



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**  
**Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y**  
**Aplicadas**

**“Producción y caracterización de anticuerpos  
monoclonales quiméricos anti *Klebsiella pneumoniae* y  
*Enterobacter cloacae*”**

**TESIS**  
QUE PRESENTA:

**MARÍA GUADALUPE FLORES HERNÁNDEZ**

**Para obtener el Grado de  
LICENCIADO EN CIENCIAS**

**Área Terminal Bioquímica y de Biología Molecular**

**Director de Tesis:**

**Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa**

**(Instituto Nacional de Salud Pública, INSP)**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**ENERO, 2021**

## **Miembros de comité tutorial**

Presidente: Dra. Angélica Santana Calderón  
(Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

Secretario: Dra. Verónica Narváez Padilla  
(Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

Vocal: Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa  
(Instituto Nacional de Salud Pública, INSP)

Suplente 1: Dra. Sonia Dávila Ramos  
(Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

Suplente2: Dr. Ramón Antonio González García Conde  
(Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

## INDICE

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
2.1 Antibióticos y resistencia a los antimicrobianos .....	2
2.1.1 Mecanismos de acción de los antibióticos .....	2
2.1.2 Resistencia a los antibióticos.....	2
2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	4
2.2.1 Etiología.....	5
2.2.2 Epidemiología.....	7
2.3 <i>Enterobacter cloacae</i> .....	7
2.3.1 Epidemiología .....	7
2.3.2 Etiología.....	8
2.4 Alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones bacterianas.....	9
2.5 Sistema inmune .....	9
2.6 Linfocitos B.....	10
2.7 Anticuerpos.....	11
2.6.1 Mecanismos de generación de diversidad de los anticuerpos .....	13
2.7.1 Función de los anticuerpos .....	14
2.8 Anticuerpos monoclonales terapéuticos antibacterianos .....	15
2.9 El análisis bioinformático para el desarrollo de mAbs .....	16
2.10 Producción de anticuerpos monoclonales.....	17
<b>3. Antecedentes</b> .....	17
<b>4. Justificación</b> .....	19
<b>5. Hipótesis</b> .....	20
<b>6. Objetivos</b> .....	20
<b>6.1 Objetivo general</b> .....	20
<b>6.2 Objetivos específicos</b> .....	20
<b>7 Metodología</b> .....	20
<b>7.1 Reacciones de PCR para amplificar los fragmentos VK</b> .....	20
7.1.1 Diseño de oligonucleótidos .....	21
7.1.2 Purificación de los productos de PCR .....	21
7.1.3 Reacciones de digestión y ligación .....	21
7.1.4 Transformación bacteriana por el método de electroporación.....	22

7.1.5	PCR de colonia .....	23
7.1.6	Purificación y digestión del ADN plasmídico (ADNp) .....	23
7.1.7	Preparación de muestras para secuenciación .....	24
7.1.8	Glicerolés.....	24
7.1.9	Purificación de ADNp libre de Endotoxinas (Endofree).....	24
7.2	Expresión de anticuerpos recombinantes .....	25
7.2.1	Descongelamiento de células HEK293T .....	26
7.2.2	Transfección de las células HEK293T .....	26
7.2.3	Cosecha de anticuerpo .....	26
7.2.4	Evaluación de la producción de anticuerpos por medio de Western-Blot (WB).....	27
7.2.5	Purificación de anticuerpos.....	28
7.3	Cuantificación de proteínas por el método de BCA.....	28
<b>8</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>29</b>
8.1	Generación de construcciones para expresar anticuerpos.....	29
8.1.1	Amplificación de los fragmentos variables de cadena ligera Kappa .....	31
8.1.2	Diseño de oligonucleótidos .....	31
8.1.3	Digestión de los fragmentos VK´s con enzimas <i>EcoRI</i> y <i>BstAPI</i> .....	32
8.1.4	Selección de clonas positivas por PCR de colonia.....	34
8.1.5	Verificación de las construcciones mediante digestiones enzimáticas.....	36
8.1.6	Secuenciación de las construcciones pBROS- CLlgmk-VK´s.....	37
8.1.7	Purificación de ADNp libre de endotoxinas .....	40
8.2	Producción de anticuerpos recombinantes .....	41
8.2.1	Transfección de células HEK293 para producción de anticuerpos.....	41
8.2.2	Western blot de sobrenadante de células transfectadas .....	43
8.2.3	Purificación de anticuerpos.....	46
8.2.4	Western blot de anticuerpos purificados.....	47
8.2.5	Producción de anticuerpos a mayor escala .....	50
8.3	Cuantificación por el método de BCA .....	50
8.4	Ensayo de precipitación de anticuerpos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	52
<b>9</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>Conclusiones y perspectivas futuras</b> .....	<b>58</b>
<b>11</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>59</b>

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra bacterias patógenas

Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos

Tabla 3. Concentraciones de las construcciones pBROS- CLlgmk-VK's

Tabla 4. Combinación de construcciones de cadena pesadas y ligeras para la producción de anticuerpos y la proteína blanco

Tabla 5. Concentraciones de anticuerpos purificados

Tabla 6: Concentraciones de proteínas

Figura 1. Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae*

Figura 2. Representación de *Enterobacter cloacae*

Figura 3. Estructura de anticuerpo

Figura 4. Función de los anticuerpos

Figura 5. Representación del vector pBROS-CLlgmk

Figura 6. Electroforesis de los fragmentos VK'

Figura 7. Electroforesis de las digestiones de los fragmentos VK's y del vector pBROS-CLlgmk

Figura 8. Electroforesis de los PCR's de colonia

Figura 9. Electroforesis de los PCR's de colonia de construcción pBROS-CLlgmk

Figura 10. Electroforesis de las digestiones de las construcciones pBROS-CLlgmk -VK1(diferentes candidatas)

Figura 11. Análisis de la secuencia de nucleótidos de una de las seis construcciones pBROS- CLlgmk-VK's

Figura 12. Análisis de traducción de una de las construcciones

Figura 13. Análisis de secuenciación. A) Secuencia proporcionada del vector original PFUSE. B) Secuencia correspondiente del fragmento variable Kappa 2 humano

Figura 14. Transfección con GFP

Figura 15 y 16. Western blot de los anticuerpos recombinantes en sobrenadantes de células HEK293 transfectadas

Figura 17. Repetición de Western blot de los anticuerpos recombinantes en sobrenadantes de células HEK293 transfectadas.

Figura 18. Western blot de los anticuerpos recombinantes purificados

Figura 19. Western blot de los anticuerpos recombinantes purificados

Figura 20. Western blot de los anticuerpos recombinantes purificados a mayor concentración

Figura 21. Esquema de estrategia de purificación de anticuerpos y posibles puntos de intervención.

Figura 22. Electroforesis de los anticuerpos purificados, (A) flujos de anticuerpos purificados; (B) lavados de purificación de anticuerpos

Figura 23. Precipitación de los sobrenadantes con soluciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de distintas marcas

## 1. Resumen

La resistencia a antibióticos es uno de los principales problemas que se han estado presentando en el sector salud a nivel mundial. Entre las principales bacterias patógenas multiresistentes se encuentran: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y las Enterobacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.* En conjunto, estas bacterias son responsables de infecciones comunes graves asociadas a una gran mortalidad hospitalaria, elevando dramáticamente los costos de atención médica. Desafortunadamente, para la mayoría de estos patógenos, aún no se cuenta con vacunas. En este sentido, el desarrollo de alternativas terapéuticas, como los anticuerpos monoclonales, para tratar infecciones ocasionadas por estos patógenos resulta de gran importancia.

Mediante un enfoque de vacunología reversa y secuenciación masiva de regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos, en el grupo de investigación donde se desarrolla este trabajo, se identificaron anticuerpos monoclonales humanos específicos contra proteínas de membrana externa ampliamente conservadas entre las Enterobacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. El objetivo del presente trabajo se centra en la generación de anticuerpos monoclonales quiméricos (región variable humana - región constante murina) y la validación de su capacidad para unir a los antígenos bacterianos. La información obtenida en este trabajo nos permitirá seleccionar anticuerpos candidatos para evaluar su capacidad protectora *in vivo* en un modelo murino de infección sistémica por *Klebsiella pneumoniae* o *Enterobacter cloacae*.

## **2. Introducción**

### **2.1 Antibióticos y resistencia a los antimicrobianos**

#### **2.1.1 Mecanismos de acción de los antibióticos**

El uso de antibióticos es de gran importancia para combatir infecciones bacterianas, convirtiéndose en una de las intervenciones médicas más importantes para el desarrollo de enfoques médicos. Los antibióticos matan las bacterias (efecto bactericida) o impiden que crezcan (efecto bacteriostático). Los mecanismos de acción de los antibióticos se basan en (i) prevención de la síntesis de ADN o ARN, (ii) prevención de la síntesis de folato, bloqueando así la síntesis de ácidos nucleicos, (iii) destrucción de la pared celular/membrana y (iv) prevención de la síntesis de proteínas al interferir con la función de los ribosomas (Jansen et., al 2018).

La relevancia que los antibióticos tienen para la salud dependen del buen uso de los mismos. Desafortunadamente, el uso inadecuado de los antibióticos ha propiciado el surgimiento de bacterias patógenas multirresistentes. Este problema representa una grave amenaza para la salud pública a nivel global. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la multirresistencia bacteriana es una de las amenazas más importantes para la salud pública del siglo XXI (OMS, 2014).

#### **2.1.2 Resistencia a los antibióticos**

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos elaborados por bacterias contrarrestan la efectividad de los antibióticos. Los mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos por transferencia horizontal de plásmidos u otros elementos genéticos de las bacterias. Alternativamente, la resistencia puede ocurrir a través de transmisión vertical por mutaciones cromosómicas. Entre los mecanismos de

resistencia se incluyen enzimas que inactivan los antibióticos, la eliminación del antibiótico a través de bombas de eflujo. Alternativamente, el objetivo blanco del antibiótico puede modificarse para que el antibiótico ya no pueda unirse, también las bacterias pueden modificar su superficie celular para evitar la entrada de los antibióticos (Jansen *et al.*, 2018).

Los organismos resistentes a múltiples fármacos (MDR) provocan infecciones que se han asociado a un número elevado de mortalidad en comparación con bacterias que no son multirresistentes y con ello causan una carga económica, estimada en más de 20 mil millones de dólares por año solo en los EE. UU (Munita *et al.*, 2016). Según un informe publicado en una revisión de resistencia a los antimicrobianos, se estima que la resistencia a los antibióticos provocará alrededor de 10 millones de muertes al año en el año 2050, con una pérdida de aproximadamente 100 billones de dólares (AMR, 2014).

En abril del 2014, la OMS publicó el primer informe mundial sobre la multirresistencia a los antibióticos. En dicho informe se menciona que las bacterias multirresistentes: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y las Enterobacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp* son los patógenos que representan la mayor amenaza para la salud humana, destacándose las bacterias Gram negativas (OMS, 2014). Actualmente, la lista de bacterias patógenas multirresistentes prioritarias de la OMS son (OMS, 2017):

Prioridad 1: CRITICA

*Acinetobacter baumannii* (resistente a carbapenem), *Pseudomonas aeruginosa* (resistente a carbapenem), *Enterobacteriaceae* (resistente a carbapenem, productora de BLEE).

Prioridad 2: ALTA

*Enterococcus faecium* (resistente a vancomicina), *Staphylococcus aureus* (resistente a meticilina y vancomicina), *Helicobacter pylori* (resistente a

claritromicina), *Campylobacter* spp (resistente a fluoroquinolonas), *Salmonellae* spp (resistente a fluoroquinolonas), *Neisseria gonorrhoeae* (resistente a cefalosporina y fluoroquinolonas).

Prioridad 3: MEDIA

*Streptococcus pneumoniae* (resistente a penicilina), *Haemophilus influenzae* (resistente a ampicilina), *Shigella* spp (resistente a fluoroquinolonas).

En México, el problema de la resistencia a antibióticos se encuentra ampliamente documentada. Los antibióticos se encuentran entre los medicamentos que más se consumen en México. En la literatura se describen problemas sobre la prescripción y consumo de antibióticos en México. Investigaciones realizadas en las décadas de 1980 y 1990 concluyeron que entre un 60 y 80% de pacientes con infecciones respiratorias agudas (IRAS) e infecciones gastrointestinales/diarreicas agudas (EDAS) recibían antibióticos, pero solo alrededor del 10 % de los casos la prescripción era justificable. Otros problemas de los antibióticos en México es la comercialización de medicamentos de baja calidad, falsificados y así afectando la efectividad del tratamiento y con ello llevando al desarrollo de la resistencia bacteriana (Dreser *et al.*, 2008).

Dentro de la familia Enterobacteriaceae se encuentran las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobater cloacae*. En este trabajo de investigación se abordarán estas dos bacterias.

## 2.2 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* es un bacilo Gram negativo, inmóvil, anaerobio facultativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae y puede encontrarse en todas partes de la naturaleza (agua, suelo y animales). Estas bacterias son comunes en la flora gastrointestinal de los seres humanos y de otros vertebrados. Sin embargo, son patógenos oportunistas capaces de colonizar las mucosas de personas con el

sistema inmune debilitado y posteriormente pueden diseminarse a diferentes tejidos causando infecciones mortales como neumonía, infecciones urinarias, infecciones hepato-biliares, y sepsis (Paczosa y Meccas, 2016). Actualmente, se considera que *K. pneumoniae* es responsable de más del 70% de infecciones intrahospitalarias de origen bacteriano (Plusa, 2019).

Esta bacteria fue descrita por primera vez por Carl Friedlander en 1882, quien la aislo de muestras de pulmón de pacientes que habían fallecido de neumonía (Ashurst y Dawson, 2019). *K. pneumoniae* se ha convertido en una bacteria de gran relevancia clínica debido al creciente número de cepas resistentes a distintos tipos de antibióticos como: cefalosporinas, fluroquinolonas y aminoglucósidos. En este sentido, se considera que las especies del genero *Klebsiella* son un reservorio de genes que confieren resistencia a los antibióticos y que pueden propagarse a otras bacterias Gram negativas (Ashurst y Dawson, 2019).

### 2.2.1 Etiología

La virulencia de *K. pneumoniae* se caracteriza por diversos factores: 1) la capsula de polisacáridos protege al microorganismo de la fagocitosis por parte de los leucocitos polimorfonucleares; 2) las fimbrias le permiten al patógeno unirse a las células epiteliales y endoteliales del huésped; y 3) la presencia de sideroforos determinantes para la adquisición de hierro (Paczosa y Meccas, 2016) (figura 1).

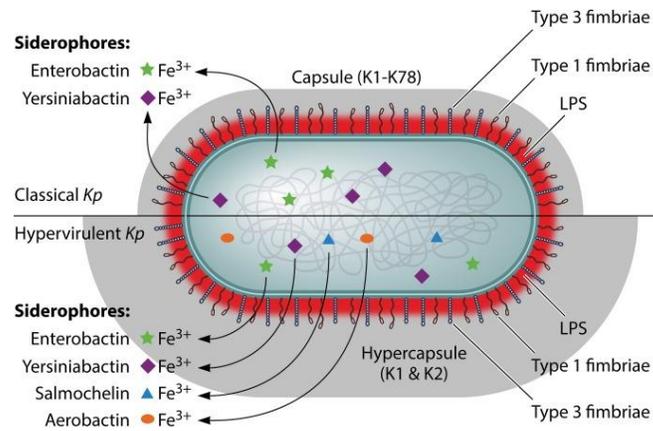


Figura.1. Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae* (tomado de Paczosa y Meccas, 2016).

