jafari *et al.*, 2011).

Actualmente, han sido desarrolladas cepas de *E. coli* con mutaciones que proporcionan a la bacteria un ambiente favorable para la formación de enlaces disulfuro y plegamiento de proteínas, reduciendo así la necesidad de replegamiento *in vitro* de los cuerpos de inclusión insolubles y la pérdida de proteína después de la extracción. (Sorensen *et al.*, 2005; Mahgoub *et al.*, 2012). La expresión bacteriana tiene por lo tanto, un papel importante en la producción de moléculas de anticuerpos recombinantes, en particular para los fragmentos que no requieren glucosilación.

### **2.2.2 Expresión de proteínas en *Pichia pastoris***

Durante las últimas dos décadas, la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se ha convertido en un huésped popular y exitoso para la expresión de proteínas recombinantes (Jafari *et al.*, 2011). Las principales ventajas de la levadura sobre otros sistemas de expresión están relacionadas con el hecho de que es tanto un microorganismo como un eucariota (Verma *et al.*, 1988).

*Pichia pastoris* es capaz de realizar muchas de las modificaciones post-traduccionales vistas en eucariotas superiores como el plegado, formación de enlaces disulfuro, glucosilación y procesamiento proteolítico. La levadura es también más fácil de manipular y cultivar que otras células eucariotas (Jafari *et al.*, 2011). Además, *P. pastoris* ofrece la posibilidad de secreción extracelular de proteínas recombinantes y su bajo nivel de proteínas endógenas secretadas permite la purificación relativamente fácil de las proteínas heterólogas (Cregg *et al.*, 1993).

Anticuerpos enteros y fragmentos de anticuerpos han sido expresados exitosamente empleando este sistema. Las proteínas que se acumulan como cuerpos de inclusión insolubles en *E. coli* son a menudo solubles cuando se expresan en ésta levadura (Ridder *et al.*, 1995b). Además, la degradación de proteínas heterólogas, a menudo un problema en *E. coli*, generalmente se reduce en *P. pastoris* (Verma *et al.*, 1988).

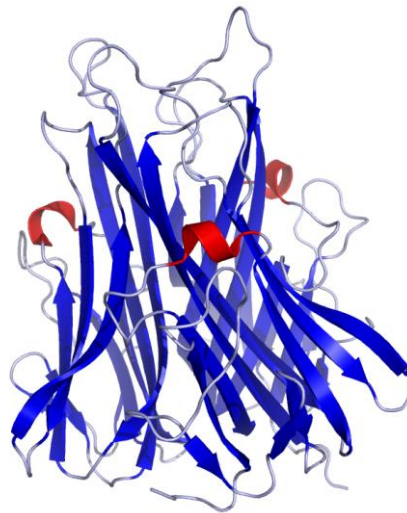
La expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* puede ser controlada bajo el promotor fuerte y estrictamente regulado del gen AOX1, que codifica a la enzima alcohol oxidasa; permitiendo el uso de metanol como inductor y única fuente de carbono (Cereghino y Cregg, 2000). El proceso de terminación en la levadura es similar a eucariotas superiores e implican la terminación de la transcripción, procesamiento endonucleolítico y poliadenilación (Verma *et al.*, 1988).

Todas estas características hacen a esta levadura una opción atractiva como tecnología de fermentación y esto ha permitido que altos niveles de fragmentos de anticuerpos recombinantes secretados se hayan logrado en sistemas de expresión de levadura (Verma *et al.*, 1988).

### **2.3 Factor de necrosis tumoral alfa**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$  por sus siglas en inglés), es una citocina dentro de la superfamilia TNF (Ellerin, 2003). Se sintetiza y secreta principalmente por los macrófagos en respuesta a estímulos proinflamatorios como los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Ellerin, 2003), aunque también los linfocitos T estimulados por el antígeno, los linfocitos NK y los mastocitos pueden secretar esta proteína (Abbas *et al.*, 2008). Se expresa como una proteína transmembranal y es funcional en la superficie celular, o si es escindida por una metaloproteinasa específica, se libera de la superficie celular como un homodímero soluble (Ellerin, 2003).





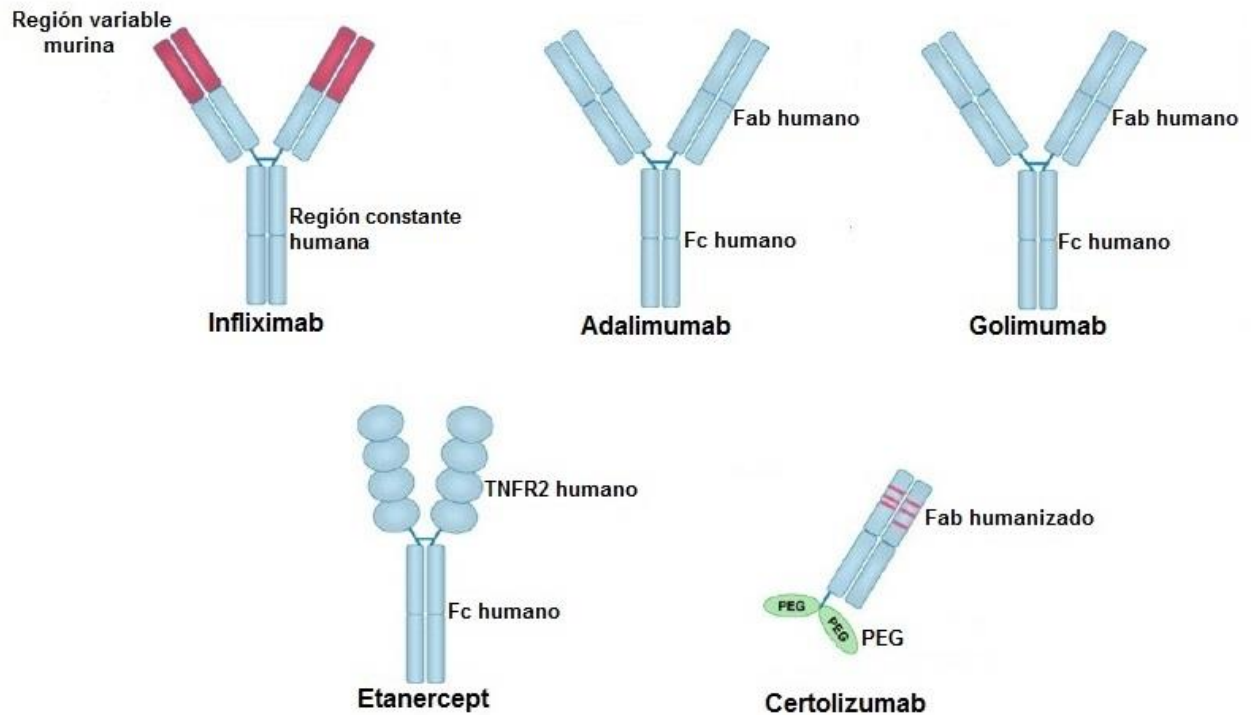
**Figura 3. Estructura cristalina de TNF $\alpha$ . Estructura de TNF $\alpha$  homotrimérica, puede unirse a tres receptores al mismo tiempo. Imagen tomada de <http://www.rcsb.org>.**

Hay dos receptores de TNF distintos, a) el p55, de 55 kD (o Receptor de TNF de tipo I [TNFR1]) y b) p75 de 75 kD (o TNFR2). Ambos receptores de TNF $\alpha$  están presentes en la mayoría de los tipos celulares (Abbas *et al.*, 2008).

La función fisiológica principal de TNF $\alpha$  es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hacia los focos de infección y activar a estas células para que erradiquen a los microorganismos invasores. Sin embargo, en las infecciones graves, el TNF $\alpha$  se sintetiza en grandes cantidades, lo que provoca que la citocina entre en el torrente sanguíneo y actúe como hormona endócrina en localizaciones distales, produciendo alteraciones clínicas y anatomopatológicas sistémicas (Abbas *et al.*, 2008).

Las principales acciones sistémicas por el aumento del TNF $\alpha$  son: inducción de fiebre, aumento de las proteínas séricas, caquexia (emaciación del músculo y las células grasas), inhibición de la contractibilidad miocárdica y del tono del músculo liso vascular, trombosis intravascular y disminución de la concentración sanguínea de glucosa (Abbas *et al.*, 2008). Una de las enfermedades donde están más estudiadas las consecuencias causadas por el aumento de TNF $\alpha$  es en la artritis reumatoide (AR), donde esta citocina actúa induciendo lesiones en el hueso y el cartílago, favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos a la zona de inflamación y activando la producción de otras citocinas y quimiocinas que favorecen el proceso inflamatorio (Ellerin *et al.*, 2003).

Existen dos alternativas posibles para inhibir la acción de TNF $\alpha$ : el receptor soluble que bloquea a TNF $\alpha$  circulante e impide su llegada a los receptores; y los anticuerpos monoclonales que actúan sobre el TNF $\alpha$  circulante y sobre las células. Actualmente existen cinco anticuerpos monoclonales inhibidores de TNF $\alpha$  (Figura 4) aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés). Tres de ellos son anticuerpos monoclonales de tamaño completo, Infliximab, Adalimumab y Golimumab. Infliximab, es una proteína quimérica compuesta de la región variable murina y de la región constante humana. Adalimumab y Golimumab son anticuerpos completos humanos, producidos mediante la tecnología del ADN recombinante. El cuarto agente, Etanercept es una proteína de fusión de dos dominios: el receptor extracelular TNFR2 (p75) y el fragmento Fc (bisagra, dominio CH2 y CH3) de la inmunoglobulina humana 1 (IgG1). El quinto agente es Certolizumab, un fragmento Fab humanizado, conjugado a Polietilenglicol (PEG). La unión al PEG de 40 kDa aumenta la vida media de Certolizumab a una comparable a la de un anticuerpo monoclonal intacto. La ausencia de un Fc previene las funciones efectoras, como la lisis dependiente del complemento y citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. Certolizumab es el único anti-TNF $\alpha$  producido en bacteria (*E. coli*), lo que mejora los rendimientos y reduce los costos de producción (Ellerin *et al.*, 2003; Thalayasingam *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Diagrama de las estructuras moleculares de 5 antagonistas de TNF $\alpha$ . Infiximab es un anticuerpo monoclonal quimérico ratón/humano de isotipo IgG1. Adalimumab y Golimumab son anticuerpos monoclonales totalmente humanos IgG1. Etanercept es una proteína de fusión de TNFR2 (p75) y la región Fc de la IgG1 humana. Certolizumab es un fragmento Fab monoclonal humanizado acoplado a PEG. Modificado de Soczynska *et al.*, 2012. 505.

La estrategia de tratamiento mediante la inhibición de TNF $\alpha$  ha dado como resultado el control de la AR, así como de otras enfermedades inflamatorias incluyendo la enfermedad de Crohn, artritis psoriásica y artritis reumatoide juvenil (Ellerin, 2003). Sin embargo, el gran tamaño de los anticuerpos y el receptor soluble utilizados para erradicar estas enfermedades, provoca la reacción del sistema inmunológico del enfermo, creando anticuerpos contra éstos medicamentos. Estudios de inmunogenicidad reportan a Infiximab como el más y a etanercept como el menos inmunogénico de los medicamentos anti-TNF $\alpha$ .

### 3. Justificación e Hipótesis

---

#### 3.1 Justificación

Los fragmentos de dominio sencillo, han mostrado ventajas sobre las Ig en algunas aplicaciones clínicas, como una buena penetración en los tumores sólidos y una rápida erradicación de infecciones.

En el tratamiento anti-TNF $\alpha$  actualmente se utilizan cinco anticuerpos monoclonales. Estos por su gran tamaño no poseen la mejor penetración en tejidos y pueden provocar reacciones inmunogénicas en el paciente, por lo que tienen que ser administrados en conjunto con otros medicamentos.

Un fragmento de Ab tipo vNAR anti-TNF $\alpha$  podría representar una opción potencial para mejorar la terapia contra esta citocina. En el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE se obtuvo y expresó un fragmento de anticuerpo tipo vNAR (nombrado T43) del tiburón *Heterodontus francisci* capaz de neutralizar a TNF $\alpha$  (Camacho, 2007). Sin embargo, el rendimiento obtenido para este anticuerpo recombinante fue bajo (0.70 mg/L en *E. coli* y 4.17 mg/L en *P. pastoris*) sobre todo, si se considera que los análisis biológicos y farmacológicos para el estudio de un anticuerpo requieren grandes cantidades de muestra activa. Se conoce que la expresión de anticuerpos o sus fragmentos en *E. coli* y *P. pastoris* puede alcanzar rendimientos más altos, es por ello que en este trabajo se comparan diferentes modelos de expresión para un fragmento de anticuerpo vNAR anti-TNF $\alpha$ , con el objetivo de encontrar el modelo y condiciones de expresión que proporcionen el mejor rendimiento de éste anticuerpo. A demás, las condiciones seleccionadas en este trabajo podrían servir de base para mejorar la expresión de otros fragmentos vNAR.

### 3.2 Hipótesis

Los rendimientos de producción del anticuerpo vNAR anti-TNF $\alpha$  a partir de las condiciones de inducción optimizadas, serán diferentes para *E. coli* y *P. pastoris*, mientras que la actividad de la proteína será la misma, independientemente del modelo de expresión utilizado.

## 4. Objetivos

---

### 4.1 Objetivo general

Evaluar y comparar el rendimiento de expresión de un anticuerpo tipo vNAR anti-TNF $\alpha$  utilizando *P. pastoris* y *E. coli* como modelos de expresión.

### 4.2 Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones de inducción del dominio vNAR en *P. pastoris* y *E. coli*.
- Comparar los rendimientos de la proteína de interés obtenidos en los diferentes modelos de expresión.
- Evaluar la actividad *in vivo* del anticuerpo anti-TNF, empleando ratones Balb/c con modelo de choque endotóxico.
- Determinar cuál de los modelos de expresión analizados fue el mejor en base a rendimiento y actividad.

## 5. Materiales y Métodos

---

### 5.1 Aislamiento del dominio vNAR

El fragmento de anticuerpo tipo vNAR anti-TNF $\alpha$  fue aislado por Camacho, (2007) y nombrado T43. En resumen, un espécimen del tiburón cornudo *H. francisci* fue inmunizado repetidamente por vía intravenosa con la citocina humana recombinante TNF $\alpha$  (Peprotech Inc, Connecticut USA). Después de las inmunizaciones se aisló el RNA del bazo y se utilizó para amplificar genes variables a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se generaron bibliotecas inmunes de las cuales se obtuvo una clona específica por la técnica de despliegue en fagos (Barbas *et al.*, 2001).

La secuencia del gen *t43* fue sintetizada con codones optimizados para la levadura *P. pastoris* (GenScript, Piscataway, NJ), con la finalidad de mejorar la expresión del anticuerpo.

### 5.2 Vectores y cepas

Se evaluaron dos cepas de *P. pastoris*, la cepa silvestre X-33 (Invitrogen) que es una cepa mut<sup>+</sup> (utiliza el metanol en grandes cantidades) y SMD1168 (Invitrogen), una cepa de *P. pastoris* también mut<sup>+</sup> y deficiente en proteasas A. Ambas cepas se pueden emplear para su crecimiento en el antibiótico de selección Zeocina y a gran escala. El vector de expresión empleado en ambas cepas fue pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen).

El vector de clonación pPICZ $\alpha$ A (Figura 5) de 3.6 kb es muy utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Algunas de sus principales características son: el promotor fuerte AOX1 de la enzima alcohol oxidasa que es inducible con metanol, la secuencia señal de secreción  $\alpha$ , sitio de clonación múltiple, la etiqueta c-Myc útil para la inmunodetección, una etiqueta de polihistidinas útil para la purificación, un sitio de terminación de la transcripción del gen AOX1, resistencia al antibiótico zeocina, entre otras. La integración del vector en *P. pastoris* se lleva a cabo por recombinación homóloga, entre las secuencias comunes del vector previamente linearizado y del genoma de la levadura (EasySelect *Pichia* Expression Kit, Invitrogen).

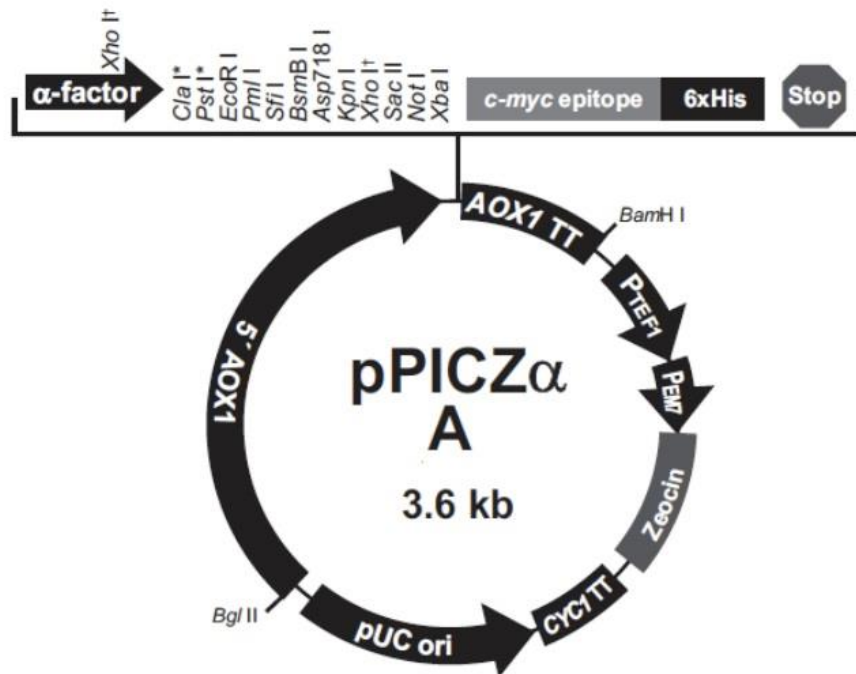
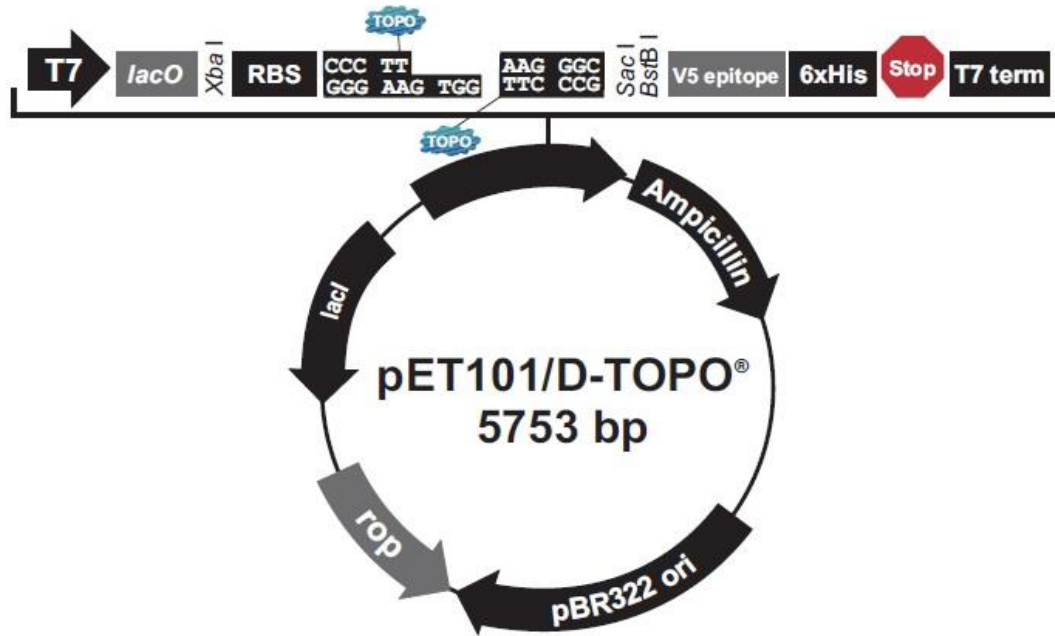


Figura 5. Vector de expresión pPICZ $\alpha$ A de 3.6 kb. Muestra las características generales del vector. Imagen tomada de [www.invitrogen.com/.../manuals/easysselect\\_man.pdf](http://www.invitrogen.com/.../manuals/easysselect_man.pdf).

