



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO

**Producción y caracterización de un anticuerpo monoclonal quimérico
anti-DEC-205 fusionado con antígenos conservados del
virus influenza**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR
QUE PRESENTA:
BIOL. EMMANUEL AYALA GUZMÁN

Director de tesis: Dr. Fernando Esquivel Guadarrama
Co-Directora de tesis: Dra. Delia Vanesa López Guerrero

Cuernavaca Morelos, México, Mayo 2019.

Esta tesis se realizó en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, México; Mayo 2019

AGRADECIMIENTOS

Miembros del comité tutorial:

Director de tesis: Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama.

Co-Directora: Dra. Delia Vanessa López Guerrero.

Tutor personal: Dr. Mario E. Cruz Muñoz.

Dr. Jesús Martínez Barnetche.

Dr. José Luis Montiel Hernández.

Miembros del comité revisor de tesis y jurado de examen para obtención de grado:

Presidente: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia.

Secretario: Dra. Vera Lucia Petricevich.

1° Vocal: Dr. Mario E. Cruz Muñoz.

2° Vocal: Dr. José Luis Montiel Hernández.

3° Vocal: Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama.

Abreviaturas

μL : Microlitro.

AbM: Anticuerpo monoclonal.

h: hora.

Kb: kilo bases.

kDa: kilo Dalton.

mAmps: miliamperios.

Min: minuto.

mL: mililitro.

mM: milimolar.

mm: milímetro.

ng: nanogramo.

nm: nanómetro.

pb: pares de bases.

rpm: revoluciones por minuto.

s: segundo.

SFB: Suero Fetal Bovino.

u/ μL : unidades (enzima)/microlitro.

v/v: relación volumen/volumen.

Índice

Resumen.....	1
I.- Introducción.....	2
1.1- Virus influenza.....	3
1.1.1.- Estructura.....	3
1.1.2- Ciclo de replicación.....	5
1.1.3.- Epidemiología del virus influenza.....	6
1.2.-respuesta inmune.....	7
1.2.1.- Respuesta inmune innata.....	8
1.2.3.- Respuesta inmune adaptativa.....	9
1.2.4.-Linfocitos B.....	10
1.2.5.- Linfocitos T.....	10
1.2.6.- Células dendríticas.....	11
1.3.- Procesamiento y presentación de antígeno a células T.....	11
1.4.-Respuesta inmune contra influenza.....	12
1.5.- Vacunas contra influenza.....	14
1.6.- Direccionamiento de Antígenos a Células Dendríticas.....	16
II.- ANTECEDENTES.....	18
III.- JUSTIFICACIÓN.....	20
IV.- HIPÓTESIS.....	21
V.- OBJETIVOS.....	22
5.1.- Objetivo general:.....	22
5.2.- Objetivos particulares.....	22
VI.- MATERIALES Y METODOS.....	23
6.1.- Diseño y clonación de las secuencias correspondientes a epítomos T y B del virus influenza.....	23
6.2.- Clonación de la secuencia (NP182-205)2-M2e en la región Carboxi-terminal de la cadena pesada de los Abm α -DEC-205 y su control de Isotipo.....	23
6.2.1.- Purificación de la secuencia (NP182-205)2-M2e y los plásmidos receptores...23	
6.2.2.- Ligación del fragmento (NP182-205)2-M2e en los plásmidos receptores.....24	
6.2.3.- Extracción y purificación de los plásmidos recombinantes.....25	
6.2.4.- Verificación de la presencia de la secuencia (NP182-205)2-M2e en los plásmidos recombinantes.....	25
6.3.- Producción in vitro de anticuerpos fusionados con los péptidos de NP y M2 del	

virus influenza.....	26
6.3.1.- ELISA para la detección de AbMs quiméricos en sobrenadantes de células HEK 293.....	27
6.3.2.- Purificación de anticuerpo por cromatografía de afinidad.....	28
6.4.- Caracterización de los anticuerpos sintetizados.....	29
6.4.1.- Electroforesis en geles de acrilamida para caracterizar los anticuerpos monoclonales purificados.....	29
6.4.2.- Ensayo de dot blot para determinar la presencia de la secuencia M2e en los anticuerpos recombinantes.....	30
6.4.3.-Citometría de flujo para determinar especificidad del anticuerpo al receptor DEC-205.....	30
VII.- RESULTADOS.....	32
7.1- Construcción de la fusión de la cadena pesada del AbM NLDC-145 anti-DEC-205 y (NP182-205)2-M2e.....	32
7.2.- Producción de anticuerpos recombinantes in vitro.....	37
7.3.-Caracterización de los anticuerpos recombinantes producidos in vitro.....	41
VIII.- DISCUSIÓN.....	47
IX.- CONCLUSIÓN.....	50
X.- PERSPECTIVAS.....	51
XI. - LITERATURA CITADA.....	52

RESUMEN

El virus influenza es causante de aproximadamente 500 mil muertes anuales a nivel mundial por influenza estacional, además de existir un riesgo latente del surgimiento de una cepa pandémica. La disponibilidad actual de vacunas contra este virus, presenta una problemática importante, ya que el recambio constante de las proteínas virales obliga a la generación anual de vacunas; las cuales dependen de la exactitud en la selección de las cepas virales circulantes, y que muy probablemente no brindaría protección contra una cepa pandémica. De esta manera, en los últimos años se ha tratado de generar una vacuna universal capaz de inducir una protección heterosubtípica. Dentro de las estrategias analizadas para este fin, se encuentra el direccionamiento a células dendríticas de antígenos conservados de las proteínas virales; entre ellos, el ectodominio de 24 aa (M2e) es uno de los candidatos principales para el direccionamiento, ya que este fragmento es altamente conservado en las diferentes cepas virales. Sin embargo, esta proteína es poco inmunogénica, por lo cual se requieren explorar estrategias que aumenten su inmunogenicidad.

En este trabajo se generó un anticuerpo monoclonal α -DEC-205, presente en la membrana de las células dendríticas, fusionado a epítomos conservados del virus influenza, así como su anticuerpo control de isotipo. Para esto, se realizó una fusión de la secuencia que codifica para la cadena pesada del anticuerpo α -DEC-205 de ratón, ligando en su extremo 3' la secuencia codificante para el fragmento (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e, el péptido NP₁₈₂₋₂₀₅ es un epítipo de células T-cooperadoras, (con el conector OLLAS entre los péptidos de NP y NP-M2e), de la misma manera se generó el anticuerpo control de Isotipo. Una vez generadas las construcciones, se co-transfectaron células HEK 293 con el plásmido que codifica para la cadena pesada fusionada y un plásmido que codifica para la cadena ligera del anticuerpo monoclonal, para producir los anticuerpos recombinantes *in vitro*. Obteniéndose cantidades suficientes de los anticuerpos recombinantes para su caracterización. El análisis estructural del anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e permitió determinar que el anticuerpo sintetizado *in vitro*, mantiene las características estructurales esperadas, tanto en la unión de las cadenas ligeras a las cadenas pesadas, así como la fusión traduccional de la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e en las cadenas pesadas del anticuerpo. Asimismo, el análisis funcional del anticuerpo por medio de un ensayo de citometría de flujo, indicó que al anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e no perdió la capacidad de reconocer DEC-205 en las células dendríticas. Esta última característica es muy importante para futuros experimentos de inmunización.

I.- INTRODUCCION

La influenza es una infección viral aguda de las vías respiratorias, altamente contagiosa. Los síntomas son parecidos al del catarro común o resfriado; sin embargo, son más graves y su inicio es generalmente abrupto. La infección por el virus influenza es considerada por la OMS como un problema de salud a nivel mundial, esto debido a su gran capacidad de generar brotes estacionales y pandemias, causando de 250 a 500 mil muertes al año ^[9]. El virus influenza pertenece a la familia *Orthomixoviridae* y se divide en tres tipos de virus: A, B y C. El virus tipo A es el de mayor interés ya que afecta a varias especies de aves y mamíferos, incluyendo a los humanos ^[16,17].

Una ventaja evolutiva de los virus influenza, es su capacidad de mutar la secuencia codificante de las proteínas externas, cambiando su composición antigénica, provocando un desconocimiento por parte del sistema inmune de los individuos previamente infectados, por lo que la población previamente infectada se vuelve vulnerable a una nueva infección. Esta característica es denominada como deriva antigénica o “antigenic drift”, y es el causal de que las vacunas contra el virus Influenza formuladas con anterioridad se vuelvan obsoletas, teniendo que reformular nuevas vacunas con las cepas circulantes anualmente generando un gasto continuo y problemas logísticos para cubrir las necesidades de la población. Por otro lado, los virus influenza pueden generar nuevas virus mediante la adquisición de genes de otras especies principalmente de virus aviáres y porcinos cuando hay co-infecciones con virus humanos, resultando una progenie viral mucho más virulenta para el ser humano, fenómeno que genera la mayoría de los brotes pandémicos que ocurren de manera cíclica cada 20 o 30 años. Este cambio antigénico total se conoce como “antigenic shift” y las vacunas que anualmente se producen no son capaces de proteger contra el surgimiento de estas nuevas cepas ^[7, 16, 17].

Por tal motivo, en los últimos años se ha propuesto la generación de vacunas universales que reconozcan epítopes conservados tanto en virus estacionales como pandémicos. Para esto, es necesario determinar qué antígenos del virus están altamente conservados en los distintos serotipos y determinar si estos son blancos de células T o B ^[2, 5, 6, 8, 9, 10].

1.1-virus influenza

1.1.1.- Estructura

El virus influenza es un virus envuelto por una capa lipídica que adquiere de la célula infectada. El genoma está constituido por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa y codifica para al menos 11 proteínas ^[22]. Los segmentos 1, 2 y 3 codifican para el complejo proteico trimerico de polimerasa viral, que son las proteínas PB2, PB1 y PA, respectivamente; el segmento 5 codifica para la nucleoproteína (NP) el cual se une a lo largo del segmento de ARN evitando la formación de estructuras secundarias; este complejo se une a cada uno de los 8 segmentos del genoma del virus; en conjunto, estas proteínas PB1, PB2 y PA forman el complejo de RNA polimerasa dependiente de RNA y se ubican el extremo 3'-5' teniendo como función realizar la transcripción y replicación del genoma. El virión está constituido por 8 proteínas estructurales y tiene un diámetro de 80 a 120 nm. En la superficie se proyectan a manera de espículas las glicoproteínas Hemaglutinina (HA) de la cual se conocen 18 variantes y Neuraminidasa (NA) con 11 variantes ^[16,17], las cuales son los principales blancos de anticuerpos neutralizantes ^[2]. La HA se encuentra codificada por el segmento 4 y forma homotrimeros en la superficie viral; los monómeros se generan a partir de un precursor llamado HA0, el cual posterior a su glicosilación es cortado en dos polipéptidos: HA1 y HA2. La región HA1 forma la parte globular de la espícula es aquí donde se encuentra el sitio de reconocimiento del ácido siálico, indispensable para la entrada del virus a la célula, y la mayoría de los anticuerpos neutralizantes mapean en esta región; sin embargo, son predominantemente homotípicos ^[5]. La NA es un tetrámero codificado por el segmento 6 y con actividad sialidasa y que actúa recortando los extremos del ácido siálico de las glicoproteínas receptoras, lo cual favorece la liberación de nuevas partículas virales ^[16,17]. Esta proteína ha sido poco evaluada en modelos vacúnales, sin embargo, en algunos modelos se ha encontrado que la respuesta de anticuerpos anti-NA tienen poca capacidad neutralizante heterosubtípica, por lo cual no ha sido considerada en el desarrollo de vacunas universales.

El segmento 7 codifica para dos proteínas en dos marcos de lectura diferente, la proteína de matriz M1 que le da estructura a la cápside viral y que se encuentra por debajo de la membrana englobando al genoma viral, y la proteína de matriz M2, que es la tercera proteína de membrana presente en el virión. Esta proteína forma homotetrámeros y

funciona como una bomba de protones que es esencial en la eficiente liberación del genoma viral en la célula infectada [10, 16,17]. La respuesta humoral contra esta proteína genera anticuerpos capaces de disminuir la carga viral y proteger ante una dosis letal en ratones inmunizados con esta proteína recombinante [6, 8, 9,10]. Normalmente, existen muy pocas moléculas de M2, entre 14 y 68 asociadas a la membrana del virión figura 1 [22], sin embargo, se encuentran en mayor cantidad en la membrana de las células infectadas, por lo cual los anticuerpos antivirales dirigidos contra esta proteína actúan predominantemente sobre la célula infectada [22]. Es de resaltar que el dominio extracelular de 23 aa (M2e) está altamente conservado en todos los subtipos del grupo A, lo cual la convierte en un atractivo blanco en el diseño de una vacuna universal [12,22].

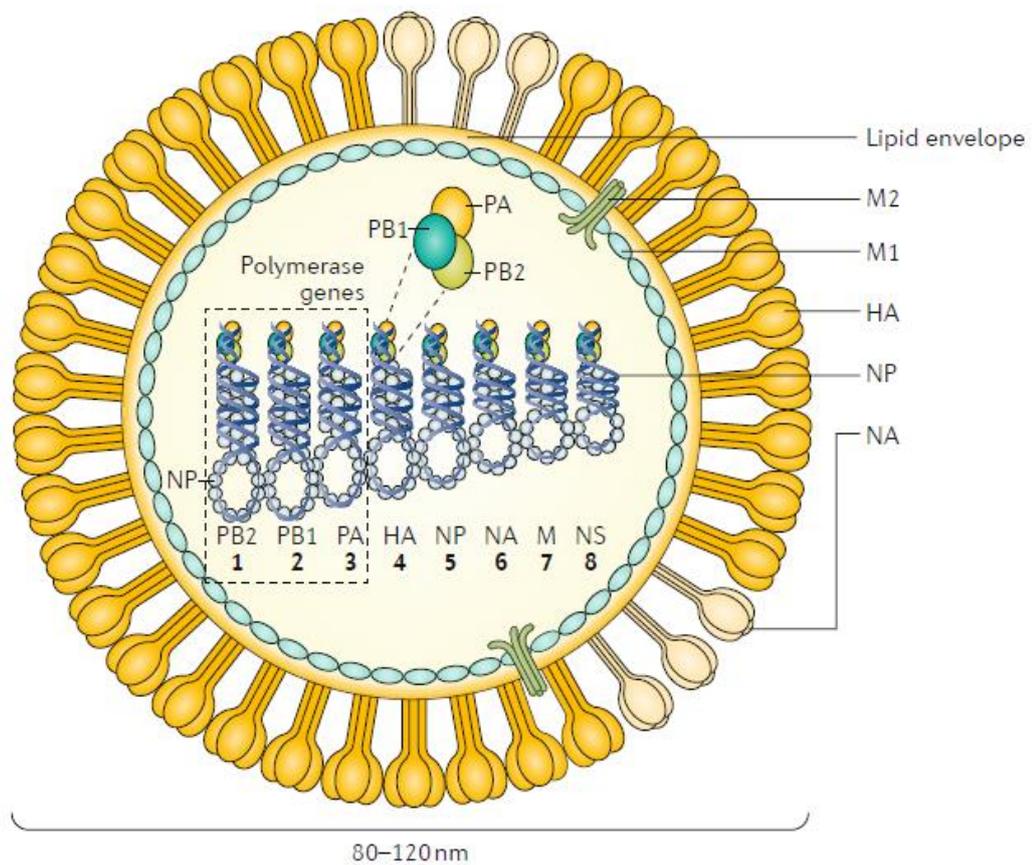


Figura 1. Virus influenza. Esquema representativo de una particular viral del virus influenza A o B, en la cual se muestran las diferentes proteínas estructurales y no estructurales; así como la distribución en el virus. (Tomado de Florian Krammer, et al., 2018).

1.1.2- Ciclo de replicación.

El virus Influenza tiene la capacidad de infectar no solo a humanos; posee un amplio rango de organismos hospederos entre los que destacan cerdos, aves de corral, aves acuáticas y migratorias, así como otros organismos como son caballos y otros mamíferos; dependiendo del tipo de organismo hospedero, la vía de transmisión puede ser vía aérea o digestiva; lo cual determina que ciertas cepas virales tengan afinidad por células epiteliales del tracto digestivo o respiratorio, esto es determinante ya que en el primer paso del ciclo de infección del virus, una vez haya ingresado al tracto respiratorio o digestivo del huésped; se realizara la interacción entre la proteína HA y el ácido siálico en la membrana de la célula huésped [14, 15, 25]. El ácido siálico es un monosacárido ácido comúnmente encontrado como un glicoconjugado en la superficie de la célula, y frecuentemente se encuentra unido a galactosa. El carbono 2 del ácido siálico puede unirse al carbono 3 o al carbono 6 de la galactosa, formando enlaces alfa 2-3 o alfa 2-6. Los virus influenza que infectan aves tienen preferencia por los enlaces alfa 2-3, ya que en las células del epitelio intestinal se encuentran estos receptores [15, 16]. Por otro lado, los virus que infectan humanos reconocen preferencialmente ácido siálico en configuración alfa 2-6, las cuales se encuentran en células del tracto respiratorio superior [16, 17, 25]. El siguiente paso es la internalización del virus a la célula huésped, por medio de un tipo de endocitosis dependiente o independiente de moléculas de clatrina, una vez que la vesícula se ha formado, con el virus en su interior; esta comienza a acidificarse, en el endosoma temprano existe un pH de 6.0 a 6.5 y una alta concentración de Na⁺ pero baja concentración de K⁺, esto activa la proteína M2 la cual funciona como canal iónico selectivo de protones, esta bomba realiza una salida de K⁺ y un influjo de protones del núcleo del virus; a causa de esto el núcleo del virus comienza a acidificarse comenzando una desestabilización en las interacciones de las proteínas M1-vRNP, M1-M1 o M1-envuelta viral; las cuales provén estabilidad estructural al virus [16, 17, 18, 25].