*K. pneumoniae* ha desarrollado estrategias para evadir el sistema inmune y sobrevivir en su huésped (Bengoechea y Pessoa, 2019). Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que la neumonía causada por *Klebsiella* está caracterizada por altos niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Esta citocina es expresada por gran parte de las células del sistema inmune y tiene un impacto en muchos tipos celulares que controlan la activación de la respuesta inmune innata. Se sugiere que *K. pneumoniae* explota la IL-10 atenuando la respuesta inmune causando una bacteriemia y con ello una mortalidad acelerada (Dolgachev *et al.*, 2014). La defensa del huésped contra el patógeno depende de algunas células del sistema inmune como los macrófagos y neutrófilos. Sin embargo, en la infección por *Klebsiella* se ha demostrado que la actividad de estas células es suprimida a través de la IL-10 al inhibir la producción de interferón gamma, IL-2, IL12 e IL18. La capacidad de la IL-10, al atenuar la producción de citocinas proinflamatorias, resulta desventajoso para el huésped ya que reduce su capacidad para eliminar la neumonía bacteriana (Dolgachev *et al.*, 2014).

### 2.2.2 Epidemiología

El reservorio principal de *K. pneumoniae* son los humanos. Se calcula que del 5% al 38% de las personas portan la bacteria en el tracto gastrointestinal y del 1% al 6% en la nasofaringe. En años recientes se ha documentado ampliamente la presencia de esta bacteria en pacientes hospitalizados, particularmente en pacientes inmunosuprimidos. Además, se especula que estos elevados niveles de infección causados por *K. pneumoniae* están relacionados con el uso de antibióticos de amplio espectro que se administran en los hospitales (Ashurst y Dawson, 2019).

### 2.3 *Enterobacter cloacae*

*Enterobacter cloacae* es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae y que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, es posible localizarlo en plantas, tierra y animales (figura 2). Particularmente en el humano, *E. cloacae* forma parte de la microbiota normal, sin embargo, pueden actuar como un patógeno oportunista en pacientes hospitalizados causando infecciones en el tracto respiratorio, urinario y en las meninges (Mezzatesta *et al.*, 2012). Se ha descrito que *E. cloacae* tiende a contaminar dispositivos utilizados en hospitales (Mezzatesta *et al.*, 2012). Recientemente esta bacteria ha cobrado gran importancia clínica debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos como: carbapenémicos (una de las últimas opciones terapéuticas), penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación. Por medio de estudios clínicos y genómicos, se ha demostrado que *E. cloacae* tienen capacidad para adquirir genes que codifican mecanismos de resistencia a distintos antibióticos (Annavajhaka *et al.*, 2019).

#### 2.3.1 Epidemiología

*E. cloacae* es una bacteria oportunista que causa infecciones nosocomiales. Esta bacteria es responsable del 5% de sepsis, 5% de neumonías nosocomiales, 4% de

infecciones del tracto urinario y 10% de peritonitis post-quirúrgica (Pauu y Caspers, 2008).

### 2.3.2 Etiología

Los factores de virulencia y el mecanismo de patogenicidad de esta bacteria no se encuentran muy bien descritos. Sin embargo, se sabe que *E. cloacae* es capaz de producir varias endotoxinas que podrían poseer propiedades patogénicas y ser consideradas como factores de virulencia. Según Barnes y colaboradores (1997), después de que la bacteria se adhiere a las células epiteliales, producen diferentes factores de virulencia como las enterotoxinas y las citotoxinas formadoras de poros. Otro factor de virulencia que podría tener *E. cloacae* es el sistema de secreción tipo III (TTSS) característico de las bacterias patógenas Gram negativas (Krzminska *et al.*, 2009). En un estudio publicado en el 2009, se demostró que los genes que codifican para el TTSS estaban presentes en el 27% de las cepas de *E. cloacae* aisladas de muestras clínicas; sugiriendo que el TTSS podía estar involucrado en la patogénesis de esta bacteria (Krzminska *et al.*, 2009).

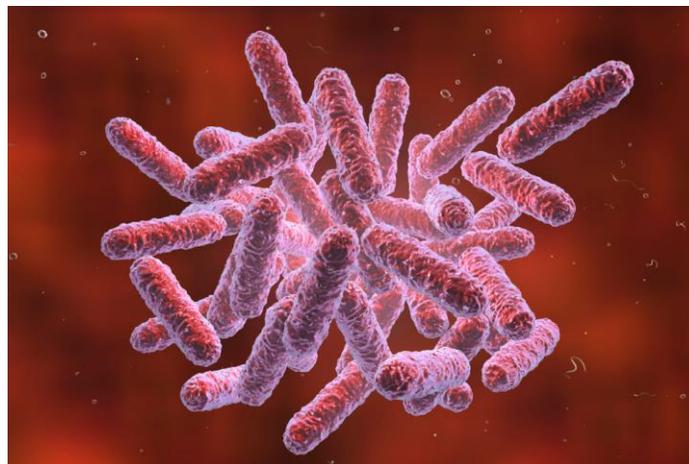


Figura 2: Enterobacter cloacae (tomada de [https://www.std-gov.org/blog/wp-content/uploads/2018/06/Enterobacter\\_Cloacae3.jpg](https://www.std-gov.org/blog/wp-content/uploads/2018/06/Enterobacter_Cloacae3.jpg))

## 2.4 Alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones bacterianas

Ante la problemática de la resistencia bacteriana se han buscado alternativas para combatir infecciones causadas por bacterias multirresistentes. Ejemplos de estas estrategias son las siguientes: 1) Los fagos líticos son una alternativa novedosa debido a que poseen un potencial terapéutico gracias a que son capaces de infectar y matar de manera específica a su bacteria hospedera. Está ampliamente reportado que los fagos no presentan ningún riesgo para la salud animal y humana, inclusive podrían ser utilizados en personas con el sistema inmune debilitado, a diferencia de lo que ocurre con algunos antibióticos (Orrero, 2015). 2) Los péptidos antibacterianos han sido señalados como una alternativa al uso de antibióticos, sobre todo los que son de origen sintético. Algunos péptidos antimicrobianos ya se encuentran en fases clínicas de estudio (Brogden y Brogden, 2011). El mecanismo de acción de los péptidos depende de cada especie de bacteria, pero en general actúan permeabilizando la membrana y alterando las funciones del DNA y de algunas proteínas (Brogden, 2005). 3) Las vacunas son consideradas como una herramienta sumamente importante para mitigar la resistencia bacteriana. La función de las vacunas es entrenar al sistema inmunitario (generar memoria inmunológica) contra el patógeno (Lipsitch y Siber, 2016). Actualmente se encuentran en pruebas clínicas vacunas candidatas contra *S. aureus* grupo B *Streptococcus sp*, y *E. coli* (Jansen *et al.*, 2018). 4) Los anticuerpos monoclonales han sido de gran importancia clínica en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades incluyendo infecciones bacterianas. La ventaja de los anticuerpos monoclonales es su capacidad de unirse a objetivos bacterianos específicos (Oleksiewicz *et al.*, 2012). Los anticuerpos, también llamadas inmunoglobulinas (Ig), son proteínas que forman parte esencial del sistema inmune.

## 2.5 Sistema inmune

El sistema inmunitario consiste en un conjunto de células y moléculas responsables de la inmunidad, por lo tanto, su función es la defensa contra microorganismos extraños como bacterias, virus, hongos, etc. Dicha defensa está mediada por respuestas tempranas de la inmunidad innata y respuestas tardías de la inmunidad adaptativa (Abbas *et al.*, 2008). La inmunidad innata también conocida como la primera línea de defensa está constituida por barreras físicas y químicas como el epitelio, células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas y linfocitos NK; proteínas componentes del sistema del complemento y mediadores de la inflamación (Abbas *et al.*, 2008). Cuando el organismo no logra combatir al microorganismo extraño en la primera línea de defensa surge la respuesta inmune adaptativa como respuesta a la infección. El sistema inmune adaptativo reconoce un gran número de sustancias microbianas, la particularidad de la inmunidad adaptativa es la capacidad de distinguir diferentes sustancias y por lo tanto se dice que tiene especificidad. Por otra parte, la capacidad de responder a exposiciones repetidas del mismo microbio se le conoce como memoria inmunológica. Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T (inmunidad celular) y los linfocitos B capaces de producir anticuerpos (inmunidad humoral) (Abbas *et al.*, 2008).

## 2.6 Linfocitos B

Los linfocitos B son las células responsables de la producción y secreción de anticuerpos capaces de reconocer un amplio repertorio de antígenos. Durante las etapas tempranas de su desarrollo, previa a la producción de anticuerpos, las células B presentan en su superficie a las moléculas de anticuerpo ancladas a membrana que funcionan como receptores de membrana (BCR). Estos receptores tienen una alta capacidad de reconocimiento de antígenos. Durante su desarrollo, los linfocitos B, procedentes de médula ósea, salen a circulación para alojarse en órganos linfoides secundarios (Kuby *et al.*, 2007). Si durante su trayectoria un

linfocito B se encuentran con un antígeno capaz de unirse a su BCR, éstos linfocitos B serán seleccionados para completar su maduración y activación en órganos linfoides secundarios. Estos procesos culminan con la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno en cuestión (Rabinovich, 2004). Además de la producción de anticuerpos, las células B tienen un papel fundamental como células presentadoras de antígeno, habilidad que permite la activación de linfocitos ThCD4+ y recibir señales de estas células, que les permiten la maduración por afinidad a los anticuerpos y el cambio de isotipo (Kuby *et al.*, 2007).

## 2.7 Anticuerpos

Los anticuerpos son glucoproteínas que se producen en respuesta a una sustancia extraña (antígeno) y que poseen la capacidad de unirse de manera específica a un determinante antigénico dando como consecuencia la activación de una serie de mecanismos que provocan la eliminación del elemento externo (Abbas *et al.*, 2008). Estructuralmente los anticuerpos tienen una estructura simétrica compuesta por dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H), ambas idénticas (figura 3). Las cadenas L y H constan de regiones amino terminales variables (V), y de regiones carboxilo terminales constantes (C). Las regiones V participan en el reconocimiento y unión al antígeno, y se les conoce como región Fab (antigen binding Fragment); mientras que las regiones C median funciones efectoras y se les llaman regiones Fc (crystallizable Fragment) (Abbas *et al.*, 2008). Como se mencionó antes, la interacción de regiones VH y VL conforman la zona de unión al antígeno, llamada idiotipo. Esta zona consta de tres regiones hipervariables conocidas como regiones determinantes de complementaridad (CDR1, CDR2 y CDR3), donde el CDR3 es la superficie que generalmente tiene mayor interacción con el antígeno. Las regiones del antígeno a las que se une el anticuerpo son denominadas epítopos (Abbas *et al.*, 2008). Finalmente, y como se mencionó antes, las cadenas ligeras de los anticuerpos pueden ser de tipo Kappa o Lambda; mientras que el caso de las

cadena pesada, en el humano se han determinado cinco clases denominadas isotipos IgA, IgE, IgD, IgG e IgM. Cada isotipo le confiere a los anticuerpos propiedades efectoras distintas. El anticuerpo de isotipo IgA actúan como los principales mediadores de la inmunidad de la mucosa; los anticuerpos de isotipo IgE actúan en defensa contra parásitos helmintos y son la principal clase de anticuerpos en las respuestas alérgicas; los isotipos IgD son receptores para el antígeno del linfocito B virgen; el isotipo IgG tiene como función la activación del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, inmunidad neonatal; los anticuerpos de isotipo IgM son receptores para el antígeno del linfocito B virgen y activación de la vía clásica del complemento (Abbas *et al.*, 2008).

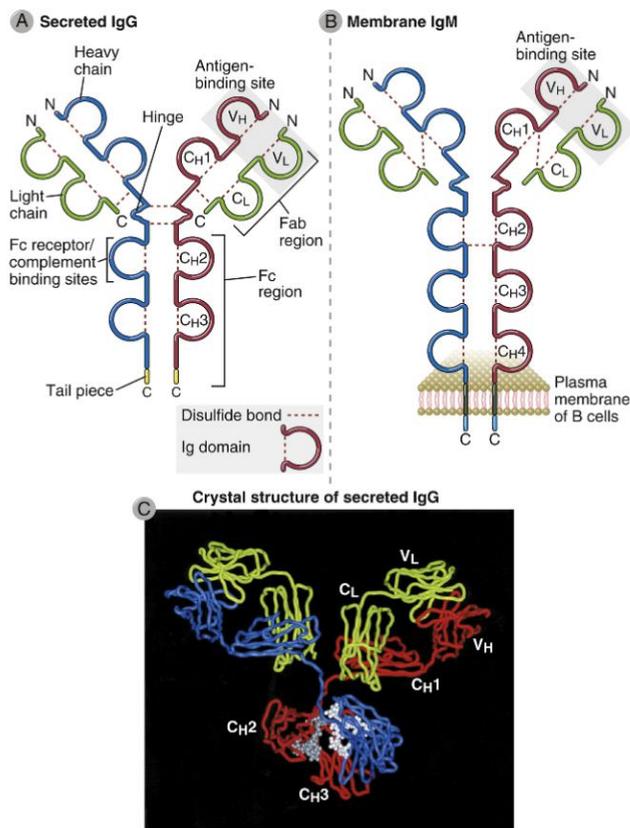


Figura.3. Estructura de anticuerpo (tomado de Abbas *et al.*, 2008).

### 2.6.1 Mecanismos de generación de diversidad de los anticuerpos

Cada linfocito B inmaduro posee un BCR con una secuencia única en su región variable, lo cual le confiere especificidad por un determinante antigénico. Se estima que la diversidad del repertorio de linfocitos B es de  $1 \times 10^{11}$ . La diversidad del repertorio de anticuerpos se debe principalmente a tres mecanismos de diversificación:

1) Recombinación V(D)J: El genoma humano posee 46 segmentos génicos V, 23 D y 6 J (localizados en el cromosoma 14) para las cadenas pesadas. Las cadenas ligeras pueden ser de dos tipos: Kappa o Lambda. Para las cadenas Kappa se cuenta con 41 segmentos génicos V y 5 J (localizados en el cromosoma 2); y para las cadenas Lambda se cuenta con 74 segmentos génicos V y 7 J (localizados en el cromosoma 22) (Rabinovich, 2004). Durante la maduración de las células B, cada linfocito recombina solo un segmento V-D-J para cadenas pesadas y segmentos V-J para cadenas ligeras. Producto de esta recombinación se conforma un solo exón que codifica la región variable (VH o VL) del BCR (Pavón *et al.*, 2016). La recombinación V(D)J es un proceso iniciado por las proteínas RAG1 y RAG2 específicas de los linfocitos. Estas proteínas reconocen y cortan la doble cadena de DNA de las secuencias señalizadoras de recombinación (RSS). Las señales RSS consisten en secuencias muy conservadas de 7 nucleótidos (heptámero) y 9 nucleótidos (nonamero), separadas por una región espaciadora de 12 o 23 pares de bases. Posterior a la rotura de doble cadena de DNA, los extremos se unen y el DNA se repara por la maquinaria de reparación de extremos no homólogos (Abbas *et al.*, 2008).

2) Hipermutación somática: Este mecanismo es dependiente del antígeno e implica un proceso de mutación que afecta los genes de las regiones variables de las Ig. En este proceso participan la enzima desaminasa de citidina inducida por activación

(AID, que se encarga de desaminar citosinas) y la maquinaria de reparación del DNA de extremos no homólogos (Abbas *et al.*, 2008).

3) Cambio de clase: Este mecanismo ocurre en los genes que codifican a las regiones constantes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas dando origen en el humano a los denominados isotipos IgA, IgE, IgD, IgG e IgM. En este proceso son necesarias las regiones switch o regiones S. El cambio de clase inicia con la transcripción de los promotores localizados en las regiones S, lo que genera un híbrido de DNA:RNAm. Este híbrido es el sustrato para la enzima AID que genera un corte de DNA y con ello recluta a la maquinaria de reparación de extremos no homólogos (Rendón *et al.*, 2008).