Para *E. coli* se evaluó la cepa Origami 2 (DE3) (Novagen), la cual posee mutaciones en los genes de la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*), lo que mejora considerablemente la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma y favorece el plegamiento de proteínas. Se evaluaron dos vectores, el vector pET101/D TOPO® (invitogen) (Figura 6) y el vector pComb3x (Figura 7).

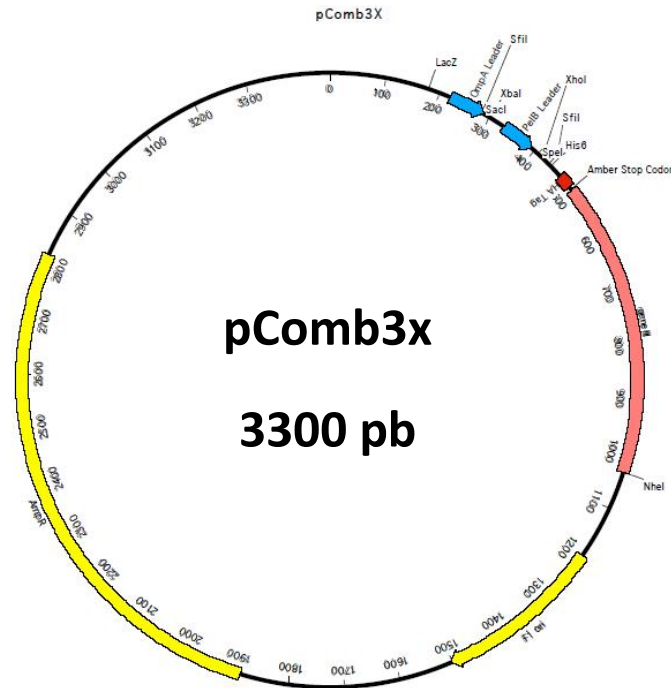
El vector pET101/D, es un vector de expresión de 5,753 pb cuyas principales características son: el promotor fuerte T7, el operador Lac, un sitio de unión al ribosoma, la etiqueta V5 útil para inmunodetección, una etiqueta de seis histidinas para la purificación, el terminador de la transcripción T7, un sitio de replicación y resistencia al antibiótico ampicilina, entre otras (Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits).





**Figura 6.** Vector de expresión pET101/D de 5,753 pb. Muestra las características generales del vector. Imagen tomada de [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pettopo\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pettopo_man.pdf).

El vector pComb3x, es un vector fagémido de 3,300 pb que facilita la expresión, detección y purificación de proteínas solubles después del despliegue en fagos. Las características de pComb3x son: el promotor LacZ, la etiqueta de hemaglutinina de la influenza HA que facilita la inmunodetección, una etiqueta de seis histidinas útil para purificación, un codón de paro y resistencia a ampicilina, entre otras (Barbas *et al.*, 2001).



**Figura 7. Vector pComb3x de 3,300 pb. Muestra las características generales del vector. Imagen tomada de <http://www.creative-biogene.com/pComb3X-vector-VPT4012-1232908-74.html>.**

### 5.3 Expresión de la proteína en *P. pastoris*

#### 5.3.1 Transformación en *E. coli* TOP10 con pPICZαA + la secuencia de *t43* optimizada para *P. pastoris* (pPICZαA + *t43*)

Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) por electroporación con el plásmido pPICZαA el cual ya tenía ligado el fragmento de interés optimizado para el uso preferencial de codones de *P. pastoris* (*t43*). Se mezclaron 50 µL de células electrocompetentes y 1.5 µL del plásmido pPICZαA+*t43* en una celda (0.2 cm) previamente enfriada y se electroporó utilizando un MicroPulser (BioRad, USA) (V=2.5 kV). Después del pulso, las células transformadas fueron recuperadas en 3 mL de medio de cultivo SOC (triptona 2 % (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v), NaCl 0.6 mM, KCl 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, glucosa 20 mM) y se incubaron a 37 °C y 300 rpm durante una hora. Del cultivo anterior se sembró 1 µL, 10 µL y 100 µL en placas con medio de cultivo Luria Bertani (LB) bajo en sales de NaCl (LB-LS) (triptona 1

% (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v), NaCl 0.5 % (p/v), agar 1.5 % (p/v), pH 7.5) suplementado con zeocina (25 µg/mL).

### **5.3.2 Purificación del ADN plasmídico**

La purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001) como se describe a continuación. A partir de una colonia de *E. coli* transformada con el plásmido pPICZ $\alpha$ A+t43 se inició un cultivo en 10 mL de medio LB-LS suplementado con zeocina (25 µg/mL) y se incubó a 37 °C, 300 rpm durante 12 h. Se tomaron 3.0 mL del cultivo y se centrifugaron durante 3 min, a 13,000 rpm y temperatura ambiente (TA). Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 100 µL de GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) adicionado con 0.2 mg/mL de RNasa A. Posteriormente se agregaron 200 µL de NaOH 0.2 N, SDS 1 %, se mezcló por inversión y se incubó 5 min a TA y 5 min en hielo. Se adicionaron 150 µL de KOAc 3 M pH 4.8, se mezcló por inversión y se dejó incubando 10 min a TA. La mezcla se centrifugó 15 min, a 13,000 rpm y TA. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se le adicionaron 2 volúmenes de etanol 100%, se mezcló e incubó a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó por 15 min a 13,000 rpm y TA, se eliminó el sobrenadante, se adicionó al botón celular 1 mL de etanol 70 % y se centrifugó 15 min a 13,000 rpm y TA. El sobrenadante fue descartado y se dejó secar el botón celular a TA. Una vez seco, el botón celular se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril. Se cuantificó por espectrofotometría a 260nm utilizando un espectrofotómetro NanoVue Plus (GE), posteriormente fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

### **5.3.3 Electroforesis en gel de agarosa**

Para evaluar el plásmido purificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, se cargaron 5 µL de muestra por pozo y se corrió a 80 volts y 500 mA durante 1 h.

### **5.3.4 Digestión del plásmido pPICZ $\alpha$ A+t43**

El plásmido purificado fue digerido utilizando la endonucleasa *Sac I* (Promega). La reacción de digestión fue de 60 µL, la cual incluía, 5 µg/µL de plásmido, buffer J 10 % (v/v) (Tris-HCl 100

mM (pH 7.5), KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 70 mM y DTT 10 mM), BSA 0.1 mg/mL y 30 unidades de enzima. La reacción se incubó durante 12 h a 37 °C.

### 5.3.5 Purificación del plásmido digerido

Una vez concluida la digestión del vector, éste fue purificado con fenol-cloroformo. A 100 µL del producto de digestión se le adicionaron 100 µL de fenol, se aplicó vortex y se agregaron 100 µL de cloroformo, se mezcló con vortex y se centrifugó 5 min a 13,000 rpm y TA. La fase acuosa fue recuperada en un tubo nuevo y se adicionó 1/10 volumen de acetato de sodio 3M pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol 100 %, se incubó a -20 °C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 13,000 rpm y TA. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol frío al 70 % para lavar el botón celular, se mezcló por inversión y se centrifugó 10 min a 13,000 rpm y TA, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el botón celular, una vez seco, se resuspendió en agua destilada estéril y se almacenó a -20 °C.

### 5.3.6 Transformación en *P. pastoris* (X-33 y SMD1168)

Las dos cepas de *P. pastoris* (X-33 y SMD1168) se transformaron por separado mediante electroporación. Previo a la transformación, se prepararon células electrocompetentes de ambas cepas siguiendo la metodología descrita en el manual EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen).

Para llevar a cabo la electroporación, se mezclaron 80 µL de células electrocompetentes de *P. pastoris* con 10 µg de vector linealizado y purificado y fueron transferidos a una celda de electroporación (0.2 cm) previamente enfriada. Una vez transferidas las células más el vector a la celda, ésta se incubó en hielo por 5 min y se llevó a cabo la electroporación (V=2.0 kV). Después del pulso, las células fueron rápidamente recuperadas de la celda con 1 mL de sorbitol 1 M frío, las células fueron incubadas a 30 °C sin agitación por 1 h. Transcurrido este tiempo, se adicionó 1 mL de medio de cultivo YPD (extracto de levadura 1 % (p/v), peptona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v)) y se incubó a 30 °C, 250 rpm. Después de 2, 3 y 4 horas de agitación, alícuotas de 150 y 250 µL fueron sembradas en placas con medio de cultivo YPDS (extracto de levadura 1 % (p/v), peptona 2 % (p/v), glucosa 2 % (p/v), sorbitol 1 M y agar 2 % (p/v)) suplementado con zeocina (100 µg/mL) e incubadas a 30 °C de 4-7 días.

De 20-30 colonias fueron resembradas en placa con medio YPD más zeocina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubadas a 30 °C. Después de 2-3 días de incubación se seleccionaron cinco colonias de las transformantes y se les realizó PCR de colonia para confirmar la presencia del inserto.

### 5.3.7 PCR de colonia

La reacción de PCR de colonia se realizó siguiendo la metodología de Linder *et al.*, (1996) con ligeras modificaciones. Se colocó una porción de la colonia en un microtubo con 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada, se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de una solución de Liticasa a 5 U/ $\mu\text{L}$  (Sigma). La mezcla se incubó a 30 °C por 20 min, a 37 °C por 10 min y finalmente a -80 °C por 20 min.

Para la reacción de PCR se utilizaron los cebadores 5'AOX1 Y 3'AOX1 (Tabla 1) de Invitrogen. El volumen de cada reacción fue de 30  $\mu\text{L}$  y contenía Green buffer 1 X, dNTP's 0.2 mM,  $\text{MgCl}_2$  3.0 mM, 0.2  $\mu\text{M}$  de cada cebador, 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 4  $\mu\text{L}$  de las células lisadas con Liticasa. Las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 2.

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen) y fueron cuantificados por espectrofotometría en un espectrofotómetro NanoVue Plus (GE) a 260 nm. Las muestras se analizaron en gel de agarosa al 2 % y de las clonas que presentaron el fragmento del tamaño esperado se seleccionaron dos para secuenciación (SeqxCel, San Diego, CA, USA). Una vez corroborada la secuencia del gen de interés se procedió a realizar los ensayos de síntesis de la proteína.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR

Nombre	Secuencia
5'AOX1	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
3'AOX1	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
T43chF	5'-CACCATGCTCGAGGCTTCACT

	TGACCAGACTTTG-3´
T43Rev	5´-CGCGGCCGCATTA ACTGTCAA
	AACTGTTCCAGCACCGTC -3´
T7	5´-TAATACGACTCACTATAGGG-3´
T7Reverse	5´-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3´

---

Tabla 2. Condiciones de PCR de colonia (*P. pastoris*) para amplificar los dominios vNAR

Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	95	2 min
30	95	1 min
	54	1 min
	72	1 min
1	72	5 min

---

### 5.3.8 Optimización de las condiciones de síntesis de la proteína T43 en la cepa SMD1168

La optimización de las condiciones de expresión de *t43* en la cepa SMD1168 se realizó de acuerdo a lo descrito para cepas de *Pichia* Mut (-) en el manual Easy Select *Pichia* Expression Manual (Invitrogen, USA) con algunas modificaciones. Partiendo de una clona de SMD1168 transformada con pPICZ $\alpha$ A+*t43* se iniciaron preinóculos de 3 mL en medio YPD más zeocina (100  $\mu$ g/mL), se incubaron 24 h, 250 rpm a 30 °C. Con 2 mL del preinóculo inicial se inocularon dos matraces Ferbach de 3 L, uno con 500 mL de medio rico BMGY (extracto de levadura 1 %

(p/v), peptona 2 % (p/v), fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 % (p/v), D-biotina  $\mu\text{g/mL}$ , glicerol 1 % (v/v)); y otro con 500 mL de medio mínimo BMGH (fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 % (p/v), D-biotina  $\mu\text{g/mL}$ , histidina 0.004 % (p/v), glicerol 1 % (v/v)), se incubaron a 30 °C, 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica  $\text{OD}_{600} = 4$ . Posteriormente las células fueron recuperadas por centrifugación a 1500  $\times g$ , 5 min a 4 °C y el sobrenadante fue eliminado. Para inducir la expresión, los botones celulares correspondientes a 100 mL del cultivo se resuspendieron en 20 mL de medio de cultivo inductor BMMY (extracto de levadura 1 % (p/v), peptona 2 % (p/v), fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 % (p/v), D-biotina  $\mu\text{g/mL}$ ) o medio de cultivo inductor BMMH (fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34 % (p/v), D-biotina  $\mu\text{g/mL}$ , histidina 0.004 % (p/v)). Se agregó el inductor (metanol) al cultivo, evaluando cuatro diferentes concentraciones en cada uno de los medios empleados (0, 1, 2 y 4 % (v/v)). Los cultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm durante 5 días. Se adicionó metanol a los cultivos cada 12 h para mantener la concentración inicial de inductor de 1, 2 y 4 % (v/v). Cada 24 horas se tomó muestra (1.0 mL) de todas las condiciones de cultivo e inducción. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 5 min a TA, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C para su análisis posterior.

### 5.3.9 Optimización de las condiciones de síntesis de la proteína T43 en la cepa X-33

La optimización de las condiciones de expresión de la proteína recombinante en X-33 se realizó siguiendo la metodología descrita para cepas de *Pichia Mut (+)* en el manual Easy Select *Pichia* Expression Manual (Invitrogen, USA) con algunas modificaciones. A partir de una colonia de X-33 transformada con pPICZ $\alpha$ A+t43 se iniciaron preinóculos de 3 mL en medio YPD más zeocina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) y se incubaron por 24 h, a 30 °C y 250 rpm. Los preinóculos sirvieron para inocular 500 mL de medio BMGY y 500 mL de medio BMGH. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una  $\text{OD}_{600} = 4$ . Posteriormente las células fueron recuperadas por centrifugación a 1500  $\times g$  durante 5 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Las células recuperadas fueron resuspendidas en 50 mL de medio inductor BMMY o 50 mL de medio inductor BMMH a una  $\text{OD}_{600} = 1.0$ . Se agregó el inductor al cultivo (metanol 0, 1, 2 y 4 % (v/v)) y se incubó a 30 °C y 250 rpm durante 5 días. Se adicionó metanol a los cultivos cada 12 h para mantener la concentración inicial de inductor. Cada 24 horas se tomó muestra (1.0 mL) de cada

una de las condiciones de cultivo e inducción. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 5 min a TA, el sobrenadante se recuperó y almacenó a -20 °C.

### **5.3.10 Optimización de las condiciones preseleccionadas de síntesis de la proteína recombinante**

Se realizó una preselección de las condiciones óptimas de expresión de la proteína y siguiendo la metodología antes descrita para cepas mut (-), se realizó una inducción de 2 días. Se utilizó el medio mínimo BMGH, el medio inductor BMMH y se evaluaron dos concentraciones de inductor (metanol a 1 y 2 % (v/v)). Por separado, los botones celulares correspondientes a 50 y 100 mL del cultivo en medio BMGH, fueron resuspendidos en 20 mL del medio inductor. Se agregó metanol al inicio y cada 12 horas durante los días de inducción para mantener la concentración inicial de inductor. Se tomaron muestras (1 mL) al inicio y cada 24 horas durante la inducción. Como control negativo se emplearon las cepas sin transformar de *P. pastoris*.

### **5.3.11 Análisis de la proteína recombinante**

#### **5.3.11.1 Preparación de las muestras**

Las muestras obtenidas en los ensayos de expresión fueron precipitadas mediante el método de precipitación con ácido tricloroacético (TCA). A cada 1 mL de muestra se adicionó 175 µL de TCA 100 % (p/v), se mezcló por inversión e incubó por 12 horas a 4 °C. Se centrifugó durante 25 min, 13,000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL de acetona al 100 % fría y se centrifugó en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante, el botón se dejó secar y fue resuspendido en 25 µL de buffer de carga Laemmli 2 X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4 % (p/v), glicerol 20 % (v/v), β-mercaptoetanol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0.004 % (p/v)). Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

#### **5.3.11.2 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes Tricina-SDS-PAGE**

El análisis de las proteínas recombinantes se realizó utilizando la metodología de Tricina-SDS-PAGE descrita por Schägger y von Jagow (1987), la cual es comúnmente empleada para separar



proteínas pequeñas (1-1,000 kDa), en geles de poliacrilamida al 12 %. La electroforesis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: amperaje constante 50 mA, 150 Volts, durante 2.5 horas. Los geles fueron teñidos toda la noche con azul de Coomassie, a TA y agitación constante. Posteriormente fueron desteñidos empleando una solución de desteñido (40 % etanol, 10 % ácido acético) o fueron utilizados para los análisis de inmunodetección.

### **5.3.11.3 Inmunodetección de las proteínas recombinantes**

Para detectar y evaluar semi-cuantitativamente la concentración de la proteína recombinante producida en cada una de las condiciones de inducción se utilizó el método de Western blot mediante la técnica de transferencia semi-seca (Harlow y Lane, 1988). Inmediatamente después de terminar la electroforesis se realizó la transferencia de la proteína del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45  $\mu\text{m}$  (BioRad). Se humedecieron seis papeles filtro, el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa con el amortiguador Towbin 1 X (Tris Base 250 mM, Glicina 192 mM, metanol 20 % (v/v), pH 8.3) durante 5 min. El sistema de transferencia utilizado fue el Semi-Dry Electrobloetter (CLP) y las condiciones de transferencia fueron: amperaje constante 200 mA, 20 V máximo, durante 1 h.

Al finalizar la electrotransferencia la membrana fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación moderada en solución de bloqueo (PBS 1 X-Tween 0.05 %: (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, Tween-20 0.05 % (v/v), pH 7.4) con leche descremada 5 % (p/v) (Svelty<sup>®</sup> de Nestle<sup>®</sup>)). Posteriormente la membrana se enjuagó con solución PBST (PBS 1 X-Tween 0.05 %), se descartó la solución y se incubó durante 2 horas a TA con agitación moderada en una dilución 1:1,500 del anticuerpo anti-cMyc (Roche) en PBST con leche descremada 1 % (p/v). Al terminar la incubación con el anticuerpo, la membrana se lavó tres veces durante 5 min cada lavado con PBST y finalmente las proteínas fueron detectadas por colorimetría empleando el reactivo DAB Substrate Kit (Thermo Scientific).

### **5.3.12 Expresión de la proteína en la cepa SMD1168**

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de inducción para la expresión de la proteína recombinante, se procedió a expresar el anticuerpo en gran cantidad, utilizando la cepa SMD1168. Para ello se prepararon lotes de inducción de dos diferentes volúmenes, a) lote 1: a partir de un botón celular correspondiente a 100 mL de biomasa cultivada en medio BMGH se resuspendió en 20 mL de medio de cultivo inductor BMMH y b) lote 2: el cual se escaló 1:3, para ello células correspondientes a 300 mL de cultivo en medio BMGH, fueron resuspendidas en 60 mL de medio inductor BMMH. Se agregó 2 % de metanol (v/v) a cada lote al inicio y cada 12 horas durante los 2 días de inducción. Al concluir ésta, el cultivo fue centrifugado a 1500  $\times g$  durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y fue almacenado a -20 °C para la posterior purificación de la proteína recombinante.