Conforme transcurre el endosoma temprano a tardío, las condiciones cambian, el pH se acidifica entre 6.0 a 5.4 y las concentraciones de K⁺ son altas, mientras que la de Na⁺ disminuye. En este estado, el bajo pH y las altas concentraciones de K⁺ actúan iniciando el siguiente paso, que es la disociación de M1 de la envuelta viral y la liberación de vRNP. En este paso la proteína HA sufre un cambio conformacional exponiendo un péptido de fusión causando la unión de la membrana endosomal con la membrana viral; causando así la liberación del material genético viral en el citosol de la célula huésped, para ser

dirigido al interior del núcleo de la célula huésped, donde la transcripción y replicación toma lugar. [14, 15, 18]

Una vez que las proteínas se han sintetizado y localizado en la membrana celular, el genoma ya replicado, se ensambla con el complejo vRNP y es dirigido hacia la membrana celular donde se ensambla la partícula viral; una vez completado el nuevo virión, es liberado de la membrana celular por medio de la acción de la NA, permitiendo así que este virus pueda infectar otras células o transmitirse a otros organismos [16, 17, 25].

1.1.3.- Epidemiología del virus influenza

Las principales enfermedades respiratorias en la población humana son causadas por el virus influenza tipo A y B, aunque toda la población es susceptible de infección, los casos más severos afectan principalmente grupos vulnerables como son niños y adultos mayores. Las cepas que actualmente circulan en humanos son Influenza A H1N1 y H3N2, las cuales se consideran cepas estacionales [25, 27, 28] y de las cuales se generan cambios puntuales en su estructura, debido al cambio de aminoácidos adyacentes al sitio activo, generalmente en la región globular de la HA (*drift* antigénico) [14, 15, 16]; por otra parte la introducción de cepas virales de diferentes hospederos como son aves o cerdos, han generado brotes pandémicos, a causa de un evento denominado *shift* antigénico (**Figura 2**), esto representa un cambio drástico en la antigenicidad de la HA, en el virus de influenza A circulante; la HA y en algunos casos la NA de los virus pandémicos son derivados de otras cepas virales que infectan diversos animales; usualmente durante los brotes pandémicos, los virus estacionales circulantes son desplazados por el nuevo virus emergente y aunque se han detectado infecciones zoonóticas en humanos por virus de influenza como el aviar H5N1, aviar H7N9 y cerdo H3N2 en regiones geográficas donde estos virus prevalecen, estos no parecen ser transmitidos humano a humano, por lo que se sugiere que se necesitan fuertes adaptaciones de los mecanismos de infección que permitan a estos virus infectar y transmitirse de humano a humano [14, 15, 16, 17, 25, 27, 28].

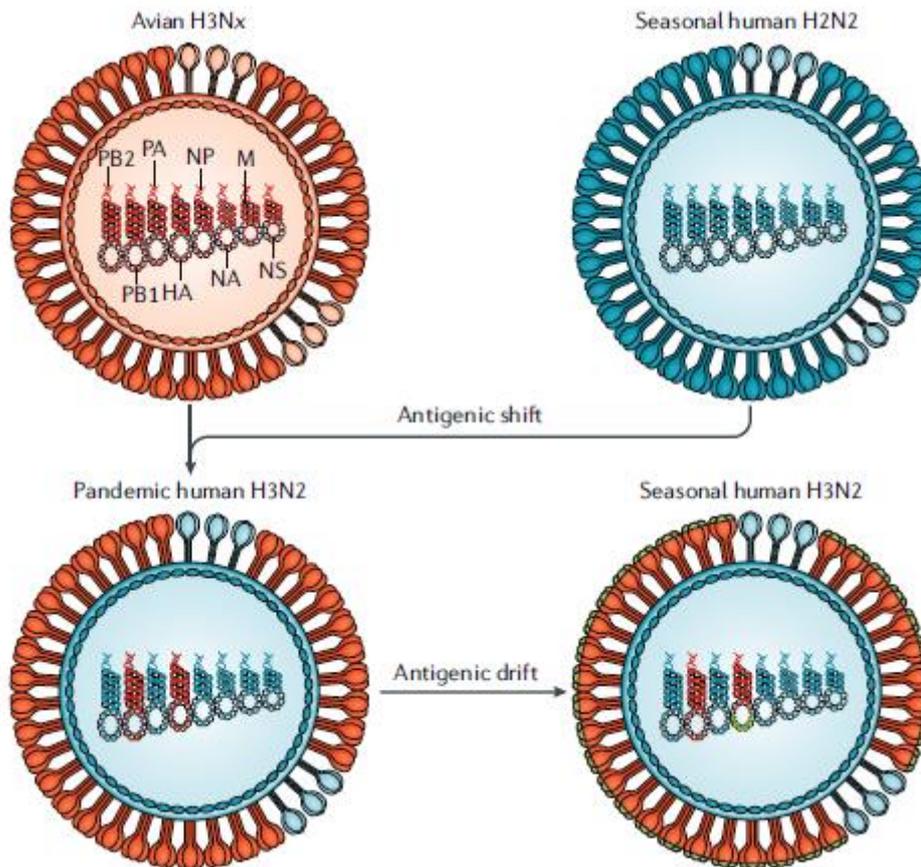


Figura 2. Shift y Drift antigénico. En la parte superior del diagrama se muestra como dos cepas que infectan diferentes hospederos, aviar y humano; por medio de un evento de recombinación de los diferentes segmentos del genoma viral, se produce un nuevo virus pandémico que contiene características de las dos cepas anteriores (*Shift* antigénico), conforme este virus se replica, va sufriendo mutaciones lo que provoca un cambio en algunos de los aminoácidos de la estructura proteica, principalmente Hemaglutinina (*Drift* antigénico) de esta forma se convierten en cepas estacionales que circulan en la población. (Tomado de Florian Krammer, et al. 2018)

1.2.-Respuesta inmune

La función del sistema inmune es proteger al organismo frente a sustancias extrañas, externas o propias, en las que se incluyen micro organismos y macromoléculas como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. La manera en como este sistema reacciona a tales eventos, se denomina respuesta inmunitaria, la cual se desencadena conforme a la sustancia que se presente. En los animales vertebrados la respuesta inmune frente a microorganismos se divide en dos respuestas, siendo las reacciones tempranas de la respuesta inmune innata, y posteriormente la reacción tardía de la respuesta inmune adaptativa.

1.2.1.- Respuesta inmune innata

Se refiere a los mecanismos bioquímicos y celulares presentes en los organismos de manera constante, esta representa la primera defensa del individuo frente a microorganismos, pero no a otro tipo de sustancias no infecciosas. Está conformada por barreras físicas y químicas como son los epitelios; también se conforma por células especializadas, los leucocitos (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, y además de células citolíticas naturales). También se encuentran presentes proteínas efectoras: complemento, colectinas, pentraxinas, y otras proteínas como las citocinas (TNF, IL- 1, IL-12, INF, entre otras). De esta manera, la respuesta innata existe incluso antes del contacto con el patógeno ^[31].

Uno de los principales mecanismos por los que se regula la respuesta innata, es por medio de la detección de moléculas particulares de micro organismos como son lipopolisacáridos bacterianos, peptidoglicanos, ácidos nucleicos bacterianos o virales, ácido lipoteicoico, entre otros; a estos se denominan Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP's). Así como los Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMP's), los cuales son moléculas endógenas derivadas de daño en tejido celular; estos patrones son reconocidos por Receptores de Patrones de Reconocimiento (PRR's). Estos receptores se encuentran en las células de la respuesta innata, tanto en la membrana celular como en el interior de la célula en citoplasma o endosoma ^[30, 31]. Los PRR's se dividen en 4 familias de receptores:

Los receptores de dominio de oligomerización de nucleótidos, tipo NOD (NLR) se encuentran en el interior de las células de la respuesta innata y en los epitelios, estos receptores tienen como función identificar PAMP's que se hayan internalizado en la célula (p.ej. virus), así como también la identificación de DAMP's asociados con el estrés celular ^[29].

Los Receptores tipo RIG (LRR's), incluyen el receptor del Gen Inducible por Ácido retinoico, tipo (RIG-1), y el gen 5 de diferenciación asociado a melanoma (MDA-5); tienen como función identificar la infección viral en células, por medio de la detección de RNA viral de doble cadena; el cual es reconocido por un dominio de helicasa en su extremo carboxil-terminal estos receptores inducen la síntesis de INF I y III, así como citocinas pro-inflamatorias; induciendo la activación de proteínas mitocondriales antivirales como moléculas adaptadoras (MAV's) ^[32, 33].

Los receptores tipo Toll (TLR's) son glicoproteínas transmembranales tipo 1, por lo que tienen un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citosólico. El

dominio extracelular tiene como función el reconocimiento de su ligando, reconociendo así a los PAMP's, para posteriormente iniciar una vía de señalización, por medio del dominio intracelular que induce el reclutamiento de diversos factores de transcripción y que al translocarse al núcleo inician la activación y regulación de promotores de genes codificantes de interferones y citocinas [30, 31].

Receptores de Lectina C (CLR's), reconocen hidratos de carbono como la manosa, fucosa o sacarosa, las cuales forman parte de las glucoproteínas o glucolípidos presentes en la pared celular de diferentes microorganismos; pero no están presentes en las células del huésped. Estos receptores tienen como función endocitar aquellos microorganismos que fueron reconocidos por el receptor, para posteriormente en el caso de las CPA's poder procesar, degradar y realizar la presentación antigénica. Dentro de estos CLR's se encuentran Langerina (CD207), DC-SIGN (CD209), BCDA-2, y DEC-205 (CD205) entre otros [32, 33].

1.2.3.- Respuesta inmune adaptativa.

La respuesta inmune adaptativa se divide en inmunidad celular e inmunidad humoral; está mediada por diferentes compuestos del sistema inmunitario teniendo como función la eliminación de microorganismos ya sean intracelulares o extracelulares. Las características principales de esta respuesta es la gran especificidad para discernir entre diferencias muy simples de los diferentes antígenos; la gran variabilidad para poder reconocer una cantidad sumamente amplia de diferentes antígenos; así como la generación de una memoria inmunológica de largo plazo frente a estos antígenos con los que se tuvo contacto.

La respuesta humoral, esta mediada por linfocitos B los cuales producen anticuerpos; estos tienen como función reconocer antígenos microbianos específicos, neutralizando su capacidad infecciosa por medio de la activación de diferentes mecanismos efectoros. La respuesta humoral es el principal mecanismo de defensa en la eliminación de microorganismos extracelulares. Por otra parte, la respuesta celular, esta mediada por dos grandes poblaciones de linfocitos T: los linfocitos T cooperadores (Th) cuya función principal es la síntesis de citocinas reguladoras de la respuesta inmune. Por otra parte los linfocitos T citotóxicos (Tc); se encargan de la eliminación de células infectadas por patógenos intracelulares por medio de citotoxicidad celular o por citocinas pro inflamatorias [26].

1.2.4.-Linfocitos B

Son las células que al diferenciarse pueden responder a diferentes funciones como es la presentación de antígenos, la inmunoregulación por medio de secreción de citocinas, así como una co-estimulación con linfocitos T. sin embargo la función principal de estas células es la generación de anticuerpos. Para lograrlo, se requiere de la activación de la célula B en células plasmáticas productoras de anticuerpos; para esto los receptores localizados en la membrana celular del linfocito B (BCR) reconocen el antígeno y desencadenan una vía de señalización que culmina con la diferenciación de la célula B, habilitando a la célula para la producción primaria de anticuerpos ^[34].

Los anticuerpos pueden tener diferentes mecanismos efectores; la eliminación del antígeno, o impedir la infección del microorganismo bloqueando los receptores utilizados para la internalización a la célula; o uniéndose directamente al antígeno y neutralizándolo por medio de dos mecanismos diferentes: cuando el microorganismo está recubierto por los anticuerpos, los receptores de las células fagocíticas reconocen la región FC del anticuerpo y de esta manera fagocitan al antígeno; la segunda manera es cuando alternativamente el sistema del complemento se activa y se une al patógeno para su fagocitosis o la lisis del microorganismo por medio de la generación de poros en su membrana ^[26, 34].

1.2.5.- Linfocitos T

Las células T, proceden de células pluripotenciales localizadas en la médula ósea; posteriormente migran al timo para alcanzar la madurez y diferenciarse; posteriormente ingresan al torrente sanguíneo y al sistema linfático alojándose en órganos linfáticos periféricos, hasta ser activados por el antígeno el cual está acoplado a moléculas del MHC; para esto, se inicia el reconocimiento por medio del Receptor de Célula T (TCR), el cual es un complejo proteico formado por un heterodímero a su vez compuesto por una cadena α y una β , producidas por el reordenamiento de genes somáticos constantes, variables, y cadenas constantes CD3 y ζ asociadas; las cuales se encargan de la transducción de señales ^[35]. El TCR de las células Th reconocen como ligandos péptidos microbianos de 14-25 aminoácidos asociados a moléculas de MHC clase II, en este caso el CD4 de la célula funciona como molécula co-receptora durante el reconocimiento. Por otra parte, la respuesta de células Tc, es por medio del reconocimiento de péptidos de 8 a 10 aminoácidos, provenientes de proteínas exógenas presentes en el citosol de la célula

huésped; acoplados a moléculas del MHC clase I, la molécula que participa como co-receptora del reconocimiento es el CD8 [35, 36].

1.2.6.- Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) son un linaje que aunque forma parte de la respuesta inmune innata, tiene como función fagocitar los microorganismos, procesar y presentar el antígeno a las células de la respuesta adaptativa, formando así un enlace entre ambas respuestas; por tanto las CD son consideradas células presentadoras de antígeno. Una de las características de estas CD es la expresión constitutiva de moléculas de MHC y de la integrina CD11c en la membrana celular; así como su capacidad para poder migrar hacia diferentes órganos linfoides y activar a los linfocitos T [37, 38].

La maduración de las CD comienza con el reconocimiento del antígeno por medio de los PRR's (TLR's, CLR, NLR's y RIG) integrados en la membrana de las CD, los cuales reconocen los DAMP's o PAMP's producidos durante el daño al tejido o durante la infección; este reconocimiento produce la activación de CD's en CPA's las cuales migran hacia los ganglios linfáticos donde al estar en contacto con las células T, inician una cascada de señalización, que dependiendo del antígeno, culminara en la síntesis de distintas citocinas, quimiocinas, expresión de receptores de quimiocinas, así como diferentes moléculas co-estimuladoras; todo esto en conjunto, determinara el sub tipo de célula T que se genere [30, 31, 37].

1.3.- Procesamiento y presentación de antígeno a células T

Para que las células T puedan reconocer los diferentes antígenos, es necesaria la participación de un sistema que les presente estos epítopos. Las células nucleadas procesan péptidos provenientes de proteínas exógenas, citosólicas como antígenos virales o tumorales; estos péptidos son acoplados a moléculas del MHC clase I y expuestos en el exterior de la membrana, de esta manera cuando la célula es infectada (vía endógena) o sufre daño; la célula es reconocida por los linfocitos Tc (CD8⁺). Por otra parte las células que expresan moléculas de MHC clase II, son aquellas conocidas como células profesionales presentadoras de antígenos (CPA's), dentro de las que se encuentran los macrófagos, linfocitos B, y CD (consideradas las más eficientes para activar linfocitos T vírgenes) [32, 35, 36, 37]. Las cuales después de internalizar el microorganismo (vía exógena) y degradarlo proteolíticamente, la célula expone en la superficie estos péptidos acoplados a moléculas de MHC clase II siendo reconocidos únicamente por linfocitos Th [36].

De manera general, el procesamiento de antígenos, se basa en la degradación de proteínas nativas en péptidos y su asociación a moléculas de MHC. La vía del MHC clase I, está asociada a la síntesis de proteínas pertenecientes al microorganismo en el interior de una célula infectada (antígenos citosólicos), las cuales son degradadas por vía del proteasoma, generando péptidos de 8 a 10 aminoácidos, los cuales son dirigidos al retículo endoplasmático por el Transportador Asociado con Procesamiento (TAP) antigénico, el cual tiene afinidad por péptidos con aminoácidos hidrófobos o ácidos en el extremo carboxilo. Estos péptidos se asocian, por medio de chaperonas, en el retículo endoplasmático con la cadena α polimórfica del MHC I, cuya estructura forma una hendidura donde se asocia el péptido ^[38].

La vía del MHC clase II comienza por la internalización del microorganismo por parte de las CPA's, vía endocítica, las cuales causan la degradación proteolítica a nivel endosoma, para posteriormente, en un compartimento vesicular especializado; asociar los péptidos resultantes de 13 a 25 aminoácidos, con las cadenas α y β polimorfas del MHC II, las cuales fueron sintetizadas en el retículo endoplasmático ^[40]. Estas cadenas se unen a la cadena invariante (Ii) la cual interactúa con la hendidura de las cadenas polimorfas por medio del péptido de cadena invariante relacionado a clase II (CLIP), evitando la unión de péptidos endógenos y dirigiendo las moléculas de MHC a compartimentos intracelulares (MIIC) de la red del tras Golgi; donde se realiza el intercambio del CLIP por acción competitiva de la molécula HLA-DM que es altamente afín a CLIP; liberando así la hendidura para la unión con el péptido procesado, culminando en la transportación a la membrana plasmática ^[40].