#### 2.7.1 Función de los anticuerpos

Las funciones principales de los anticuerpos son: 1) Neutralización del antígeno. El anticuerpo puede prevenir la acción tóxica o infecciosa de las moléculas a la que se unen; 2) Activación del sistema complemento. Este sistema es el encargado de la destrucción de bacterias; 3) Fagocitosis mediada por anticuerpos. En este caso, las partículas antigénicas son recubiertas por anticuerpos cuyas regiones Fc son a su vez reconocidas por receptores específicos de los neutrófilos y los fagocitos mononucleares estimulando la fagocitosis de dichas partículas; 4) Citotoxicidad dependiente de anticuerpo. Los linfocitos citotóxicos expresan receptores de baja afinidad para Fc IgG (FcγRIII=CD16) que solo se unen a IgG agregada en superficies reconocidas por los anticuerpos (Oleksiewicz *et al.*, 2012) (figura 4).

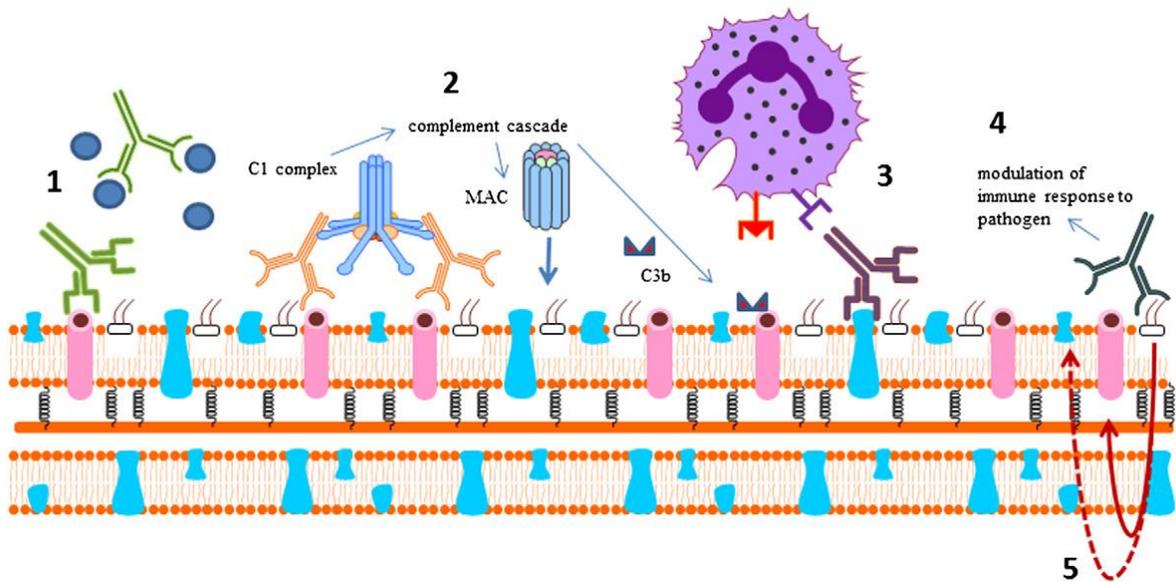


Figura 4. Función de los anticuerpos (tomado de Oleksiewicz *et al.*, 2012).

### 2.8 Anticuerpos monoclonales terapéuticos antibacterianos

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos idénticos provenientes de clones de una sola célula B. La propiedad de los anticuerpos monoclonales (mAbs) para unirse de manera específica a un antígeno ha llevado a aprovecharlos con fines terapéuticos. En años recientes, los anticuerpos monoclonales han surgido como alternativas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, las enfermedades autoinmunes, las enfermedades inflamatorias, infecciosas y degenerativas (Cáncer. Net, 2014). Particularmente, en el área de las enfermedades infecciosas se han desarrollado principalmente dos tipos de mAbs: 1) Los dirigidos a la neutralización de infecciones virales, como es el caso del Palivizumab (Synagis, MedImmune) contra el virus sincicial respiratorio y el ZMapp, contra el virus de Ebola; y 2) Los dirigidos contra infecciones bacterianas. En los últimos años se han desarrollado anticuerpos capaces de unirse a componentes bacterianos para activar mecanismos que conduzcan a la eliminación del patógeno reduciendo con ello tanto la infección, como la inflamación producida. Actualmente, varios mAbs están siendo

valorados y se encuentran en las diferentes fases clínicas de desarrollo (Tabla 1) (Oleksiewicz *et al.*, 2012).

**Tabla 1. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra bacterias patógenas**

Patógeno	Endotoxina	Exotoxina	Patología	Tratamiento	Naturaleza del AcM	Fase Clínica
<i>Escherichia coli</i>	Lípido A (LPS)		Sepsis	Nebacumab	IgM Humano	Desaprobado
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ácido lipoteicoico		Sepsis	Pagibaximab	IgG1 Quimérico	Fase III
	Cif A		Bacteremia	Tefibazumab	IgG1 Humano	Fase II
	GrfA (transportador ABC)		Sepsis	Aurograb		Desaprobado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PcrV (SST3)		Infecciones en pacientes con fibrosis quística	KB-100		Fase II
	Antígeno O		Neumonía	Panabacumab		Fase II
	Alginato		Infecciones en pacientes con fibrosis quística	Aerucin	IgG1 Humano	
<i>Bacillus anthracis</i>		Toxina Ántrax	Ántrax	Raxicumab	Humano	
<i>Clostridium botulinum</i>		Toxina Butiifinica	Botulismo	Xoma 3AB	Coctel IgGs Humanos	Fase I
<i>Clostridium difficile</i>		Toxina B	Colitis y diarrea	GS-CDA	Humano	Fase II

Se describen distintos AcM que actualmente están siendo valorados y se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico (Oleksiewicz *et al.*, 2012).

## 2.9 El análisis bioinformático para el desarrollo de mAbs

Por otra parte, el avance en las técnicas de secuenciación de última generación DNA y en la bioinformática han llevado a enfoques que proporcionan resultados más rápidos para el diseño de anticuerpos con potencial terapéutico a diferencia de los enfoques experimentales tradicionales (Norman *et al.*, 2018). La secuenciación del repertorio de células B es capaz de proporcionar millones de secuencias de regiones variables de los anticuerpos contenidos en una muestra de sangre (Miho *et al.*, 2018). El análisis bioinformático de estas secuencias ha inspirado la identificación y generación de anticuerpos monoclonales con distintos potenciales (Rappuoli *et al.*, 2016). Por otra parte, se encuentra la vacunología reversa que es

una estrategia que ha permitido el diseño de vacunas partiendo de la información de la secuencia genómica del patógeno. Para este fin, se eligen los antígenos candidatos con mayor probabilidad de ser inmunógenos considerando varios factores, por ejemplo: proteínas que se encuentran expuestas en la membrana, que estén altamente conservadas en la especie bacteriana de interés (Rappuoli *et al.*, 2016). El descubrimiento de anticuerpos humanos protectores, la secuenciación del repertorio de células B y la caracterización de antígenos protectores proporcionan mejor comprensión para el desarrollo de nuevas vacunas (Rappuoli *et al.*, 2016).

## 2.10 Producción de anticuerpos monoclonales

Al tener una especificidad única, los anticuerpos monoclonales se han encontrado como tratamientos para una gran variedad de enfermedades, por ello se han desarrollado herramientas para su producción.

- a) Originalmente la producción de anticuerpos monoclonales se centró en la generación de hibridomas. Esto se realiza inyectando un ratón con el antígeno objetivo, después se fusionan las células B del ratón con otra célula B de larga vida dando lugar a una célula híbrida. Este hibridoma se convierte en un tipo de fábrica de anticuerpos, produciendo copias idénticas de moléculas de anticuerpos específicas para el antígeno objetivo (IMGT, 2003).
- b) Con los avances en el campo de la biología molecular, se han generado anticuerpos mediante el uso de vectores que expresan las cadenas de anticuerpos, es decir, utilizando técnicas de DNA recombinante (Holliger y Hudson, 2005).

## 3. Antecedentes

En la búsqueda de alternativas no antibióticas para el tratamiento de infecciones causadas por las bacterias multirresistentes, en el grupo de investigación donde se realiza este trabajo, se identificaron 16 mAbs humanos del isotipo IgG1 que reconocen proteínas de membrana externa altamente conservadas en *K.*

*pneumoniae* y *E. cloacae*. Para este fin, se estimularon *in vitro* células B de sangre periférica, donadas por el Banco de Sangre del Estado de Morelos, en condiciones que favorecieron la selección clonal específica contra el antígeno de interés. Como antígeno se utilizaron dominios solubles de las proteínas MtlA y BamA de *K. pneumoniae*. Ambas proteínas, seleccionadas mediante un enfoque de vacunología reversa, se localizan en la membrana externa y están altamente conservadas en *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. MtlA es una transglucosilasa lítica que cataliza la escisión no hidrolítica de las estructuras de peptidoglucano de la pared celular bacteriana. BamA forma parte del complejo de ensamblaje e inserción de proteínas en la membrana externa. Para la identificación de células B productoras de anticuerpos específicos contra los antígenos de interés se utilizaron ensayos de ELISPOT. Posteriormente, se realizó la extracción de RNA de las células B que secretaban los anticuerpos de interés y mediante la técnica de PCR-RACE-5' se realizó la amplificación de las regiones variables de cadena pesada (VH) y de cadena ligera (VL) de los anticuerpos. Los amplicones generados se secuenciaron masivamente en la plataforma MiSeq de Illumina y mediante un análisis bioinformático se guió la selección de los reordenamientos V-D-J de cadenas pesadas y V-J de cadenas ligeras. Las regiones variables seleccionadas se sintetizaron *in vitro* (genes sintéticos gBlocks, IDT, Inc) y se clonaron en vectores de expresión de cadenas pesadas y ligeras para la producción recombinante de mAbs humanos en células HEK293T. La especificidad y funcionalidad de dichos anticuerpos se validó mediante ELISA, Western blot y ensayos bactericidas contra ambas bacterias. En suma, los resultados obtenidos nos sugieren que estos anticuerpos son capaces de reconocer antígenos presentes en ambas bacterias. Sin embargo, para analizar la capacidad protectora de estos anticuerpos, planeamos realizar en un ensayo de inmunidad pasiva en un modelo murino de infección por *K. pneumoniae* o *E. cloacae*.

#### **4. Justificación**

*Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* son bacterias patógenas multirresistentes causantes de infecciones nosocomiales y representan una amenaza a nivel mundial. Desafortunadamente, aún no se cuentan con vacunas eficaces para contender contra estos patógenos. En este sentido, resulta de gran importancia la búsqueda de estrategias no basadas en antibióticos para tratar infecciones causadas por estas bacterias. En años recientes, los anticuerpos monoclonales han surgido como alternativas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, las enfermedades autoinmunes, las enfermedades inflamatorias, infecciosas y degenerativas (cáncer.Net, 2014). Esta tecnología podría intervenir ante la gran problemática de resistencia bacteriana siendo esta una alternativa para combatir infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

Como se mencionó anteriormente, en el grupo de investigación donde se realizó este trabajo se identificarán mAbs humanos de isotipo IgG1 específicos contra las proteínas MtlA y BamA de *K. pneumoniae*. Para analizar la capacidad protectora de estos anticuerpos, mediante un ensayo de inmunidad pasiva en ratón, es necesario generar anticuerpos quiméricos (región variable humana - región constante murino). Lo anterior para simular anticuerpos murinos de isotipo IgG2a equivalentes en función del anticuerpo humano de isotipo IgG1 y así mismo para evitar una posible respuesta inmune del ratón contra los anticuerpos humanos.

## **5. Hipótesis**

Los anticuerpos monoclonales quiméricos (murino-humano) tendrán la capacidad de reconocer de manera específica a las proteínas MtlA y BamA de *K. pneumoniae* y *E. cloacae*.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Analizar la capacidad de anticuerpos recombinantes monoclonales quiméricos (región variable humana – región constante murino) para unir a los antígenos bacterianos MtlA y BamA.

### **6.2 Objetivos específicos**

- 1.- Generar anticuerpos recombinantes monoclonales quiméricos (región variable humana - región constante de ratón).
- 2.- Validar la capacidad de los anticuerpos monoclonales quiméricos para unir a las proteínas MtlA y BamA.

## **7 Metodología**

### **7.1 Reacciones de PCR para amplificar los fragmentos VK**

La amplificación de los fragmentos VK se realizó mediante PCR de la siguiente manera: 5 µl de oligo fuse Fw (5 pmol/µl), 5 µl de oligo Rv (5 pmol/µl), 2 µl dNTPS 1 mM, 2.5 µl MgCl<sub>2</sub>, 5 µl buffer, 0.1 µl de Taq ADN polimerasa Platinum HF, H<sub>2</sub>O cbp (cuanto baste para) 50 µl y 1 µl de ADN del molde correspondiente y se incluyó una reacción control negativo (sin molde). Las condiciones del PCR fueron: 94 °C x 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 62 °C por 30 seg, 68 °C por 30 seg y una incubación final de 68 °C 5 min.

### 7.1.1 Diseño de oligonucleótidos

Para este fin se utilizó la herramienta Oligo analyzer de Integrated DNA Technologies (IDT, Inc). La temperatura de alineamiento que tienen los oligonucleótidos depende de la concentración de G y C y de la longitud de las secuencias, y son las mismas o muy similares para ambos cebadores. El contenido de GC se encuentra alrededor del 50%-60%, la longitud de los oligonucleótidos está entre 18-25 pb, y se evitó la formación de estructuras secundarias y dímeros. En las secuencias de los oligonucleótidos “reverse” se incluyó la secuencia del sitio de corte para la enzima de restricción *BstApl*.

### 7.1.2 Purificación de los productos de PCR

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar los productos de PCR. En un tubo de 1.5 ml se depositó el segmento del gel que contiene el fragmento de ADN de interés, se le agregó 1 ml de resina de diatomeas y se mantuvo en agitación hasta que se disolvió la banda de agarosa. La mezcla se transfirió a una jeringa a la que previamente se le colocó una columna Promega y se filtró lentamente. En seguida se le agregó 2 ml de solución de lavado y de nuevo se pasó por la jeringa lentamente. Luego, la columna se colocó en un tubo y se centrifugó por 2 min a velocidad máxima. La columna se colocó en un tubo nuevo y se le agregaron 20 µl de H<sub>2</sub>O MQ estéril. Para recuperar el ADN, el tubo con la columna se mantuvo a temperatura ambiente por 3 min y después se centrifugó a velocidad máxima por 2 min. Se tomaron 2 µl del ADN purificado para separarlo por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y corroborar la presencia de ADN del tamaño adecuado.

### 7.1.3 Reacciones de digestión y ligación

Las digestiones con las enzimas *EcoRI* y *BstApl* se realizaron de manera independiente. Inicialmente una reacción con 1 µl de *EcoRI* (10 unidades/µl), 2 µl

de buffer (10X), ADN (1 µg) y H<sub>2</sub>O cbp 20 µl; se dejó incubando a 37 °C durante 4 horas. Después se preparó un gel de agarosa al 1% y se corrieron 2 µl para verificar el corte. Una vez que se verificó que la enzima cortó el ADN, se eliminaron las sales de la reacción precipitando el ADN con butanol de la siguiente manera: el ADN se mezcla con 1 ml de butanol, seguido de una centrifugación a 14000 rpm por 20 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y al pellet se le agregó 500 µl de etanol al 70%, y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante, y el pellet se dejó secar y después se resuspendió en 5 µl de H<sub>2</sub>O. Posteriormente, se realizó la segunda digestión con 1 µl de *Bst*API (10 unidades/µl), 2 µl de buffer (10X), 5 µl de ADN, H<sub>2</sub>O cbp 20 µl, y se dejó incubando a 60 °C durante 4 horas. En seguida, se verificó que la enzima realizó bien su corte en una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El ADN purificado se precipitó con butanol (como se describió arriba). Para la reacción de ligación se utilizó una cantidad de ADN del inserto y vector en una relación 3:1, respectivamente; 2 µl de buffer ligasa 10X, 1 µl de T4 DNA ligasa y H<sub>2</sub>O cbp 20 µl, y se incubó a 16 °C por 12 horas. Finalmente, la reacción de ligación se precipitó con butanol y se resuspendió en 5 µl de H<sub>2</sub>O.