### **5.3.13 Purificación del fragmento de anticuerpo recombinante por cromatografía de afinidad**

Para la purificación de la proteína recombinante se utilizó la metodología de purificación por cromatografía de afinidad a metales de acuerdo a lo descrito en el protocolo NiNTA de QUIAGEN con algunas modificaciones. Previo a la purificación, el pH de la muestra recuperada de la inducción se ajustó a pH 8.0 y se clarificó centrifugando 20 min, 10,000 rpm a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se cargó en una columna de plástico de 10 mL (Poly-Prep® Chromatography Columns BioRad), la cual contenía 1 mL de resina Ni-NTA Agarose (QUIAGEN). El extracto se pasó tres veces a través de la columna, posteriormente se realizó un lavado con 15 mL de buffer de lavado 1 (Imidazol 20 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0) y un segundo lavado agregando a la columna 10 mL de buffer de lavado 2 (Imidazol 50 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). La proteína fue eluida en cinco fracciones de 500  $\mu$ L con el buffer de elución (Imidazol 250 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0), con un tiempo de incubación de 5 min entre cada una. La proteína purificada se evaluó en un gel desnaturizante de tricina al 12% (apartado 5.3.11.2) teñido con azul de Coomassie y por Western blot utilizando el anticuerpo anti-cMyc (apartado 5.3.11.3). Una vez comprobada la presencia de la proteína de interés, se juntaron las eluciones en las cuales se detectó la proteína.

### **5.3.14 Diálisis**

Las fracciones purificadas en las cuales se detectó presencia de la proteína fueron reunidas y dializadas contra PBS 1 X con agitación constante a 4 °C utilizando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer® de 7,000 MWCO (Thermo Scientific). Se realizaron dos recambios cada uno de 2 horas y un recambio final de 12 horas.

### **5.3.15 Cuantificación de las muestras**

Para la cuantificación de la proteína se empleó el método del ácido bicinconínico utilizando el kit micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Se utilizó BSA como proteína estándar y se realizaron diluciones de 200, 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1 µg/mL. Se utilizó una placa de ELISA de 96 pozos en la cual se agregó por triplicado 75 µL de cada dilución de BSA y 75 µL de las muestras de interés. Se siguieron las instrucciones recomendadas por el proveedor y la placa fue leída en un lector de placas Multiskan Go (Thermo Scientific) a 562 nm. Los datos obtenidos fueron graficados, se construyó la curva estándar y se calculó la concentración de proteína utilizando la ecuación de la recta. La proteína recombinante dializada y cuantificada fue almacenada a -20 °C.

## **5.4 Expresión de la proteína en *E. coli***

### **5.4.1 Purificación del plásmido pComb3x+t43**

A partir del plásmido pComb3x, en el cual previamente había sido clonada la secuencia optimizada de la proteína de interés, se transformaron células electrocompetentes TOP10 como se describe en el apartado 5.3.1. La purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo según se describe en el apartado 5.3.2. El plásmido purificado se evaluó en gel de agarosa al 0.8 %.

### **5.4.2 Clonación del gen *t43* en pET101/D partiendo de la secuencia *t43* optimizada (pET101/D+t43)**

A partir del plásmido pPICZαA en el que se encontraba clonado el gen optimizado de la proteína T43 (*t43*) se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando la polimerasa de DNA Vent la cual

genera productos de PCR con extremos romos, empleando los cebadores t43chF y t43Rev específicos para el gen (Tabla 1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un gradiente de temperatura (50-60 °C) con la finalidad de seleccionar la temperatura óptima para ese juego de cebadores; las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 3. El producto de PCR se evaluó en gel de agarosa al 2 %. Para llevar a cabo la clonación, en un microtubo se mezclaron suavemente los componentes de la reacción de clonación (Tabla 4) y se incubó por 5 min a TA. Posteriormente, la reacción se colocó en hielo y se procedió a transformar células electrocompetentes de *E. coli*. Se añadieron 3 µL de la reacción de clonación a 50 µL de células electrocompetentes, se mezcló suavemente y se transfirió a una celda de electroporación previamente enfriada. Ésta se incubó durante 3 min en hielo y se llevó a cabo la electroporación. Las células fueron rápidamente recuperadas con 250 µL de medio SOC e incubadas a 37°C con agitación durante 1.5 horas. Posteriormente se sembraron 50 y 100 µL de la muestra en placas con medio LB suplementado con carbenicilina 100 µg/mL y se incubaron a 37 °C de 12-15 horas. Se seleccionaron y resembraron siete colonias las cuales se evaluaron por PCR utilizando los juegos de cebadores T7 y T7rev; y t43chF y t43Rev (Tabla 1); las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 5. Se seleccionaron dos colonias positivas para purificar el plásmido por lisis alcalina y ser enviado a secuenciación (SeqXcel) para corroborar la secuencia del gen *t43* optimizado.

Tabla 3. Condiciones de PCR con gradiente.de temperaturas

Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	95	5 min
30	95	30 s
	50-60	30 s
	72	40 s
1	72	5 min

Tabla 4. Reacción de Clonación pET101/D+*t43*

Producto de PCR (200 µg/ml)	0.9 µl
Solución Salina (1:4)	1 µl
Agua estéril	3.1 µl
Vector topo	1 µl
<hr/>	
Volumen total	6 µl

Tabla 5. Condiciones de PCR de colonia (*E. coli*) para amplificar dominios vNAR

Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	95	2 min
30	95	30 s
	58	30 s
	72	45 s
1	72	5 min

#### 5.4.3 Transformación en *E. coli* (Origami 2 (DE3))

Se prepararon células electrocompetentes de la cepa Origami 2 (DE3) (Invitrogen) de *E. coli*, de acuerdo a lo descrito por Barbas *et al.*, (2001). Las células Origami 2 (DE3) electrocompetentes se transformaron por separado con los plásmidos purificados pET101/D y pComb3x que

contenían la secuencia de interés. La transformación se realizó como se describe en el apartado 5.3.1. Después del pulso de electroporación, las células transformadas fueron recuperadas en 3 mL de medio de cultivo SOC e incubarán a 37 °C, 300 rpm durante una hora. Del cultivo anterior se sembraron 1, 10 y 100 µL en placas con medio LB suplementado con carbenicilina 100 µg/mL y estreptomina 50 µg/mL. Las placas se incubaron de 12-15 horas a 37 °C. De cada cepa, se seleccionaron y resembraron cinco colonias que fueron evaluadas por PCR utilizando los cebadores t43chF y t43Rev (Tabla 1) para confirmar la presencia del gen de interés, las condiciones de PCR se muestran en la tabla 5. Una vez corroborada la presencia del gen en ambas clonas se procedió con los ensayos de producción de la proteína.

#### **5.4.4 Optimización de las condiciones de producción de la proteína recombinante en la cepa Origami 2 (DE3) de *E. coli***

A partir de una colonia de la cepa Origami 2 (DE3) transformada con el vector pET101/D+t43 se llevó a cabo la optimización de la concentración del inductor (IPTG) y del medio cultivo para la expresión de la proteína en *E. coli*. Se evaluaron tres concentraciones de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (0.1, 0.5 y 1.0 mM) y tres medios de cultivo: LB (triptona 1 % (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v), NaCl 1.0 % (p/v), pH 7.5); 2xYT (2x Yeast extract and Tryptone: (triptona 1.6 % (p/v), extracto de levadura 1.0 % (p/v), NaCl 0.5 % (p/v), pH 7.5)) y SB (Super Broth: (triptona 3.2 % (p/v), extracto de levadura 2.0 % (p/v), NaCl 0.5 % (p/v), pH 7.5)). Partiendo de una colonia aislada, se inocularon 10 mL de medio SB suplementado con carbenicilina 100 µg/mL y estreptomina 50 µg/mL y se incubó durante 18 h a 37 °C y 300 rpm. El preinóculo se diluyó en 300 mL de medio SB que contenía carbenicilina 100 µg/mL y estreptomina 50 µg/mL y se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una OD<sub>600</sub>=0.6-0.9. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se agregó el inductor (0.1, 0.5 o 1.0 mM de IPTG) y el cultivo se incubó por 6 horas más en las mismas condiciones de temperatura y agitación. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 8,000 xg durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y los botones celulares se almacenaron a -20 °C.

Posteriormente, se realizaron tres inducciones más, para evaluar los medios de cultivo (SB, 2xYT, LB). Las inducciones se realizaron como se describe previamente, sustituyendo solo el medio de cultivo en cada inducción. Una vez seleccionada la concentración de inductor y medio

de cultivo óptimo para la expresión de la proteína se procedió a producir la proteína en las células Origami 2 (DE3) que contenían el vector pET101/D+*t43* así como en las células Origami 2 (DE3) transformadas con pComb3x+*t43* para evaluar la producción del anticuerpo recombinante por ambos vectores.

#### **5.4.5 Extracción citoplasmática de la proteína recombinante**

Los botones celulares recuperados de cada inducción fueron resuspendidos en 10 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0; sacarosa 25 % (p/v); EDTA 1 mM, lisozima 100 µg/mL) en un tubo Falcon de 50 mL e incubados en hielo por 30 min. Después se congelaron a -20 °C y fueron descongelados sumergiendo el tubo en agua a 37 °C. Se agregaron 10 mL del buffer de lisis (que contenía imidazol 20 mM) a cada tubo y se centrifugó a 8,000  $\times$ g durante 20 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y la proteína fue purificada como se describe en el apartado 5.3.13. La proteína purificada fue evaluada por Western blot y posteriormente dializada y cuantificada como se describe en los apartados 5.3.14 y 5.3.15, respectivamente.

#### **5.4.6 Expresión de la proteína recombinante en células Origami 2 (DE3) transformadas con pET101/D o pComb3x**

Una vez seleccionada la concentración de IPTG y medio óptimo para la expresión del dominio vNAR recombinante, se llevó a cabo la síntesis del mismo por separado en células Origami 2 (DE3) transformadas con el vector pET101/D y el vector pComb3x en lotes de 300 mL, siguiendo la metodología antes descrita (apartado 5.4.4) y utilizando la concentración de inductor y medio de cultivo que presentaron el mayor rendimiento en los ensayos de optimización. Se extrajo la proteína del citoplasma y fue posteriormente dializada y cuantificada para comparar el rendimiento al utilizar cada uno de los vectores en la cepa Origami 2 (DE3).

#### **5.5 ELISA de reconocimiento a TNF $\alpha$**

En una placa de ELISA de 96 pozos, se colocaron 250 ng/pozo de la citocina humana recombinante TNF $\alpha$  (Peprotech Inc, Connecticut USA) y se incubó la placa por 2 h a 37 °C. El

sobrenadante fue descartado y se bloqueó la placa con 150  $\mu$ L/pozo de BSA 3 %-PBS 1 X-Tween 0.05 % durante 1 h a 37 °C. Se eliminó la solución de bloqueo y se agregaron 50  $\mu$ L/pozo de la proteína T43 recombinante purificada y dializada, la placa se incubó 2 h a 37 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavaron los pozos tres veces con solución PBS 1 X-Tween 0.05 %. Se agregaron 50  $\mu$ L/pozo de anticuerpo de gallina anti-vNAR diluido 1:1000 en solución de BSA 1 %-PBS 1 X-Tween 0.05 %, la placa fue incubada por 2 h a 37 °C. Se descartó el sobrenadante y los pozos se lavaron nuevamente tres veces. Se agregaron 50  $\mu$ L/pozo de anticuerpo secundario anti-gallina acoplado a peroxidasa, diluido 1:1500 en solución BSA 1%-PBS 1 X-Tween 0.05 % y se incubó la placa 2 h a 37 °C. Se descartó la solución y se lavó la placa tres veces. Finalmente se agregaron 50  $\mu$ L/pozo de sustrato de peroxidasa (ABTS 20 mg/mL, buffer citratos 1 X, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3 %), se incubó la placa por 10 min a 37 °C y se determinó su absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placas Multiskan Go (Thermo Scientific). Como control negativo se utilizó BSA 1%.

### **5.6 Ensayos de neutralización de TNF $\alpha$ en ratones con modelo de choque endotóxico.**

Se indujo choque endotóxico por lipopolisacáridos (LPS) en ratones machos Balb/c, de 5-7 semanas de edad. La dosis letal (DL<sub>100</sub>) de LPS serotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) utilizada fue 20 mg/kg y fue administrada por inyección intraperitoneal (*ip*) en una dosis única; y la dosis del anticuerpo vNAR anti-TNF empleada para mejorar la supervivencia en ratones con modelo de shock endotóxico fue de 1 mg/kg, con base en lo reportado por Bojalil *et al.*, (2013). Como control positivo se empleó un fragmento de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> anti-TNF (Laboratorios Silanes, México) 1 mg/kg.

Se emplearon cinco grupos de ratones, con cuatro ratones por grupo. El grupo (A) fue inyectado *ip* con 2DL<sub>100</sub> de LPS resuspendida en 200  $\mu$ L de amortiguador PBS 1 X. Estos ratones recibieron también 200  $\mu$ L de PBS 1 X por inyección *ip* 15 min antes de la inyección con los LPS, así como 2 y 24 h después de que las 2DL<sub>100</sub> de LPS fueron administradas. El grupo (B) fue inyectado *ip* con los dominios vNAR anti-TNF $\alpha$  (1 mg/kg) expresados en *P. pastoris* y diluidos en 200  $\mu$ L de PBS 1 X, 15 min antes así como 2 y 24 h después de que se inyectaron las 2DL<sub>100</sub> de LPS; el grupo (C), fue inyectado *ip* con los dominios vNAR anti-TNF $\alpha$  (1 mg/kg) expresados en *E. coli* y diluidos en 200  $\mu$ L de PBS 1 X, 15 min antes, 2 y 24 h después de que se aplicaron las 2DL<sub>100</sub> de LPS; el grupo (D) fue inyectado *ip* con los fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> anti-



TNF $\alpha$  (1 mg/kg) diluidos en 200  $\mu$ L de PBS 1 X, en un horario igual al de los dominios vNAR; finalmente el grupo (E) fue inyectado *ip* con 200  $\mu$ L de PBS 1 X en el mismo horario que los otros grupos, estos ratones no recibieron ni LPS ni tratamiento anti-TNF $\alpha$ , por lo tanto se consideraron como grupo control.

### **5.6.1 Medición de TNF $\alpha$ sérico**

Se obtuvo sangre de tres ratones de cada grupo a las 3 y 24 h después de que se indujera la endotoxemia. La concentración de TNF $\alpha$  sérico se midió por un ensayo ELISA, como se describe en el apartado 5.5 empleando como control el grupo E.

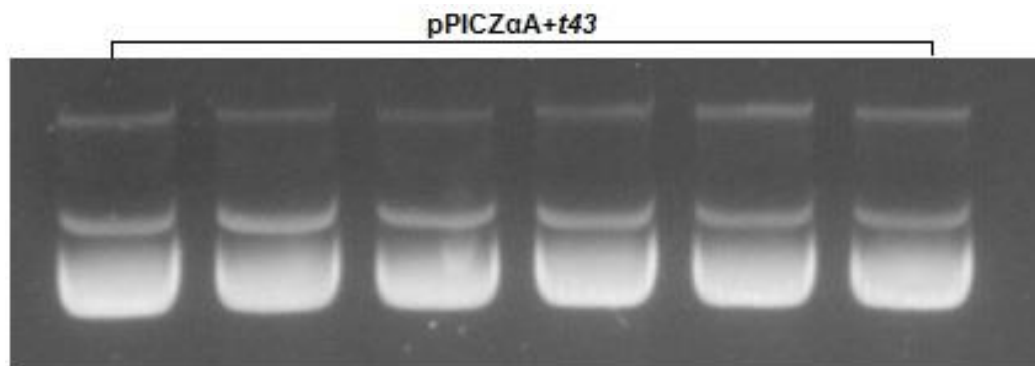
## 6. Resultados

---

### 6.1 Expresión de la proteína en *P. pastoris*

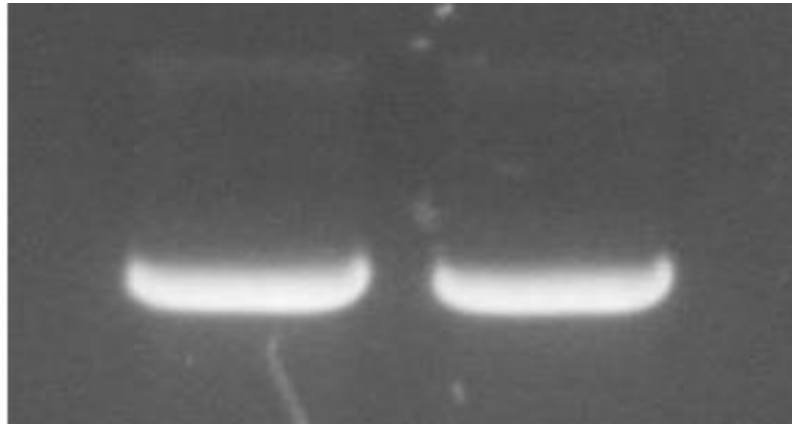
#### 6.1.1 Transformación en *E. coli* (TOP10)

Se transformaron células electrocompetentes TOP10 con el plásmido pPICZ $\alpha$ A+t43 y de las transformantes obtenidas se seleccionó una a partir de la cual se extrajo exitosamente el ADN plasmídico. La figura 8 muestra un gel de agarosa 0.8 %, donde se evaluó la integridad del plásmido purificado a partir del cual se transformaron las dos cepas de *P. pastoris* utilizadas como modelo de expresión. En la imagen se observan las tres bandas correspondientes al plásmido superenrollado, lineal y relajado.



**Figura 8. ADN plasmídico purificado (pPICZ $\alpha$ A+t43). Gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio.**

El plásmido purificado fue linearizado (Figura 9) usando la enzima *Sac I*, para estimular la recombinación cuando el plásmido fuera transformado en *P. pastoris*.



**Figura 9. Plásmido linearizado. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio.**

### **6.1.2 Transformación en *P. pastoris* (X-33 y SMD1168)**

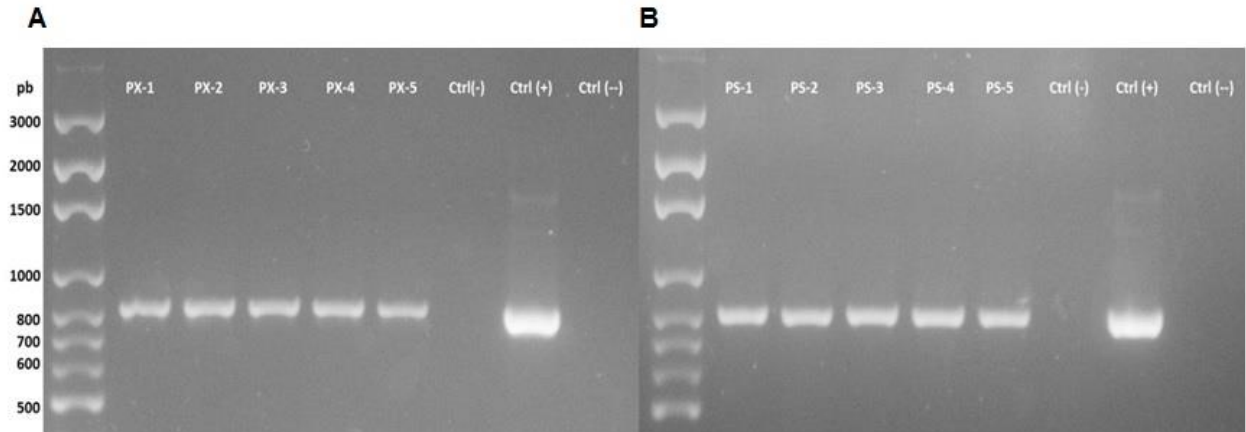
Una vez linearizado el plásmido pPICZ $\alpha$ A se transformaron las células electrocompetentes previamente preparadas de SMD1160 y X-33. La electroporación fue exitosa para ambas cepas de *P. pastoris*. Las células transformadas se sembraron en placas con medio YPDS suplementado con zeocina (100  $\mu$ g/mL), al segundo día se observaron colonias resistentes a zeocina, indicativo de que esas colonias habían integrado el plásmido de interés a su genoma; el cuarto día se eligieron de 20-30 colonias al azar de cada cepa y fueron resembradas en una nueva placa con medio de cultivo YPD suplementado con zeocina 100  $\mu$ g/mL.