1.4.-Respuesta inmune contra influenza

La respuesta inmune innata, que consta de barreras físicas, producción de moco, etc. forma la primer barrera contra los agentes agresores del medio ambiente, incluyendo los patógenos, como el virus influenza. Las células que participan en la respuesta inmune innata, son principalmente macrófagos y células dendríticas que poseen mecanismos de reconocimiento, como lo son los TLR's que permiten discernir entre lo patógeno de lo inocuo ^[31], y mediante la presentación de antígeno generar o no una respuesta inmune mucho más compleja y específica como lo es la respuesta inmune adaptativa. Por otra parte, el virus influenza, en primer lugar necesita burlar la respuesta inmune innata, para

poder replicarse y propagarse en las células hospederas, para esto ha desarrollado estrategias para que una vez, que ha infectado a la célula, el virus inhiba las cascadas de señalización celular que le permiten a la célula detectar y responder a la infección intracelular [16, 17, 25]. Para ello, el virus influenza utiliza varias proteínas que están destinadas a esta función, tal es el caso de la proteína NS1, la cual impide la activación de sensores celulares de RNA's virales, como son la proteína del gen 1 inducible por ácido retinoico (RIG-1) [41] la cual reconoce estructuras de RNA de doble cadena [31], interrumpiendo así, la cascada de señalización que conduce a la inducción de interferón. También a genes antivirales inducidos por interferón como el PKR el cual realiza funciones pro apoptóticas, además de prevenir la síntesis de proteínas virales. Por otra parte, NS1 puede prevenir la síntesis de RNAm celular, así como también bloquear los eventos de señalización de interferón mediados por la vía de señalización JAK-STAT [41]. Además de NS1, existen otras proteínas que cumplen funciones similares en la evasión de la respuesta celular, tal es el caso de PB1-F2 y PB2 que suprime la activación de la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) la cual es una molécula adaptadora que se encuentra río abajo de RIG-1 y que es necesaria para la inducción de interferón. Por otra parte, la proteína PA-X (resultante de un cambio en el marco de lectura del RNAm de la PA) tiene la función de suprimir la expresión de genes hospederos, por medio de su actividad endonucleasa de RNA [25, 41].

En la respuesta inmune adaptativa participan las células T y las células B. Por su parte, la respuesta dependiente de linfocitos T, se ha visto que en la infección por virus influenza, los linfocitos Th son requeridos para el cambio en la clase de anticuerpos así como para la óptima respuesta de memoria en linfocitos Tc. Las células Tc son requeridos para una eficiente limpieza o erradicación del virus de influenza [42, 43].

En una infección natural por virus influenza, las células infectadas exponen péptidos de 8 a 12 aminoácidos acoplados a moléculas del MHC de clase I conformando así el complejo antigénico, "epítipo" que es reconocido por el TCR de los linfocitos T, estos péptidos derivan del procesamiento de proteínas inmunodominantes como son la HA; además de otras proteínas como la núcleo proteína NP, proteína de matriz M1, y la polimerasa viral [15, 16, 25].

Por otra parte, la respuesta de células B es de suma importancia en la protección durante la infección por virus influenza, así como en la inmunidad por vacunación.

Los anticuerpos producidos por los linfocitos B contribuyen a la protección contra una infección del virus, como se muestra en experimentos en los que el suero de hurones vacunados, protegen a hurones *Naive* de la infección del virus influenza post reto^[44].

De manera general, la respuesta de linfocitos B está dirigida hacia las proteínas más inmunodominantes, las cuales están representadas por el dominio globular de la HA, así como a la Neuroaminidasa; y en menor medida a otras proteínas virales como la NP y la proteína de Matriz M^[15, 16, 21]. Los anticuerpos que son dirigidos al dominio globular de la HA tienen función neutralizante por medio del bloqueo de la unión del receptor^[21]. Sin embargo el dominio globular de la HA presenta una alta tasa de cambio, debido al *Drift* antigénico, lo cual le permite tener una amplia plasticidad para que el virus pueda burlar esta respuesta^[15].

Para una protección óptima contra el virus influenza, se requiere de anticuerpos producidos por linfocitos B, así como de la producción de citocinas y de citotoxicidad celular mediada por células T. Las células Th específicas contra el dominio externo de M2 (aa 1-24; M2e) de influenza, han mostrado estar asociadas en la protección *in vivo*^[9, 10, 11, 13, 19, 20].

1.5.- Vacunas contra influenza

Actualmente, se encuentran aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*, USA) tres tipos de vacunas para prevenir la infección por influenza en humanos: las que utilizan virus inactivados disgregados, administrados vía intramuscular; las que utilizan virus atenuados, administradas vía nasal en forma de aerosol, y las vacunas con proteínas recombinantes. Las vacunas con virus inactivados disgregados normalmente son trivalentes y contienen una cepa viral de influenza A H1N1, una cepa H3N2 y un virus influenza del grupo B^[1]. Existen también otras vacunas llamadas cuadrivalentes que contienen otra cepa del grupo B adicional a las anteriores. Estos virus son crecidos en huevos de gallina embrionados por lo que no pueden ser administradas a personas alérgicas a proteínas como la ovoalbúmina.

Dentro de estas formulaciones, existe una disolución mediante el uso de detergentes de la envoltura lipídica liberando a la HA. Estas formulaciones producen sub-viriones de las

partículas virales lo que aumenta su inmunogenicidad y han sido utilizadas desde los años setenta ^[21]; sin embargo, estas vacunas son reformuladas anualmente según las cepas circulantes en cada región; estrategia que resulta ser insuficiente para proteger ante la aparición de virus emergentes, los cuales no fueron aislados durante la formulación.

Otra plataforma de desarrollo de vacunas utiliza virus atenuados, administrados vía intra nasal. Estos virus han sido adaptados para crecer eficientemente en huevos embrionados a 25 °C, por lo que su replicación se ve restringida a 37 °C, temperatura corporal humana. Este tipo de vacunas ha sido relativamente exitosa en niños comparada con las vacunas de virus inactivados, sin embargo, es menos efectiva en adultos, por lo que su uso no está recomendado en esta población ^[1, 21].

Existe una vacuna recién aprobada, Flublok, que es la primera vacuna recombinante que consiste en la producción de las HA de cuatro diferentes cepas. Estas HA son producidas en células de insecto en cultivo usando el sistema de expresión de proteínas recombinantes por medio de baculovirus, siendo hasta la fecha una de las vacunas más seguras por no tener virus atenuados generados en huevo, lo que disminuye el riesgo de reacciones adversas en personas alérgicas. Sin embargo, el mecanismo de protección de esta vacuna es similar al de virus inactivados ^[45].

Las vacunas tradicionales anteriormente descritas tanto inactivadas como atenuadas, son poco eficientes, esto podría deberse a que las cepas utilizadas se crecen en huevos embrionados para su posterior purificación; sin embargo, algunas de las cepas al adaptarse a crecer en huevo generan mutaciones lo que probablemente cambie la estructura de la HA, lo que conlleva a una pérdida en el reconocimiento de la cepa infectante por parte del sistema inmune. Por otro lado, la producción en los huevos limita su aplicación a personas alérgicas a la ovoalbúmina, lo que ha provocado el surgimiento de nuevas estrategias de generación de vacunas creciendo las cepas en cultivo celular ^[19, 20, 21, 45].

Si bien, la proteína HA es la más inmunodominante en las personas inmunizadas con estas vacunas, es la proteína más cambiante entre las cepas de un año a otro, esto debido al shift antigénico, por lo que la reformulación y la aplicación de las vacunas tiene que realizarse anualmente, ya que el gen de la HA de una cepa circulante del año en curso puede mutar y ya no ser reconocida por los anticuerpos producidos en los individuos previamente vacunados ^[27, 28]. Por esta razón, la producción y aplicación de las vacunas que actualmente se encuentran disponibles, se vuelve poco eficiente para proteger a los grupos

vulnerables de la población. Por lo anterior, surge la necesidad de generar vacunas universales, utilizando otras plataformas como lo es el direccionamiento de antígenos [24] utilizando otras proteínas o péptidos menos inmunodominantes que la HA pero más conservados en diferentes cepas virales, generando así, una vacuna que sea capaz de proteger durante más tiempo contra diferentes cepas y a un menor costo.

1.6.- Direccionamiento de Antígenos a Células Dendríticas

Recientemente, se ha propuesto al direccionamiento de antígenos a las células dendríticas (CD) como una estrategia de inmunización, capaz de optimizar y mejorar la respuesta hacia los antígenos, ya que las CD son las responsables de captar, procesar y presentar los antígenos a las células del sistema inmune adquirido, células Th y Tc; iniciando así la respuesta antígeno-específica [14].

En general, las CD pueden captar antígeno mediante procesos no específicos como la micro o la macropinocitosis, o utilizando mecanismos más específicos como la endocitosis mediada por receptor [3,19,31,37]. Esta característica puede ser aprovechada para el diseño de respuestas inmunes más eficientes, utilizando ligandos, anticuerpos monoclonales o fragmentos procedentes de anticuerpos específicos de receptores expresados en la superficie de las CD, fusionados o entrecruzados al antígeno de interés. En el ratón se ha estudiado el potencial de diferentes receptores de las CD, los monocitos y los macrófagos como blancos para el direccionamiento de antígeno, como son: moléculas de adhesión [4], moléculas co-estimuladoras [11,13,15], receptores tipo *Toll*, lectinas tipo C [29,30], o receptores Fc [2], entre otros.

Las lectinas tipo C han resultado ser excelentes candidatos a fin de promover respuestas inmunes contra los antígenos. En el caso de la molécula DEC-205, es una lectina de tipo C que se expresa en la membrana de las CD inmaduras tanto en ratón como en humanos, funcionando como un receptor endocítico.

El uso de un anticuerpo monoclonal contra DEC-205, funciona como ligando provocando la internalización del antígeno asociado al anticuerpo. Bonifaz et al., 2004; utilizando un anticuerpo monoclonal anti-DEC-205 fusionado a la ovalbúmina, consiguieron mejorar la respuesta celular, necesitando hasta 1000 veces menos cantidad del Ag para obtener los mismos niveles de linfoproliferación [23]. En este mismo trabajo, se consiguió reducir

el crecimiento de tumores que expresaban la ovalbúmina y proteger frente a la infección por un virus *vaccinia* recombinante que expresaba esta misma proteína ^[23]. Asimismo, Do, Y. et al, en 2008, en un modelo de infección pulmonar con *Yerssinia pestusis*, inocularon un antígeno de esta bacteria fusionado a DEC-205 vía subcutánea (s.c.) en combinación con Poli I:C como adyuvante ^[24]. Bajo este esquema de inmunización, se obtuvieron 10 veces más anticuerpos en los lavados bronquiales que cuando se inoculó el mismo antígeno más el adyuvante, pero de manera soluble. Aunado a lo anterior, hubo una potenciación en la respuesta de células T CD4 y en la producción de citocinas. Recientemente, en nuestro laboratorio, Badillo, et al., 2015; demostraron que ratones inoculados s.c. con anti-DEC-205 entrecruzado bioquímicamente con VP6 de rotavirus en presencia de Poli I:C como adyuvante tuvieron hasta un 40 % de protección contra la infección por rotavirus a nivel intestinal, en comparación con dos veces más VP6 soluble que no indujo protección alguna ^[46].

Por lo anterior, existen suficientes evidencias de que la estrategia de direccionar antígenos a las CDs por medio de anticuerpos dirigidos al receptor DEC-205; entrecruzados con los antígenos promueve una respuesta inmune adaptativa protectora contra patógenos que infectan tanto a nivel sistémico como a nivel de mucosas, por esta razón, el direccionamiento de antígenos del virus influenza a las CD mediante el anticuerpo monoclonal anti-DEC205, resulta ser un excelente candidato como vacuna para generar una respuesta protectora heterosuptípica a nivel mucosa respiratoria.

II.- ANTECEDENTES

El direccionamiento de antígenos es una estrategia que ha resultado ser exitosa en modelos murinos ^[23, 24], en donde una vía parenteral genera respuesta a nivel de mucosa intestinal (Badillo, et al., 2015). Este proceso involucra a las CD, células presentadoras de antígeno que son el enlace con las células de la respuesta inmune adaptativa, iniciando y dirigiendo la respuesta hacia los antígenos captados. Gracias al desarrollo de anticuerpos monoclonales contra los receptores endocíticos de estas células es posible dirigir antígenos para que sean captados, procesados y presentados a las células T ^[23, 24]. Como es el caso del anticuerpo monoclonal anti-DEC205, el cual mediante métodos bioquímicos o moleculares es posible acoplar a un antígeno el cual será acarreado junto con el anticuerpo y entregado a la CD. Esta estrategia permite la mayor captación del antígeno, optimizando la cantidad y el tiempo que requiere un antígeno soluble en llegar a la CD ^[23].

Como se mencionó anteriormente, la proteína M2 (constituida por 97 aa) presente en la membrana del virión está altamente conservada en las diferentes cepas de virus influenza, en particular existe una secuencia perteneciente al dominio extracelular (aa 1-24; M2e), la cual tiene un porcentaje de identidad del 99% entre todas las cepas del virus tipo A ^[12,22]. Se ha encontrado que en una infección natural los niveles de anticuerpos contra esta secuencia son marginales y parecen no contribuir de manera importante a la protección contra una reinfección ^[16,19], sin embargo, varios estudios han demostrado que en ratones vacunados con M2 o con el dominio extracelular M2e se pueden inducir anticuerpos protectores heterosubtípicos contra la infección por el virus influenza ^[47]. Resultados de un estudio realizado por Padilla, et al (2018) (en este Laboratorio); mostraron que ratones vacunados con un anticuerpo α -DEC-205 entrecruzado bioquímicamente con un péptido sintético representando a la secuencia de M2e Presentaron altos niveles de anticuerpos séricos, comparado con los grupos controles. Interesantemente, aunque hubo protección contra la mortalidad, no hubo ningún efecto sobre la morbilidad (baja en peso corporal). Esta inmunización protegió de manera heterosubtípica hasta un 76% contra una dosis letal del virus influenza, lo cual es superior al 20% inducido por la inmunización con el anticuerpo control: isotipo:M2e. Sin embargo, los anticuerpos producidos por el direccionamiento a DEC-205 no fueron neutralizantes ^[48].

Por otra parte estos resultados obtenidos por el direccionamiento de M2e a células dendríticas, sustentan la estrategia de que al dirigir epítomos altamente conservados del virus influenza, se induce una protección heterosubtípica en el organismo frente a la infección de diferentes cepas virales de influenza ^[47].

Actualmente, la mayoría de las vacunas contra influenza están basadas en la generación de anticuerpos neutralizantes, sin embargo, la inmunidad conferida por M2 está dada por mecanismos inmunes no neutralizantes. Se ha encontrado que los anticuerpos anti-M2 no neutralizan la infectividad de los viriones probablemente por una interferencia estérica por parte de HA y NA, así como por el bajo número de esta proteína en los viriones. Por otro lado, ensayos realizados por Bakkouri y col., demostraron que los anticuerpos anti-M2 eliminan a las células infectadas por mecanismos de citotoxicidad celular dependientes de receptores Fc en macrófagos y células NK ^[2].

III.- JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el abordaje de nuevas estrategias vacúnales enfocadas a la generación de respuestas protectoras heterosubtípicas contra el virus de influenza, se encuentran encaminadas a la generación de una vacuna universal. A pesar de contar con vacunas disponibles contra esta infección, éstas han resultado poco eficientes, ya que inducen una baja protección heterosubtípica y por tanto no resuelven la incidencia en la morbilidad y la mortalidad causada por esta infección.

Entre las proteínas virales más conservadas y que son capaces de inducir una respuesta inmune de anticuerpos heterosubtípicos protectores, está la proteína M2 y en específico la secuencia correspondiente al dominio M2_e. De esta manera, M2_e es un antígeno viral candidato para la implementación de vacunas heterosubtípicas de nueva generación contra influenza. En este proyecto se propone una nueva estrategia de inmunización que consiste en dirigir a las CD₄ el péptido M2_e en combinación con el péptido 182-205 de la nucleoproteína (NP) que representa a un epítipo Th; altamente conservado, restringido por la molécula IA^d, con el propósito de inducir en ratones BABL/c una potente respuesta de anticuerpos protectores heterosubtípicos contra la infección por el virus influenza.

Para esto, se clonó en la región carboxi-terminal del gen de la cadena pesada del AbM NLDC-145 anti-DEC-205 de ratón, una secuencia que contiene dos péptidos NP₁₈₅₋₂₀₅ y un péptido M2_e (cada péptido separado por el conector OLLAS). Células HEK-239 se co-transfectaron con el plásmido conteniendo la cadena pesada fusionada y un plásmido que codifica para la cadena ligera del anticuerpo, para de esta manera producir *in vitro* un anticuerpo quimérico con las secuencias mencionadas. El anticuerpo se caracterizó bioquímica e inmunológicamente, para verificar que contenía la secuencia fusionada a la cadena pesada del anticuerpo y que este mantenía su especificidad hacia DEC-205.

IV.- HIPOTESIS

La co-transfección de los plásmidos codificantes para la cadena ligera y pesada fusionada con las secuencias conservadas (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e al Abm NLDC-145 anti-Dec205 en células HEK-293 generaran un AbM recombinante funcional, capaz de mantener especificidad hacia el receptor DEC205.

V.- OBJETIVOS

5.1.- Objetivo general:

Producir y caracterizar *in vitro* el anticuerpo monoclonal NLCD-145 anti-DEC-205 fusionado a epítomos conservados del virus influenza.

5.2.- Objetivos particulares:

1.- Generar un plásmido que codifique para la cadena pesada del anticuerpo monoclonal quimérico NLCD-145 anti-DEC-205 fusionado a las secuencias NP₁₈₂₋₂₀₅ y M2₁₋₂₄ del virus influenza.