#### 7.1.4 Transformación bacteriana por el método de electroporación

Se descongelaron las alícuotas de células electrocompetentes DH5α y se le agregó 2.5 µl del producto de ligación, se mezcló ligeramente y se dejó en hielo por 5 min. La mezcla se colocó en una cubeta para electroporar y se dejó en hielo por 2 min. La cubeta se colocó en el electroporador y se realizó una descarga eléctrica de 2.5 KV. Las bacterias se recuperaron con 1 ml de medio Luria Bertani (LB) y se incubaron por 1 hora a 37 °C en agitación. Las bacterias se platearon (100 µl o 150 µl) en placas con medio LB sólido con el antibiótico de selección del plásmido (espectinomicina), seguido de una incubación a 37 °C por 16 hrs. Las colonias resistentes se crecieron en otra placa de medio LB con espectinomicina por 16 hrs a 37°C.

#### 7.1.5 PCR de colonia

Se realizó un PCR de colonia para seleccionar colonias candidatas de las construcciones de interés. Para este fin, se utilizaron los oligonucleótidos Pfuse forward (5'-3' ACAGATCCAAGCTGTGACCG) Y SvpolA reverse (5'-3' TCACTGCATTCTAGTTGTGG). Ambos oligonucleótidos, diseñados anteriormente, priman en el vector flanqueando el MCS. La reacción se realizó de la siguiente manera: 1 µl de oligo Pfuse (5 pmol/µl), 1 µl de oligo SvpolA (5 pmol/µl), 2 µl dNTPS 1 mM, 0.5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl buffer, 0.1 µl de Taq polimerasa y H<sub>2</sub>O DEPC cbp 10 µl. A la mezcla anterior se le agregó una colonia bacteriana con la ayuda de un palillo y se mezcló. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de: 94 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min y una incubación final de 72°C por 5 min. Las reacciones de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1%.

#### 7.1.6 Purificación y digestión del ADN plasmídico (ADNp)

Las colonias bacterianas de interés se crecieron en medio líquido LB con el antibiótico de selección a 37°C durante toda la noche (ON). Al día siguiente, se purificó DNAP con el método de lisis alcalina de la siguiente manera: el cultivo se transfirió a un tubo de 1.7 ml, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 150 µl de la solución I (glucosa 50 mM, Tris Base pH:8 25 mM, EDTA pH 8 10 mM) mezclando con ayuda de vortex, después de que la pastilla estaba totalmente resuspendida se le agregó 250 µl de la solución II (NaOH 0.2 N) y se mezcló por inversión, a la muestra se le agregó 250 µl de la solución III (acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 2 M) y también se mezcló por inversión, seguido de una centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C. En un nuevo tubo se agregó 1 ml de resina policatiónica (polvo de diatomeas resina de diatomeas) al cual se le

agregó el sobrenadante de la centrifugación anterior a cada tubo correspondiente; se mantuvo por 3 min a temperatura ambiente en rotación, la mezcla se transfirió a una jeringa a la que previamente se le colocó la columna promega y se filtró lentamente, enseguida se agregaron 2 ml de solución de lavado y de nuevo se pasó por la jeringa lentamente, la columna se colocó en un tubo Eppendorf y se centrifugó por 2 min a 14000 rpm, la columna se colocó en un tubo nuevo y se le agregaron 30 µl de H<sub>2</sub>O estéril, se mantuvo a temperatura ambiente por 3 min y después se centrifugó a velocidad máxima por 2 min, se retiró columna. Se midió la concentración de DNAp un espectrofotómetro de microvolumen (Implen) y se realizaron ensayos con digestiones enzimáticas con *EcoRI* y *BstAPI* para verificar la presencia del inserto,

#### 7.1.7 Preparación de muestras para secuenciación

La secuenciación del ADN se realizó por el método de Sanger en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para este fin se preparó una mezcla de 16 µl totales que contiene de 100 a 400 ng del ADN de interés y 5 picomolas del oligonucleótido adecuado. Los resultados de la secuenciación se analizaron con el programa bioinformático "Chromas". para identificar mutaciones puntuales o cambios en los marcos de lectura.

#### 7.1.8 Gliceroles

Para conservar las colonias que contienen las construcciones de interés, las bacterias se crecieron en medio líquido LB con el antibiótico adecuado durante toda la noche a 37°C en agitación (180 rpm). Al siguiente día, en criotubos se agregó 800 µl del cultivo y 200 µl de glicerol concentrado estéril, se homogenizó e inmediatamente se guardó a -70 °C.

#### 7.1.9 Purificación de ADNp libre de Endotoxinas (Endofree)

Para purificar ADNp libre de entotoxinas y en altas concentraciones se realizó una midiprep con el estuche comercial PureYield de Promega de la siguiente manera: Las colonias de interés se crecieron en 3 ml de medio LB con el antibiótico de selección a 37°C en agitación durante 5 hrs. Posteriormente, se inoculó 1 ml de este cultivo en un matraz con 100 ml de medio LB con antibiótico de selección y se dejó creciendo a 37°C durante 16 hrs. Al día siguiente, el cultivo se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó a 4,950 rpm por 30 min a temperatura ambiente. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 ml solución de resuspensión celular con ayuda de vortex. Se agregaron 8 ml de solución II de lisis celular, el tubo se invirtió 3 veces y se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Después, al tubo se le agregaron 8 ml de la solución de neutralización y se centrifugó a 4,950 rpm por 30 min a temperatura ambiente. Se vertió el lisado sobre una columna azul previamente colocada en tubo Falcon de 50 ml; se incubó por 2 min y se centrifugó a 1500 g por 5 min. La columna que posee la membrana de afinidad por ADN se colocó en un nuevo tubo de 50 ml, se le vertió el filtrado del lisado, se centrifugó a 1500 g por 3 min y al terminó se desechó el filtrado. Posteriormente, la columna se lavó con 5 ml de la solución de lavado libre de endotoxina, se centrifugó a 1500 g por 3 min y se descartó el filtrado. La columna se reinsertó en el tubo Falcon, se le agregaron 20 ml de solución de lavado de columna y se centrifugó a 1500 g por 5 min. Se descartó el filtrado, la columna se reinsertó al tubo y se centrifugó a 1500 g por 10 min para remover por completo el etanol. Para recuperar el ADNp, la columna se colocó en un nuevo tubo de 50 ml, se agregaron 600 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas a 50 °C. Se dejó caer la primera gota y se centrifugó a 1500 g por 5 min. El filtrado se transfirió a un tubo de 1.5 ml y la concentración del ADNp se calculó en un espectrofotómetro de microvolumen.

## 7.2 Expresión de anticuerpos recombinantes

Para la producción de los anticuerpos monoclonales quiméricos se transfectaron células HEK293T (línea celular derivada de riñón embrionario humano).

#### 7.2.1 Descongelamiento de células HEK293T

Una alícuota de células HEK293T mantenida en nitrógeno líquido se descongeló en hielo. Las células se crecieron en medio DMEM preparado con glutamax, 10% de suero fetal bovino (SFB), y los antibióticos penicilina y estreptomicina; a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 - 90 %, se realizó el primer pase (cambio de medio). En total se realizaron tres pases. En el último pase, las células se contarón y 150,000 fueron colocadas en una placa de 24 pozos.

#### 7.2.2 Transfección de las células HEK293T

Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia del 70 - 80 % (aproximadamente después de 22 hrs de incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>), se reemplazó el medio DMEM-SFB 2 % y después de 24 hrs se realizó la transfección. Para cada pocillo, se usaron 2 µg de ADNp libre de endotoxinas. Los ADNp que codifican la cadena pesada y ligera de los anticuerpos se mezclaron en una relación de masa 1:3, respectivamente. El ADNp se mezcló con 2.5 µl de CaCl<sub>2</sub> 2 M y agua hasta un volumen de 20 µl, y se combinó con 20 µL de 2X HBS (NaCl 180 mM, HEPES libre de ácido 50 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.1). Esta mezcla se le añadió a las células y éstas se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. A las 24 hrs de la transfección, el medio de crecimiento se reemplazó con DMEM bajo en glucosa (12-725F, Lonza) sin FBS y con glutamina al 1%.

#### 7.2.3 Cosecha de anticuerpo

Después de 72 hrs de la transfección, se realizó la primera cosecha del sobrenadante que contiene el anticuerpo. Para este fin, se realizó lo siguiente: se colectó el medio de cada pozo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4 °C, esto con el fin de sedimentar las células flotantes. Luego, el sobrenadante se filtró a través de filtros de 0.2 µm (Advantec), se le agregó azida de sodio 0.01% a cada muestra y se guardó a 4 °C. Se realizaron 2 cosechas más por cada anticuerpo con intervalos de 48 horas.

**7.2.4 Evaluación de la producción de anticuerpos por medio de Western-Blot (WB)**  
La producción de los anticuerpos se verificó por medio de WB utilizando el sobrenadante de las células transfectadas. Se preparó un gel de poliacrilamida al 10%, con espesor de 1 mm; y se cargó 1 µg de cada sobrenadante previamente desnaturalizado por calor (las muestras se hirvieron por 10 minutos). La electroforesis se realizó a 100 volts por 80 min. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por una hora y 20 min a 100 volts. Al terminar la transferencia, se verificó que se llevó a cabo correctamente la transferencia tiñiendo la membrana con rojo de Ponceau. El colorante se retiró y la membrana se dejó bloqueando con leche al 5% en buffer de fosfatos con Tween 0.05% (PBS-T) durante toda la noche (ON) a 4 °C. Al día siguiente, a la membrana se le realizaron 3 lavados con PBS1X-Tween 0.05% y se agregó el anticuerpo anti-IgG – ratón H&L conjugado HRP diluido 1: 5,000 (Cat. No. 205719 de Abcam) y se dejó ON a 4 °C. Al día siguiente se realizaron ocho lavados de 15 minutos con PBS1X-T 0.05% y un último lavado con PBS1X. Posteriormente, la membrana se reveló con la adición del sustrato quimioluminiscente de HRP (LG Health care, cat. RPN2108) que provocó una reacción enzimática que da como resultado final la emisión de luz. Las señales quimioluminiscentes de la membrana se observaron en el equipo “iBright CL1000 imaging system” de Invitrogen.

### 7.2.5 Purificación de anticuerpos

Inicialmente, los anticuerpos contenidos en los sobrenadantes de los cultivos celulares se precipitan con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado de la siguiente manera: en un frasco de vidrio se agregaron las cosechas totales de cada anticuerpo. Posteriormente, se agregó 10% del volumen total de TRIS-HCL pH 8.0 para mantener el pH, se adicionó gota a gota una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en una relación volumétrica 1:1 y se dejó agitando por 1:30 hrs a temperatura ambiente. El precipitado se pasó a un tubo de centrifuga de 15 ml, se centrifugó 20 min a 7100 RCF a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el pellet proteico se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de buffer star (buffer de fosfato de sodio 20 mM pH 7.0 ó buffer Tris 50 mM pH 7.0). Para purificar los anticuerpos, la muestra se agregó a un tubo con resina (proteína G) previamente lavada. Se dejó interaccionando ON a 4°C. Al día siguiente, la resina se centrifugó a 2200 rpm por 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante (flujo); se lavó la resina dos veces con cinco volúmenes con buffer de fosfato de sodio 20 mM pH 7.0 centrifugando a 2200 rpm por 5 min a 4 °C. Después de los lavados, los anticuerpos se recuperaron con buffer de elución (buffer glicina 0.1 M o ácido cítrico 0.1 M pH 3.0).

### 7.3 Cuantificación de proteínas por el método de BCA

Los anticuerpos y las proteínas recombinantes purificadas (MtlA y BamA) fueron cuantificadas por el método del ácido bicinconínico utilizando el kit micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific). La cuantificación se llevó de la siguiente manera: Se realizó una curva estándar usando diluciones de la proteína de Albumina de Suero Bovino (BSA). Se realizaron las siguientes diluciones de BSA: 200, 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; después, se preparó la solución de trabajo mezclando 50 partes de reactivo A de BCA con 1 parte de reactivo B de BCA. En una placa de ELISA de 96 pozos se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de cada dilución en diferente pozo cada una, también se agregaron las proteínas problema, a cada dilución y proteína se agregaron 200

µl de solución de trabajo. La placa se cubrió de la luz y se dejó incubando por 30 min a 37 °C. Finalmente, la placa fue leída en un lector de placas a 562 nm.

## 8 Resultados

### 8.1 Generación de construcciones para expresar anticuerpos

La producción recombinante de los anticuerpos requiere de la transfección de líneas celulares. Para este fin se utiliza una mezcla de DNA de las construcciones que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos.

Los 10 anticuerpos anti-BamA y 6 anticuerpos anti-MtIA que se identificaron previamente se generaron a partir de la combinación de 12 construcciones de cadenas pesadas y 7 de cadenas ligeras. Para lo anterior se utilizaron vectores de expresión de anticuerpos humanos del isotipo IgG1 (para cadenas pesadas) y Kappa o Lambda (para cadenas ligeras). A partir de estas construcciones se plantea reclonar las regiones VH (rearrreglos V-D-J) y VL (rearrreglos V-J) en vectores de expresión de anticuerpos murinos. Los vectores utilizados para este fin son: el pBROS-CHIgmG2a (para cadena pesada del tipo IgG2a) y el pBROS-CLlgmk (para cadena ligera Kappa) o el pBROS-CLlgm1 (para cadena ligera Lambda 1). Cabe mencionar que los vectores pBROS-CLlgmk, pBROS-CHIgmG2a y pBROS-CLlgm1 fueron modificados a partir de los vectores comerciales pFUSE2ss-CLlgm-mk, pFUSEss-CHIgm-mG2a y pFUSE2ss-CLlgm-ml1 (InvivoGen), respectivamente. Los vectores pBROS-CLlgmk, pBROS-CHIgmG2a, pBROS-CLlgm1 son replicativos en *E. coli*, confieren resistencia a espectinomicina, poseen la secuencia señal de la interleucina 2 humana (IL2) para la secreción al medio de las cadenas pesadas y ligeras. Además, en estos vectores, la transcripción de las cadenas depende de un promotor derivado del virus de la leucemia humana.

Al inicio de este trabajo ya se habían generado las construcciones de las cadenas pesadas de los anticuerpos quiméricos y la construcción de cadena ligera Lambda,

y entonces nos planteamos la generación de las 6 construcciones de cadenas ligeras Kappa en el vector pBROS-CLlgmk (Figura 5). Los fragmentos variables Kappa (VK) necesitaban una inserción del sitio de corte de la enzima BstAPI para poder ser clonadas en su vector correspondiente.