#### **6.1.2.1 PCR de colonia (*P. pastoris*)**

Se seleccionaron cinco colonias de cada cepa y se les realizó PCR para corroborar la inserción en el genoma de *P. pastoris* del plásmido que contenía la secuencia de interés. Las colonias seleccionadas de SMD1168 fueron nombradas PS-1, PS-2, PS-3, PS-4 y PS-5, mientras que a las colonias seleccionadas de X-33 se nombraron PX-1, PX-2, PX-3, PX-4 y PX-5.

El análisis en geles de agarosa al 2 % de los fragmentos amplificados por PCR, evidenció que las cinco transformantes evaluadas tanto de SMD1168 como de X-33 habían integrado a su genoma el vector linearizado que incluía la secuencia del vNAR. La figura 10 muestra los fragmentos

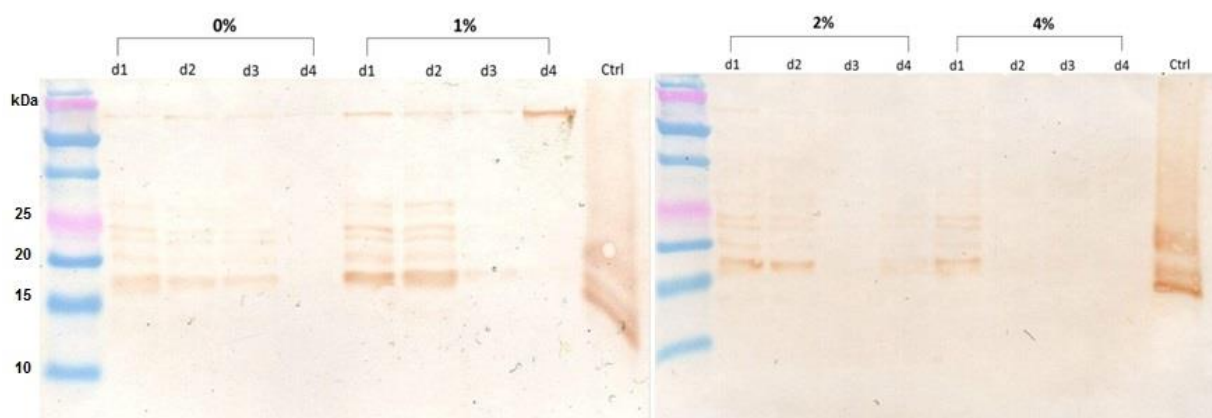
amplificados para ambas cepas de *P. pastoris*, todos los fragmentos corresponden al tamaño esperado (~800 pb) utilizando los cebadores para el promotor AOX1.



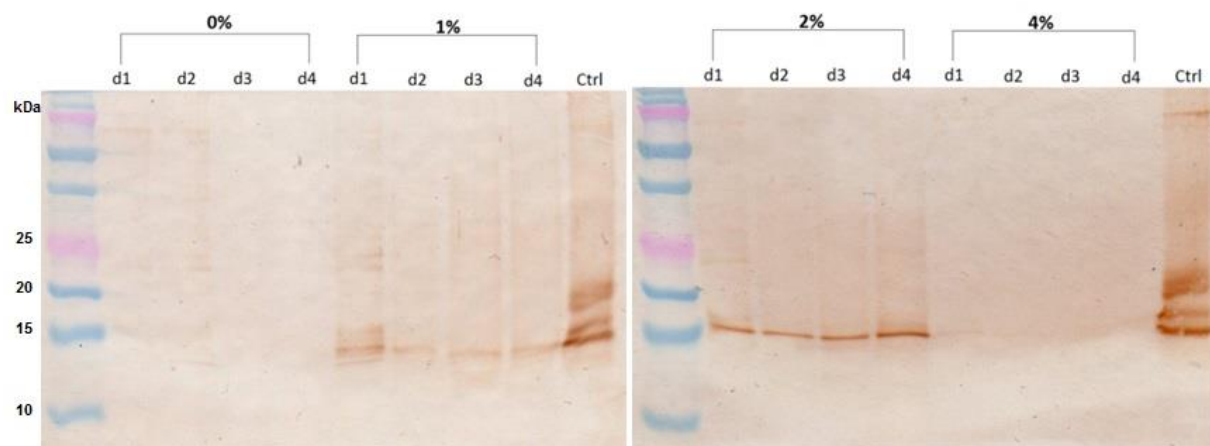
**Figura 10. Productos de PCR de colonia. a) Producto de PCR de las cinco transformantes de X-33 b) Producto de PCR de las cinco transformantes de SMD1168. Control (-) cepa de X-33 (a) y SMD1168 (b) sin transformar. Control (+): ADN plasmídico (pPICZaA+t43). Control (-) producto de PCR sin templado. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.**

De las colonias en las que se verificó por PCR la integración del fragmento de interés, se eligieron dos tanto de SMD1168 (PS-1 y PS-2) como de X-33 (PX-1 y PX-2) para su secuenciación. La figura 11 presenta la alineación de la secuencia consenso obtenida a partir de las clonas analizadas de X-33 y SMD1168 (SeqCon) con la secuencia del gen *t43* optimizado (TNFopt). El análisis de las secuencias (Multalin), muestra que no hubo mutaciones y que el fragmento que codifica para la proteína T43 está en fase con la señal de secreción de proteínas ( $\alpha$ -factor). De esas clonas, se eligió la clona 1 de cada cepa (PS-1 y PX-1) para los posteriores análisis de síntesis de la proteína.

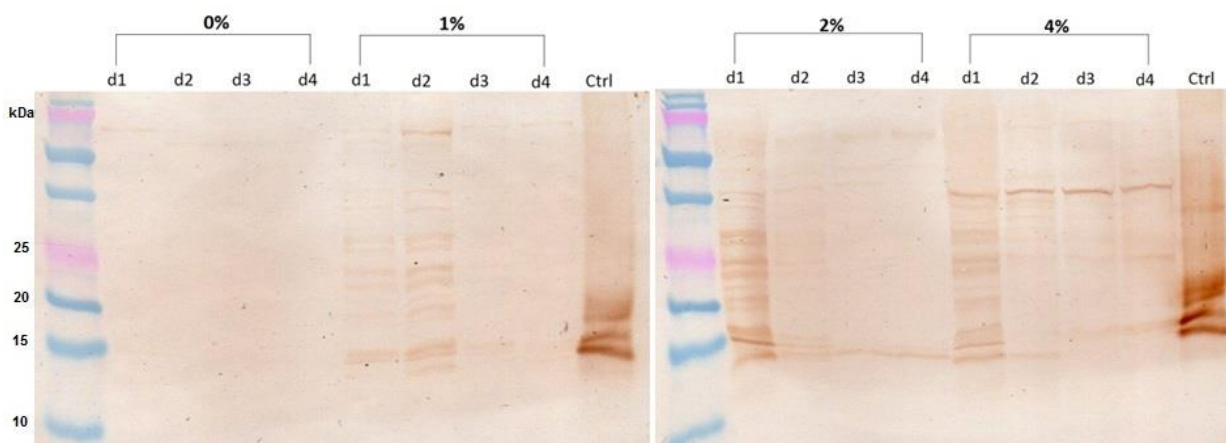




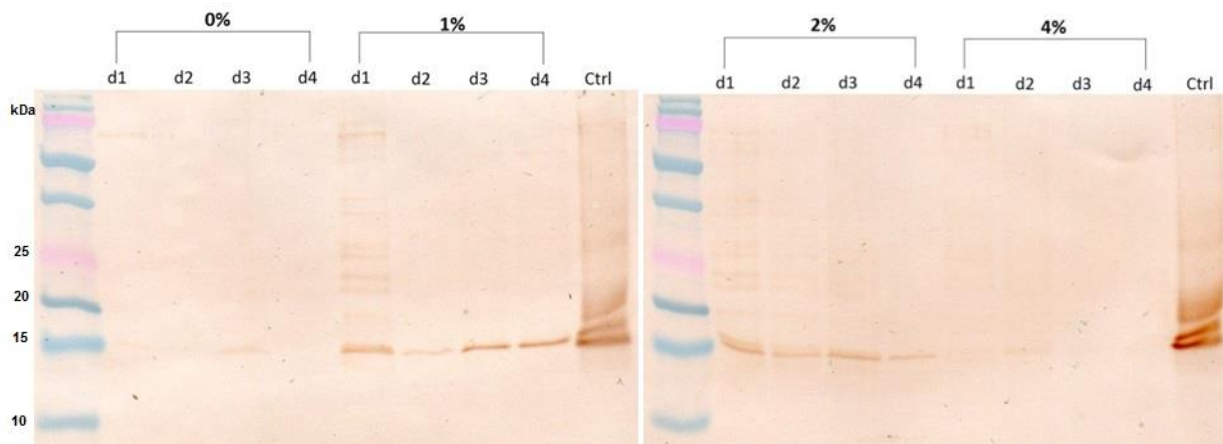
**Figura 12.** Western blot de la proteína sintetizada por PS-1 en medio BMMY. Identificación de la proteína utilizando anti-cMyc del día 1 al 4 de inducción, los porcentajes superiores indican el porcentaje (v/v) de metanol mantenido en cada cultivo.



**Figura 13.** Western blot de la proteína sintetizada por PS-1 en medio BMMH. Identificación de la proteína utilizando anti-cMyc del día 1 al 4 de inducción, los porcentajes superiores indican el porcentaje (v/v) de metanol mantenido en cada cultivo.



**Figura 14| Western blot de la proteína sintetizada por PX-1 en medio BMMY. Identificación de la proteína utilizando anti-cMyc del día 1 al 4 de inducción, los porcentajes superiores indican el porcentaje (v/v) de metanol mantenido en cada cultivo.**

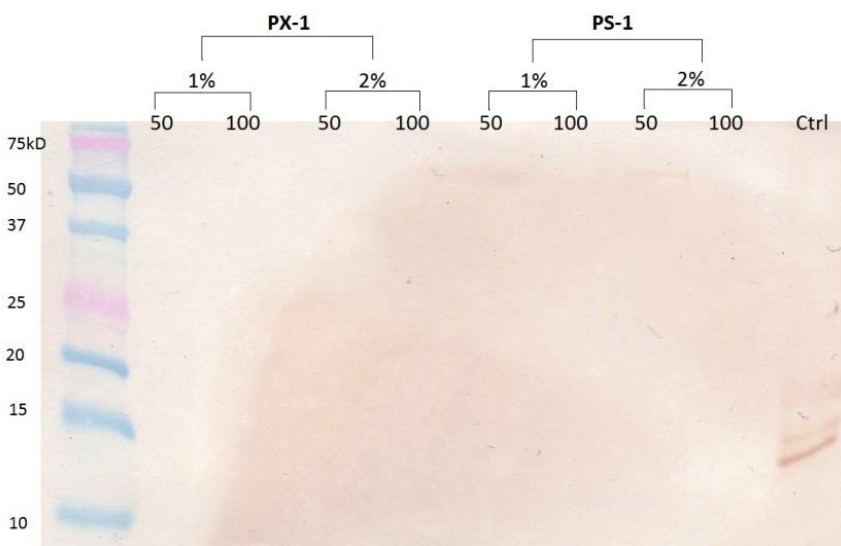


**Figura 15. Western blot de la proteína sintetizada por PX-1 en medio BMMH. Identificación de la proteína utilizando anti-cMyc del día 1 al 4 de inducción, los porcentajes superiores indican el porcentaje (v/v) de metanol mantenido en cada cultivo.**

#### 6.1.4 Condiciones preseleccionadas de expresión del dominio vNAR recombinante

Las condiciones preseleccionadas a partir de los primeros ensayos de optimización, fueron medio BMMH, 1 y 2 % de metanol durante los días 1 y 2 de inducción. Para este análisis se modificó la metodología de inducción usada previamente para X-33 debido a la baja densidad celular con la que empezaba el cultivo y se decidió realizar de manera similar a como se había llevado a cabo

para SMD1168 (apartado 5.3.8). Para cada cepa de *P. pastoris* se realizó un análisis partiendo de botones celulares correspondientes a 50 mL y 100 mL de inóculo, que fueron resuspendidos en 20 mL del medio inductor BMMH. Se evaluaron las concentraciones de metanol predeterminadas durante dos días de inducción. En la figura 16 se muestra un Western blot donde se analizaron 500  $\mu$ L de cada muestra el día 0 de inducción (día en que empieza la inducción), en este día no se observa presencia de la proteína recombinante.

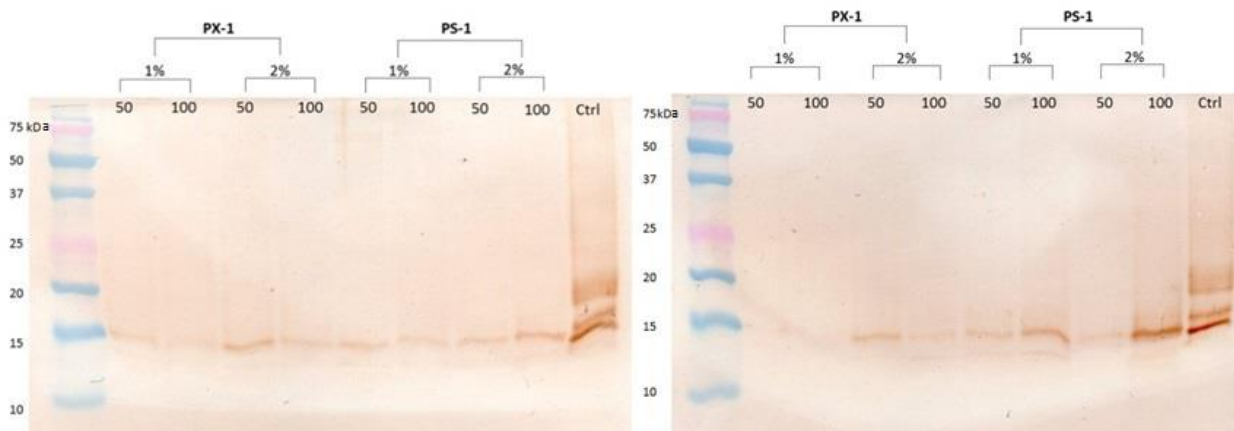


**Figura 16. Western blot día 0 de inducción. Evaluación de la síntesis de proteína por PX-1 y PS-1 el día 0 de inducción en medio BMMH, con concentraciones de 1 y 2 % de metanol (v/v). 50 y 100: volumen (mL) de células a partir del cual se realizó la inducción.**

La figura 17 corresponde al Western blot donde se analizaron las muestras de los días 1 y 2 de inducción. Se puede observar que para SMD1168 hay mayor presencia de la proteína partiendo de botones celulares correspondientes a 100 mL de cultivo, mientras que con X-33 por el contrario, las bandas más intensas de proteína se presentan a partir del botón celular correspondiente a 50 mL de cultivo. Para ambas cepas el día 2 de inducción mostró mayor acumulación de proteína. A partir de estos resultados, se seleccionaron las mejores condiciones para los ensayos de expresión de la proteína T43 en grandes cantidades. Las condiciones seleccionadas incluían dos días de inducción, 2 % de metanol cada 12 h, a partir de un volumen

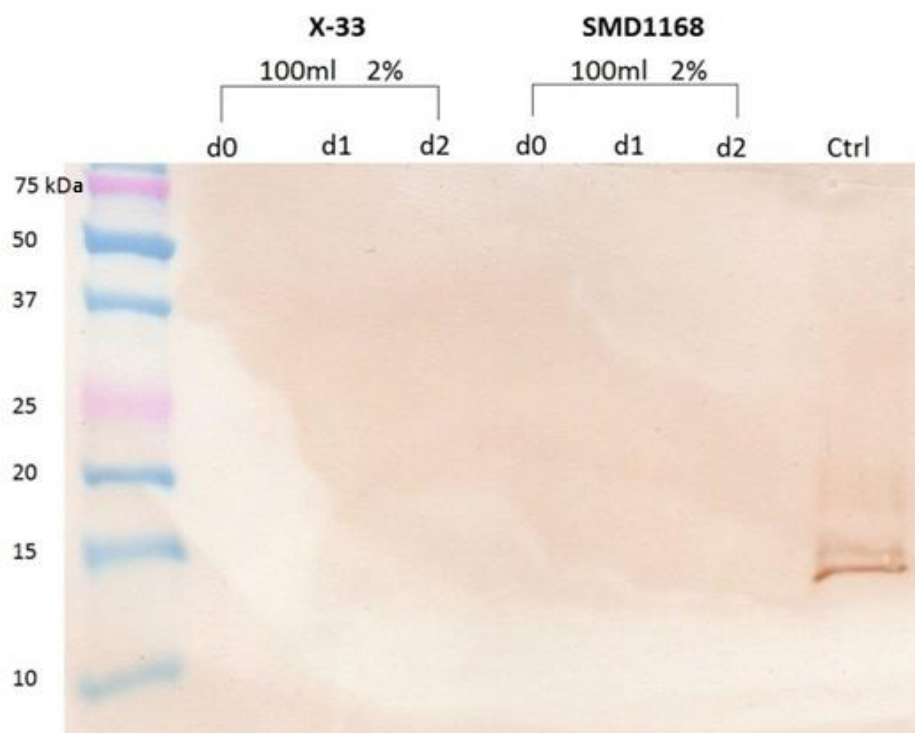


de células correspondiente a 100 mL de cultivo de cepa SMD1168. Se decidió continuar trabajando solo con esta cepa ya que a pesar de que fue poca la diferencia mostrada en los Western blots entre SMD1168 y X-33, la primera presentó menos proteínas endógenas secretadas al medio, proporcionando desde el inicio una proteína recombinante más pura y facilitando así los pasos sucesivos de purificación.



**Figura 17. Western blot día 1 y 2 de inducción. Evaluación de la síntesis de proteína por PX-1 y PS-1 el día 1 y 2 de inducción en medio BMMH, con concentraciones de 1 y 2 % de metanol (v/v). 50 y 100: volumen (mL) del cultivo correspondiente al botón celular del que partió la inducción.**

La figura 18 corresponde a un Western blot, realizado a las muestras de SMD1168 y X-33 sin transformar, utilizadas como control negativo. Se observa que las cepas que no fueron transformadas con el vector no expresan la proteína T43.