2.- Expresar *in vitro* en células HEK-293 el anticuerpo monoclonal quimérico NLCD-145 anti-DEC-205 fusionado a las secuencias NP₁₈₂₋₂₀₅ y M2₁₋₂₄ del virus influenza.

3.- Verificar que el anticuerpo monoclonal producido *in vitro* contenga las secuencias fusionadas del virus influenza

4.- Determinar si el anticuerpo monoclonal producido *in vitro* mantiene su especificidad hacia DEC-205.

VI.- MATERIALES Y METODOS

6.1.- Diseño y clonación de las secuencias correspondientes a epítomos T y B del virus influenza.

La secuencia de bases correspondientes a los aminoácidos 182-205 de la NP del virus influenza A/H3N2/NT/60/68 (NP₁₈₂₋₂₀₅; VTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEG), que representan un epítomo de células Th restringidas por el MHC de clase II IA^d (Gao et al. 1989), y a los aminoácidos 1-24 de M2 del virus influenza A/H1N1/New Caledonia/20/99 (M2e; MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD); representan tanto a un epítomo Th restringido por la molécula IA^d como un epítomo de células B (Zebedee et al. 1988), fueron clonadas en el plásmido pcDNA 3.1 (-) por la Compañía *GenScript*. La construcción de 300 pb se diseñó para contener dos secuencias NP₁₈₂₋₂₀₅ separadas por el conector OLLAS (SGFANELGPRLMGK) y seguidas por otro conector OLLAS y la secuencia M2e, como se muestra a continuación:

NP₁₈₂₋₂₀₅-OLLAS-NP₁₈₂₋₂₀₅-OLLAS-M2₁₋₂₄ [(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e]

6.2.- Clonación de la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e en la región Carboxi-terminal de la cadena pesada de los Abm α -DEC-205 y su control de Isotipo.

6.2.1.- Purificación de la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y los plásmidos receptores.

El fragmento (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e clonado en el plásmido pcDNA 3.1 (-) fue escindido con enzimas de restricción y purificado. Para esto, 5 μ g del plásmido fue tratado con la endonucleasa Hind III (New England) por 2 h a 37 °C. Posteriormente, el plásmido cortado fue precipitado con acetato de amonio (10 M) y se trató con la enzima de restricción Xho I (New England) por 2 h a 37 °C. La mezcla del plásmido pcDNA 3.1(-) cortado y el fragmento (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e se resolvieron en un gel de agarosa al 1 % a 88 V durante 60 min en buffer TBE (4.4 M Tris base, 4.5 M ácido Bórico, 0.1 M EDTA; pH 8.0). Al término de la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio, colocado en papel egapack y las bandas visualizadas en un tras iluminador con luz UV (marca FOTODYNE). Utilizando una hoja de bisturí se cortó la banda correspondiente al fragmento (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e. El fragmento fue purificado usando el kit *GeneJET Gel Extraction Kit* de la compañía Thermo Fisher Scientific; de acuerdo al protocolo de fabricación.

El fragmento (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e purificado fue clonado en fase Hindi III – Xho I en los plásmidos que codifican para la cadena pesada del anticuerpo de rata α -DEC-205 (α -DEC-205CP) de ratón NLCD (IgG2a) y su control de Isotipo (IsotipoCP) 111-10 (anti-hapteno). Para esto, se partió de los plásmidos que contenían la secuencia de ovoalbúmina (OVA), α -DEC-205CP-OVA e IsotipoCP-OVA, generosamente cedidos por la Dra. Laura Bonifaz (Hospital de Especialidades, CMN, Siglo XXI, IMSS). Es importante mencionar que la región constante de rata de la cadena pesada fue sustituida por la región constante de IgG1 de ratón. La secuencia de OVA fue escindida de los plásmidos con las enzimas de restricción Hindi III y Xho I, la mezcla del plásmido cortado y la secuencia de OVA fueron resueltas en un gel de agarosa al 1 %. Las bandas correspondientes a los plásmidos cortados fueron purificadas como se indicó previamente para el fragmento (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e.

6.2.2.- Ligación del fragmento (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e en los plásmidos receptores.

El fragmento purificado (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e, denominado en adelante como inserto, así como los plásmidos linearizados α -DEC-205CP e IsotipoCP, denominados en adelante como vectores, fueron utilizados para generar los nuevos plásmidos recombinantes mediante una reacción de ligación. Para esto. Se realizó una reacción de ligación usando una proporción de inserto: vector de 1:4 (25 ng de inserto: 100 ng de vector), 1 μ L de la enzima ligasa T4 (New England) (400 u/ μ L) y su buffer ligasa 10x; en un volumen final de 20 μ L. La mezcla fue realizada en tubos cónicos de 0.5 mL y se incubó a 16 °C toda la noche. Esta reacción de ligación generaría las siguientes construcciones moleculares: el plásmido α -DEC-205CP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y el plásmido IsotipoCP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e.

Al término de la incubación la mezcla fue adicionada a un volumen de 100 μ L de bacterias *E. coli* DH5 α competentes, seguido de una incubación en hielo durante 30 min. Posteriormente, las bacterias fueron sometidas a un choque térmico a 42 °C durante 1 min e inmediatamente se agregó 1 mL de medio LB líquido sin antibiótico y se incubó en baño maría a 37 °C durante 1 h en agitación a 200 rpm. Al finalizar, las bacterias fueron sembradas en medio LB sólido (bacto triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, Agar 1.5%, pH 7.0) con 100 μ g/mL de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C. Finalmente, de las colonias bacterianas transformadas crecidas se seleccionó un promedio de 5 colonias para su posterior caracterización.

6.2.3.- Extracción y purificación de los plásmidos recombinantes.

Las colonias bacterianas transformadas se transfirieron a 5 mL de medio LB líquido con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm. Posteriormente, se centrifugaron a 8,000 rpm en una micro centrífuga (SIGMA) durante 5 min a 4 °C, la pastilla fue resuspendida en 100 µL de solución disruptiva (25 mM Tris, 10 mM de EDTA, 15% de sacarosa, 2 µg/mL de lisozima; pH 8.0) y se incubó en hielo por 10 min; al término de la incubación, se añadieron 200 µL de solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 min, se adicionaron 150 µL de acetato de potasio 5 M, se agitó en un vortex durante 10 s y se incubó en hielo durante 10 min; se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C durante 10 min en una micro centrífuga, el sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf nuevo donde se adicionaron 3 µg de RNAsa (SIGMA) y se incubó por 30 min a 37 °C. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA por fenol: cloroformo; a la fase acuosa se le adicionó 2 volúmenes de etanol absoluto frio y un volumen de 1/10 de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló e incubó 1 h a -70 °C, Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C durante 15 min, se desechó el sobrenadante. La pastilla fue lavada 2 veces con etanol frio al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 10 µL de agua libre de DNAsa. En todas las purificaciones se verificó la presencia de plásmido por medio de un gel de agarosa al 1 %.

6.2.4.- Verificación de la presencia de la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e en los plásmidos recombinantes.

La presencia de la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e en los plásmidos recombinantes α -DEC-205CP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y el plásmido IsotipoCP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e se realizó por dos métodos: (a) digestión enzimática y (b) secuenciación. Para la digestión enzimática, los plásmidos fueron sometidos a la digestión secuencial con las enzimas de restricción Hindi III y Xho I, como se describió previamente, y analizados por un gel de agarosa al 1 % para determinar la presencia del inserto de 300 pb.

La secuenciación de las clonas seleccionadas, fue realizada por la unidad de secuenciación del IBT de la UNAM. Para esto, se realizaron cultivos de las clonas en 5 ml de medio LB líquido con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se realizó la extracción y purificación de

plásmido utilizando el *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific) conforme a las especificaciones del fabricante.

Para poder realizar la secuenciación, se diseñaron los siguientes oligos para ambos plásmidos puesto que los dos comparten la misma secuencia de la cadena pesada y del inserto.

Oligo Fw

CTCGAGTCGGGGTTCGCGAA

Oligo Rv

GCCGAAGCTTATCTGAACTGTC

Se preparó una mezcla con 1 µg de cada plásmido (α -DEC-205CP:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y α -Isotipo-205CP:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e) y 10 pm de oligo Rv o Fw, por separado, en un volumen final de 16 µL (de acuerdo a especificaciones de la unidad de secuenciación), y se envió a la unidad de síntesis y secuenciación del IBT. El resultado fue analizado mediante un *Blast two* comparando la secuencia obtenida de la secuenciación contra la secuencia teórica del fragmento NP₁₈₂₋₂₀₅-OLLAS- NP₁₈₂₋₂₀₅-OLLAS-M2₁₋₂₄.

6.3.- Producción *in vitro* de anticuerpos fusionados con los péptidos de NP y M2 del virus influenza.

Para la producción del anticuerpo quimérico α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2, las células se co-transfectaron con los plásmidos α -DEC-205CP:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e (que codifica para la cadena pesada), el plásmido α -DEC-205CL (que codifica para la cadena ligera) y un plásmido “helper” (sin datos específicos por patente). Para la producción del anticuerpo quimérico α -isotipo: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e, las células se co-transfectaron con los plásmidos α -IsotipoCP:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e (que codifica para la cadena pesada), el plásmido α -isotipoCL (que codifica para la cadena ligera) y el plásmido “helper”. Todos los plásmidos fueron purificados por el kit *EndoFree* de la compañía Qiagen, conforme al protocolo de fabricación

Para la co-transfección, se sembraron 1×10^6 células HEK 293 en cajas Petri de cultivo celular de 100 mm de diámetro (COSTAR) en un volumen de 10 mL de medio DMEM Advance (GIBCO), suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-

glutamina, 100 U/mL penicilina/ 100 µg/mL estreptomicina e incubadas a 37 °C con 10% de CO₂. Cuando alcanzaron un 90% de confluencia, se retiró el medio, se lavó una vez con PBS y se adicionaron 10 mL de medio DMEM Advance sin suplementar. Por otro lado, en un volumen de 1 mL de NaCl 150 mM estéril se realizó un mezcla 1:1 de plásmido de cadena ligera (10µg): cadena pesada (10 µg) más 0.5 µg del plásmido “helper” (potenciador de la transcripción) y se agregaron 80 µg de Polietilenimina (Polyscience, Inc.). La mezcla se agitó manualmente por inversión durante 20 s, y se dejó incubando 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se adicionó lentamente por goteo en un extremo de la caja de cultivo y se incubo durante 5 h, al término de este tiempo se retiró el medio, se lavó con 5 mL de PBS y finalmente se adicionaron 15 mL de medio DMEM Advance con antibiótico suplementado con 150 µL de Nutridoma (Roche) para sustituir la necesidad del SFB. Las células fueron incubadas a 37 °C durante 8-10 días. Posteriormente, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a 4 C° hasta su uso.

Durante el trabajo experimental se realizaron algunas variaciones con respecto a la proporción de los plásmidos empleados y diferentes medios de cultivo, las cuales se presentan en la sección de resultados

6.3.1.- ELISA para la detección de AbMs quiméricos en sobrenadantes de células HEK 293.

La presencia de los AbMs quiméricos fusionados a antígeno en los sobrenadantes de las células HEK-239 transfectadas fue determinada por un ensayo de ELISA de captura. Así, placas de 96 pozos de fondo redondo (Costar de Alta adherencia) fueron cargadas con 50 µL de PBS con una dilución 1:2000 de un anticuerpo policlonal de conejo anti IgG de ratón (Sigma) y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron 2 veces con PBS/Tween 0.05 % (solución de lavado) y se bloqueó con 150 µL de PBS/ 5 % leche descremada en polvo (Carnation)/Tween 0.05 % (solución de bloqueo) por 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces, se agregaron 50 µL de los sobrenadantes por duplicado y se incubó por 2 h a 37 °C. Se lavó 4 veces y se adicionaron 50 µL de solución de bloqueo con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón (Sigma) a una dilución 1:1000 en solución bloqueadora y se incubó toda la noche a 4 °C. Se realizaron 4 lavados y se adicionaron 50 µL de un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG1 de ratón (Zymed)

acoplado a peroxidasa diluido 1:1000 en solución bloqueadora y se incubó por 1 h a 37° C. Como se mencionó previamente la región constante de rata de la cadena pesada de los AbMs fue cambiada por la región constante del IgG1 de ratón. Se lavó 4 veces y se adicionaron 50 µL de sustrato orto-Fenilendiamina (Sigma) a una concentración de 2 mg en 5 mL de solución amortiguadora de citratos (ácido cítrico 51.4 mM, fosfato de sodio 24.3 mM y 10 µL de H₂O₂ 30%). La reacción se incubó por 10-20 min a temperatura ambiente y la absorbancia a 492 nm se leyó en lector de placas (Bio-Tek instruments inc.). Como control negativo se usó medio solo. En todos los casos el valor negativo sin antígeno fue restado a toda la placa.

Para determinar la presencia del péptido M2e en los AbMs, se realizó un ensayo de ELISA de captura de similar al descrito arriba pero utilizando como anticuerpo de captura un Ab policlonal de conejo anti-M2e (producido en el laboratorio) a una dilución 1:200 en solución bloqueadora.

6.3.2.- Purificación de anticuerpo por cromatografía de afinidad.

Partiendo del sobrenadante recolectado de las células co-transfectadas, se realizó la purificación de los anticuerpos mediante una columna de proteína G de 5 mL. (GE Health Care Kit Trap). Para esto, la columna se colocó en un soporte universal y se conectaron las mangueras a una bomba peristáltica. Para lavar la columna, se pasaron 20 mL de buffer de lavado (fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0), posterior a esto se adicionó la muestra (10 mL) y se pasó 10 veces por la columna. Se lavó con 25 mL de buffer de lavado y para colectar el anticuerpo se pasaron 15 mL de buffer de elusión (glicina 0.1 M, pH 2.7). Se colectaron fracciones de 1 mL en tubos de vidrio, los cuales tenían 50 µL de buffer de neutralización (Tris 1 M, pH 9.0). Para lavar la columna, se pasaron 20 mL de buffer de lavado y posteriormente 20 mL de etanol al 20%, se dejó la columna con etanol y se cubrió con parafilm, guardándose a 4°C. Se determinó la concentración de proteína en las fracciones colectadas midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro (Biodrop µLITE). Aquellas fracciones con mayor absorbancia fueron mezcladas y posteriormente colocadas en un Centricon (Millipore) con punto de corte de 30 kDa, el cual se centrifugó por un tiempo aproximado de 20 min 2000 rpm, a 4°C. Posteriormente, se adicionaron 1 mL de PBS a la muestra, y se volvió a centrifugar, esto con el objetivo

de limpiar la muestra de restos de buffer utilizados anteriormente. Finalmente, se cuantificaron los anticuerpos purificados y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4.- Caracterización de los anticuerpos sintetizados

6.4.1.- Electroforesis en geles de acrilamida para caracterizar los anticuerpos monoclonales purificados.

Para poder determinar la diferencia de peso molecular entre las cadenas pesadas del anticuerpo α DEC-205 (sin fusionar) y el anticuerpo α DEC-205:fusionado, así como el anticuerpo α Isotipo:fusionado; se realizaron electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE). Se utilizó un gel separador al 12 % de acrilamida. Para 5 mL se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos: 1.6 mL de H_2O , 2 ml de mezcla de acrilamida 30% (acrilamida 29%, bis-acrilamida 1%), 1.3 mL de Tris 1.5 M (pH 8.8), 0.05 mL SDS 10%, 0.05 mL Persulfato de amonio (APS) 10% y 0.002 mL TEMED. Para 2 mL del gel concentrador al 5 % de acrilamida se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos: 1.4 mL de H_2O , 0.33 mL de mezcla de acrilamida 30% (acrilamida 29%, bis-acrilamida 1%), 0.25 mL de 1.5 M Tris (pH 8.8), 0.02 mL de SDS 10%, 0.02 mL de Persulfato de amonio 10% y 0.002 mL de TEMED.

Una vez polimerizado el gel, se procedió a preparar las muestras en condiciones desnaturalizantes. En un volumen final de 20 μL , se utilizaron 4 μL de buffer de carga de proteínas con 2- β -mercapto etanol 5x (35 mM de Tris pH 6.8, 2% de SDS, 5% de v/v glicerol, 0.1% de azul de bromofenol y 1% de 2- β mercapto etanol) más el volumen correspondiente a 4 μg de los anticuerpos, ajustando a 20 μL con agua H_2O . La mezcla se vortexeó y se calentó a punto de ebullición durante 10 min. Las muestras se cargaron en los pozos del gel, y se agregaron 500 mL del buffer de corrida (25 mM de Tris-base, 250 mM de glicina y 0.1 % de SDS) a la cámara de electroforesis. Las muestras se corrieron a 40 mAmps por 1 h. Posteriormente, el gel se colocó en solución de fijación (50% metanol, 10% ácido acético) durante 20 min y se tiñó con una solución de azul de Coomassie 0.05 % en 50% / 10% de ácido acético en agua destilada durante 20 min, con agitación lateral a temperatura ambiente. El gel se destiñó en una solución de ácido acético 10% durante 30 min, realizándose un cambio de solución para dejarse en agitación

toda la noche. Al día siguiente, el gel se pasó a un recipiente con agua destilada para fotografiarlo bajo un transiluminador.

6.4.2.- Ensayo de dot blot para determinar la presencia de la secuencia M2e en los anticuerpos recombinantes.