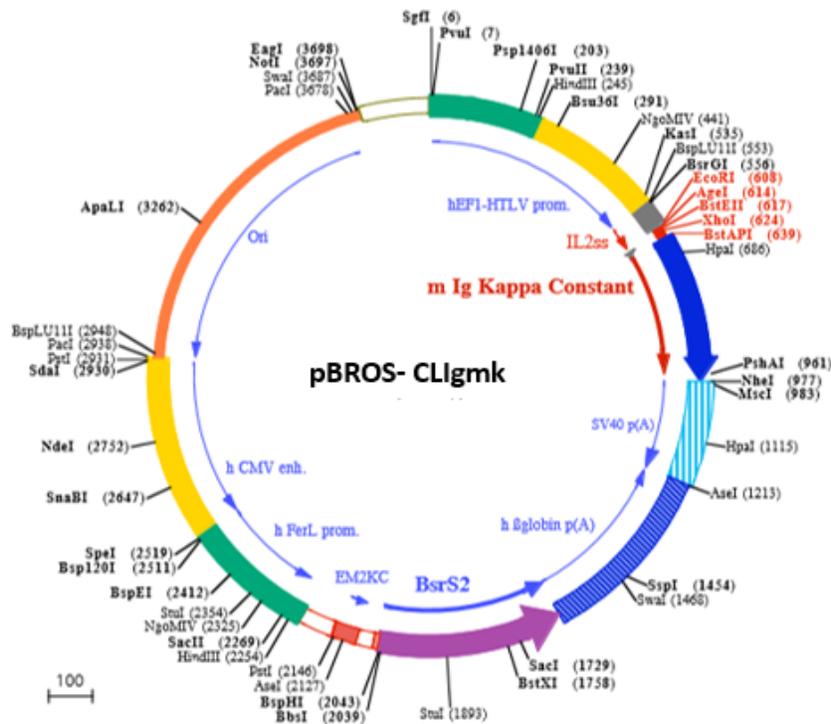


Figura 5. Representación esquemática del plásmido que expresa la región constante de la cadena ligera Kappa murina con un tamaño aproximado de 6,000 pares de bases. Este vector contiene un sitio múltiple de clonación (MCS) para la inserción de la región VK. Dentro del MCS se encuentran los sitios de corte de las enzimas de restricción *BstAPI* y *EcoRI* que se utilizaron para la construcción, mismas enzimas que fueron utilizadas para digerir los fragmentos de las regiones VK

### 8.1.1 Amplificación de los fragmentos variables de cadena ligera Kappa

Los fragmentos variables Kappa (VK's) no tenían el sitio de corte de la enzima *Bst*API, el cual es necesario para poder clonar dichos fragmentos en el vector pBROS-CLlgmk (figura 5). Por tal motivo se realizó una inserción de la secuencia de corte de esta enzima por medio de un PCR. Para amplificar los fragmentos VK's con el sitio de corte de la enzima *Bst*API, se diseñaron los oligonucleótidos reverse que contienen la secuencia de corte de esta enzima. Los fragmentos VK's se nombraron: VK1, VK2, VK3, VK5, VK26 y VK28.

### 8.1.2 Diseño de oligonucleótidos

Se utilizó el programa oligo analyzer de Integrated ADN Technologies (<http://www.idtdna.com/site>) y se incluyó el sitio de corte de la enzima *Bst*API (GCAGCATCTGC). En algunos casos el mismo oligonucleótido se puede utilizar para amplificar más de un fragmento VK.

oligonucleótido reverse VK5:	<b>GTGCAGCATCTGCTTTGATCTCCAGCTTGGT</b>
oligonucleótido reverse VK1- 2:	<b>GTGCAGCATCTGCTGTGATTTCCACCTTGGT</b>
oligonucleótido reverse VK3-26-28:	<b>GTGCAGCATCTGCTTTGATTTCCACCTTGGT</b>

Tabla 2: Diseño de primers reverse para amplificar fragmentos VK's con sitio de corte de la enzima *Bst*API.

El primer forward fuse (ACAGATCCAAGCTGTGACCG) fue el mismo para todos los fragmentos y ya había sido diseñado anteriormente. Este cebador prima en el vector en la región que codifica al péptido señal de IL2.

Después de realizar las reacciones de PCR con las condiciones adecuadas se corrió el producto en un gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio (figura 6). Se esperaba fragmentos de ADN con un peso molecular de alrededor de 400 pares de bases (pb) correspondiente al peso de los fragmentos VK's. La banda correspondiente a cada uno de los seis fragmentos se cortó de gel y se purificó con una resina policatiónica (polvo de diatomeas).

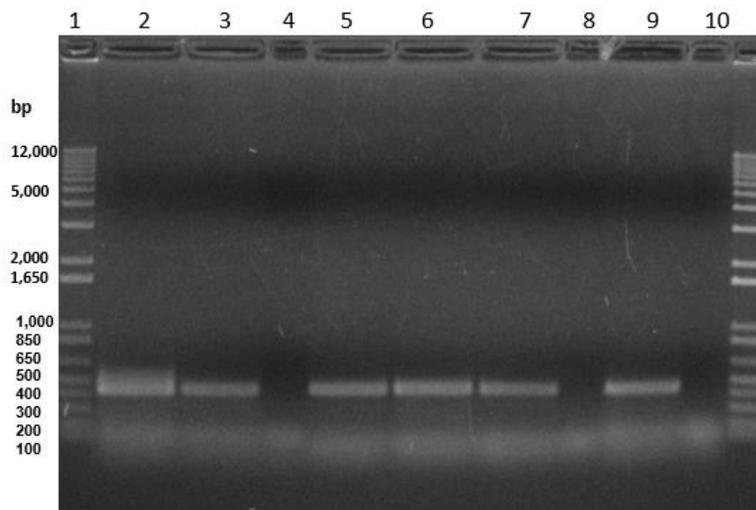


Figura 6: Electroforesis de los fragmentos VK's. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: fragmento VK1, carril 3: fragmento VK2, carril 5: fragmento VK3, carril 6: fragmento VK5, carril 7: fragmento VK26, carril 9: fragmento VK28, carril 4, 8 y 10; control negativo.

### 8.1.3 Digestión de los fragmentos VK's con enzimas *EcoRI* y *BstAPI*

Después de purificar los fragmentos VK's y corroborar la presencia del ADN de cada fragmento en un gel de agarosa al 1%, se realizaron dos digestiones enzimáticas. Primero se digirió con la enzima *EcoRI* utilizando todo el ADN purificado, se dejó incubando a 37 °C de 3 a 4 horas o toda la noche, después se precipitó el ADN con

butanol y se lavó con etanol 70 % para eliminar restos de buffer de la primera digestión. Luego, se realizó la digestión con la enzima *Bst*API y la reacción se dejó incubando a 60 °C por 4 horas. De manera simultánea, 1 µg de ADN del vector pBROS-CLlgmk se digirió con las mismas enzimas. Al día siguiente se realizó una electroforesis para verificar la presencia del ADN digerido con ambas enzimas, se corrió 2 µl de digestión en gel de agarosa al 1% (figura 7).

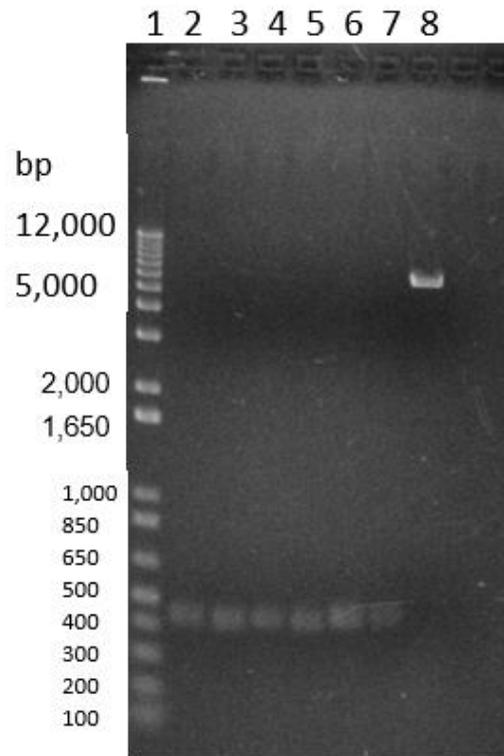


Figura 7. Electroforesis de las digestiones de los fragmentos VK's y del vector pBROS-CLlgmk. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-7: fragmentos digeridos con *Eco*RI y *Bst*API VK1, VK2, VK3, VK5, VK26 y VK28, respectivamente, carril 8: vector digerido con *Eco*RI y *Bst*API.

En seguida se realizó la ligación de cada inserto con el vector pBROS-CLlgmk. Para este fin, se mezcló aproximadamente 10 ng del vector con 30 ng del inserto y la reacción se mantuvo por 16 °C durante toda la noche. Al día siguiente, la reacción

de ligación se lavó con butanol para eliminar sales y se utilizó para transformar la cepa de *E.coli* DH5-alfa por el método de electroporación. Las bacterias se cultivaron durante toda la noche en placas con medio solido LB adicionado con el antibiótico de selección (espectinomicina 100 mg/ml), Al día siguiente, las colonias transformantes se crecieron en otra placa con medio LB con espectinomicina para su posterior análisis.

#### 8.1.4 Selección de clonas positivas por PCR de colonia

Después del crecimiento de las bacterias transformantes, se procedió a realizar un PCR de colonia para seleccionar clonas candidatas, es decir, para identificar aquellas colonias bacterianas que adquirieron el plásmido fusionado al inserto. Para este fin se utilizaron los primers Pfuse-forward y Svp01A-reverse. Al usar estos oligos, las colonias candidatas deberían amplificar un fragmento de ADN con un peso alrededor de 900 pb, mientras que las colonias que adquirieron el plásmido sin inserto amplificarían un fragmento con un peso de 500 pb. Los productos de PCR de colonia se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En la figura 8 se observa un PCR de colonia con clonas positivas y negativas, cinco de las seis construcciones planeadas se logró obtener al menos dos clonas candidatas.

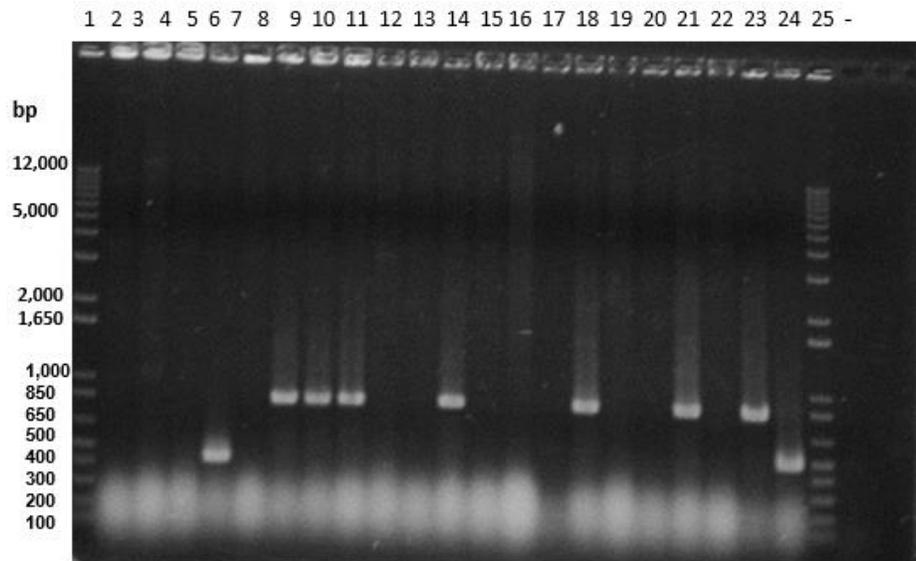


Figura 8: Electroforesis de los PCR's de colonia. Gel de agarosa 10%, carriles 1 y 25: marcador de peso molecular, carril 2-24: muestran PCR de diferentes colonias, carril 26: control negativo.

Debido a que no logramos obtener clonas candidatas de la construcción pBROS-CLlgmk-VK1, se decidió realizar una desfosforilación del vector para evitar su autoligadura. Lo anterior se realizó de la siguiente manera: al ADN del vector, que previamente se había digerido con las enzimas *EcoRI* y *BstAPI*, se le agregó la enzima desfosfatasa SIP (en presencia del amortiguador adecuado) y la reacción, se dejó por 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, la reacción se inactivo durante 5 minutos a 80 °C y se lavó con butanol para retirar sales. El ADN desfosforilado se usó para la reacción de ligación del vector con el fragmento VK1. Posteriormente, la ligación se usó para la transformación de células electrocompetentes de la cepa DH5-alfa, seguido de la selección de clonas candidatas por PCR de colonia (figura 9).

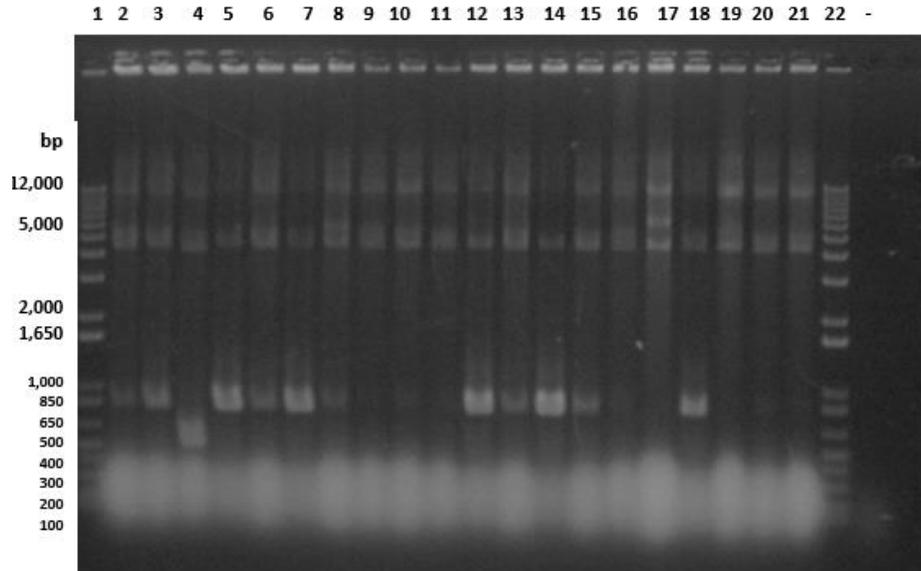


Figura 9: Electroforesis de los PCR's de colonia de la construcción pBROS-CLlgmk-VK1. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2-21: muestran PCR's de diferentes colonias: carril 23: control negativo.

#### 8.1.5 Verificación de las construcciones mediante digestiones enzimáticas

Después de seleccionar las colonias candidatas, se purificó el ADNp, por el método de lisis alcalina en conjunto con una resina policatiónica, y se realizaron digestiones con enzimas de restricción para verificar que la presencia del inserto. Inicialmente se realizó la primera digestión con la enzima *EcoRI*, se dejó incubando a 37 °C de 3 a 4 horas o toda la noche, después se precipitó el ADNp con butanol y se lavó con etanol para eliminar restos de buffer de la primera digestión; y luego se realizó la digestión con la enzima *BstAPI* durante 4 horas a 60 °C. Al día siguiente, la digestión se separó en un gel de agarosa al 1% (figura 10). En los carriles donde se presentan las dobles digestiones se muestran un fragmento de ADN de aproximadamente 400 pb que corresponde al tamaño del inserto esperado.