**Figura 18. Western blot de cepas sin transformar. Evaluación de la síntesis de proteína por X-33 y SMD1168 sin transformar, durante los días 0-2 de inducción en medio BMMH, con una concentración de 2 % de metanol (v/v). 100: volumen (mL) del cultivo correspondiente al botón celular del que partió la inducción.**

### 6.1.5 Expresión de la proteína recombinante en la cepa SMD1168

A partir de las condiciones seleccionadas en el apartado anterior, se llevó a cabo la producción del anticuerpo recombinante en *P. pastoris* cepa SMD1168. Se realizó la expresión en dos lotes: uno incluía 10 matraces de 200 mL, con 20 mL del cultivo BMMH (200 mL volumen total por lote) y otro lote, en el que se triplicó el volumen inicial de células y el volumen del medio inductor en 10 matraces de 500 mL (600 mL volumen total del lote).

### 6.1.6 Purificación del anticuerpo T43

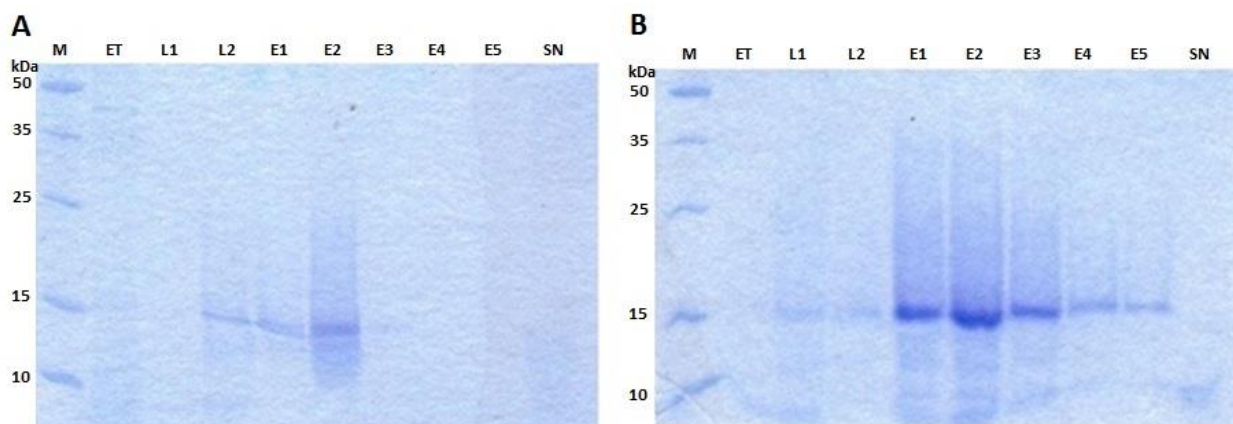
La proteína T43 producida se purificó utilizando la resina Ni-NTA. Para el análisis del producto purificado, se incluyeron las muestras correspondientes al extracto total (ET) sin purificar, los

lavados (L1 y L2) y el sobrenadante (SN) después de pasar por la resina (previamente precipitados de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.3.11.1) así como las eluciones 1-5 (E1-E5).

### 6.1.7 Análisis del anticuerpo T43

#### 6.1.7.1 Análisis del anticuerpo en SDS-PAGE al 12 %

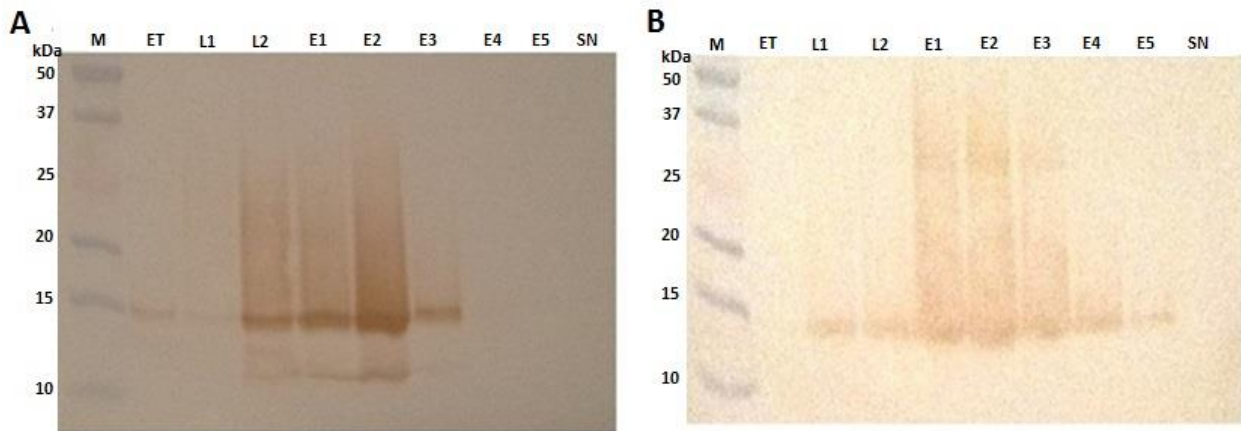
En la figura 19 se muestra el análisis en gel de poliacrilamida al 12 % de la purificación del lote 1 y 2 basada en la cola de seis histidinas incluida en el extremo carboxilo de la proteína recombinante. Se observa que en el lote 1 se purificó una proteína de ~14 kDa en E1, E2 y E3 mientras que para el lote 2, las cinco eluciones muestran la presencia de una proteína en este peso molecular. En cuanto a los lavados, existe poca pérdida de la proteína. Los geles teñidos con azul de Coomassie muestran que en las fracciones purificadas la proteína más abundante es la correspondiente a 14 kDa, ésto coincide con el peso molecular del anticuerpo T43.



**Figura 19. SDS-PAGE al 12 %, proteína T43 expresada en *P. pastoris*. A: Lote 1; B: Lote 2; M: Marcador molecular; ET: Extracto total antes de purificar; L1: Buffer de lavado 1, imidazol 20 mM; L2: Buffer de lavado 2, imidazol 50 mM; E1: elución 1; E2: elución 2; E3: elución 3; E4: elución 4; E5: elución 5; SN: sobre nadante después de purificar.**

### 6.1.7.2 Inmunodetección del anticuerpo recombinante

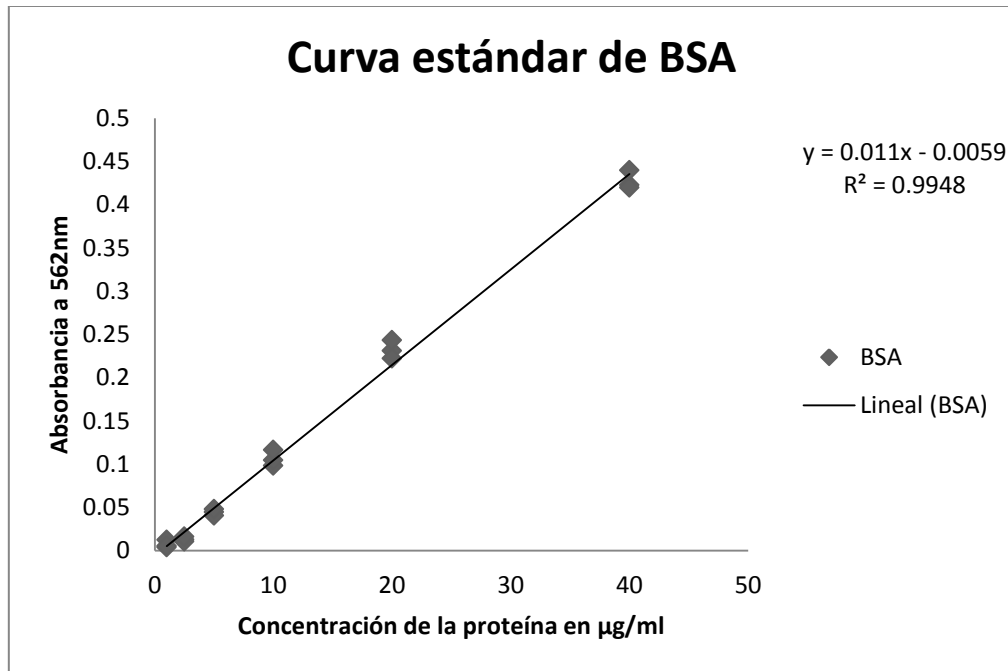
La figura 20 muestra el Western blot utilizando anti-cMyc (que reconoce la etiqueta c-Myc ubicada en el extremo carboxilo de la proteína recombinante) donde se analizaron las muestras correspondientes a los geles de poliacrilamida que se muestran en el apartado 6.1.7.1. En el lote 1 se observa una banda de ~14 kDa en E1, E2 y E3, mientras que en el lote 2 se observa una banda del mismo peso molecular en las cinco eluciones. El lote 1 presenta en las fracciones purificadas una banda accesoria de ~10 kDa, sin embargo ésta representa menos del 15 % de la proteína purificada en cada elución. Con respecto a los lavados, en L2 se aprecia pérdida de proteína.



**Figura 20. Inmunodetección por Western blot de la proteína T43. Se empleó el sustrato DAB kit. A: Lote 1; B: Lote 2; M: Marcador molecular; ET: Extracto total antes de purificar; L1: Buffer de lavado 1, imidazol 20 mM; L2: Buffer de lavado 2, imidazol 50 mM; E1: elución 1; E2: elución 2; E3: elución 3; E4: elución 4; E5: elución 5; SN: sobre nadante después de purificar.**

### 6.1.8 Cuantificación y rendimiento del anticuerpo T43 expresado en la cepa SMD1168 de *P. pastoris*

Previo a la cuantificación de la proteína, se juntaron las eluciones E1, E2 y E3 para el lote 1 y las cinco eluciones para el lote 2, las muestras fueron dializadas contra PBS 1X para eliminar las sales de los buffers empleados en la purificación. La figura 21 muestra la curva estándar de BSA y la ecuación de la recta utilizada para estimar el rendimiento de la proteína. Se obtuvo un rendimiento de 4.66 mg/L y 4.08 mg/L para el lote 1 y 2, respectivamente.

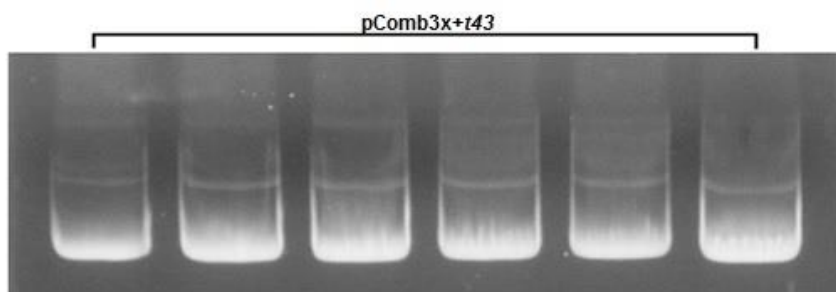


**Figura 21. Curva estándar de BSA, cuantificación de proteína expresada en *P. pastoris*.**

## 6.2 Expresión de la proteína en *E. coli*

### 6.2.1 Purificación del plásmido pComb3x+t43

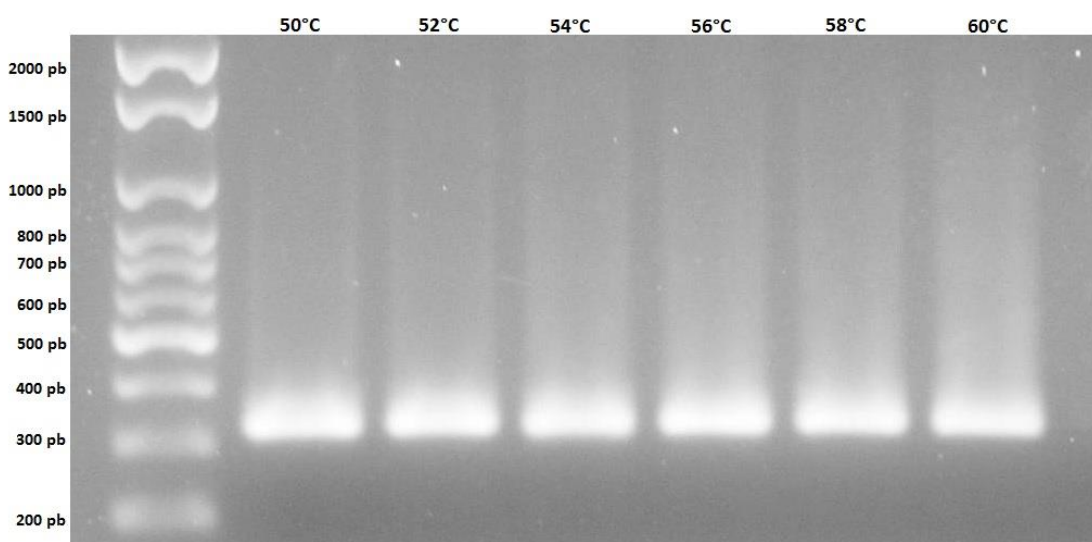
Utilizando el vector pComb3x donde se encontraba ya clonada la secuencia del gen *t43* optimizada para *P. pastoris* se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 y se inició un cultivo a partir del cual se purificó el plásmido pComb3x+t43. La figura 16 muestra el gel de agarosa al 0.8 %, donde se evaluó la integridad del plásmido purificado.



**Figura 22.** ADN plasmídico purificado, pComb3x+t43. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

### 6.2.2 Clonación del gen *t43* optimizado en pET101/D

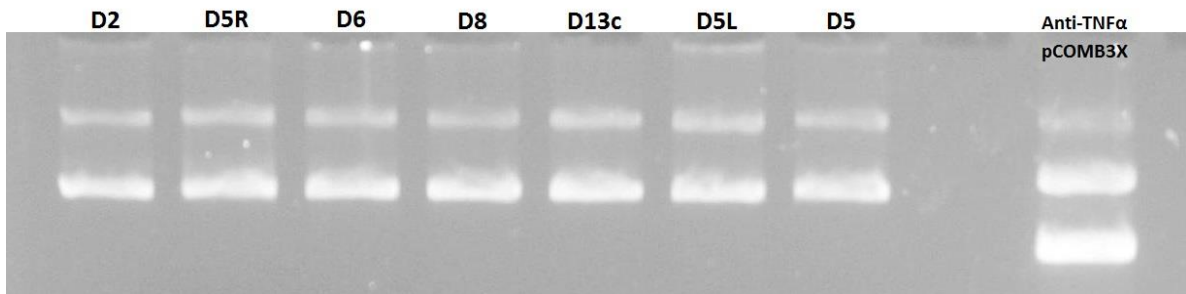
Se llevó a cabo la clonación del gen *t43* en pET101/D, partiendo del vector pPICZ $\alpha$ A+t43 que contenía ya ligada la secuencia de interés. Se realizó un PCR en gradiente utilizando la enzima polimerasa Vent bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 3, con la finalidad de determinar la mejor temperatura de alineamiento para los cebadores t43chF y t43Rev. La figura 23 muestra un gel de agarosa al 2 % donde se evaluaron los productos de PCR, en todas las temperaturas amplificó un fragmento de ~330 pb correspondiente al gen *t43* y se seleccionó 60 °C como la mejor temperatura de alineamiento para el juego de cebadores utilizado.



**Figura 23.** Productos de PCR en gradiente. Productos amplificados por PCR utilizando

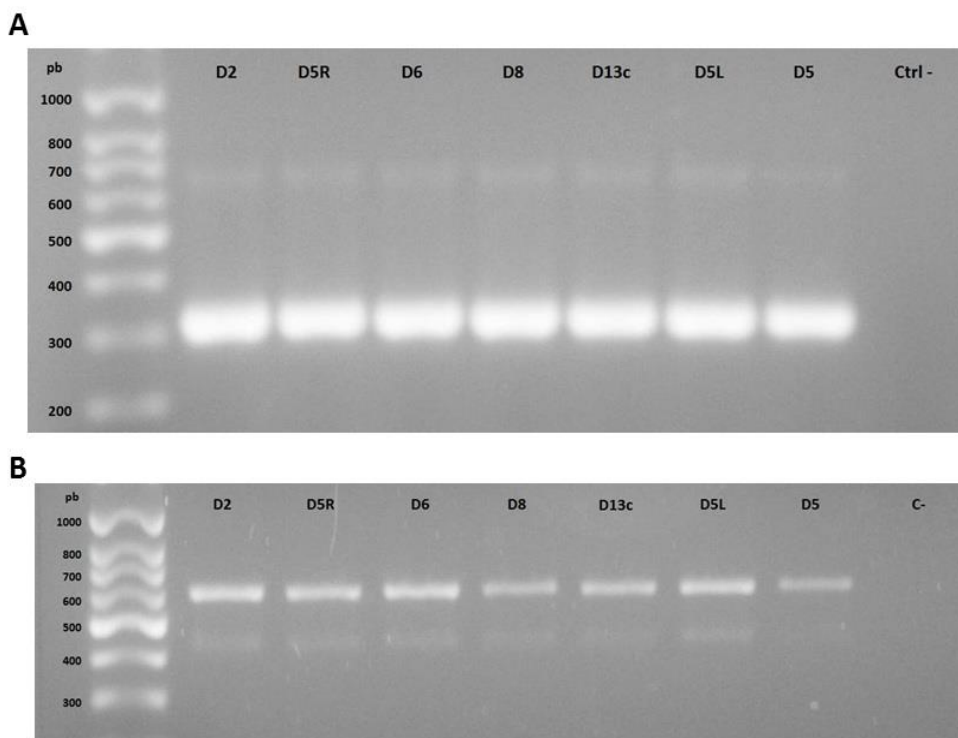
los cebadores t43chF y t43Rev. MM: marcador molecular; 50-60 °C: fragmento de *t43* amplificado en las temperaturas evaluadas. Gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio.

Después de la transformación de células de *E. coli* TOP10 con la reacción de clonación de pET101/D+*t43*, se seleccionaron al azar siete colonias, se les extrajo el plásmido y fueron evaluados por PCR. La figura 24 presenta un gel de agarosa al 0.8 %, donde se muestra la integridad del ADN plasmídico purificado a partir de las siete colonias.



**Figura 24. ADN plasmídico purificado, pET101/D+*t43*. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio.**

La figura 25a corresponde a un gel de agarosa al 2 % donde se muestra el producto de PCR obtenido al utilizar los cebadores t43chF y t43Rev, el fragmento amplificado corresponde al tamaño esperado (~330 pb). La figura 25b muestra un gel de agarosa al 2 %, donde se observa un fragmento amplificado por PCR de ~700 pb, que corresponde al tamaño esperado al utilizar los cebadores T7 y T7Rev. De todos los plásmidos se amplificó el producto de tamaño esperado; se seleccionaron las muestras D13c y D5 para secuenciación.



**Figura 25. Productos de PCR, pET101/D+*t43*. A: producto de PCR utilizando el juego de cebadores T43chF y T43Rev. B: producto de PCR utilizando los cebadores T7 y T7Rev. C-: control negativo, agua. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.**

La secuencia obtenida para D13c fue de 600 pb y no correspondió a la secuencia del plásmido pET101/D-TOPO ni a ninguna otra secuencia en GenBank (Standard Nucleotide BLAST). La secuencia obtenida para D5 se alineó correctamente con la del gen de interés, demostrando que D5 contenía el gen *t43* correctamente clonado. La figura 26 muestra la secuencia de D5 obtenida al utilizar los cebadores t7For y t43Rev. Se observa que la secuencia quedó clonada en fase en el vector pET101/D, con el promotor, el sitio de unión al ribosoma (RBS), el codón de inicio, así como las etiquetas para la purificación e inmunodetección. Con lo anterior, se seleccionó al plásmido D5 para las siguientes fases del trabajo.