Para poder determinar la presencia del fragmento M2e en la cadena pesada del anticuerpo α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e se realizó un ensayo de dot blot. Diluciones seriales de los anticuerpos monoclonales α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y ratón anti-M1 de influenza HB64 (IgG1), así como del péptido sintético M2e (control positivo) y HA₃₃₁₋₃₅₅ (control negativo), se inmovilizaron en una membrana de nitrocelulosa usando el equipo Hybri-Slot Manifold (Biometra). Las membranas se bloquearon con buffer bloqueador (5% de leche libre de grasa y 0.05% de Tween-20 en PBS) por 1h a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con Tween-20 0.05% en PBS, las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo contra M2e (obtenido en el laboratorio) diluido 1:100 en solución de bloqueo toda la noche (16 h) a 4 °C con agitación lateral. Al día siguiente las membranas se lavaron 6 veces con solución de lavado y se incubaron con un anticuerpo policlonal cabra anti-IgG de conejo HRP (Dako) diluido 1:1000 en solución bloqueadora durante 1 h a 4 °C.

La membrana se colocó sobre un soporte de papel Whatman recubierto con Clean Pack, y se reveló con reactivo de quimioluminiscencia (Perkin Elmer), 1200 uL por membrana (600 uL de luminol + 600 uL de solución oxidativa), se cubrió con papel egapack antes de colocar en el lector Odyssey y se leyó durante 30 minutos de exposición.

6.4.3.-Citometría de flujo para determinar especificidad del anticuerpo al receptor DEC-205.

Para evaluar la especificidad del anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2, se utilizaron células de bazo de ratón adulto hembra BALAB/c de 8 semanas de nacido. Las células de bazo contienen aproximadamente un 2 % de CD que a su vez expresan DEC-205 en su superficie. El bazo se colocó en 10 ml de Hank's con 2mM EDTA, posteriormente fue macerado en una malla metálica, se colectó el sobrenadante, se centrifugó 1 700 rpm y se desechó el sobrenadante. El botón celular se re suspendió en 5 ml de Cloruro de Amonio 0.15 M y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos para eliminar los eritrocitos. Posterior a la incubación con Cloruro de Amonio, las células fueron centrifugadas 1700 rpm por 5 minutos y el botón celular se re suspendió en Hank's y se volvió a repetir este

paso. Las células fueron re suspendidas en 1 mL de medio RPMI suplementado para su conteo y se lavaron 2 veces con buffer de enlace [BE] (PBS, 2% SFB, 0.16 mM EDTA). Se distribuyeron 1×10^6 células en placas de 96 pozos en un volumen de 100 μ L de BE con 2% de suero humano y se incubaron por 30 minutos a 4°C, para bloquear los receptores Fc. Posteriormente, se adicionaron 100 μ l de BE y centrifugaron a 2000 rpm a 4°C por 5 minutos en una microcentrífuga. Las células se resuspendieron en 100 μ l de BE con 2% de suero de humano y en presencia de los anticuerpos anti-CD11c-Biotina (ebioscience 1/150), NLDC-145 anti DEC-205 purificado (5 μ g) o el anticuerpo fusionado α -DEC-205:(NP182-205)2-M2 (1 y 5 μ g). Las células se incubaron por 30 minutos a 4°C en la oscuridad, se lavaron 2 veces centrifugando a 2000 rpm a 4°C por 5 minutos y se resuspendieron en 100 μ l de BE con 2% de suero de humano con streptavidina-APC (1/200) y un segundo anticuerpo de cabra anti-rata acoplado a FITC (Jackson) (1/20) o cabra anti-IgG1 de ratón acoplado a FITC (1/100). Después de 20 minutos de incubación a 4°C por 5 minutos en la oscuridad, las células se lavaron 2 veces, se resuspendieron en 100 μ l de BE más 100 μ l de paraformaldehído al 2% y se almacenaron a 4°C cubriéndolas de la luz hasta su uso. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo (Facs AriaII, BD) usando el programa FlowJ.

VII.- RESULTADOS

7.1- Construcción de la fusión de la cadena pesada del AbM NLDC-145 anti-DEC-205 y (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e

El principal objetivo del trabajo fue fusionar la secuencia del virus influenza A M2e a un AbM específico para DEC-205 de ratón, para en un futuro determinar si esta estrategia incrementa la inmunogenicidad del péptido de 24 aa M2e en un modelo murino. Como se mencionó anteriormente, la región extramembranal del virus influenza M2e puede inducir una respuesta de anticuerpos protectores ya que en su secuencia contiene tanto un epítipo de células B como un epítipo de células Th restringido por la molécula IA^d (Zebedee et al. 1988). Con la finalidad de incrementar la potencia de la respuesta de anticuerpos se construyó un gen sintético que incorporó la secuencia de bases correspondientes a los aminoácidos 182-205 de la NP del virus influenza, que representan un epítipo sumamente conservado de células Th restringidas por el MHC de clase II IA^d (Gao et al. 1989). La construcción de 300 pb se diseñó para contener dos secuencias NP₁₈₂₋₂₀₅ separadas por el conector OLLAS y seguidas por otro conector OLLAS y la secuencia M2e, la cual denominamos (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e.

Para poder producir *in vitro* el AbM de rata NLDC-145 es necesario co-transfectar las células de humano HEK-239 con dos plásmidos, uno con la secuencia de la cadena ligera y el otro con la secuencia de la cadena pesada. En el caso de que el Ab esté fusionado a un antígeno, se utiliza la secuencia de la cadena pesada como receptor de la secuencia del antígeno. Como se mencionó en Materiales y Métodos, al inicio del proyecto se contaba con un plásmido de la cadena ligera y otro plásmido de la cadena pesada fusionada a OVA (α DEC-205CP:OVA) (Figura 3), correspondientes al AbM NLDC-145 anti-DEC-205.

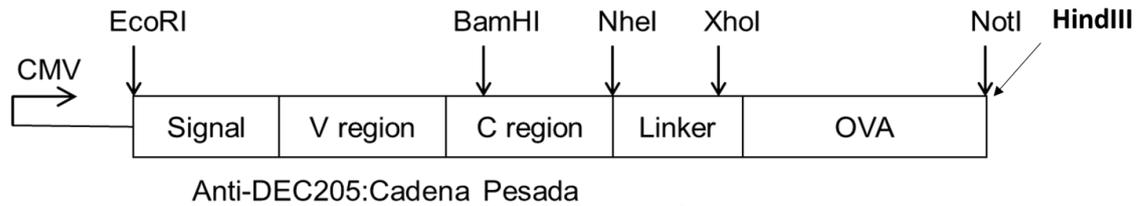


Figura 3 -. Región de la cadena pesada fusionada al gen de OVA en el plásmido. Se indican las regiones del α DEC-205CP/OVA, así como los sitios de restricción únicos.

Es importante mencionar que en esta construcción la región constante del anticuerpo de rata fue sustituida por la región constante de la inmunoglobulina IgG1 de ratón y antes del gen de OVA se insertó una secuencia conectora. De esta manera, para generar la cadena pesada fusionada fue necesario sustituir el gen de OVA por la secuencia que codifica para $(NP_{182-205})_2$ -M2e. De la misma manera, se sustituyó el gen de OVA por la secuencia que codifica para $(NP_{182-205})_2$ -M2e en un plásmido que codifica para la cadena pesada del AbM de rata 111-10 que en futuros experimentos de inmunización actuaría como control de isotipo (IgG2a). Es importante mencionar, que la región de la cadena pesada de esta construcción tiene las mismas modificaciones que el plásmido que codifica para α -DEC-205CP.

El gen sintético de 300 pb fue clonado en el plásmido pcDNA 3.1 (-) por la Compañía *GenScript*. Para clonar el fragmento $(NP_{182-205})_2$ -M2e en los plásmidos que codifican para α -DEC-205CP e IsotipoCP, los plásmidos pcDNA3.1- $(NP_{182-205})_2$ -M2e, α -DEC-205CP-OVA e IsotipoCP-OVA fueron digeridos con las enzimas de restricción Xho I/ Hind III, y los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1 %. Como se observa en la **figura 4**, la digestión del plásmido pcDNA3.1- $(NP_{182-205})_2$ -M2e generó dos fragmentos; uno de 5.427 pb, correspondiente al plásmido sin inserto y otro de 300 pb correspondientes a el fragmento $(NP_{182-205})_2$ -M2e. Por otro lado, la digestión del plásmido α -DEC-205CP-OVA también generó dos fragmentos; uno de 6000 pb correspondiente al plásmido sin inserto y otro de 1140 pb correspondientes al gen de OVA. La digestión con el plásmido

IsotipoCP-OVA, generó fragmentos similares a la digestión del plásmido α -DEC-205CP-OVA (dato no mostrado).

Posteriormente se realizó la purificación del inserto y de los plásmidos, como se indica en la metodología.

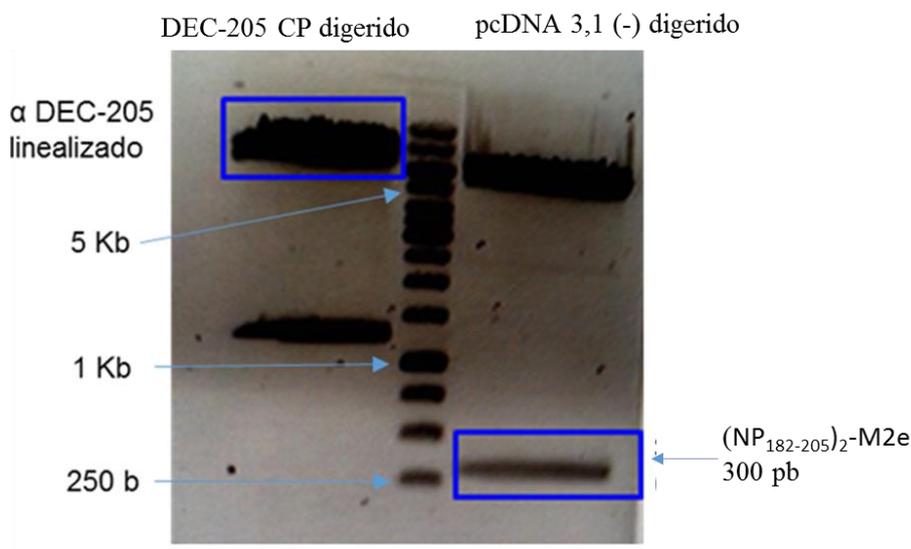


Figura 4. Digestión de plásmidos. Los plásmidos pcDNA 3.1(-):(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y el plásmido α DEC-205:OVA fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y Hind III. Los productos de la digestión y su tamaño se indican con flechas. Las bandas de interés se enmarcan en color azul, estas fueron posteriormente extraídas y purificadas.

Los fragmentos correspondientes a los plásmidos α -DEC-205CP e IsotipoCP linearizados y la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e, fueron posteriormente purificados y su integridad se verificó por medio de un gel de agarosa al 1 %. En la **figura 5** se observan las bandas correspondientes a los fragmentos purificados; esto es, un fragmento de 300 pb correspondiente a (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y otro de 6000 pb correspondiente a α -DEC-205CP o IsotipoCP.

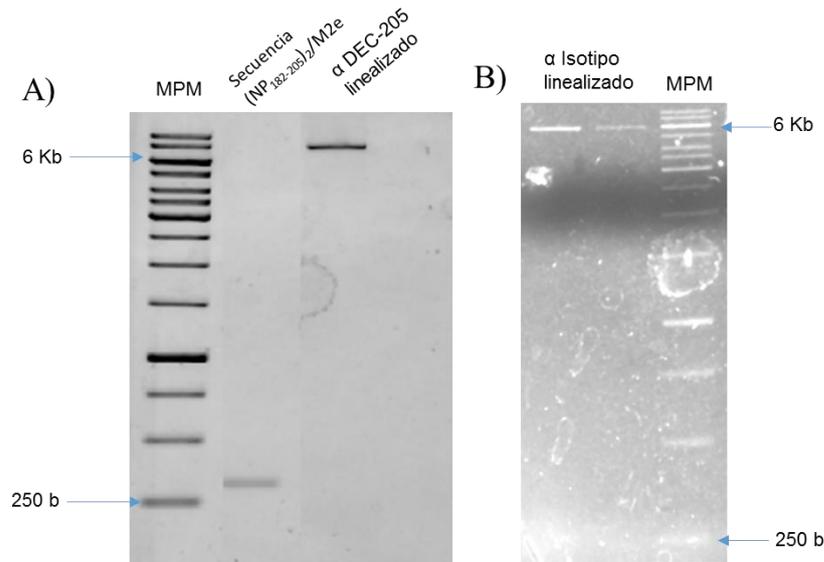


Figura 5. Productos digeridos purificados. En el panel A Se observan las bandas correspondientes al fragmento $(NP_{182-205})_2$ -M2e y el plásmido α DEC-205CP. En el panel B se observan las bandas correspondientes al plásmido IsotipoCP. Los fragmentos purificados y su tamaño se indican con flechas.

El fragmento $(NP_{182-205})_2$ -M2e se ligó en la orientación Xho I (5')/ HindIII (3') a los plásmidos α -DEC-205CP o IsotipoCP linealizados, como se indica en Materiales y Métodos. Los productos de las ligaciones se utilizaron para transformar bacterias competentes en presencia de ampicilina y se obtuvieron varias colonias bacterianas a las cuales, después de expandirlas, se les extrajo el DNA plasmídico, se cortaron con las enzimas Xho I/HindIII y se analizaron en un gel de agarosa al 1 % para verificar si contenían el inserto en la orientación adecuada. En la **figura 6** se presentan las digestiones de DNA plasmídico provenientes de bacterias transformadas con los plásmidos α -DEC-205CP: $(NP_{182-205})_2$ -M2e (A) o IsotipoCP: $(NP_{182-205})_2$ -M2e (B). En el caso de las clonas bacterianas transformadas con el plásmido α -DEC-205CP: $(NP_{182-205})_2$ -M2e, se observó que en todos los casos se generaba un fragmento de 300 pb correspondientes a la secuencia $(NP_{182-205})_2$ -M2e. Por otro lado, solamente una colonia bacteriana transformada con el plásmido IsotipoCP: $(NP_{182-205})_2$ -M2e, presentó el fragmento esperado.

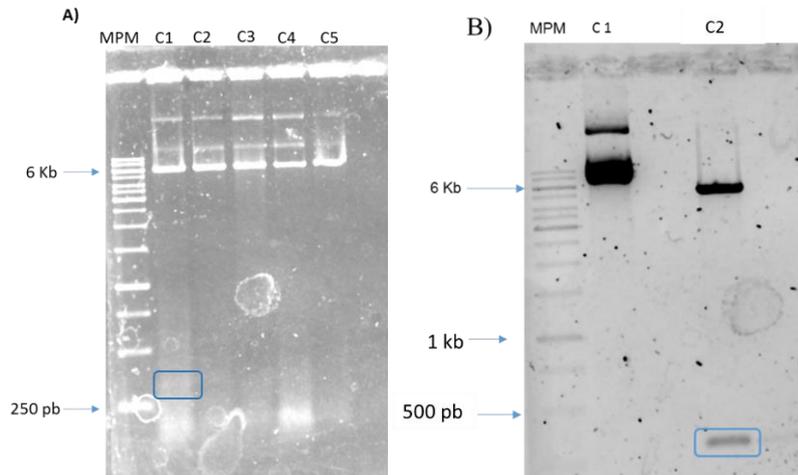


Figura 6. Digestión enzimática de los DNA plasmídicos provenientes de bacterias transformadas con plásmidos recombinantes. Los DNA plasmídicos provenientes de bacterias transformadas con los plásmidos recombinantes α -DEC-205CP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e (A) o IsotipoCP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e (B) fueron digeridos con las enzimas Xho I/HindIII y corridos en un gel de agarosa al 1 %. Las flechas indican los tamaños del marcador de peso molecular. Las bandas enmarcadas en azul, corresponden al fragmento de 300 pb (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e de las clonas seleccionadas para secuenciación.

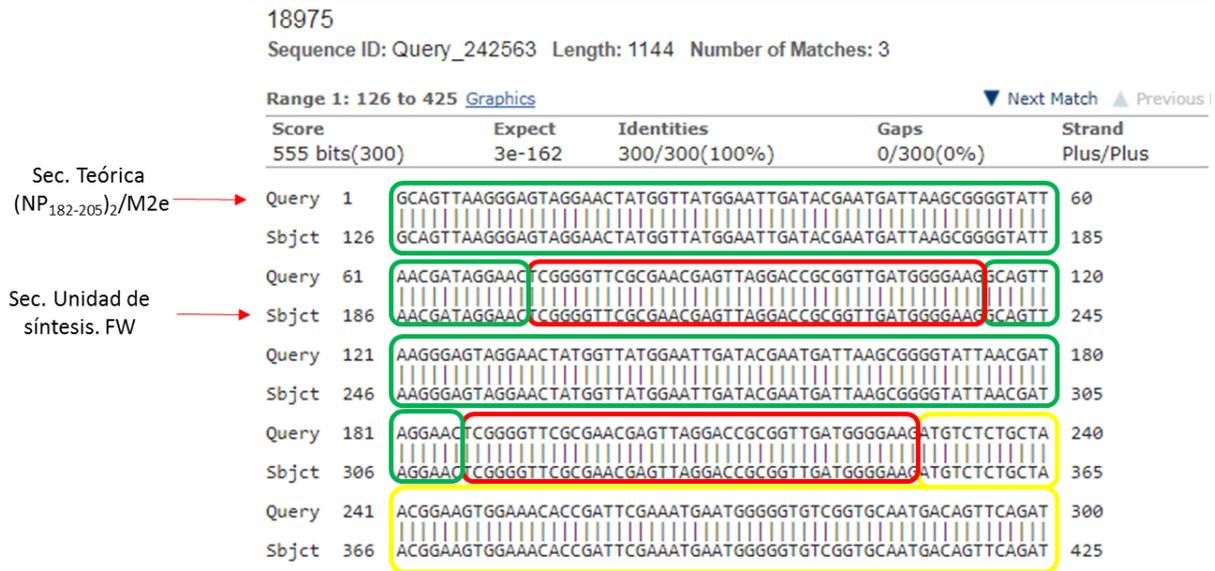
Se seleccionó una colonia de bacterias transformadas con los plásmidos recombinantes que presentaron la inserción del fragmento (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e. Las bacterias se amplificaron, el DNA plasmídico se purificó y la secuencia correspondiente (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e se verificó usando primers específicos. Se encontró que un 100 % de homología en la secuencia de nucleótidos con la secuencia teórica correspondiente a (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e (Tabla 1); **Figura 7.** De esta manera, se demostró que los plásmidos recombinantes α -DEC-205CP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e, e IsotipoCP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e tienen fusionada la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e en la orientación correcta, por lo que se procedió a realizar la producción *in vitro* de los anticuerpos recombinantes.