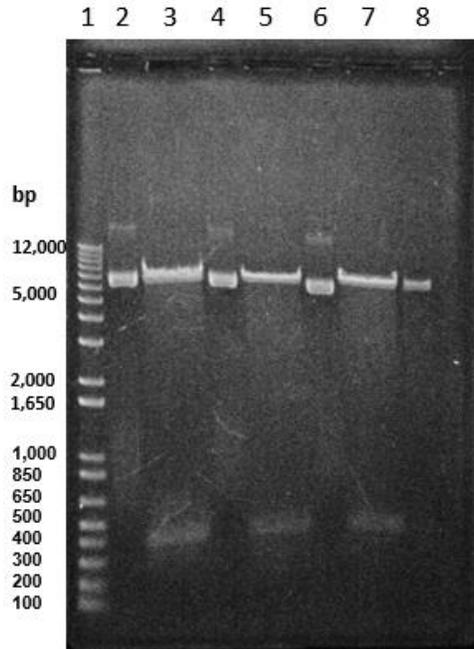


Figura 10. Electroforesis de las digestiones de las construcciones pBROS-CLlgmk-VK1(diferentes candidatas). Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2, 4 y 6: ADNp digerido con una enzima; carril 3, 5 y 7: ADNp digerido con ambas enzimas; carril 8: control negativo (vector digerido con ambas enzimas).

#### 8.1.6 Secuenciación de las construcciones pBROS- CLlgmk-VK's

Para confirmar que las construcciones generadas se encontraban correctamente clonadas, es decir, que el inserto (VK) se encontraba en fase con la región constante codificada en el vector; se obtuvo la secuencia de nucleótidos del inserto a partir del ADNp de cada una de las seis construcciones candidatas utilizando el primer Pfuse-forward. Las secuencias resultantes se analizaron verificando el sitio de corte de las enzimas *EcoRI* y *BstAPI*, la secuencia señal de la interleucina 2 humana (IL2), y el fragmento VK. Posteriormente, la secuencia de nucleótidos se tradujo para obtener los péptidos y verificar que la IL2, el VK, y la región constante Kappa estuvieran en el mismo marco de lectura (figura 12). Las secuencias de las construcciones se compararon con las secuencias proporcionadas del vector pBROS-CLlgmk (figura

13, A) y de igual manera con la secuencia del fragmento variable Kappa 2 humano (figura 13, B). A continuación, se muestra el análisis de la construcción pBROS-CLlgmk-VK2 (figura 11).

IL-2 -EcoRI GAATTC-INSERTO-BstAPI GCAGATGCTGC-VECTOR

>15798 pBROS-CLlgmk VK2 col. 8.

GCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGCACGAATTCAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAAGCAGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCAACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGACAAAGTCTGAGAGCTAGCTGGCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAAGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACA AATGTGGTATGGAATTAATTCTAAAATACAG

Figura 11. Análisis de la secuencia de nucleótidos de una de las seis construcciones pBROS- CLlgmk-VK's. En rosa se muestra la secuencia de la IL2, en azul la secuencia del sitio de corte de la enzima *EcoRI*, en seguida la secuencia del fragmento VK, en amarillo el sitio de corte de la enzima *BstAPI* y en gris la secuencia del vector (solo se muestra el análisis de una construcción de manera representativa, pero todas las clonas candidatas se analizaron de la misma manera)

AGTCTTGCACCTTGTACGAATTCAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA < 100  
 SLALVTNS DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS

GTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC < 200  
 QSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVP

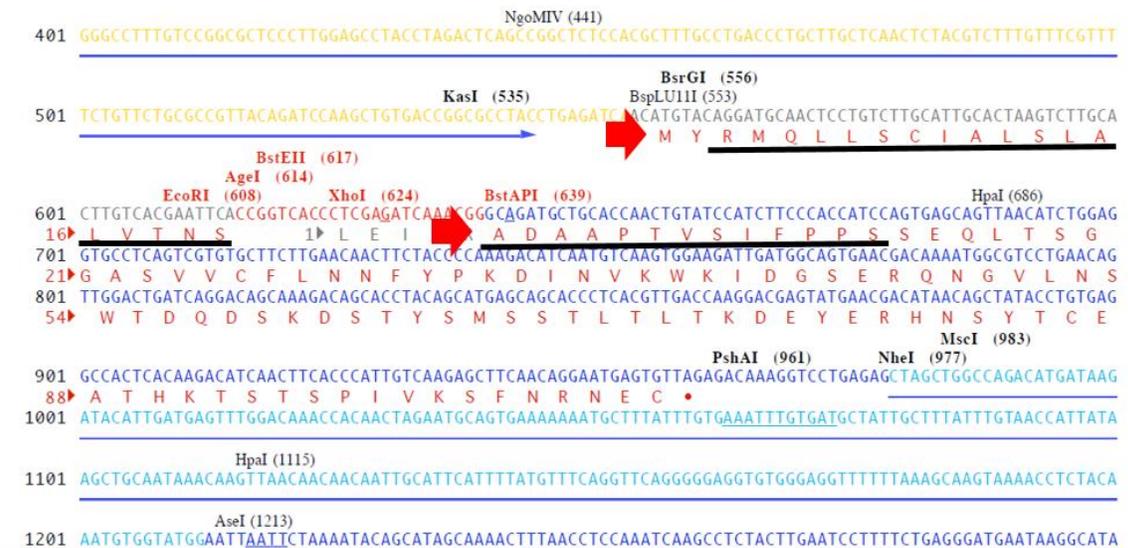
ATCAAGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTAC < 300  
 SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSY

AGTACCCCGTACACTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAAGCAGATGCTGCACCAACTGTATCCATC < 372  
 STPYTFGQGTKLEIKADAAPT VSI

**QLLSCIALSLALVTN** SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR  
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS  
 GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGT  
 KLEIKADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKD  
 INVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLT  
 KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE

Figura 12: Análisis de la traducción de la construcción pBROS-CLlgmk VK2. En rosa se muestra la secuencia de la IL2, en azul la secuencia del sitio de corte de la enzima *EcoRI*, en seguida la secuencia del fragmento VK, en amarillo el sitio de corte de la enzima *BstAPI* y en gris la secuencia del vector.

A)



**B)**

```
AGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA < 100
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L

AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT < 200
N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S

CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGTACACTTTTGGCCA < 300
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P Y T F G Q

GGGGACCAAGCTGGAGATCAA < 322
G T K L E I K
```

Figura 13: Se muestra en el panel A) Secuencia proporcionada del vector original PFUSE: se muestra en rojo y subrayada la secuencia IL2 (primera flecha), y secuencia del vector en letras rojas (a partir de segunda flecha); en el panel B) Secuencia correspondiente del fragmento variable Kappa 2 humano.

### 8.1.7 Purificación de ADNp libre de endotoxinas

Una vez seleccionadas las colonias con las construcciones correctas, se purificó el ADNp por medio del kit PureYield™ Plasmid Miniprep de PROMEGA. Este kit que nos permite purificar plásmidos libres de endotoxinas en altas concentraciones. De esta manera, se obtuvieron las siguientes concentraciones de ADNp en un volumen de 600 µl.

VK1	455.55 ng/ µl
VK2	426.60 ng/ µl
VK3	496.30 ng/ µl
VK5	442.10 ng/ µl
VK26	482.89 ng/ µl

VK28	461.00 ng/ $\mu$ l
------	--------------------

Tabla 3. Concentraciones de las construcciones pBROS- CLlgmk-VK's.

## 8.2 Producción de anticuerpos recombinantes

### 8.2.1 Transfección de células HEK293 para producción de anticuerpos

Con el ADN de las construcciones generadas se realizaron transfecciones de células HEK293 para la producción de anticuerpos. Como control positivo de las transfecciones se utilizó el pGFP (plásmido que expresa la proteína verde fluorescente) y además se incluyó el ADN de un anticuerpo humano que ya había sido producido anteriormente. Para la transfección se utilizaron 500 ng de ADN de las cadenas ligeras y 1500 ng de ADN de las cadenas pesadas. La combinación de las cadenas ligeras con pesadas fue la misma que se utilizó para la producción de los anticuerpos humanos; en los anticuerpos humanos se utilizaron cadenas pesadas de isotipo IgG1 y los quiméricos cadenas pesadas de isotipo IgG2a de ratón. Después de 24 horas de realizar la transfección se observó el control GFP en el microscopio para verificar que la transfección se llevó a cabo correctamente (figura 14). En la tabla 4 se muestran las combinaciones de las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos, estas combinaciones son las mismas que se utilizaron anteriormente cuando se produjeron los anticuerpos recombinantes humanos.

### Cosecha de anticuerpo

A las 72 horas de la transfección se realizó la primera cosecha de anticuerpo, para este fin se realizó lo siguiente: se colectó medio de cada pozo en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C esto con el fin de

sedimentar las células flotantes; se filtró el sobrenadante a través de filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  (Advantec); por último, se agregó azida de sodio 0.01% a cada muestra y se guardó la cosecha a 4 °C. Se realizaron 3 cosechas por cada anticuerpo.

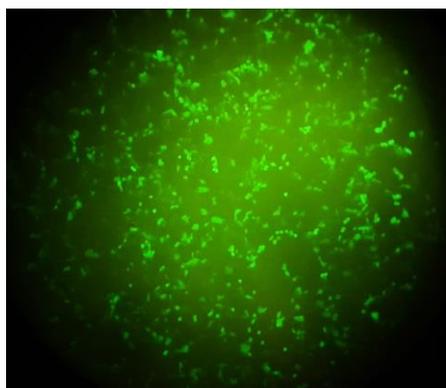


Figura 14: Se muestra una foto de las células HEK293 transfectadas con el pGFP.

<b>Numero de anticuerpo</b>	<b>VH</b>	<b>VL</b>	<b>OMP blanco</b>
Q1	VH002	VK005	BamA
Q2	VH004	VK001	BamA
Q3	VH006	VK005	BamA
Q4	VH008	VK003	BamA
Q5	VH008	VK005	BamA
Q6	VH011	VK005	BamA
Q7	VH001	V2-36VL	BamA
Q8	VH004	VK002	BamA
Q9	VH010	V2-36VL	BamA
Q10	VH010	VK002	BamA
Q11	VH022	VK26	MtlA

Q12	VH022	VK28	MtIA
Q13	VH023	VK28	MtIA
Q14	VH016	VK28	MtIA
Q15	VH019	VK28	MtIA
Q16	VH021	VK28	MtIA

Tabla 4: Combinación de construcciones de cadena pesadas y ligeras para la producción de anticuerpos y la proteína blanco.

### 8.2.2 Western blot de sobrenadante de células transfectadas

Al término de las cosechas de células transfectadas por cada anticuerpo se realizó un western blot (WB-9) con la finalidad de asegurarnos que se estaban produciendo los anticuerpos. Para este fin, se cuantificó la concentración de cada sobrenadante, la muestra se desnaturalizó calentando 10 minutos y se corrió 1  $\mu$ g en un gel de poliacrilamida al 10%. Posteriormente, las muestras del gel, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para el WB, se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón H&L conjugado a HRP (diluido 1: 5,000, cat. No. 205719 de la marca Abcam). Este es un anticuerpo policlonal que reconoce la cadena pesada (aproximadamente 55 KDa) y cadena ligera (aproximadamente 25 KDa). Al revelar con el sustrato se observaron bandas de aproximadamente 50-55 KDa, que corresponden al peso de la cadena pesada, en 10 de los 16 anticuerpos que se transfectaron (figura 15); sin embargo, en ninguno de los casos se observó la banda de 25 KDa, que corresponde a la cadena ligera. Además, en todos los casos se observó una banda de aproximadamente 75 KDa, suponemos que esta proteína es transferrina proveniente del medio de cultivo celular. Por otra parte, se repitió el western blot de los sobrenadantes de los anticuerpos Q2, Q7 Y Q12 ya que se cargó una cantidad muy pequeña en el gel de poliacrilamida. Lo anterior porque la concentración que mostraron estos sobrenadantes al cuantificar fue mayor al de los demás

sobrenadantes. Los anticuerpos que si se estaban produciendo son: Q4, Q8, Q9, Q10, Q11, Q13, Q16. Por otra parte, los anticuerpos que no se estaban produciendo son: Q1, Q3, Q5, Q6, Q14 y Q15.

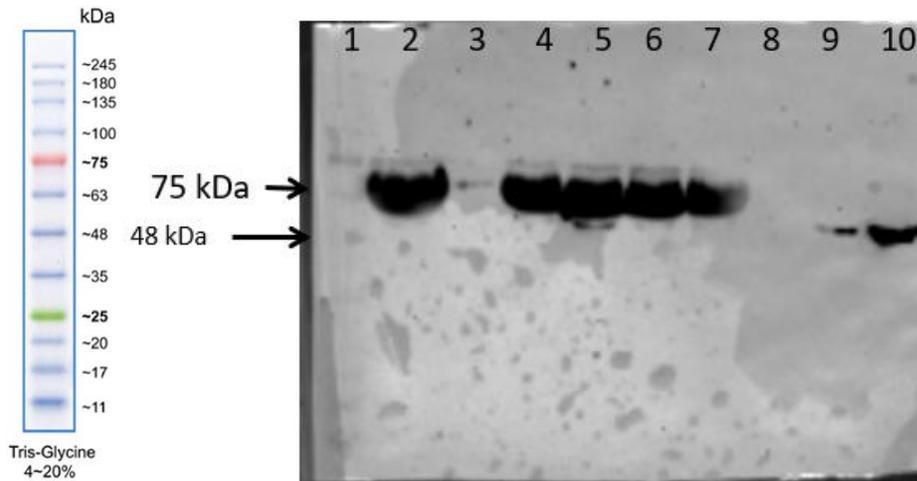


Figura 15: Western blot de los anticuerpos recombinantes en sobrenadantes de células HEK293 transfectadas. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Q1, carril 3: Q2, carril 4: Q3, carril 5: Q4, carril 6: Q5, carril 7: Q6, carril 8: Q7, carril 9: Q8, carril 10: Q9.

En el carril 10 se corrió el sobrenadante del anticuerpo humano, se reveló con un anticuerp anti-IgG humano acoplado a HRP dando señal positiva lo que demuestra que la transfección se llevó a cabo correctamente (figura 16).

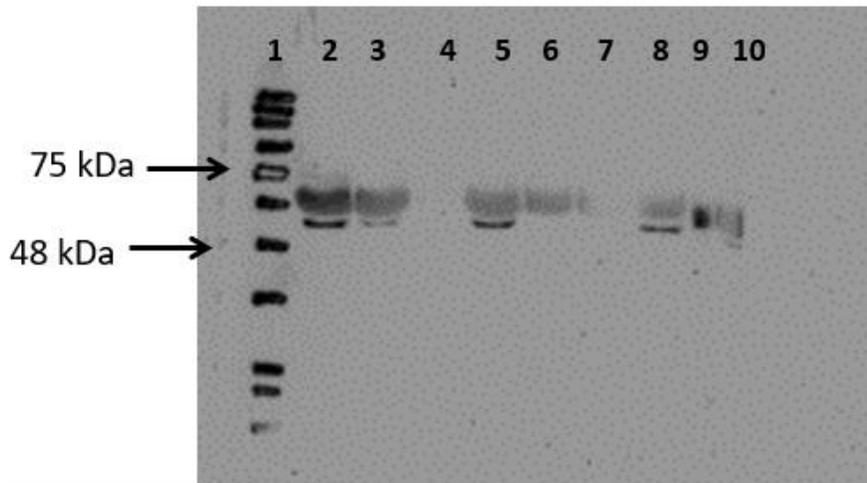


Figura 16: Western blot de los anticuerpos recombinantes en sobrenadantes de células HEK293 transfectadas. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2. Q10, carril 3: Q11, carril 4: Q12, carril 5: Q13, carril 6: Q14, carril 7: Q15, carril 8: Q16, carril 9: sin DNA (control negativo), carril 10: anticuerpo humano.

Debido a los resultados anteriores, se repitió nuevamente western blot de tres anticuerpos, pero en este ensayo se corrió un volumen equivalente de sobrenadante de los demás anticuerpos. Los tres anticuerpos dieron señal positiva, una banda de entre 50-55 KDa (figura 17). De igual manera en este WB no se observó la banda de 25 KDa que corresponde a la cadena ligera del anticuerpo.