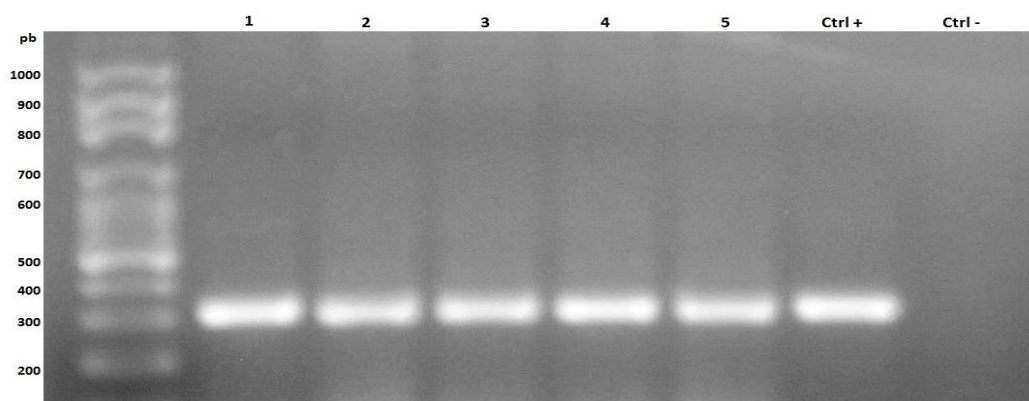




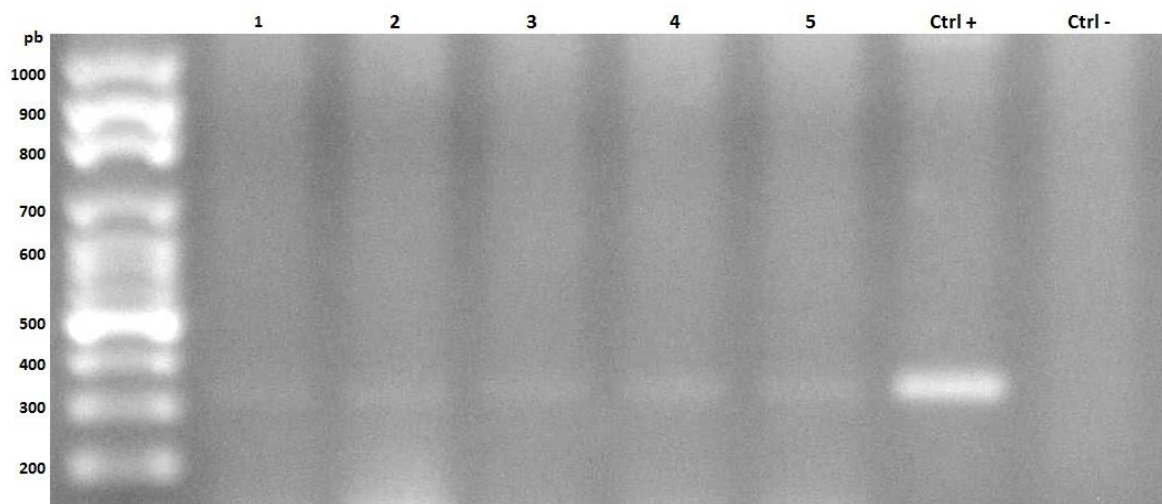
**Figura 26. Resultados de secuenciación de plásmido pET101/D+t43. A: Secuencia de pET101/D+t43 utilizando los cebadores T7For y t43Rev. B: código de colores señala las principales regiones dentro de la secuencia, se subraya la secuencia del gen *t43*.**

### 6.2.3 Transformación en la cepa de *E. coli* Origami 2 (DE3)

Se empleó la cepa Origami 2 (DE3) de *E. coli* para transformar por separado con el vector pComb3x y pET101/D; ambos vectores contenían la secuencia de la proteína de interés y habían sido previamente evaluados para confirmar la correcta clonación. Se seleccionaron cinco colonias transformadas con cada vector y se realizó PCR de colonia utilizando los cebadores t43chF y t43Rev. Las figuras 27 y 28 muestran los geles de agarosa al 2 % con la amplificación por PCR del gen *t43* (~330 pb) a partir de las cepas transformadas con pET101/D y pComb3x respectivamente. Las 10 colonias evaluadas amplificaron el fragmento del tamaño esperado. Se seleccionó la colonia 1 de las transformantes con cada vector para los ensayos de optimización y síntesis de la proteína.



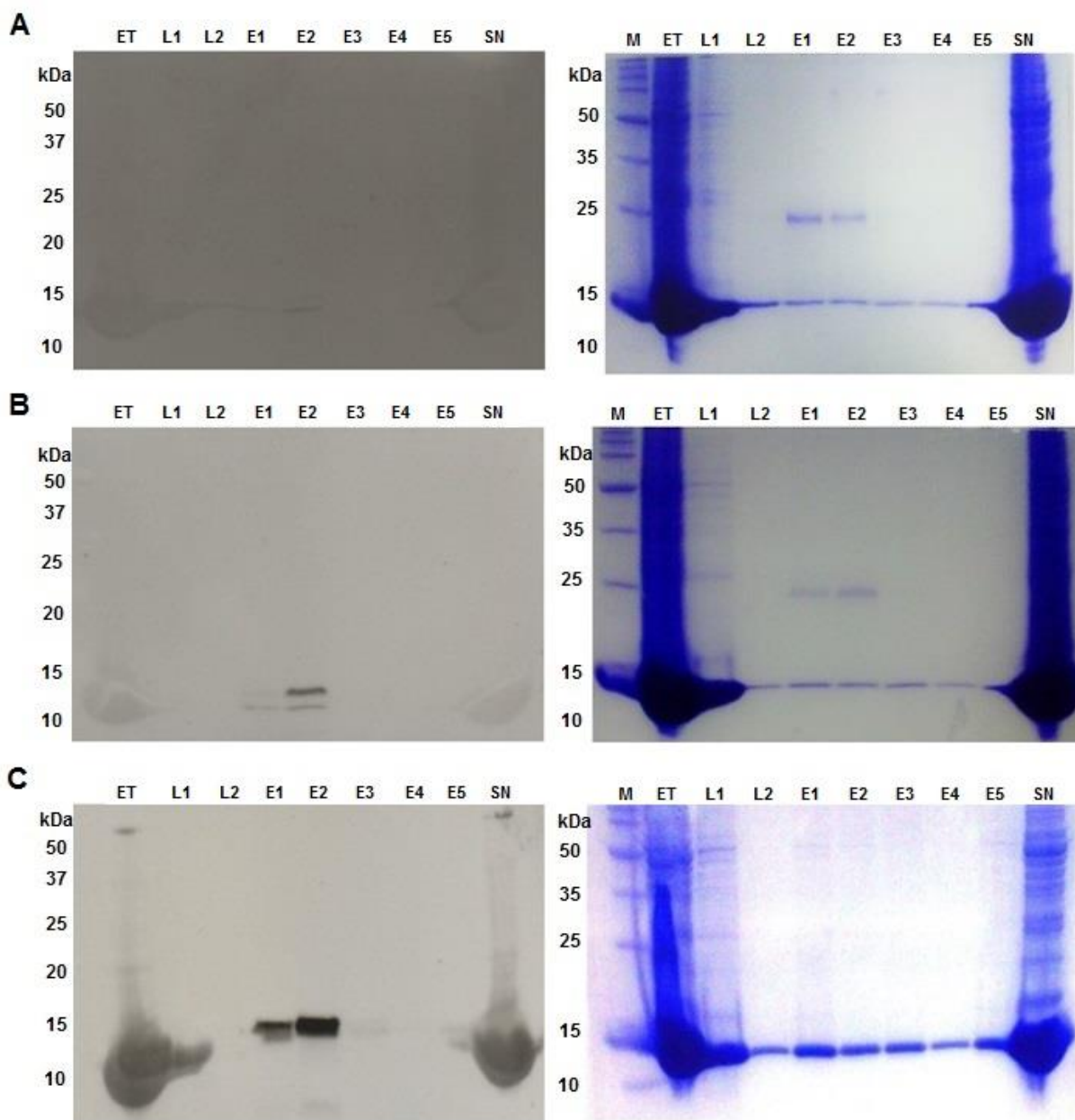
**Figura 27.** Productos de PCR de colonia, pET101/D+t43. Evaluación de cinco clonas transformadas con pET101/D+t43 utilizando el juego de cebadores T43chF y T43Rev. 1-5: Colonias evaluadas; Ctrl +: pPICZαA+t43; Ctrl -: Agua. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.



**Figura 28.** Productos de PCR de colonia, pComb3x+t43. Evaluación de cinco clonas transformadas con pComb3x+t43 utilizando el juego de cebadores T43chF y T43Rev. 1-5: Colonias evaluadas; Ctrl+: pPICZαA+t43; Ctrl -: Agua. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.

#### **6.2.4 Optimización de las condiciones de síntesis de la proteína recombinante en *E. coli* Origami 2 (DE3)**

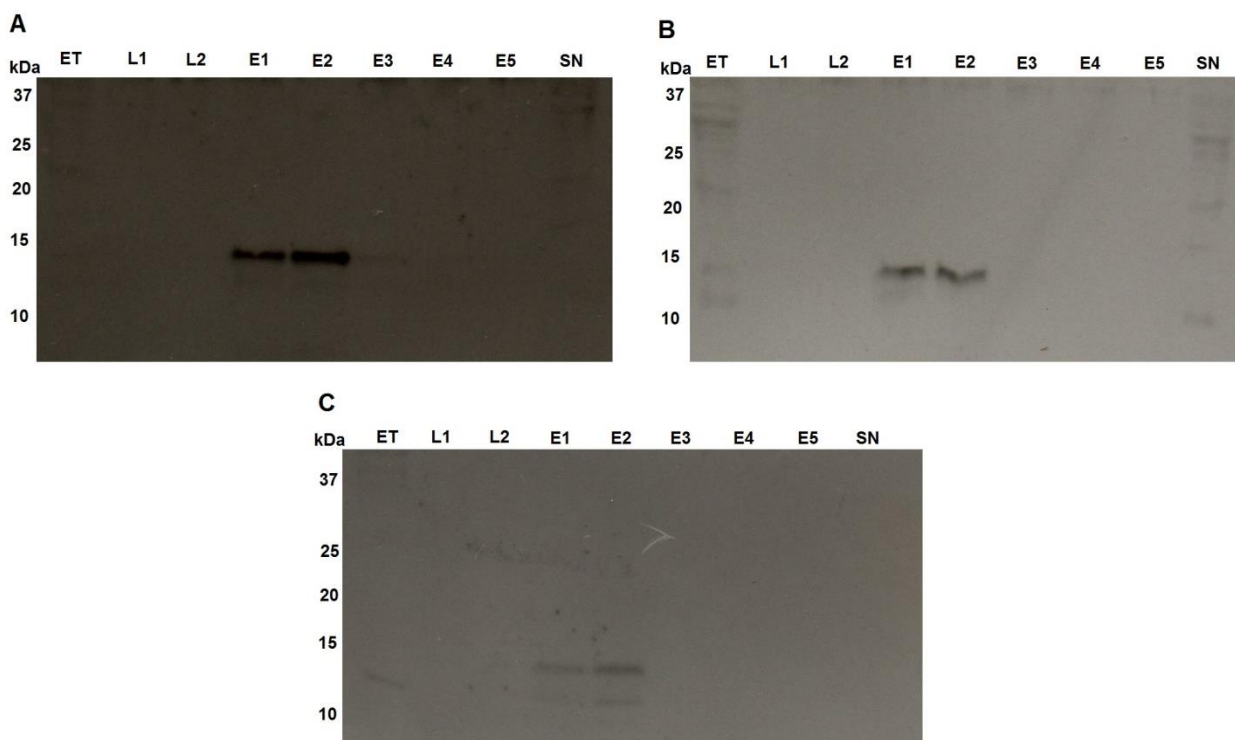
Las condiciones de síntesis de la proteína en *E. coli*, que incluían concentración de inductor (IPTG) y medio de cultivo, fueron optimizadas utilizando la cepa Origami 2 (DE3) + pET101/D+t43. Se evaluaron tres concentraciones de IPTG (0.1, 0.5 y 1 mM) y tres medios de cultivo (SB, 2XYT y LB). La figura 29 presenta los resultados del análisis de las muestras al utilizar diferentes concentraciones de inductor, del lado izquierdo se observa el análisis por Western blot utilizando el anticuerpo anti-v5, que reconoce el epítipo V5 ubicado cerca del extremo carboxilo de la proteína expresada en pET101/D y del lado derecho se muestran los geles de poliacrilamida al 12 % teñidos con azul de Coomassie. Las figuras 29A, 29B y 29C corresponden respectivamente, a las concentraciones 0.1, 0.5 y 1 mM del inductor IPTG empleadas. En los geles de poliacrilamida de todas las concentraciones evaluadas se observa una banda de ~14 kDa en las cinco fracciones eluidas. En la elución 1 y 2 utilizando 0.1 y 0.5 mM de IPTG se observa una banda accesoria de ~25 kDa. Los resultados de Western blot utilizando el anticuerpo anti-v5 presentan una banda a la altura de 14 kDa en la elución 1 y 2 para 0.1 y 0.5 mM de IPTG, mientras que al utilizar 1 mM del inductor se reconoce una banda de ~14 kDa en las cinco eluciones. Las fracciones que en el Western blot presentaron la banda correspondiente a la proteína T43 fueron reunidas, dializadas y cuantificadas. Los rendimientos obtenidos fueron de 0.9 mg/mL 0.140 mg/L y 0.113 mg/L correspondientes a 1, 0.5 y 0.1 mM de inductor, respectivamente, siendo 1 mM la concentración de IPTG en la que se expresó la mayor cantidad de proteína.



**Figura 29.** Evaluación de concentraciones de IPTG. (A) IPTG 0.1 mM; (B) IPTG 0.5 mM; (C) IPTG 1 mM. Izquierda: Western blot anticuerpo purificado utilizando anti-V5. Derecha. SDS-PAGE al 12% del anticuerpo purificado teñido con Coomassie. M: Marcador molecular; ET: Extracto total antes de purificar; L1: Lavado 1 (imidazol 20 mM); L2: Lavado 2 (imidazol 50 mM); E1: elución 1; E2: elución 2; E3: elución 3; E4: elución 4; E5: elución 5; SN: sobre nadante después de purificar.

Una vez seleccionada la concentración óptima de inductor, se realizaron ensayos de optimización del medio de cultivo. Las figuras 30A, 30B y 30C presentan el análisis por Western blot de las muestras obtenidas en el medio SB, 2XYT y LB, respectivamente. En SB se observa una banda de ~14 kDa en las fracciones 1, 2 y 3, mientras que en 2XYT y LB la banda en ese peso molecular sólo se observa en las eluciones 1 y 2. Las primeras tres fracciones de cada muestra fueron reunidas, dializadas y cuantificadas. Los rendimientos obtenidos fueron de 0.69 mg/L, 0.39 mg/L y 0.26 mg/L para SB, 2XYT y LB respectivamente, siendo SB el medio que proporcionó el mayor rendimiento de la proteína.

A partir de estos resultados se decidió seguir trabajando con el medio SB y una concentración de IPTG 1 mM en los siguientes ensayos de expresión de la proteína en *E. coli* con los vectores pET101/D+*t43* y pComb3x+*t43*.



**Figura 30. Evaluación de medio de cultivo. Western blot del anticuerpo T43 purificado, utilizando el anticuerpo anti-V5. (A) SB; (B) 2XYT y (C) LB. ET: Extracto total antes de purificar; L1: Lavado 1 (imidazol 20 mM); L2: Lavado 2 (imidazol 50 mM); E1: elución 1; E2: elución 2; E3: elución 3; E4: elución 4; E5: elución 5; SN: sobrenadante después de purificar.**

Debido a que en los ensayos de optimización de inductor los geles teñidos con azul de Coomassie presentaban una banda de ~14 kDa en las cinco eluciones, mientras que en los Western blot dicha banda solo aparecía en las primeras dos eluciones, se decidió hacer un segundo Western blot con estas muestras usando el anticuerpo anti-histidina para la detección (reconoce la etiqueta de polihistidinas localizada en el extremo carboxilo de la proteína recombinante). La figura 31 muestra el Western blot donde se analizaron las fracciones purificadas provenientes de la expresión en medio SB, utilizando 1 mM de IPTG. Al emplear este anticuerpo, se reconoció una banda de ~14 kDa en las cinco fracciones purificadas.



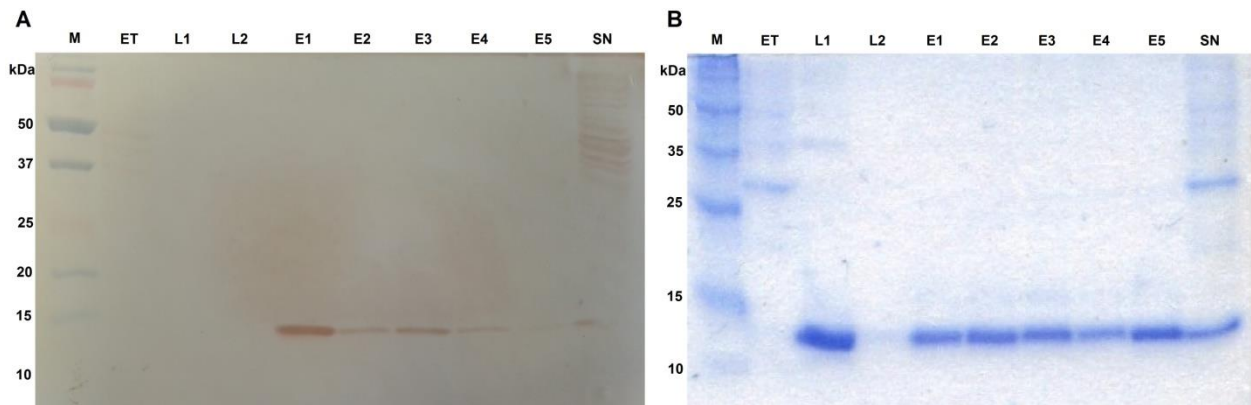
**Figura 31. Western blot anti-Histidinas.** Western blot del anticuerpo purificado utilizando el anticuerpo anti-His. ET: Extracto total antes de purificar; L1: Lavado 1 (imidazol 20 mM); L2: Lavado 2 (imidazol 50 mM); E1: elución 1; E2: elución 2; E3: elución 3; E4: elución 4; E5: elución 5; SN: sobrenadante después de purificar.