Tabla 1. Valores de alineamiento.

Alineamiento	Cobertura de muestra problema	E value	Identidad	Acceso
α DEC-205:(NP ₁₈₂₋₂₀₅) ₂ /M2e	99%	1e ⁻¹⁶⁵	100%	Query_239681
α Isotipo:(NP ₁₈₂₋₂₀₅) ₂ /M2e	98%	1e ⁻¹⁶²	100%	Query_81959

Los alineamientos teóricos emparejados con la secuencia obtenida de la unidad de secuenciación mostraron valores de identidad del 100% y sin deleciones en la secuencia.

A)



B)

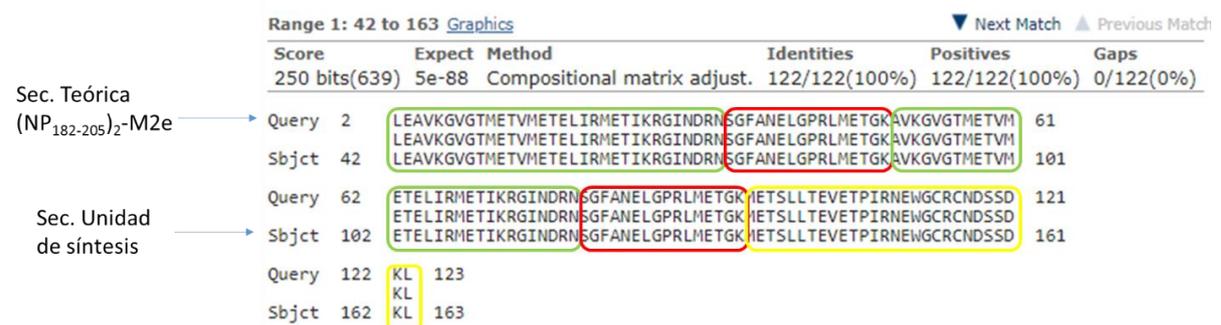


Figura 7. BLAST de secuencia de nucleótidos correspondientes a (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂/M2e. La figura muestra un ejemplo del emparejamiento realizado entre la secuencia teórica (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂/M2e ya conocida vs las secuencias obtenidas de la secuenciación de los plásmidos α -DEC-205CP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e e IsotipoCP (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e. La secuencia enmarcada en verde es correspondiente al NP₁₈₂₋₂₀₅, la secuencia enmarcada en rojo corresponde a la secuencia del conector sintético OLLAS, y la secuencia enmarcada en amarillo pertenece a la secuencia M2e. El panel A) muestra el alineamiento nucleótido. El panel B) muestra el alineamiento de las secuencias traducidas a aminoácidos. La secuencia de nucleótidos fue traducida a aminoácidos con el programa ExPASy Translate.

7.2.- Producción de anticuerpos recombinantes *in vitro*

Con la finalidad de determinar las mejores condiciones de producción de los anticuerpos recombinantes *in vitro*, células HEK-293 sembradas en cajas de cultivo de 24 pozos y co-transfectadas con los plásmidos α -DEC-205CP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e, α -DEC-205CL y un plásmido *helper*. Como controles positivos de producción de anticuerpo recombinantes

se realizaron transfecciones sustituyendo el plásmido α -DEC-205CP: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e por los plásmidos α -DEC-205:OVA o α -DEC-205:E5. Este último plásmido fue donado por los Drs. Lourdes Gutiérrez y Oscar Badillo (INSP, SS, Cuernavaca, Morelos) y codifica para la cadena pesada del AbM α -DEC-205 fusionado a la proteína E5 del virus Papiloma humano. Después de 10 días de incubación, los niveles de anticuerpos recombinante en los sobrenadantes fueron evaluados por un ensayo de ELISA de captura para IgG1 de ratón.

En un primer ensayo las células HEK-293 fueron co-transfectadas con los plásmidos arriba mencionados con PEI en una proporción 1:1 plásmido cadena pesada (1 μ g): plásmido cadena ligera (1 μ g), más 0.5 μ g de plásmido “helper”. Después de la co-transfección se agregó medio DMEM Advance y las células se cultivaron por 10 días. Se encontró que los anticuerpos recombinantes α -DEC-205:OVA y α -DEC-205:E5 se produjeron en mucho mayor cantidad que el anticuerpo α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e, que mostro niveles ligeramente superiores al control de células no transfectadas (**Figura 8**).

Para tratar de mejorar el rendimiento en la producción del anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e, después de la transfección las células fueron cultivadas con DMEM Advance + 2% de SFB o medio OPTIMEM+ 1% de SFB. Sin embargo, los niveles encontrados del anticuerpo α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e siguieron siendo bajos en comparación con los anticuerpos α -DEC-205:OVA y α -DEC-205:E5; y no mejoró la producción en comparación con el control **figura 9**.

Una posibilidad para explicar la baja producción del anticuerpo α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e en comparación con los otros anticuerpos recombinantes, podría ser que la proporción 1:1 de la cadena pesada: cadena ligera no es la óptima para este anticuerpo en particular. De esta manera, las células se co-transfectaron con ratios 1:0.5, 1:1 y 1:2 de cadena pesada: cadena ligera para producir los anticuerpos α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y α -DEC-205:E5, en presencia de DMEM Advance o OPTIMEM. Ninguno de los tratamientos mejoró la producción del anticuerpo anticuerpos α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e (**Figura 10**), manteniéndose ligeramente arriba del control negativo y muy bajo con respecto a la producción del anticuerpo anticuerpos α -DEC-205:E5. De esta manera, es claro que la baja producción del anticuerpo α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e; no se debe a

los diferentes medios de cultivo o radios de plásmidos utilizados, por lo que es probable que las células HEK-293 sean susceptibles a un evento transcripcional o post-traducciona l de la cadena pesada recombinante.

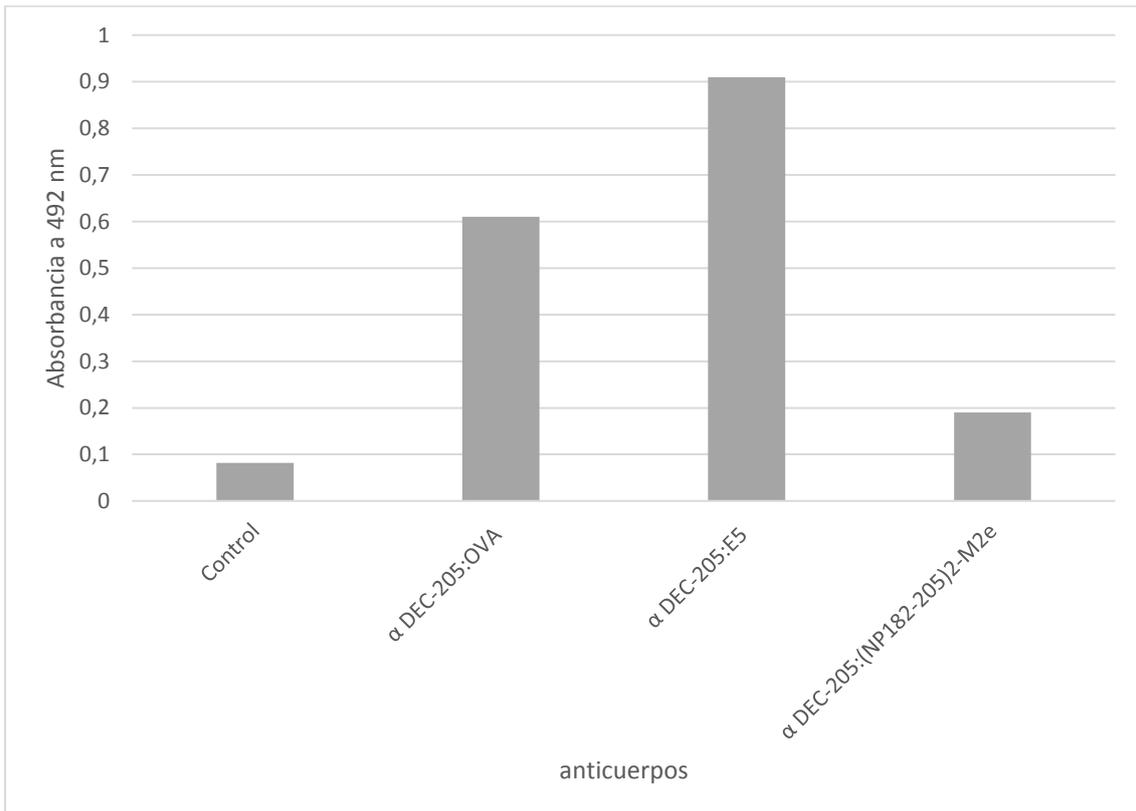


Figura 8. Presencia de anticuerpos recombinantes en sobrenadantes de células HEK-293 co-transfectadas. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con PEI con los diferentes plásmidos usando un radio 1:1 cadena pesada (1 µg): cadena ligera (1 µg) más 0.5 µg de plásmido “helper”. Las células fueron incubadas 10 días en presencia de DEMEM Advance y los niveles de los diferentes anticuerpos recombinantes analizados por medio de un ensayo de ELISA de captura para IgG1 de ratón.

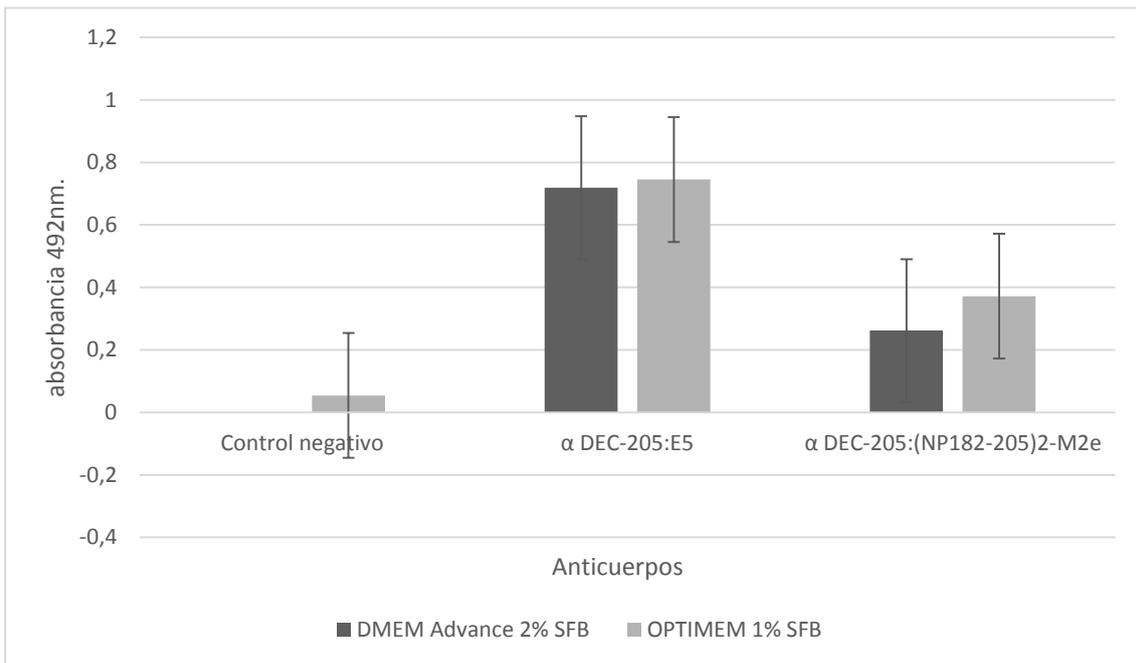


Figura 9. Comparación de medios de cultivo en la producción anticuerpos recombinantes por células HEK-293 co-transfectadas. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con PEI con los diferentes plásmidos usando un radio 1:1 cadena pesada (1 µg): cadena ligera (1 µg) más 0.5 µg de plásmido “helper”. Las células fueron incubadas 10 días en presencia de DEMEM Advance + 2% SFB u OPTIMEM + 1% SFB y los niveles de los diferentes anticuerpos recombinantes analizados por medio de un ensayo de ELISA de captura para IgG1 de ratón.

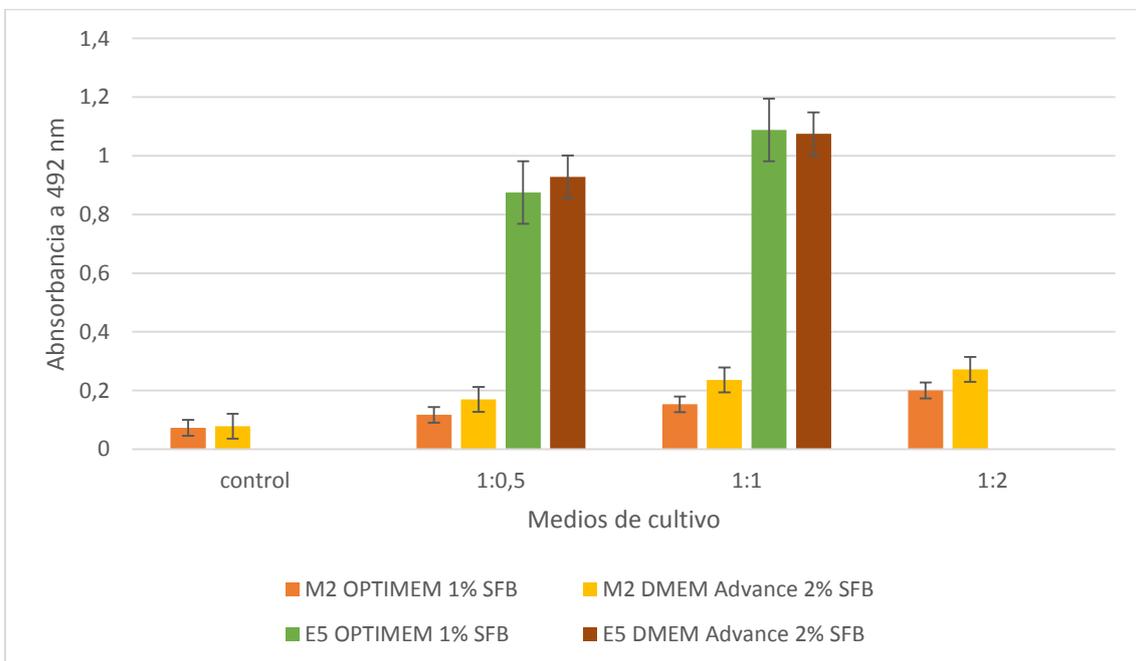


Figura 10. Efecto de diferentes radios de los plásmidos usados en la producción de anticuerpos recombinantes por células HEK-293 co-transfectadas. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con PEI con los diferentes plásmidos usando los radios cadena pesada: cadena ligera; indicada en la figura. Las células fueron incubadas 10 días en presencia de DEMEM Advance 2% SFB u OPTIMEM 1% SFB y los niveles de los diferentes anticuerpos recombinantes analizados por medio de un ensayo de ELISA de captura para IgG1 de ratón.

Tomando en cuenta la baja producción del anticuerpo α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e por parte de las células HEK-293 co-transfectadas, se escaló la producción de este. Para esto, las células HEK-293 fueron cultivadas en cajas Petri de 100 ml de diámetro y transfectadas en presencia de PEI con los plásmidos en un radio 1 (10 μ g): 1 (10 μ g) cadena pesada: cadena ligera, más 0.5 μ g del plásmido “helper” y cultivadas 10 días con DMEM Advance. El sobrenadante se colectó, y el anticuerpo recombinante se purificó por medio de una columna de proteína G. Se realizaron transfecciones con un total de 10 cajas Petri, y se obtuvieron un total de 100 μ g de anticuerpo purificado de los ensayos de transfección, obteniéndose un promedio de 10 μ g por caja. Por otro lado, solamente se realizó una transfección de 4 cajas Petri para la producción y purificación del anticuerpo isotipo: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e, obteniéndose solamente 4 μ g. De esta manera, solamente se logró producir suficiente anticuerpo α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e para su posterior. Estudios futuros son necesarios para determinar si mínima producción del anticuerpo isotipo: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e se debe a un problema con sus síntesis en las células HEK-293 más exacerbado que el observado con el anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e o fue causa de algún error técnico.

7.3.-Caracterización de los anticuerpos recombinantes producidos *in vitro*.

En la **figura 11** se representa la estructura teórica del anticuerpos recombinantes α -DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e donde la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e de 88 aa se encuentra fusionada en el carboxilo terminal de las dos cadenas pesadas.