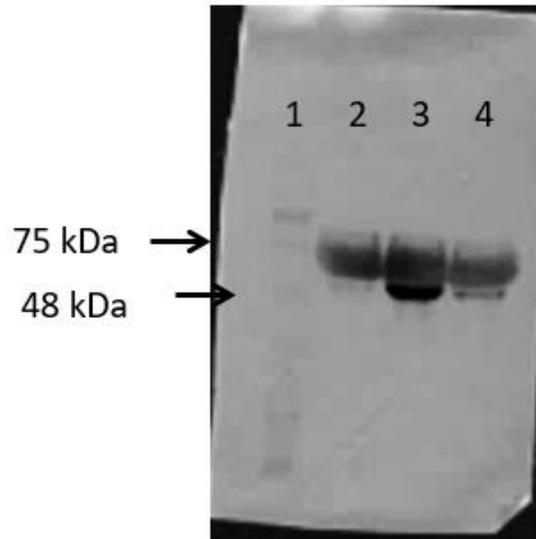


Figura 17: Western blot de los anticuerpos recombinantes en sobrenadantes de células HEK293 transfectadas. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Q2, carril 3: Q7, carril 4: Q12.

### 8.2.3 Purificación de anticuerpos

Con los primeros resultados de Western Blot con sobrenadantes, se purificaron los anticuerpos que dieron señal positiva. La purificación se llevó a cabo con proteína G y previamente se realizó una precipitación con sulfato de amonio saturado partiendo con un volumen de 1.5 ml total de cosecha de cada anticuerpo. La precipitación de los anticuerpos con sulfato de amonio se realizó con la finalidad de aislar los anticuerpos de las proteínas que tiene el medio de cultivo celular, y de esta manera obtener anticuerpos más puros; posterior a la precipitación de anticuerpos se purificó con la proteína G, esta es una proteína que se une a la región Fc de la IgG de esta manera reteniendo los anticuerpos y con ello permitiendo su purificación.

Debido a que algunos anticuerpos estaban teniendo concentraciones bajas, se decidió concentrar los anticuerpos utilizando filtros obteniéndose los siguientes resultados.

Anticuerpo	Concentración
Q2	0.0075 µg/µl
Q4	0.025 µg/µl
Q7	0.2145 µg/µl
Q8	1.26 µg/µl
Q9	0.0765 µg/µl
Q10	0.0960 µg/µl
Q11	0.22 µg/µl
Q12	0.418 µg/µl
Q13	0.14 µg/µl
Q16	0.28 µg/µl

Tabla 5: Concentraciones de anticuerpos purificados

Las concentraciones de los anticuerpos purificados fueron bajas y un volumen pequeño (alrededor de 70 µl).

#### 8.2.4 Western blot de anticuerpos purificados

Se realizó un western blot de anticuerpos purificados, con la finalidad de confirmar que realmente se purificaron y poder observar las cadenas pesadas ligeras. Por cada anticuerpo se corrieron 10 µg en un gel de poliacrilamida 10%, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se reveló con un anticuerpo IgG anti ratón H&L acoplado a HRP. En este experimento se utilizó suero de ratón como control positivo. Después de revelar, se observó una banda de aproximadamente 30 KDa en los anticuerpos purificados. En este ensayo no se observó la banda de 50-55 KDa correspondiente a la cadena pesada de los anticuerpos recombinantes; por otra parte, con el suero de ratón se observó banda de cadena ligera de 25 KDa y una banda de 55 KDa correspondiente a la cadena pesada (figura 18).

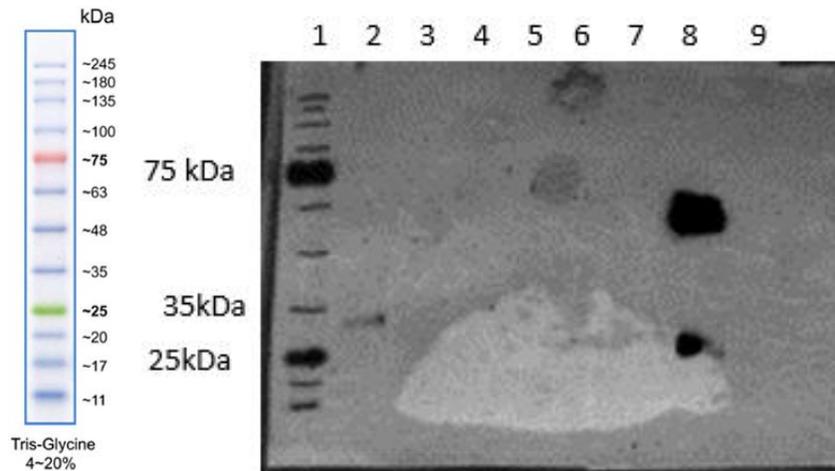


Figura 18: Western blot de los anticuerpos recombinantes purificados. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Q12, carril 3: Q11, Carril 4: Q13, carril 5: Q16, carril 6: Q16, carril 7: Q10, carril 8: suero de ratón, carril 9: PBS1X (control negativo).

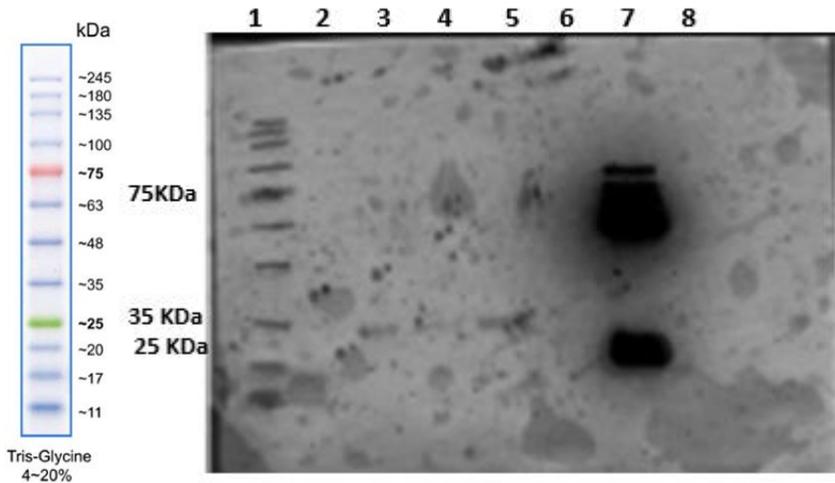


Figura 19: Western blot de los anticuerpos recombinantes purificados. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Q2, carril 3: Q4, Carril 4: Q7, carril 5: Q8, carril 6: Q9, carril 7: suero de ratón, carril 8: PBS1X (control negativo).

### Repetición de western blot con mayor cantidad de anticuerpos purificados

Debido a que solo cuatro anticuerpos dieron señal en el western blot de anticuerpos purificados decidimos repetirlo, pero ahora utilizando una mayor concentración de anticuerpo. Se cargaron 15  $\mu\text{g}$  de anticuerpo en un gel de poliacrilamida al 10%. En algunos casos se cargó una concentración menor ya que no había suficiente anticuerpo debido a que la concentración del anticuerpo estaba muy baja. En este ensayo tres anticuerpos dieron señal. Con estos resultados pensamos que el espectrofotómetro que utilizamos para cuantificar está dando resultados poco confiables.

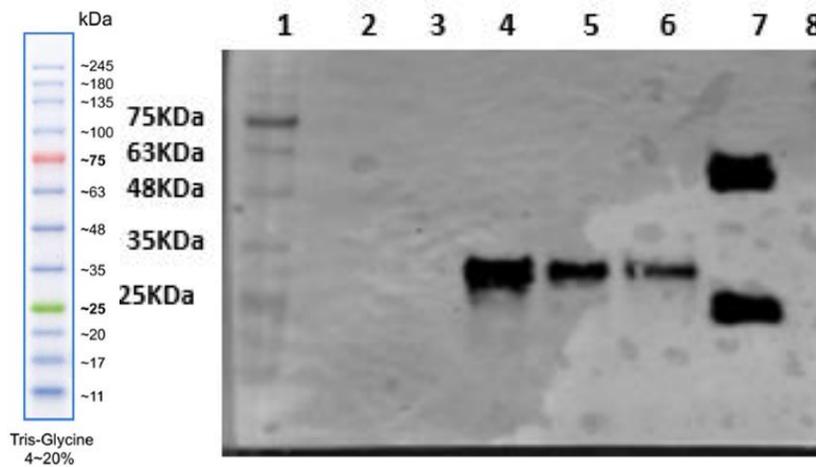


Figura 20: Western blot de los anticuerpos recombinantes purificados a mayor concentración. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Q2, carril 3: Q10, carril 4: Q11, carril 5: Q13, carril 6: Q16 carril 7: suero de ratón, carril 8: PBS1X.

De acuerdo con los resultados de western blot de los anticuerpos purificados se observaron bandas de 30 KDa de los anticuerpos Q4, Q7, Q8, Q12, Q11, Q13 y Q16. Por otra parte, los anticuerpos Q2, Q9 y Q10 no mostraron ninguna señal. Con

estos resultados se planteó volver a realizar la transfección a mayor escala para obtener mayor volumen de anticuerpo purificado.

#### 8.2.5 Producción de anticuerpos a mayor escala

La cantidad de anticuerpo obtenido en la primera transfección en placas de 24 pozos fue muy baja, por lo que se procedió a producir los anticuerpos en mayor cantidad. En este caso, la transfección se realizó por duplicado en una placa de 6 pozos. En una placa de 6 pozos se sembraron una densidad de 500,000 células por pocillo con medio DMEM completo (suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de FBS) e incubado a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para cada pocillo, se usaron 8 µg de DNA total para las transfecciones. Los plásmidos libres de endotoxinas se mezclaron en una relación de masa 1: 3 de las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Así mismo, se incluyó el anticuerpo anti-HEL, el cual ya había sido producido exitosamente en nuestro laboratorio.

Al terminar las cosechas los anticuerpos se precipitaron con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y posteriormente se purificaron con proteína G.

Las concentraciones de los anticuerpos obtenidas por espectrofotometría estaban saliendo muy bajas, por lo que se decidió realizar una cuantificación de los anticuerpos purificados por el método de BCA. Este es un método muy confiable para cuantificar proteínas; así mismo se cuantificaron las proteínas blanco MtlA y BamA, (ambas proteínas ya se habían purificado anteriormente en el laboratorio).

#### 8.3 Cuantificación por el método de BCA

<b>Proteína</b>	<b>Concentración</b>
MtlA	95.139 µg/ml
BamA	144.177 µg/ml

Tabla 6: Concentraciones de proteínas

Sorprendentemente, los anticuerpos que se purificaron hasta el momento mostraron concentraciones muy bajas por el método de BCA. Por lo anterior pensamos que el anticuerpo se está perdiendo durante una fase de la purificación. Así que se decidió intervenir en algunos puntos de la purificación de anticuerpos como se muestra en el siguiente esquema:

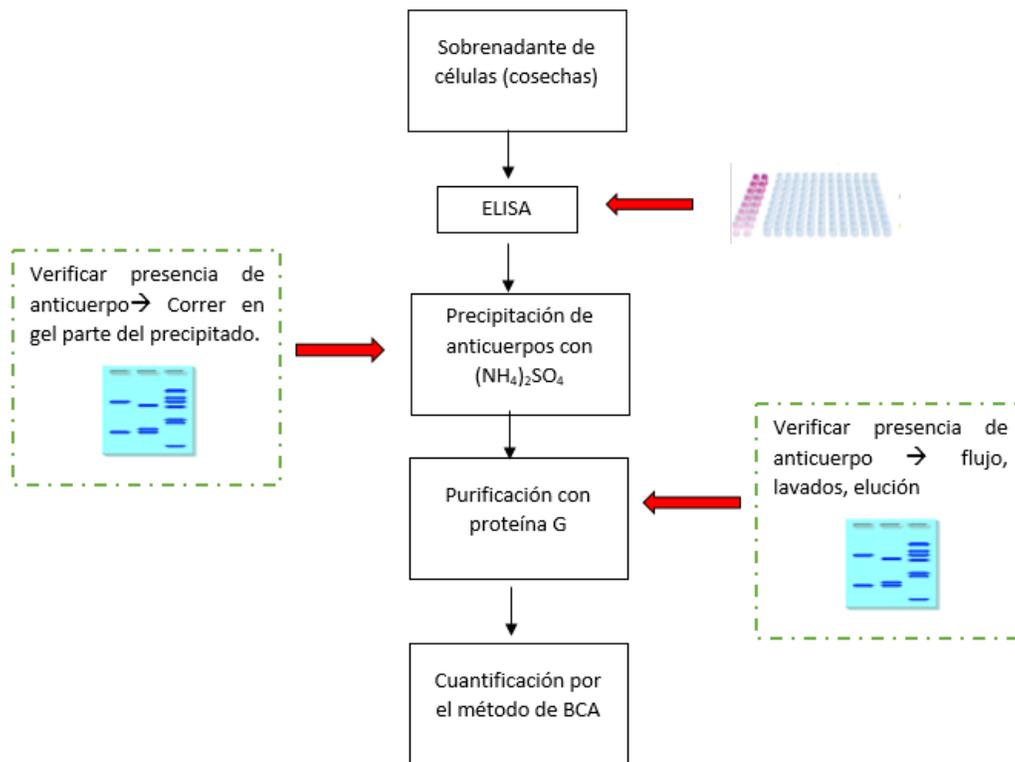


Figura 21. Esquema de la estrategia de purificación de anticuerpos y posibles puntos de intervención.

Se corrieron 10 µl del flujo de los anticuerpos purificados (el flujo es lo que se recupera después de dejar interaccionando la proteína G con el anticuerpo) en un gel de poliacrilamida 10% para verificar si la proteína G no está atrapando el anticuerpo. Con este experimento se pudo notar que al precipitar los anticuerpos también se está co-precipitando una proteína contaminante con un peso de alrededor de 70 KDa (posiblemente transferrina del medio de cultivo), en este mismo

gel se alcanzan a observar bandas tenues de 50 KDa (asterisco) correspondientes a las cadenas pesadas de los anticuerpos (figura 22, A). Lo anterior nos indica que posiblemente la proteína G no está atrapando al anticuerpo en su totalidad. De igual manera se corrieron 100 µl de los lavados en la purificación de anticuerpos y se observó la presencia de una banda de aproximadamente 70 KDa correspondiente a la transferrina (figura 22, B).

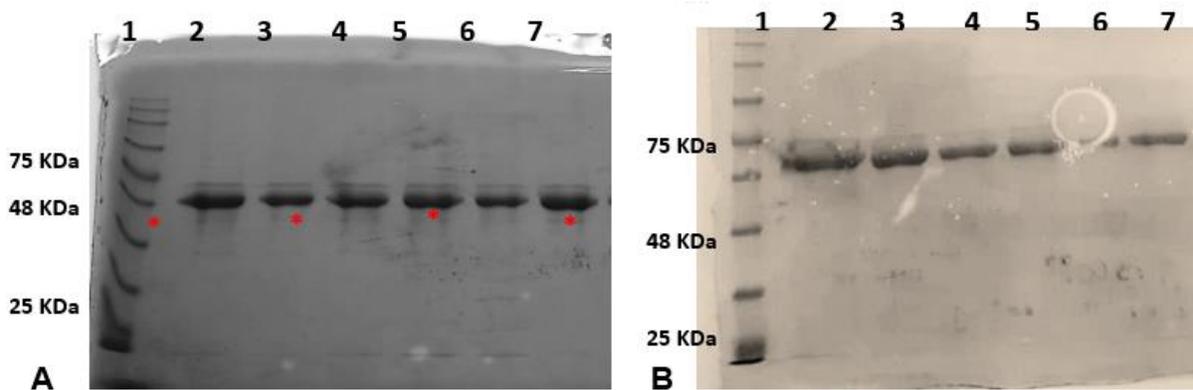


Figura 22. Electroforesis de los anticuerpos purificados. En el panel A se muestran los flujos de anticuerpos purificados: carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-7: flujos de anticuerpos. En el panel B se muestran los lavados de purificación de anticuerpos: carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-7: lavados de anticuerpos purificados.