### 6.2.5 Expresión de la proteína recombinante en células Origami 2 (DE3) transformadas con pET101/D o pComb3x

A partir de las condiciones seleccionadas en los ensayos de optimización, se llevó a cabo la expresión de la proteína en células Origami 2 (DE3) transformadas con los vectores

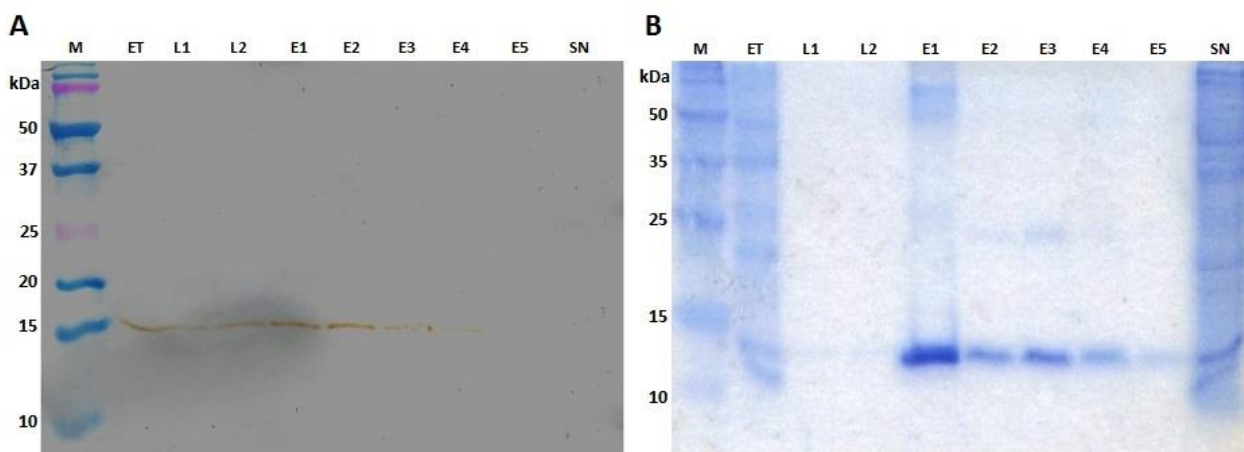


pET101/D+*t43* y pComb3x+*t43*. La proteína se expresó en lotes de 300 mL y una vez extraída del citoplasma fue analizada por SDS-PAGE y por inmunodetección. Las figuras 32A y 32B presentan respectivamente el Western blot y SDS-PAGE 12 % donde se analizaron las muestras expresadas en Origami 2 (DE3) + pET101/D+*t43*. Para la inmunodetección, se utilizó el anticuerpo de gallina anti-vNAR y un anticuerpo secundario anti-gallina acoplado a peroxidasa. Una banda de ~14 kDa se observa en las cinco eluciones tanto en el Western blot como en el gel de poliacrilamida. El SDS-PAGE muestra otras bandas accesorias que no representan más del 10 % de la proteína total.



**Figura 32. Análisis de la proteína purificada expresada en Origami 2 (DE3) + pET101/D+*t43*. (A) Western blot, utilizando el anticuerpo de gallina anti-vNAR y un anticuerpo secundario anti-gallina; (B) SDS-PAGE 12 % teñido con azul de Coomassie; ET: Extracto total antes de purificar; L1: Buffer de lavado 1, imidazol 20 mM; L2: Buffer de lavado 2, imidazol 50 mM; E1: elución 1; E2: elución 2; E3: elución 3; E4: elución 4; E5: elución 5; SN: sobrenadante después de purificar.**

La figura 33A presenta el análisis por Western blot de las muestras expresadas en Origami 2 (DE3) + pComb3x+*t43* utilizando el anticuerpo de gallina anti-vNAR y un anticuerpo secundario anti-gallina acoplado a peroxidasa, mientras que la figura 33B corresponde al análisis de las muestras por SDS-PAGE al 12 %. En ambas imágenes se puede observar un banda de ~14 kDa en las cinco fracciones eluidas. En el gel de poliacrilamida, se presentan bandas accesorias, sin embargo no representan más del 10 % de la proteína purificada.

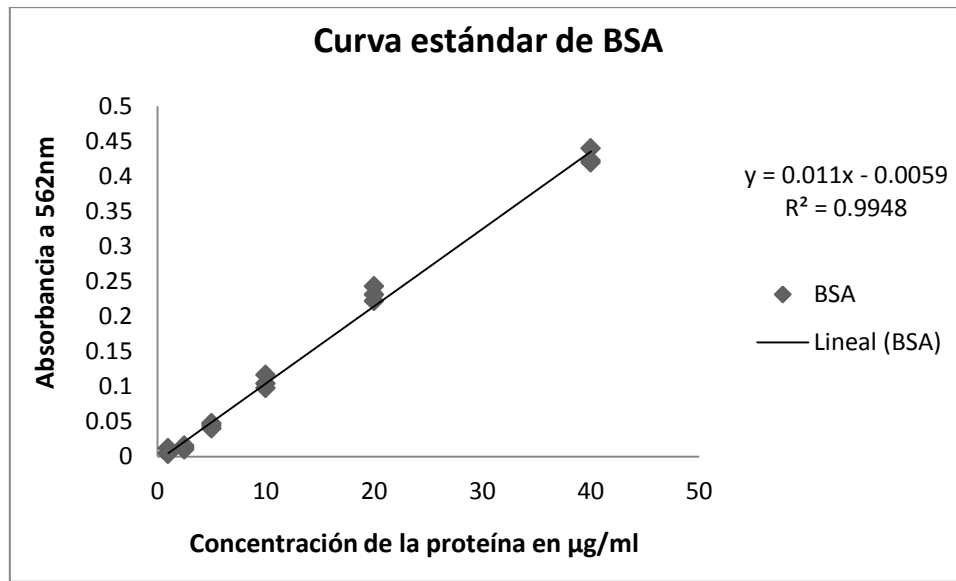


**Figura 33. Análisis de la proteína purificada expresada en Origami 2 (DE3) + pComb3x+t43. (A) Western blot utilizando el anticuerpo de gallina anti-vNAR y un anticuerpo secundario anti-gallina acoplado a peroxidasa; (B) SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de Coomassie; ET: Extracto total antes de purificar; L1: Buffer de lavado 1, imidazol 20 mM; L2: Buffer de lavado 2, imidazol 50 mM; E1: elución 1; E2: elución 2; E3: elución 3; E4: elución 4; E5: elución 5; SN: sobrenadante después de purificar.**

### **6.2.6 Cuantificación y rendimiento de la proteína T43 expresada en células Origami 2 (DE3) de *E. coli***

Previo a la cuantificación se juntaron las cinco eluciones de las muestras correspondientes a pET101/D y pComb3x. La figura 34 presenta la curva estándar de BSA y la ecuación de la recta utilizada para estimar la cantidad de proteína obtenida a partir de cada vector. Se obtuvo un rendimiento de hasta 0.9 mg/L y 0.273 mg/L para Origami 2 (DE3) + pET101/D+t43 y Origami 2 (DE3) + pComb3x+t43 respectivamente.

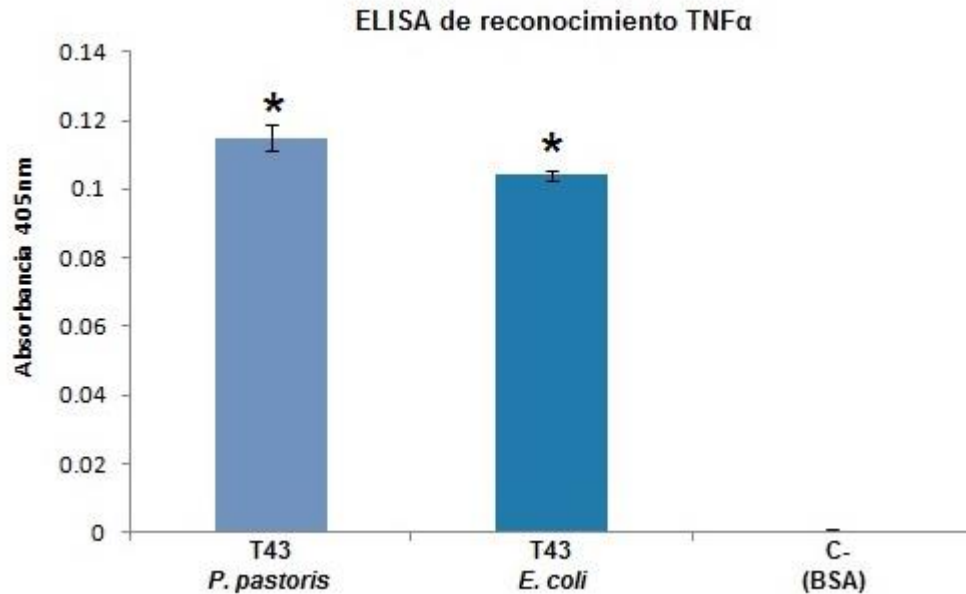




**Figura 34.** Curva estándar de BSA, cuantificación de proteína expresada en *E. coli*.

### 6.3 ELISA de reconocimiento a TNF $\alpha$

Se juntó la proteína obtenida en *E. coli* a partir de las inducciones para cada uno de los dos vectores y se realizó un ELISA de reconocimiento a TNF $\alpha$  utilizando la proteína T43 expresada en *P. pastoris* y en *E. coli*. Se empleó BSA como control negativo. La figura 35 corresponde a los resultados del ELISA de reconocimiento; se puede observar que la proteína T43 expresada en ambos microorganismos tubo la capacidad de reconocer a la citocina, no existió diferencia significativa entre ambas muestras, sin embargo si hubo diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) entre el reconocimiento a BSA 1 % empleado como control negativo.



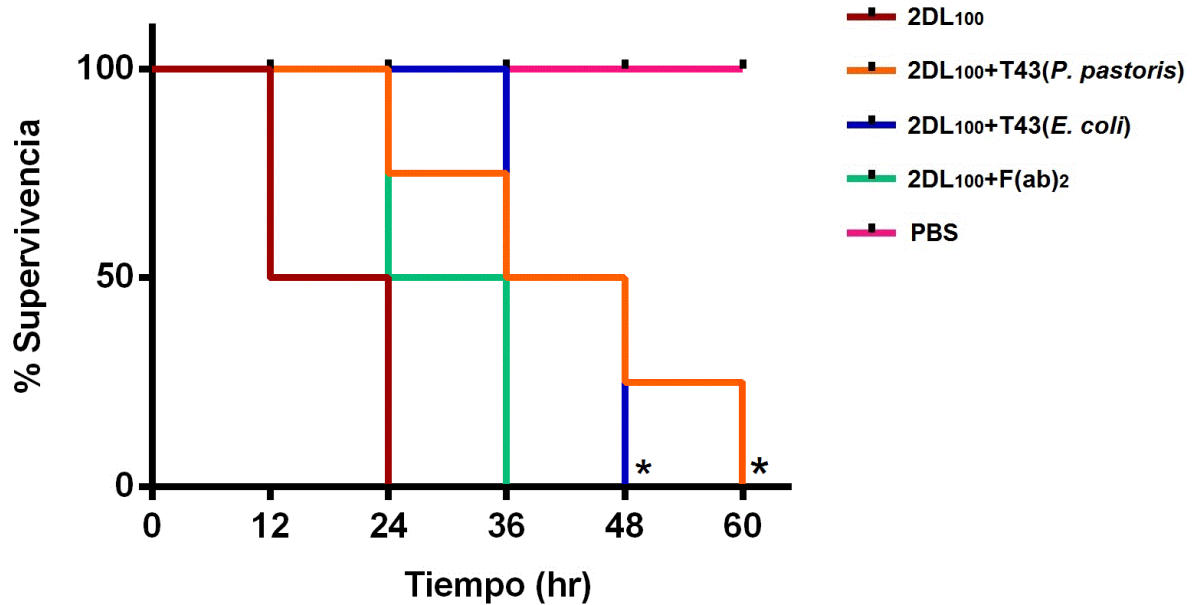
**Figura 35. ELISA de reconocimiento a TNF $\alpha$ . Proteína T43 expresada en *P. pastoris* y *E. coli*. Control negativo, BSA.**

#### **6.4 Ensayos de neutralización de TNF $\alpha$ en ratones con modelo de choque endotóxico**

La supervivencia de los ratones se documentó por tres días después de la inducción de endotoxemia. La figura 36 muestra la supervivencia de los ratones a lo largo de 60 horas. Todos los animales del grupo con choque endotoxémico murieron durante las primeras 24 h después de la administración de las 2DL<sub>100</sub> de LPS. En contraste, todos los grupos en los que se bloqueó TNF $\alpha$ , con el vNAR expresado en *P. pastoris*, el vNAR expresado en *E. coli* y el fragmento F(ab')<sub>2</sub> redujeron su mortalidad en las primeras 24 h. El grupo de ratones tratados con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> presentó supervivencia hasta las 36 h mientras que los grupos tratados con los vNAR expresado en *E. coli* y *P. pastoris* presentaron hasta 48 y 60 h de supervivencia respectivamente. Los grupos tratados con vNAR retrasaron la mortalidad en comparación al fragmento F(ab')<sub>2</sub>, sin embargo no hubo diferencia en la supervivencia final en estos grupos (P=0.36).

Los grupos tratados con la proteína T43 expresada en *P. pastoris* y *E. coli*, fueron protegidos significativamente durante más tiempo, con respecto al grupo control de 2DL<sub>100</sub> de LPS (P=0.04 y P=0.02 respectivamente). Sin embargo no se observó una diferencia significativa en la

supervivencia a través del tiempo del grupo control de 2DL<sub>100</sub> de LPS con el grupo tratado con F(ab')<sub>2</sub> (P=0.16).

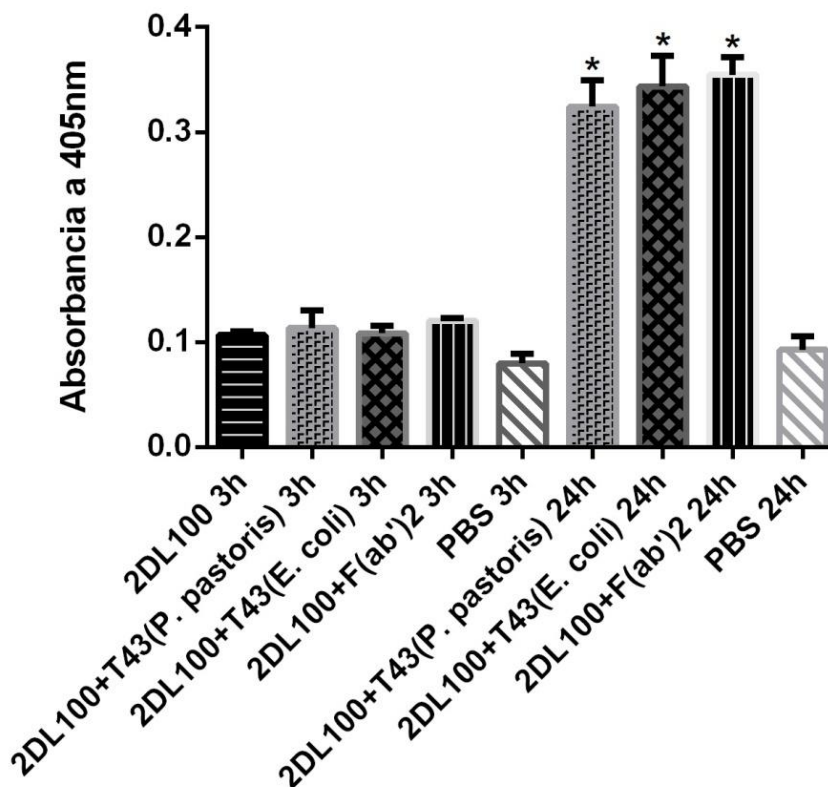


**Figura 36.** Supervivencia de ratones tratados con 2DL<sub>100</sub> de LPS. Se muestra la supervivencia de animales tratados con la proteína T43 expresada en *P. pastoris* (Anaranjado), la proteína T43 expresada en *E. coli* (Azul) y un fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-TNF $\alpha$  (Verde). Se utilizó como control + de muerte, un grupo con 2DL<sub>100</sub> de LPS y sin tratamiento anti-TNF (Café). El grupo control - (Rosa) se trató solo con PBS. Cada grupo incluía cuatro ratones. La comparación de la supervivencia se analizó con la prueba de Mantel-Cox. Se consideró una diferencia significativa cuando \*P<0.05 contra el control.

#### 6.4.1 Medición de TNF $\alpha$ sérico.

La figura 37 muestra el resultado del ELISA de reconocimiento utilizando la sangre de los diferentes grupos de ratones, para comparar la concentración de TNF $\alpha$  sérico a las 3 y 24 h después de inducida la endotoxemia. Se observa que a las 3 horas de administrados los LPS, no hubo un aumento significativo en la concentración sérica de TNF $\alpha$  con respecto al grupo control de PBS, al cual no se le administro ni LPS ni tratamiento anti-TNF. Sin embargo, tanto en los grupos tratados con los fragmentos vNAR a partir de *P. pastoris* y *E. coli*, así como en el grupo tratado con los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, se indujo un incremento significativo (P<0.05) de TNF $\alpha$  a las

24 horas, en comparación a dicho grupo control. La concentración de TNF $\alpha$  sérico en el grupo control de 2DL<sub>100</sub> de LPS, no se midió a las 24 horas, debido a que para esa hora todos los ratones del grupo habían muerto.



**Figura 37. Reconocimiento de TNF $\alpha$  sérico.** Se muestra el nivel de reconocimiento de la citocina en el suero de todos los grupos estudiados a diferentes tiempos. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. Se determinaron las diferencias entre los grupos mediante una prueba de Kruskal-Wallis y un análisis utilizando la prueba de comparación múltiple de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.01$ .

## 7. Discusión

---

En este trabajo, se reporta la expresión de un fragmento de anticuerpo tipo vNAR en dos modelos de expresión, uno eucariota inferior (*P. pastoris*) y otro procariota (*E. coli*).

Debido a la degeneración del código genético, el uso de codones sinónimos para un aminoácido específico, difiere en cada organismo (Fath *et al.*, 2011), por lo cual, una de las consideraciones más importantes para mejorar la expresión de proteínas heterólogas, es la adaptación de la secuencia del gen, para el uso de codones típico del hospedero. Si un gen contiene codones que son raramente usados por el hospedero, su nivel de expresión no será el máximo, esto puede ser una limitación importante de la expresión de la proteína heteróloga de interés, (Puigbò *et al.*, 2007). Bajo estas consideraciones, en este trabajo se empleó el gen *t43* optimizado para el uso de codones en *P. pastoris*. Para la optimización se modificó el 60% de la secuencia total del gen, sin embargo, se mantuvo la secuencia original de la proteína. Debido a que entre la secuencia de *t43* optimizada para *P. pastoris* y la secuencia optimizada para su uso en *E. coli*, solo existe una diferencia de ~30%, se decidió trabajar con la secuencia optimizada para *P. pastoris* en ambos modelos de expresión.

Durante la expresión de la proteína T43 en *P. pastoris*, se evaluaron dos medios de cultivo, un medio rico (BMMY) y un medio mínimo (BMMH). Se seleccionó el medio BMMH para los siguientes ensayos de expresión debido a que los SDS-PAGE correspondientes a este medio, presentaron menos proteínas accesorias en las fracciones purificadas. Esto sugiere una mayor pureza de la proteína T43 en el medio BMMH que en el medio BMMY, lo que puede facilitar los pasos posteriores de purificación de la proteína.

Los ensayos de optimización de inductor (metanol) para *P. pastoris*, sugirieron que existe una baja expresión basal de la proteína T43 controlada por el promotor AOX1. En 1 y 2 % de metanol, se registró un incremento de la expresión de la proteína, siendo 2 % la concentración óptima ya que al incrementar la concentración de metanol a 4 % se observó un decremento de la proteína. Se pudo observar también que el botón celular obtenido al final de la inducción con 4 % de metanol, era menor que el obtenido con las otras tres concentraciones de inductor evaluadas, sugiriendo que la adición de 4 % de metanol cada 12 h, resulta tóxico para el cultivo de *P. pastoris*.