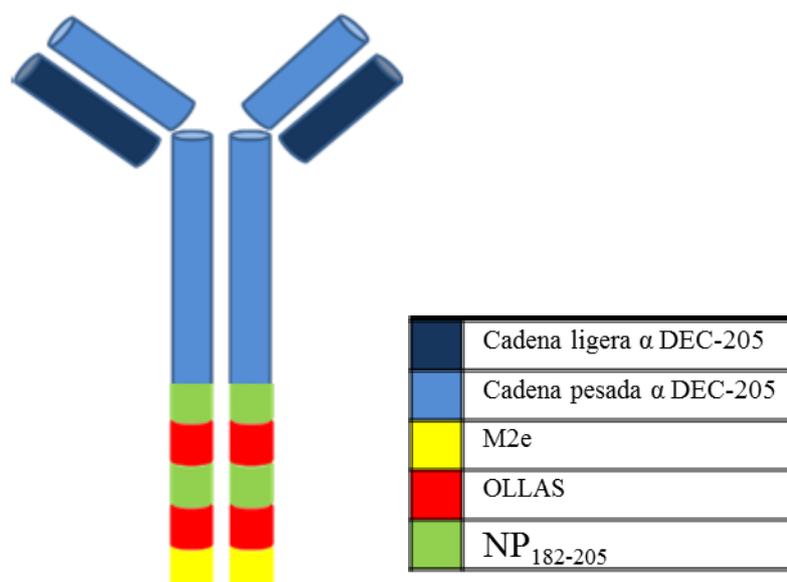


Figura 11. Anticuerpo fusionado. Modelo del anticuerpo α -DEC-205 fusionado a la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e en su extremo carboxilo terminal.

El tamaño estimado de la cadena pesada no fusionada es de 50 kDa, por lo que la cadena pesada fusionada a la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e debería tener un tamaño aproximado de 55.59 kDa. Para corroborar este punto, se corrió un gel de acrilamina al 12%, en condiciones reductoras, de los anticuerpos recombinantes purificados α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e e isotipo:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y como control se incluyó el AcM de rata α -DEC-205, (sin fusionar). Como se esperaba, el anticuerpo α -DEC-205 generó dos bandas; una correspondiente a la cadena pesada de 50 kDa y otra correspondiente a las cadenas ligeras de 25 kDa (**Figura 12**). Por otro lado, los anticuerpos recombinantes generaron una banda de aproximadamente 55 kDa correspondiente a la cadena pesada fusionada y otra de 25 kDa correspondiente a la cadena ligera. Este resultado sugiere fuertemente que las cadenas pesadas de los anticuerpos recombinantes están fusionadas a la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e.

Para corroborar el resultado anterior se realizó un ensayo de ELISA de captura con el anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e a manera de antígeno; y usando como anticuerpo primario, un anticuerpo policlonal de conejo anti-M2e (hecho en el laboratorio) y revelando con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Como control positivo se cargó en la placa el péptido M2e. Como se puede ver en la **Figura 13**, el anticuerpo recombinante dio solamente una señal de fondo, mientras que el péptido M2e tuvo un alto nivel de reconocimiento. Este resultado nos indica que bajo las condiciones del ensayo el anticuerpo de captura anti-M2e no fue capaz de reconocer esta secuencia en el anticuerpo recombinante.

Como método alternativo se realizó un ensayo de dot blot con diluciones seriadas del anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e y el péptido M2e como control positivo. Como controles negativos se realizaron diluciones seriadas del anticuerpo HB64 anti-M1 de influenza IgG1 de ratón y un péptido irrelevante (HA derivado de la Hemaglutinina de influenza). La membrana se incubó con el anticuerpo policlonal de conejo anti-M2e, seguido de un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Se encontró que el péptido solo M2e fue reconocido hasta una dilución de 16.25 μ g y el anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e hasta la dilución de 32.5 μ g (**Figura 14**). Los controles negativos no generaron señal alguna. Este resultado indica que el anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e efectivamente contiene la secuencia M2e y junto con el

resultado de movilidad electroforética demuestra que la secuencia $(NP_{182-205})_2$ -M2e está fusionada a la cadena pesada del anticuerpo recombinante. Aunque el anticuerpo isotipo: $(NP_{182-205})_2$ -M2e no fue incluido en este ensayo, su movilidad electroforética sugiere fuertemente que también tiene la secuencia $(NP_{182-205})_2$ -M2e fusionada a la cadena pesada.

En un futuro se pretende utilizar los anticuerpos recombinantes en ensayos de vacunación en un modelo murino. Para esto es importante que los anticuerpos mantengan su especificidad hacia el receptor DEC-205 de las células Dendríticas. Esto se determinó por medio de un ensayo de citometría de flujo usando células de bazo de ratón. Las células de bazo fueron teñidas con anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos. Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para la molécula CD11c que define a las células dendríticas y las cuales presentan DEC-205 en su superficie. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo α -DEC-205: $(NP_{182-205})_2$ -M2e, seguido de un anticuerpo policlónal de cabra anti-IgG1 de ratón. Como control positivo, las células CD11c se tiñeron con el anticuerpo monoclonal de rata anti-DEC-205 (NLDC 45), seguido de un policlónal de cabra contra IgG de rata. Como controles negativos, las células se tiñeron con anti-CD11c más los segundos anticuerpos policlónales. Se encontró (Figura 15) que el anticuerpo control, rata anti-DEC-205 tiñó a las células Dendríticas (IMF 140.64), de la misma manera el anticuerpo α -DEC-205: $(NP_{182-205})_2$ -M2e a 1 y 5 μ g tuvo niveles similares de tinción (165.65). Los segundos anticuerpos policlónales solos dieron niveles de fondo. Este resultado demuestra que el anticuerpo recombinante α -DEC-205: $(NP_{182-205})_2$ -M2e mantiene su especificidad hacia el receptor DEC-205.

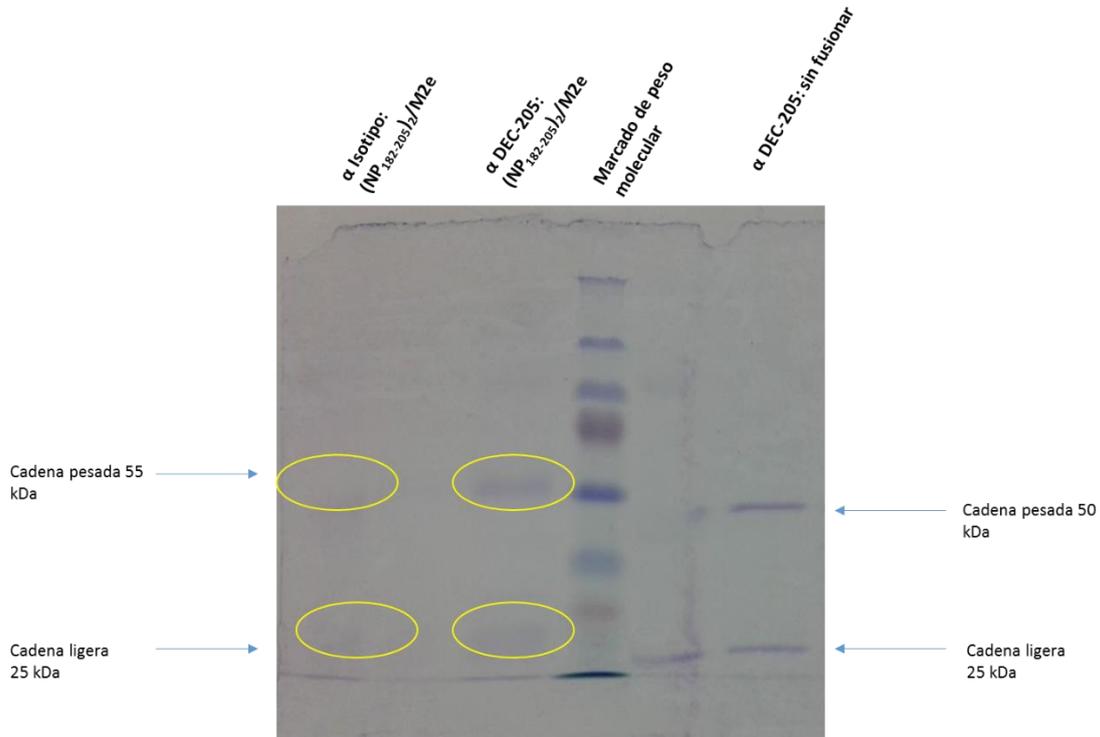


Figura 12. La cadena pesada de los anticuerpos recombinantes están fusionados a la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e. Dos microgramos de los anticuerpos indicados se corrieron en un gel de acrilamida al 12% bajo condiciones reductoras. Las flechas indican los tamaños de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos.

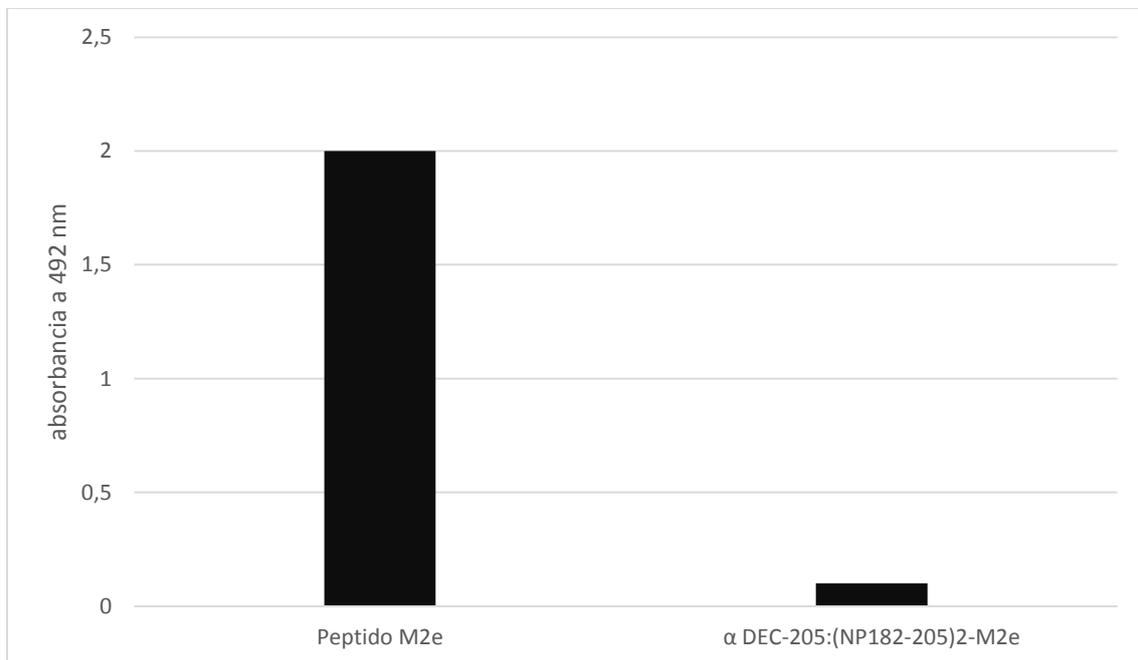


Figura 13. Ensayo de ELISA de captura para detectar la secuencia M2e en anticuerpo recombinante α-DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e. Placas de ELISA se cargaron con el anticuerpo recombinante, y con el péptido M2e como control positivo. Se utilizó como anticuerpo primario, el policlonal de conejo anti-M2e, posteriormente se adiciono el anticuerpo secundario cabra anti IgG de conejo HRP. Las placas se leyeron a 492 nm. El resultado no muestra la detección del fragmento M2e en el anticuerpo recombinante.

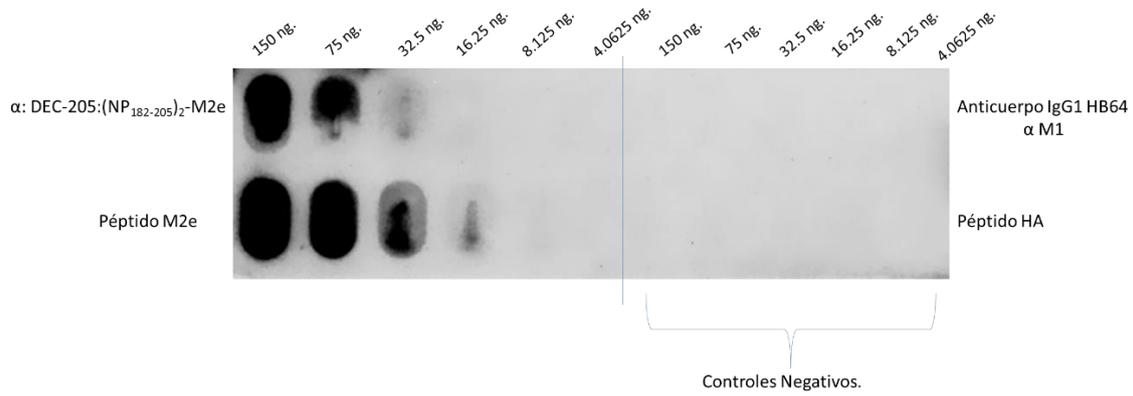
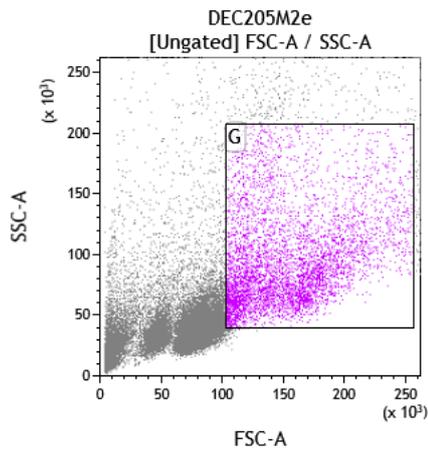
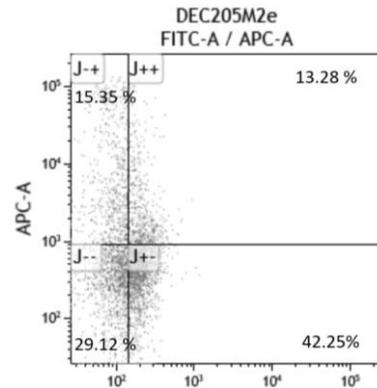


Figura 14. Ensayo de dot blot para detectar la secuencia M2e en anticuerpo recombinante α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e. Se realizaron diluciones seriadas de los anticuerpos o los péptidos indicados en la figura en membranas de nitrocelulosa. La membrana se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-M2e y un anticuerpo policlonal de cabra anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa. La membrana se reveló por quimioluminiscencia y la señal se capturó en un lector Odyssey.

A)



B)



C)

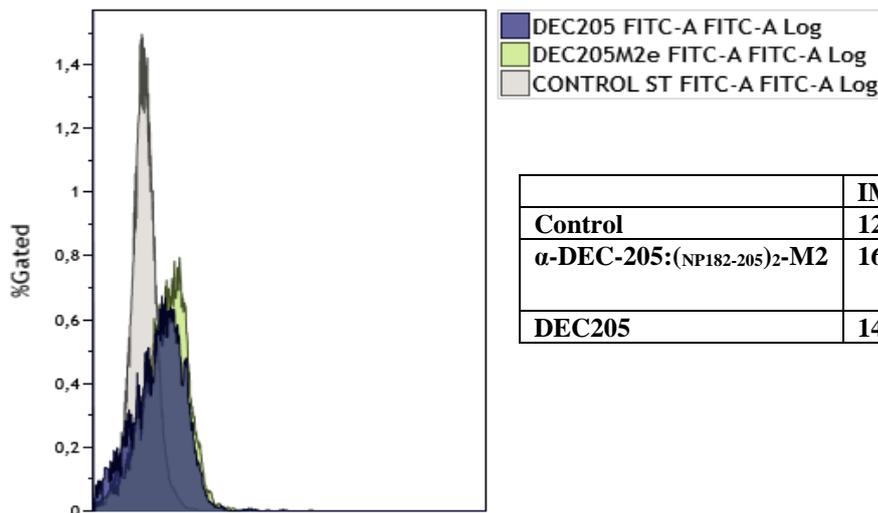


Figura 15. Reconocimiento del anticuerpo α -DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2 expresado en células HEK 293 transfectadas, sobre células dendríticas de bazo. A) Dot plot de tamaño y granulosidad de células obtenidas de bazo de ratón sano donde se muestra el *gate* sobre células que expresan CD11 y DEC205. B) Dot plot del *gate* sobre células totales de bazo. En FITC se muestra la tinción para DEC505M2e y en APC CD11c como marcador de CD. C) IMF del anticuerpo monoclonal anti-DEC205M2e sobre las células dendríticas de bazo, IMF del anticuerpo DEC205 sobre células dendríticas de Bazo.

VIII.- DISCUSIÓN

La influenza estacional es causante de aproximadamente 500,000 mil muertes anuales en todo el mundo y existe un peligro constante que surjan cepas pandémicas más letales [25, 27, 28]. A pesar de contar con vacunas disponibles contra esta infección, su eficacia depende de la exactitud en la selección de las cepas del virus influenza circulantes cada año, además de que estas vacunas muy probablemente no son eficaces con las cepas pandémicas. Por esta razón, en años recientes se ha propuesto generar vacunas “universales” contra esta infección basadas en proteínas individuales del virus [1, 2, 3, 6, 19, 21].

La proteína M2 está sumamente conservada en todas las cepas conocidas del virus influenza y su región extramembranal de 24 aa M2e es capaz de inducir respuestas heterotípicas contra este virus [2, 4, 20, 47]. Sin embargo, M2e es poco inmunogénica, por lo que se buscan estrategias innovadoras que mejoren su inmunogenicidad [16, 25]. En un trabajo previo de nuestro laboratorio [48] se encontró que ratones inmunizados con un anticuerpo monoclonal de rata contra DEC-205 de ratón, presente en la membrana de las CD, entrecruzado bioquímicamente con el péptido M2e, presentaron niveles altos de anticuerpos heterosubtípicos protectores contra la infección por virus influenza. Los títulos de anticuerpos fueron al menos 40 veces superiores a los inducidos con M2e sin entrecruzar o un anticuerpo control de isotipo entrecruzado a M2e. Sin embargo, el método de entrecruzamiento bioquímico resultó ser ineficiente ya que el péptido entrecruzado representaba solamente del 4 al 10 % de la masa total del conjugado [48]. De esta manera; en este trabajo se planteó fusionar la secuencia M2e a la cadena pesada del anticuerpo anti-DEC-205 para poder producir *in vitro* en células transfectadas anticuerpos recombinantes que tuvieran en su totalidad el antígeno fusionado. Esto facilitaría tener material suficiente para realizar los estudios de inmunogenicidad futuros. Por otro lado, para tratar de potenciar aún más la inmunogenicidad de M2e dirigida a DEC-205, se planteó fusionar la cadena pesada del anticuerpo con dos repeticiones de un epítipo de células Th específicas para la NP de influenza, seguidos por la secuencia M2e.

La secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e (con el conector OLLAS entre los péptidos de NP y NP-M2e) se clonó en la región carboxi-terminal del gen de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal NLDC-145 de rata anti-DEC-205 de ratón a la cual se le sustituyó la región constante de rata por la región constante de IgG1 de ratón. Como control de isotipo, (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e fue clonado en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de rata 111-

10 específico para nitrofenol (NP) ^[23] (molécula inexistente en el ratón), a la cual también se le sustituyó la región constante. Para ambas construcciones, se logró obtener al menos una colonia bacteriana transformada. Cuando el DNA plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción Xho I y HindIII ambas construcciones generaron un fragmento de 300 pb en la orientación adecuada, lo que sugería que (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e fue correctamente insertado. Esto se corroboró cuando se secuenció este fragmento en los plásmidos ya que se obtuvo un 100 % de identidad en nucleótidos y aa en comparación con la secuencia teórica.

Para montar las condiciones óptimas de transfección de las células HEK-293 para producir anticuerpos recombinantes, se utilizaron los plásmidos que codifican para la cadena ligera y pesada recombinante del anticuerpo anti-DEC-205. Para esto, las células HEK-293 se co-transfectaron con ambos plásmidos a diferentes radios y usando diferentes medios sin suplementar y suplementados y después de 7 a 10 días posteriores a la transfección, se colectaron los sobrenadantes y el contenido del anticuerpo recombinante se evaluó por un ensayo de ELISA de captura. Como controles positivos, las células HEK-293 se co-transfectaron con plásmidos que codifican para los anticuerpos anti-DEC-205:OVA o anti-DEC-205:E5, que en trabajos previos se demostró que se producirán en niveles adecuados. Bajo todas las condiciones evaluadas, el anticuerpo recombinante anti-DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e se produjo en cantidades mínimas, dando lecturas de absorbancia un poco superiores al control. Sin embargo, tanto anti-DEC-205:OVA o anti-DEC-205:E5 presentaron absorbancias hasta 5 veces mayores. Cuando la producción de anti-DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e se escaló en cajas Petri de 100 mm de diámetro solamente se produjeron 10 µg de anticuerpo por caja, lo que corroboró lo observado en los experimentos piloto.

No es claro porque el anticuerpo recombinante es producido tan ineficientemente por las células HEK-293, pero es posible que la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e pudiera alterar la transcripción del RNAm o la traducción de este. Otra posibilidad es que el anticuerpo recombinante no se pliegue apropiadamente en el retículo endoplásmico y sea degradado. El posible efecto negativo de la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e se corroboró cuando se escaló la producción del anticuerpo recombinante isotipo: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e ya que de 3 placas Petri se obtuvieron solamente 3.6 µg. En trabajos futuros sería importante evaluar la transfección de otras células de humano usadas para la producción de anticuerpos

recombinantes, como las células CHO y determinar si la baja producción de estos anticuerpos se mantiene o se mejora.

Los anticuerpos recombinantes purificados anti-DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e e isotipo: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e fueron usados para determinar si efectivamente expresaban la secuencia (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e. Por medio de un gel de acrilamida en condiciones reductoras, se encontró que las cadenas pesadas tenían un tamaño molecular de aproximadamente 55 kDa, en comparación con la cadena pesada no fusionada del anticuerpo monoclonal de rata anti-DEC-205 que mostró un tamaño de 50 kDa. El tamaño teórico de la cadena pesada fusionada es de 55.59 kDa, por lo que podemos afirmar que entra dentro del rango de lo esperado. Este resultado también indica que ambas cadenas pesadas de los anticuerpos recombinantes están fusionadas con (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e. La presencia de (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e en los anticuerpos recombinantes se corroboró de manera indirecta en un ensayo de dot blot usando un anticuerpo policlonal de conejo contra el péptido M2e. Ya que al menos el anticuerpo anti-DEC-205:(NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e fue reconocido eficientemente por este anticuerpo policlonal.

Para realizar trabajos futuros de inmunización de ratones, utilizando el anticuerpo anti-DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e; con el objetivo de inducir una respuesta inmune protectora contra la infección por influenza; es importante demostrar que el anticuerpo recombinante mantiene su especificidad hacia el receptor DEC-205 presente en las células dendríticas. Por medio de citometría de flujo, se encontró que efectivamente el anticuerpo anti-DEC-205: (NP₁₈₂₋₂₀₅)₂-M2e mantiene su especificidad hacia DEC-205, ya que tiñó las células dendríticas de bazo de ratón al mismo nivel que el anticuerpo de rata anti-DEC-205.

IX.- CONCLUSIÓN

Se lograron generar plásmidos que codifican para la cadena pesada de los anticuerpos anti-DEC-205 y su control de isotipo fusionadas a la secuencia $(NP_{182-205})_2$ -M2e. La co-transfección de estos plásmidos, junto con un plásmido que codifica para la cadena ligera; en células HEK-293 produce anticuerpos recombinantes fusionados a la secuencia $(NP_{182-205})_2$ -M2e, que en el caso del anticuerpo anti-DEC-205: $(NP_{182-205})_2$ -M2e no modifica su especificidad hacia DEC-205. Sin embargo, los niveles de producción fueron muy bajos por lo que sería necesario escalar considerablemente la producción para obtener cantidades de anticuerpos recombinantes suficientes para realizar inmunizaciones en ratones. Alternativamente, sería necesario en futuros experimentos evaluar la eficiencia de producción en otras líneas celulares humanas.

X.- PERSPECTIVAS

1. Evaluar diferentes estrategias de transfección que permitan el aumento en la síntesis de los anticuerpos recombinantes.
2. Utilizar otras líneas celulares de humano, como las células CHO, para intentar incrementar la síntesis de los anticuerpos recombinantes.
3. Producir cantidades suficientes de los anticuerpos, con el objetivo de realizar ensayos de inmunización en el modelo murino.

XI. - LITERATURA CITADA

- 1.- Cao, R.G.2014. *Differences in antibody responses between trivalent inactivated influenza vaccine and live attenuated influenza vaccine correlate with the kinetics and magnitude of interferon signaling in children.* J infect Dis. 210(2): 224-33.
- 2.- El, B. K., F. Descamps, F. M. De, A.Smet, E.Festjens, A. Birkett, R. N. Van, S Verbeek, W. Fiers, y X. Saelens. 2011. *Universal vaccine base on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection.* J. immunol. 186: 1022-1031.
- 3.- Fan, X., y col. 2014. *Targetin the HA2 subunit of influenza A virus Hemagglutinin via CD40L provides universal protection against diverse subtypes.* Mucosal Immunol.
- 4.- Gao, X., y col. 2013. *Enhanced Influenza VLP vaccine comprising matrix-2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge.* Antiviral Res. 98(1): 4-11.
- 5.- Hu, W. 2013. *Fully human broadly neutralizing monoclonal antibodies against influenza A virus generated from the memory B cells of a 2009 pandemic H1N1 influenza vaccine recipient.* Virology. 435(2): 320-8
- 6.- Huleatt, J. W., V. Nakaar, P. Desai, Y. Huang, D. Hewitt, A. Jacobs, J. Tang, W. McDonald, L.Song, R. K. Evans, S. Umlauf, L. Tussey, y T. J. Powell. 2008. *Potent immunogenicity and efficacy of universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin.* Vaccine. 27: 201-2014.
- 7.- Hensley, S.E., y col.2009. *Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift.* Science. 326 (5953): 734-6.
- 8.- Jegerlenher, A., N. Schmitz, T. Storni, y F. M. Bachmann. 2004. *Influenza A vaccine base on the extracellular domain of M: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity.* J. immunol. 172: 5598-5605.
- 9.- Kim, M. C., J. M. Song, OE, Y. M. Kwon, Y. J. Lee, R. W. Compans, y S. M. Kang. 2013. *Virus- Like Particles containing multiple M2 extracellular domains confer*

improved cross-protection against various subtypes of influenza virus. Mol. Ther. 21:485-492.

10.-Kim, M. C., J. S. Lee, Y. M. Kwon, OE, Y. J. Lee, J. G. Choi, B. Z. Wang, R. W. Compans, y S. M. Kang. 2013. *Multiple Heterologous M2 extracellular domains presente on virus-like particles confer broader and stronger M2 immunity than live influenza A virus infection. Antiviral Res.* 99: 328-335.

11.- Kim; S. H., y col. 2013. *Mucosal vaccination with recombinant adenovirus encoding nucleoprotein provides potent protection against Influenza virusinfection. PLoS One.* 8(9): e75460.

12.- Long, J. X., Q. Z. Wang, J.H. Lu, Y. L. Liu, y X. F. Liu. 2005. *Cloning of full-lenght genes of H5N1 subtype avian influenza virus strain A/duck/Shandong/093/2004 and analysisof the sequences. Wei Sheng Wu Xue. Bao.* 45: 690-696.

13.-Ma., J.H., y col. 2013. *An M2e-based syntheticpeptide vaccine for influenza A virus confers Heterosubtypic protection from lethal virus challene. Virol J.* 10: 227

14. - Medina, R. A., y col. 2013. *Glycosilatyons in the globular head of the hemagglutinin protein modulate the virulence and antigenic properties of the H1N1 influenza viruses. Sci Transl Med.* 5(518):187-70.

15. - Muramatsu. M., y col. 2013. *Heterosubtypic antiviral activity of Hemagglutinin-specific antibodies induced by intranasal immunization with inactivated influenza viruses in mice. PLoS One.* (8): p.e71534

16.-Nicole M. Boubier, y P. Palese. 2008. *The biology of influeza virases. Vaccine.* 26:49-53

17. - Palese P, Shaw M. L. 2007. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. Fields Virology,* 5th ed. Philadelphia, Williams and Wilkins.

18. - Pinto, L.H., L. J. Holsinger, y R. Lamb. 1992. *Influenza virus M2 protein has Ion channel activity. Cell.* 69: 517-528

19. - Price, G. E., y col. 2014. *Mucosal immunization with a candidate universal influenza vaccine reduces virus transmission in a mouse model. J Virol.* 88(11): 6019-30

- 20.-Song, J.M., B. Z. Wang, K. M. Park, R. N. Van, F. S. Quan, M. C. Kim, H. T. Jin, A. Pekosz, R. W. Compans, y S. M. Kang. 2011. *Influenza virus-like particles containig M2 induce broadly cross protective immunity*. PLoS one. 6: e14538.
- 21.-Wong, S. S. y R. J. Weby. 2013. *Traditional and New Influenza Vaccines*. Clin Microbiol Rev. 26(3) 476-92
22. - Zebedee, S. L., y R. A. Lamb. 1989. *Nucleotide sequences of influenza A virus RNA segment 7: a comparison of five isolate*. Nucleic Acid Res. 17: 2870.
- 23.- Bonifaz Laura C., B.D.P., Charalambousn Anna, Darguste Dara I., Fujii Shin-Ichiro, Soares Helena, Brimnes Marie K., Moltedo Bruno, Moran Thomas M., and Steinman Ralph M., 2004. *In Vivo targeting of antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 receptor improves T Cell Vaccination*. The Journal of Experimental Medicine. 6 (199): 815-824..
24. - Do, Y., et al., 2008. *Broad T cell immunity to the LcrV virulence protein is induced by targeted delivery to DEC-205/CD205-positive mouse dendritic cells*. Eur J Immunol. 38(1): p. 20-9.
25. - Florian Krammer, Gavin J. D. Smith, Ron A. M. Fouchier, Malik Peiris, Katherine Kedzierska, Peter C. Doherty, Peter Palese, Megan L. Shaw1, John Treanor, Robert G. Webster and Adolfo García- Sastre., 2018. *Influenza*. Nature reviews. (3)
26. Rosendahl Huber SK, Camps MGM, Jacobi RHJ, Mouthaan J, van Dijken H, van Beek J, et al. (2015) *Synthetic Long Peptide Influenza Vaccine Containing Conserved T and B Cell Epitopes Reduces Viral Load in Lungs of Mice and Ferrets*. PLoS ONE 10(6).
27. - Rambaut, A. et al. 2008. *The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus*. Nature 453, 615–619.
28. - Russell, C. A. et al 2008. *The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses*. Science 320, 340–346.

29. - Reis e Sousa C. 2004. *Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls*. *Seminars in immunology*, 16 (1): 27-34
- 30.- Pandey S, A. D., 2006. *Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends*. *Immunol Cell Biol*. 84 (4): p. 333-41.
31. - Kagan JC, M. V., and Wu H. 2014, *SMOCs: Supramolecular organizing centres that control Innate Immunity*. *Nat Rev Immunol*. 14 (12): p821-6
32. - Wilkins C, G.M.J., 2010, *Recognition of viruses by cytoplasmic sensors*. *Current Opinion in Immunology*. 22 (1): p41-7
- 33.- Takeuchi Osamu, A. S., 2008. *Recognition of viruses by innate immunity*. *Immunological Reviews*. 220: p. 214-224.
- 34.- Amanna, I.J., Carlson N.E. and Slifka, M. K. 2007. *Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens*. *New Engl. J. Med.*, (357): p 1903-1915.
- 35.- Matis, L., 1990. *The molecular basis of T-cell specificity*. *Annu Rev Immunol*. 8:p 65-82.
- 36.- Swain SL, M.K., Strutt TM, 2012. *Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses*. *Nat Rev Immunol*. 12 (2): p 136-48.
- 37.- Nussenzweig MC, S.R., Unkeles JC, Witmer MD, Gutchinov B.19981. *Studies of the cell surface of mouse dendritic cells*. *Natl Acad Sci USA*.154: p168-187.
- 38.- Androlewicz MJ, A.K., Creswell P., 1993. *Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: p. 9130-9134.
- 39.- Nussenzweig MC, S.R., Witmer MD, Gutchinov B. 1982. *A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells*. . *Natl Acad Sci USA*. 79: p 161-165

- 40.- Savina A., a., Amigorena S., 2007. *Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells*. Immunol Rev., 219: p 143-156
- 41.- Mibayashi, M. et al. 2007. *Inhibition of retinoic acid inducible gene I- mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus*. J. Virol. 81: p 514–524.
- 42.- Sun, J. C. & Bevan, M. J., 2003. *Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help*. Science **300**: p 339–342.
- 43.- McKinstry, K. K. et al., 2012. *Memory CD4+ T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms*. J. Clin. Invest. **122**: p 2847–2856.
- 44.- Smith, W., Andrewes, C. H. & Laidlaw, P. P., 1933. *A virus obtained from influenza patients*. Lancet 222: p 66–68.
- 45.- Manon M. J. Cox, Ruvim Izikson, Penny Post, Lisa Dunkle., 2015. *Safety, efficacy, and immunogenicity of Flublok in the prevention of seasonal influenza in adults*. Ther Adv Vaccines. 3(4): 97–108.
- 46.- O. Badillo-Godinez, L. Gutierrez-Xicotencatl, T. Plett-Torres, A. Pedroza-Savedra, A. Gonzalez-Jaimes, L. Chihu-Ampan, M. Maldonado-Gama, G. Espino—Solis, L.C.Bonifaz, F. Esquivel-Guadarrama. 2015. *Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice*. Vaccine. 33: p 4228-4237.
- 47.- Min-Chul Kim, Jae-Min Song, Eunju O, Young-Man Kwon, Youn-Jeong Lee, Richard W Compans and Sang-Moo Kang.2012. *Virus-like Particles Containing Multiple M2 Extracellular Domains Confer Improved Crossprotection against Various Subtypes of Influenza Virus*. Molecular Therapy. 21 (2): p 485–492.

48.- H.O. Padilla-Quirarte a, O. Badillo-Godinez, L. Gutierrez-Xicotencatl , Y. Acevedo-Betancur, J.D. Luna-Andon, J.L. Montiel-Hernandez, D.V. Lopez-Guerrero, F. Esquivel-Guadarrama. 2019. *Targeting M2e to DEC-205 induces an enhanced serum antibody-dependent heterosubtypic protection against influenza A virus infection*. *Vaccine*. 37: p 2624-2633



"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., 20 de mayo de 2019.

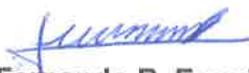
Dr. David Martínez Duncker Ramírez
Director
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Producción y caracterización de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-DEC-205 fusionado con antígenos conservados del virus influenza**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Emmanuel Ayala Guzmán. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e



Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama



"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., 20 de mayo de 2019.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez
Director
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **"Producción y caracterización de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-DEC-205 fusionado con antígenos conservados del virus influenza"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Emmanuel Ayala Guzmán. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e



Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., 20 de mayo de 2019.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez
Director
Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **"Producción y caracterización de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-DEC-205 fusionado con antígenos conservados del virus influenza"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Emmanuel Ayala Guzmán. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen l se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e



Dr. José Luis Montiel Hernández