Aunque en la fase de optimización de las condiciones de expresión los ensayos de Western blot no mostraron gran diferencia en la concentración de proteína expresada por las dos cepas experimentales de *P. pastoris*, se eligió a SMD1168 para continuar con los ensayos de síntesis del anticuerpo, ya que esta es una cepa deficiente en proteasas A (Aspartil proteasa tipo pepsina), lo que reduce la posibilidad de hidrólisis de proteínas, mientras que la cepa X-33 contiene proteasas A, proteasa B (serin proteasa) y Carboxipeptidasa Y (serin exopeptidasa). La mayoría de las proteasas de *P. pastoris* que se encuentran en el sobrenadante se generan debido a la lisis celular; mantener una tasa de crecimiento constante es una de las mejores estrategias para minimizar la liberación de proteasas (Cereghino y Cregg, 2000). Sin embargo, esto es difícil en un cultivo a nivel de matraz con agitación, donde no hay administración de inductor y oxígeno de manera controlada como cuando se trabaja en fermentadores. El efecto del pH es también un punto crítico durante la expresión ya que *P. pastoris* tiene proteasas ácidas, neutras y básicas. En este trabajo, la expresión de la proteína T43 empezó con un pH=8 y terminó con un pH=3, por lo anterior, el emplear cepas de *Pichia* deficientes de proteasas, como SMD1168, puede ayudar a disminuir la degradación de las proteínas heterólogas secretadas al medio. Camacho (2012), reporta degradación de un anticuerpo quimérico compuesto de la proteína T43, la región bisagra y la región CH2 de la IgG1 humana al expresarlo en la cepa X-33 cultivada en un biorreactor.

Por otro lado, un fenómeno frecuentemente observado en *E. coli*, es que muchas proteínas heterólogas se repliegan de manera incorrecta y se acumulan en el citoplasma como cuerpos de inclusión insolubles (Habibi *et al.*, 2012), lo que requiere pasos adicionales de repliegamiento. Esto conlleva a rendimientos que varían extensamente, recuperando desde el 75 % hasta sólo 11 % o incluso menos del rendimiento inicial (Cossins *et al.*, 2007). Otra opción es la expresión periplasmática, la cual reduce la formación de proteína insoluble, sin embargo los rendimientos de las proteínas recombinantes periplasmáticas suelen ser bajos. Con la finalidad de reducir los problemas anteriores, se seleccionó a la cepa de *E. coli* Origami 2 (DE3) para expresar el vNAR T43, ya que en esta cepa se mejora la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma a través de la interrupción de los genes *trxB* y *gor* que codifican dos enzimas reductasas.

Se evaluaron dos vectores para la expresión en *E. coli*, pComb3x y pET101/D. El primero no presentó ningún problema en los ensayos de expresión e inmunodetección, sin embargo, en el caso de pET101/D al analizar la expresión en SDS-PAGE se observaron bandas de aproximadamente 14 kDa correspondiente al vNAR T43 en las cinco fracciones purificadas,

mientras que los Western blot utilizando el anticuerpo anti-V5 mostraban la proteína sólo en las primeras tres fracciones. Se realizó un segundo Western blot empleando el anticuerpo anti-Histidinas el cual mostró la banda de ~14 kDa en las cinco eluciones. Para descartar que entre las proteínas citoplasmáticas propias de Origami 2 (DE3), se encontrara una proteína del mismo peso molecular que T43 y que también se pudiera purificar por afinidad a metales, se realizó una inducción con la cepa Origami 2 (DE3) sin transformar. En este ensayo el SDS-PAGE del extracto citoplasmático purificado no presentó las bandas de ~14 kDa. Posteriormente, en un Western blot utilizando un anticuerpo anti-vNAR se confirmó que las bandas observadas en las cinco fracciones purificadas al utilizar el vector pET101/D correspondían al vNAR.

El medio y concentración de inductor seleccionados para la expresión de la proteína en *E. coli*, fueron SB y 1 mM respectivamente ya que proporcionaron el mayor rendimiento del dominio vNAR. A esta concentración de IPTG se detectaron menos bandas accesorias en comparación con 0.1 y 0.5 mM al analizar por SDS-PAGE.

Con respecto a la purificación de la proteína expresada en los dos microorganismos, se observó pérdida del vNAR en los lavados previos a las eluciones. Conociendo que los rendimientos de estos anticuerpos suelen ser bajos, sería importante evaluar otras condiciones de purificación, como modificar las concentraciones de imidazol o pH que se aplican en los lavados, con la finalidad de reducir la pérdida de la proteína de interés.

Los rendimientos obtenidos fueron para Origami 2 (DE3)+pET101/D+t43 y Origami 2 (DE3)+pComb3x+t43 de 0.90 mg/L y 0.27 mg/L, respectivamente, mientras que el rendimiento al expresar T43 en *P. pastoris* fue de 4.66 mg/L. La levadura proporcionó un rendimiento cinco veces más alto al obtenido en *E. coli*. Además, la capacidad de secreción al medio de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, facilitó los pasos posteriores de procesamiento de la proteína al no requerir lisis celular, reduciendo así la cantidad de proteínas propias del hospedero a eliminar durante la purificación.

Previo a los ensayos de actividad de la proteína en un modelo *in vivo*, se realizó un ELISA de reconocimiento a TNF $\alpha$  para verificar si el vNAR T43 expresado en ambos microorganismos tenía la capacidad de reconocer a su blanco. Para el caso de *E. coli*, se juntó la proteína expresada a partir de los dos vectores. Se observó que la proteína sintetizada tanto en *P. pastoris* como en *E. coli* mantuvo la capacidad de reconocer efectivamente a la citocina TNF $\alpha$ . No existió diferencia

significativa entre el reconocimiento del vNAR T43 expresado en *E. coli* o el expresado en *P. pastoris*, pero si hubo diferencia significativa entre el reconocimiento a BSA empleado como control negativo. Una vez observada la capacidad del anticuerpo T43 para reconocer a la citocina en los ensayos de ELISA, se procedió a realizar los ensayos de actividad en un modelo murino con choque endotóxico.

La sepsis o choque endotóxico, describe a síntomas clínicos complejos que resultan de un proceso inflamatorio exacerbado causado por interacciones entre el sistema inmune innato y fuentes bacterianas de infección o sus antígenos circulantes principalmente lipopolisacáridos (LPS). Los LPS circulantes se acoplan a receptores tipo-toll 4 (TLR4) en la superficie de los monocitos y los macrófagos, que a su vez dan lugar a la activación celular y la producción temprana de grandes cantidades de citocinas inflamatorias, entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa. TNF $\alpha$  se libera en los primeros 30-90 min después de la exposición a los LPS y desempeña un papel clave en la sepsis debido a su capacidad de activar la explosión respiratoria y la producción de óxido nítrico, así como promover la disminución de la resistencia muscular periférica, lo que lleva a la coagulación intravascular diseminada e insuficiencia orgánica múltiple (Cohen, 2002; Bojalill *et al.*, 2013).

En este trabajo, se realizó un ensayo para comparar la capacidad del vNAR T43 de mejorar la supervivencia en un modelo murino con choque endotóxico, al administrar 2DL<sub>100</sub> de LPS. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína T43 expresada tanto en *E. coli* como en *P. pastoris* retrasó el tiempo de mortalidad de los ratones en comparación a un fragmento F(ab')<sub>2</sub>.

En 2013, Bojalill *et al.*, indujeron endotoxemia en ratones BALB/c machos al administrarles una DL<sub>100</sub> de LPS (20 mg/kg), reportando una reducción en la mortalidad al utilizar tratamientos anti-TNF $\alpha$  con un fragmento vNAR y un fragmento F(ab')<sub>2</sub> (40 y 25% de supervivencia, respectivamente). Los resultados obtenidos por Bojalill *et al.*, (2013) coinciden con el presente trabajo en que existe una asociación del vNAR con un retraso en la mortalidad en comparación al F(ab')<sub>2</sub>, aunque esta diferencia en ninguno de los casos fue significativa.

La dosis de LPS a utilizar en este estudio se determinó en ensayos preliminares tomando como base la DL<sub>100</sub> reportada por Bojalill *et al.*, (2013). Al probar una y dos DL<sub>100</sub>, esta última resultó la dosis que mataba a todos los ratones en un periodo menor a 48 horas, mientras que una DL<sub>100</sub> no fue suficiente para matar a todo el grupo de ratones tratados. Además, a pesar del aumento en



la dosis de LPS administrada a los ratones ( $2DL_{100}$ ), se trabajó con la misma concentración de anticuerpo vNAR T43, a la reportada por Bojalill *et al.*, (2013).

Los tiempos de supervivencia de los ratones durante este estudio y el reportado por Bojalill *et al.*, (2013), fueron diferentes (hasta 60 h y 96 h respectivamente). Esta diferencia puede estar relacionada con el tamaño de muestra utilizado (4 y 20 ratones por grupo, respectivamente), así como con las dosis de LPS y de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  administradas. A pesar de que los tiempos de supervivencia de los ratones en ambos trabajos fueron diferentes, se coincide con Bojalill *et al.*, (2013) en que el tratamiento anti-TNF $\alpha$  con fragmentos vNAR mejora significativamente la supervivencia temporal de los ratones en comparación con el grupo control sin tratamiento anti-TNF $\alpha$ .

En este trabajo se analizó la presencia de la citocina TNF $\alpha$  en el suero de los ratones para cada uno de los tratamientos, no se observó un aumento significativo de TNF $\alpha$  a las 3 h después de administrados los LPS en ningún grupo con respecto al control. Para las 24 horas después de la inyección de  $2DL_{100}$  de LPS, el reconocimiento de TNF $\alpha$  en el suero aumentó significativamente en comparación al del grupo control al que sólo se le administró PBS. Estos resultados difieren de los obtenidos en otros trabajos, donde los tratamientos anti-TNF $\alpha$  están asociados con una temprana reducción de TNF $\alpha$  en el suero (Karzai *et al.*, 2003), así como con el trabajo de Bojalill *et al.*, (2013) donde se reporta que los niveles de TNF $\alpha$  después del tratamiento con un fragmento vNAR y un fragmento F(ab') $_2$ , disminuían casi hasta niveles indetectables a las 24 horas después de inducido el choque endotóxico. Una posible explicación a estos resultados, está relacionada con la concentración de LPS y de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  utilizado en el presente estudio, ya que al doblar la  $DL_{100}$  de LPS pero mantener la misma concentración de anticuerpo suministrada por Bojalill *et al.*, (2013), se pudo producir una concentración de TNF $\alpha$  en la sangre, que resulta muy elevada para la dosis de anti-TNF empleada. Por lo cual, para las 24 horas se observa un aumento significativo de TNF $\alpha$ , en lugar de una disminución. Estos resultados sugieren que es importante realizar experimentos para determinar nuevamente la  $DL_{100}$  de LPS. Del mismo modo, realizar un ensayo piloto para investigar la dosis de dominios vNAR útil para mejorar la supervivencia en ratones con choque endotóxico.

## Conclusiones

---

### Conclusiones particulares

Las condiciones óptimas de expresión del vNAR T43 en *P. pastoris* fueron: cepa: SMD1168, medio mínimo BMMH, con dos días de inducción, aplicación del inductor metanol al 2% cada 12 h, a partir de un volumen de células correspondiente a 100 mL de cultivo inicial.

Las condiciones óptimas de inducción del vNAR T43 en células Origami 2 (DE3) de *E. coli*, fueron: medio SB, 1 mM de IPTG durante 6 horas de inducción.

De los dos microorganismos utilizados, *P. pastoris* presentó el mayor rendimiento de la proteína con 4.66 mg/L, mientras que *E. coli* tuvo un rendimiento de 0.90 mg/L y 0.27 mg/L al utilizar los vectores pET101/D y pComb3x, respectivamente.

Los ensayos de actividad empleando un modelo murino con choque endotóxico mostraron que *P. pastoris* (SMD1168) y *E. coli* (Origami 2 (DE3)) son capaces de expresar a la proteína T43 activa y funcional y que no existe diferencia significativa entre la actividad de la proteína T43 expresada en ambos microorganismos.

Los vNAR son una estrategia para mejorar la supervivencia en ratones con modelo de choque endotóxico.

### Conclusión General

La cepa SMD1168 de *P. pastoris* y la cepa Origami 2 (DE3) de *E. coli*, pueden ser empleadas como modelos para la expresión de dominios vNAR anti-TNF $\alpha$ , ya que ambos son capaces de expresar a la proteína activa y funcional. Siendo *P. pastoris* la que proporciona los rendimientos más altos, hasta cinco veces mayores a los de *E. coli*. Los resultados del presente estudio sugieren a los fragmentos vNAR como una estrategia para mejorar la supervivencia en ratones con choque endotóxico.

## Perspectivas

---

- Estudiar otros modelos para expresión de dominios vNAR como células de mamífero, de insecto o plantas.
- Estudiar y optimizar las condiciones de expresión de los dominios vNAR mediante el uso de biorreactores.
- Determinar la dosis de dominios vNAR anti-TNF $\alpha$  útil para mejorar la supervivencia en ratones con choque endotóxico.

## Referencias bibliográficas

---

- Abbas, A. K., Litchman A. H. y Pillaj, S. (2008). *Inmunología celular y molecular. 6ta edición*. Elsevier Saunders.
- Antibody society (2013). [http://www.antibodysociety.org/news/approved\\_mabs.php](http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php).
- Ayyar, B. V., Arora, S., Murphy, C. & O’Kennedy, R. (2012). Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, 56, 116–129.
- Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. (2001). *Phage Display: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Bojalill, R., Mata-Gonzales, M. T., Sánchez-Muñoz, F., Yee, Y., Argueta, I., Bolaños, L., Amezcua-Guerra, L. M., Camacho-Villegas, T. A., Sánchez-Castrejon, E., García-Ubbelohde, W. J., Licea-Navarro, A. F., Márquez-Velasco, R. & Paniagua-Solís, J. F. (2013). Anti-tumor necrosis factor vNAR single domains reduce lethality and regulate underlying inflammatory response in a murine model of endotoxic shock. *BMC Immunology*, 14(17), 1-7.
- Camacho V. T. A. (2007). Obtención de fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo tipo V<sub>H</sub>NAR del tiburón *Heterodontus francisci* neutralizantes de las citocinas TNF-alfa y VEGF165. Tesis de maestría en ciencias. (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada).
- Camacho V. T. A. (2012). Anticuerpos de dominio sencillo y quiméricos de tiburón neutralizantes de citocinas humanas. Tesis de doctorado en ciencias. (Universidad Autónoma de Baja California).

- Camacho-Villegas, T., Mata-Gonzales, T., Paniagua-Solis, J., Sanchez, E. & Licea, N. (2012). Human TNF cytokine neutralization with vNAR from *Heterodontus francisci*: A potential therapeutic use. *mAbs*, 5, 80-85.
- Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 45-66.
- Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420, 885-891.
- Conrath, K. E., Wernery, U., Muyldermans, S. & Nguyen, V. K. (2003). Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Developmental & Comparative Immunology*, 27, 87-103.
- Cossins, A. V., Harrison, S., Popplewell, A. G., & Gore, M. G. (2007). Recombinant production of a VL single domain antibody in *Escherichia coli* and analysis of its interaction with peptostreptococcal protein L. *Protein Expression and Purification*, 51, 253-259.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S. & Raschke, W.C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. En: Jafari, R., Holm, P., Piercecchi, M. & Sundström, B. E. (2011). Construction of divalent anti-keratin 8 single-chain antibodies (sc(Fv)<sub>2</sub>), expression in *Pichia pastoris* and their reactivity with multicellular tumor spheroids. *Journal of Immunological Methods*, 364, 65-76.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J. & Vasser, M. (1983). The tac promoter: A functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 21-25.
- Ellerin, T., Rubin, R. H. & Weinblatt, M. E. (2003). Infections and Anti-Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Therapy. *Arthritis & Rheumatism*, 48(11), 3013-3022.
- Furebring, C., Ohlin, M., Pettersson, S. & Borrebaeck, C. A. K. (1997). Evaluation of novel control elements by construction of eukaryotic expression vectors. *Gene*, 188, 191-198.

- Gorlani, A., de Haard, H. & Verrips, T. (2012). Expression of VHHs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*, 911, 277-286.
- Habibi, A. M., Feiz, B. A., Bouzari, S., Abolhassani, M., Khanahmad, H., Golkar, M., Reza, A. M., Behdani, M., Jahanian-Najafabadi, A. & Ali, S. M. (2012). Functional Recombinant Extra Membrane Loop of Human CD20, an Alternative of the Full Length CD20 Antigen. *Iranian Biomedical Journal*, 16 (3), 121-126.
- Holliger, P. & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23, 1126–1136.
- Jafari, R., Holm, P., Piercecchi, M. & Sundström, B. E. (2011). Construction of divalent anti-keratin 8 single-chain antibodies (sc(Fv)<sub>2</sub>), expression in *Pichia pastoris* and their reactivity with multicellular tumor spheroids. *Journal of Immunological Methods*, 364, 65–76.
- Juárez, K., Dubberke, G., Lugo, P., Koch-Nolte, F., Buck, F., Haag, F. & Licea, A. (2011). Monoclonal Antibodies for the Identification and Purification of vNAR Domains and IgNAR Immunoglobulins from the Horn Shark *Heterodontus francisci*. *Hybridoma*, 30(4), 323-329.
- Karzai, W., Cui, X., Mehlhorn, B., Straube, E., Hartung, T., Gerstenberger, E., Banks, S.M., Natanson, C., Reinhart, K., Eichacker, P.Q. (2003). Protection with Antibody to Tumor Necrosis Factor Differs with Similarly Lethal *Escherichia coli* versus *Staphylococcus aureus* Pneumonia in Rats. *Anesthesiology*, 99, 81–89.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- Little, M., Kipriyanov, S. M., Le Gall, F. & Moldenhauer, G. (2000). Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunology Today*, 21(8), 364-370.

- Malpiedi, L. P., Díaz, C. A., Nerli, B. B. & Pessoa, A. (2013). Single-chain antibody fragments: Purification methodologies. *Process Biochemistry*, 48, 1242–1251.
- Mahgoub, I. O. (2012). Expression and Characterization of a Functional Single-Chain Variable Fragment (scFv) Protein Recognizing MCF7 Breast Cancer Cells in *E. coli* Cytoplasm. *Biochemical Genetics*, 50, 625–641.
- Nutall, S. D., Humberstone, K. S., Krishnan, U. V., Carmichael, J. A., Doughty, L., Hattarki, M., Coley, A. M., Casey, J. L., Anders, R. L., Foley, M., Irving, R. A. & Hudson, P. J. (2004). Selection and Affinity Maturation of IgNAR Variable Domains Targeting Plasmodium falciparum AMA1. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55, 187–197.
- RCSB Protein Data Bank (2013). Recuperado 13 de octubre de 2013 de <http://www.rcsb.org>.
- Saerens, D., Ghassabeh, G. H. & Muyldermans, S. (2008). Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 8, 600–608.
- Simmons, D. P., Abregu, F. A., Krishnan, U. V., Proll, D. F., Streltsov, V. A., Doughty, L., Hattarki, M. K. & Nuttall, S. D. (2006). Dimerisation strategies for shark IgNAR single domain antibody fragments. *Journal of Immunological Methods*, 315, 171–184.
- Soczynska, J. K., Kennedy, S. H., Goldstein, B. I., Lachowski, A., Woldeyohannes, H. O. & McIntyre, R. S. (2009). The effect of tumor necrosis factor antagonists on mood and mental health-associated quality of life: Novel hypothesis-driven treatments for bipolar depression?. *Neuro Toxicology*, 30 (4), 497–521.
- Sorensen, H. P. & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115, 113–128.
- Thalayasingam, N. & Isaacs, J. D. (2011). Anti-TNF therapy. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 25, 549–567.

Verma, R., BoletI, E. & George, A. J. T. (1988). Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181.