#### 8.4 Ensayo de precipitación de anticuerpos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Al observar en el gel de poliacrilamida que se estaba co-precipitando una proteína contaminante (posiblemente transferrina del medio) con nuestros anticuerpos, se procedió a realizar un ensayo de precipitación de anticuerpos con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado de distintas marcas (Sigma, JT Baker, y Ferment). Esto se realizó debido a que anteriormente se había usado sulfato de amonio de la marca Sigma y en esta

última purificación se utilizó sulfato de amonio de la marca JT Ferment. El anticuerpo se precipitó por 1:30 horas a temperatura ambiente con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Después, en un gel de poliacrilamida 10% se corrió el precipitado de los anticuerpos (figura 23). En este gel se pudo observar una banda de aproximadamente 70 KDa correspondiente a la proteína transferrina. Por otra parte, el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de la marca JT Baker precipita mayor cantidad de proteína contaminante en comparación con los demás  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mientras que el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de la marca Sigma precipita menos transferrina. El  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de la marca Ferment que se utilizó en nuestra última precipitación de anticuerpos precipita más transferrina que el de marca Sigma. Estos resultados sugieren que la marca del  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  influyó en la calidad de purificación de los anticuerpos.

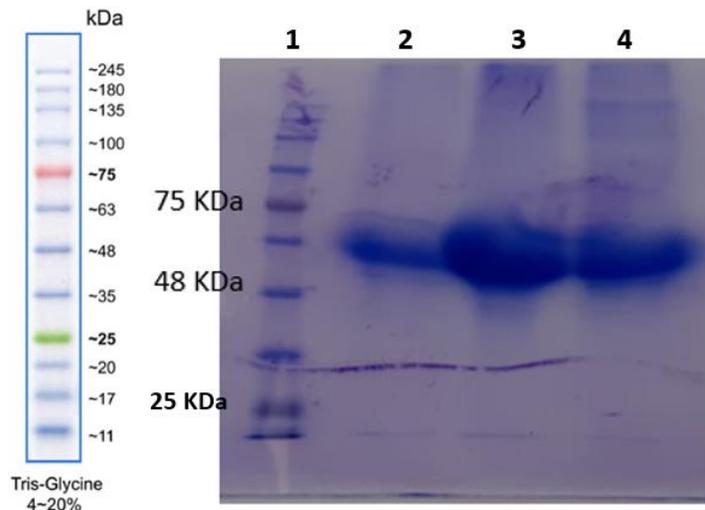


Figura 23. Electroforesis de la precipitación de los sobrenadantes con distintas soluciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Se muestra un gel de poliacrilamida al 10% con: carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Q8 precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de la marca Sigma, carril 3: Q8  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de la marca JT Baker, carril 4: Q8 precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de la marca Ferment.

## 9 Discusión

Ante la grave situación de la resistencia bacteriana se ha estimulado el trabajo en estrategias no basadas en antibióticos. Los mAbs ofrecen un potencial alto considerable para combatir infecciones bacterianas; además los mAbs han demostrado una enorme capacidad en aplicaciones de investigación (Reichert JM *et al.*, 2005). La inmunogenicidad de mAb murinos limitan su uso clínico en humanos, por tal motivo, en este grupo de investigación y previo a este trabajo de tesis se produjeron mAb totalmente humanos los cuales fueron sometidos a pruebas de unión a su proteína blanco y así mismo se demostró que dichos anticuerpos tienen actividad bacteriolítica por medio de un ensayo bactericida. Sin embargo, estos anticuerpos tienen que ser probados *in vivo* en un modelo de ratón para su evaluar su potencial protector. Para lograr lo anterior se procedió a la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos. En este trabajo se intentó producir anticuerpos monoclonales quiméricos región variable humana / región constante murino. La quimerización del anticuerpo es realizada con el fin de disminuir la inmunogenicidad que puedan provocar en los posteriores ensayos *in vivo* en ratón, además de que con la quimerización de anticuerpos humanos de isotipo IgG1 a anticuerpos quiméricos región variable humana- región constante murino de isotipo IgG2a permitirá simular las funciones efectoras (fijación de complemento) de isotipo IgG1 humano equivalentes en un modelo de ratón. El reemplazo de la región constante humana por regiones constantes murinas se realizó reclonando las regiones variables humanas de cadena pesada y ligera en los vectores de clonación pBROS-CLlgmk, pBROS-CLlg-ml1 y pBROS- CHlg2a que expresan la región constante murino IgG2a para cada cadena respectivamente. Estos vectores tienen la información génica necesaria para codificar las cadenas del anticuerpo, su posterior expresión en cultivo celular en células HEK293 y su purificación con proteína G. Por otra parte, como se mencionó anteriormente a lo largo de este trabajo, los anticuerpos producidos reconocen a las proteínas MtlA y BamA de

*Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, ambas proteínas se encuentran en la membrana externa de las bacterias. Dichas proteínas fueron seleccionadas mediante un enfoque bioinformático, vacunología reversa y es posible que posean capacidad protectora. La producción de los mAb recombinantes quiméricos se produjeron en la línea celular de riñón embrionario humano HEK293. Estas células se han usado ampliamente para la expresión de proteínas porque pueden transfectarse de manera muy eficiente con DNA plasmídico, también se puede realizar a gran escala mediante transfección con fosfato de calcio (Meissner *et al.*, 2001). Cabe mencionar que la producción de los anticuerpos que se intentaron producir en este trabajo fue a pequeña escala ya que solo se necesitaba probar la especificidad de dichos anticuerpos y así seleccionar anticuerpos para más adelante producir anticuerpos a grande escala en células CHO para su posterior evaluación en ensayos *in vivo*.

Durante la generación de las construcciones de cadena ligera Kappa se presentó dificultad, pues en una construcción no se obtenían colonias positivas que obtuvieran el vector con el inserto, más bien solo tenían el simple vector, Ante este problema, se pensó que el vector se estaba autoligando por lo que se procedió a realizar una desfosforilación del vector, se utilizó la desfosfatasa SIP, esta es una enzima que elimina los grupos fosfato 5' evitando que el vector se autoligue.

Después de tener listas las construcciones se expresaron los 16 mAb quiméricos en células HEK293. Luego se realizó un ensayo de western blot utilizando el sobrenadante de las células y un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a HRP (IgG H&L- HRP, ab205719) para verificar que todos los anticuerpos se estaban produciendo así mismo también se utilizó el sobrenadante del anticuerpo humano que se incluyó en la transfección de los anticuerpos quiméricos ya que este nos ayudó a asegurar que los reactivos utilizados estaban funcionando correctamente. Estos resultados confirman este método funciona porque si se produjo el anticuerpo ya antes producido en el laboratorio. Los resultados de este ensayo mostraron que

6 de los 16 anticuerpos de interés no se estaban produciendo. Pensamos que posiblemente la cadena pesada de los anticuerpos (IgG2a de ratón) esté afectando ya que el color del medio celular de la transfección de los anticuerpos quiméricos tenía un color distinto al medio celular al del anticuerpo humano; también intentando encontrar respuestas se pudo encontrar que los 6 anticuerpos que al parecer no se estaban produciendo tienen en común la cadena ligera Kappa 5. Por tal motivo se decidió verificar si la construcción se encontraba correctamente haciendo un ensayo con enzimas y se secuenció lo que nos confirmó que la construcción estaba correctamente construida. Por otra parte, en los 10 anticuerpos que dieron señal positiva se observó una banda de aproximadamente 50 KDa que corresponde a la cadena pesada del anticuerpo, pero también se observó una banda de 70 KDa la cual creemos corresponde a la proteína transferrina que contiene el medio de cultivo celular utilizado. En este western blot no se observó la banda correspondiente a la cadena ligera del anticuerpo, por lo que pensamos que nuestra proteína de interés (anticuerpo) podría estar siendo atrapado por la proteína contaminante transferrina, cabe mencionar que aproximadamente el 90% del medio de cultivo celular corresponde a la transferrina, después se procedió a purificar los anticuerpos seleccionados.

La purificación de los anticuerpos se convirtió en un reto, pues además de que las concentraciones eran muy bajas también se coprecipitaba la proteína transferrina del medio de cultivo de las células. Por tal motivo pensamos que el sulfato de amonio que se estaba utilizando no funcionaba correctamente pues, cabe mencionar que, es de diferente marca al que se había estado utilizando anteriormente en este laboratorio, por otra parte, también pensamos que podría ser la proteína G la que ya no esté funcionando correctamente. Para determinar dónde está el problema se realizaron ensayos en diferentes puntos de la metodología.

Para la purificación de los anticuerpos se realizaron dos etapas: primeramente, se precipitaron los anticuerpos utilizando sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50% saturado. Adicionando un volumen equivalente de saturación (30-40% de saturación) de solución reduce la contaminación por transferrina y albumina (Amarshan Pharmacia Biotech, 2000) estas proteínas se encuentran comúnmente en el medio de cultivo. Sin embargo, al precipitar los anticuerpos con sulfato de amonio saturado durante 1:30 horas a temperatura ambiente y después verificar en un gel de poliacrilamida 10% se pudo notar que los anticuerpos se coprecipitaban con la transferrina.

La concentración a la que los anticuerpos precipitan depende del tipo de especie, los anticuerpos de ratón necesitan de 45 a 50% de saturación (Amarshan Pharmacia Biotech, 2000). La segunda etapa fue la purificación de los anticuerpos utilizando proteína G, esta es una proteína que se encuentra en la superficie celular del grupo G *Streptococcus*, es un receptor Fc tipo III el cual se une a la región Fc de la IgG. La proteína A es derivada de *Staphylococcus aureus* y contiene cinco regiones que se une a la región Fc de la IgG. Ambas proteínas A y G son eficientes para la purificación del anticuerpo de isotipo IgG2a (Amarshan Pharmacia Biotech, 2000), sin embargo, tal vez la proteína G que en este trabajo se utilizó ya no estaba funcionando muy bien, por otra parte, la proteína A no se utilizó en este trabajo, pero se pudiera utilizar.

A partir de los anticuerpos purificados se realizó un western blot, en donde se observó una banda de alrededor de 30 KDa en 7 anticuerpos purificados de 10. Pensamos que los 3 anticuerpos restantes si se encontraban, pero a una concentración muy baja por lo que se tuvo que volver a repetir el western blot, pero utilizando una mayor concentración. Por otra parte, la banda de 30 KDa que se observó corresponde a la cadena ligera del anticuerpo y pensamos que tienen un peso mayor porque tal vez el péptidoseñal (IL2) no se esté liberando de la cadena

del anticuerpo (el peso molecular de la IL2 es de 2 KDa). Por otra parte, no se observó la banda correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo de 50 KDa, lo que podría ser debido a que la concentración de anticuerpo es muy baja y con ello el anticuerpo anti IgG acoplado con HRP (H +L) no está amplificando la señal quimioluminiscente adecuadamente pues cabe mencionar que en uno de los anticuerpos se alcanza a observar la cadena pesada (figura no mostrada); como control positivo se utilizó suero de ratón, en el cual se observaron dos bandas al revelar el western blot, una de 25 KDa correspondiente a la cadena ligera del anticuerpo y otra banda de 50 KDa correspondiente a la cadena pesada.

## **10 Conclusiones y perspectivas futuras**

Con el trabajo de este proyecto se realizaron las construcciones de cadenas ligeras Kappa de anticuerpos quiméricos región variable humana y región constante murina para la producción de anticuerpos quiméricos anti *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, en células HEK 293, sin embargo, en los western blot no se logró observar ambas cadenas de los anticuerpos. Se pudo observar que el grado de saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , el tiempo, la temperatura e incluso la marca pueden intervenir en una mejor calidad de precipitación del anticuerpo. Sin embargo, por falta de tiempo hicieron falta más ensayos para demostrar que los anticuerpos recombinantes efectivamente son de ratón y que se unen a su proteína blanco MtlA y BamA por medio de un ensayo de western blot y/o ELISA. Por otra parte, se planteaba realizar ensayos bactericidas utilizando las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* esperando ver un efecto bacteriolítico y ensayos de opsonofagocitosis que demuestren su funcionalidad de fagocitos mediada por anticuerpos, por falta de tiempo no se realizaron los ensayos anteriormente mencionados.

Cabe mencionar después de una selección de anticuerpos funcionales estos serán producidos a mayor escala en células CHO para poder realizar ensayos *in vivo* en un modelo de ratón, realizando una inmunización pasiva con los anticuerpos. Se ha

demostrado que algunos mAbs actúan sinérgicamente con antibióticos, mejorando su efecto antimicrobiano (DiGiandomenico A et al., 2014) pudiendo así también evaluar los anticuerpos con sus antibióticos respectivos para cada bacteria.

## 11 Referencias

Abbas A. K Lichtman A.H. and Pober J. S. 8° Ed “*Cellular and Molecular Immunology*”, Sanunders-elsevier. (2004).

Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Future Health and Wealth of Nations. 2014

Antonio DiGiandomenico, Ashley E. Keller, Cuihua Gao, Godfrey J. Rainey, Paul Warrener, Mareia M. Camara, Jessica Bonnell, Ryan Fleming, Binyam Bezabeh, Nazzareno Dimasi, Bret R. Sellman, James Hilliard, Caitlin M. Guenther, Vivekananda Datta, Wei Zhao, Changshou Gao, Xiang-Qing Yu, JoAnn A. Suzich, C. Kendall Stover. A multifunctional bispecific antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa*. *Science Translational Medicine* 12 nov 2014: vol 6, issue 262 pp 262ra155. doi: 10.1126 / scitranslmed.3009655

Amarshan Pharmacia Biotech, *Antibody Purification Handbook* No.18-1037-46, 2000

Barnes AI, Ortiz C, Paraje MG, Balanzino LE, Albesa I. Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. *Can. J. Microbiol.* 43(8), 729–733 (1997).

Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38:217-225.

Brogden KA. Antimicrobial peptides pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature* 3:238–250. (2015)

Dolgachev VA, Yu B, Sun L et al. Interleukin 10 overexpression alters survival in the setting of gram-negative pneumonia following lung contusion. *Shock* 2014;41:301-10

Dreser A, Wirtz VJ, Corbett KK, Echániz G. “Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas”. *Salud Publica Mex* 2008;50 supl 4:S480-S487

Holliger, P. & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23, 1126–1136.

IMGT. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. “Understanding the Immune System How It Works”. NIH Publication No. 03-5423 September 2003

Jose M. Munita, Cesar A. Arias. “Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol spectr.* 2016 Apr. Geneva. Who publishes list of bacteria which new antibiotics are urgently needed”. World Health Organization, February 2017

José A Bengoechea, Joana Pessoa. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 43, Issue 2, March 2019, Pages 123–144,

John V. Ashurst ; Adam Dawson. *Klebsiella Pneumonia* “StatPearls” ; 15 march 2019

Kathrin U Jansen, Charles Knirsch & Annaliesa S Anderson. The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance. *Nature Medicine* Volume 24 ,Number 1, 2018

Krzyminska S, Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Cytotoxic activity of *Enterobacter cloacae* human isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 56, 248–252 (2009).

Kuby J., Kind J.T. Goldsby A. y Osburne A. Antígenos y anticuerpos. En Thomas J. Kindt. *Inmunología de Kuby* (sexta edición) México: McGraw-Hill Interamericana. 2007

Lipsitch, M. & Siber, G.R. How can vaccines contribute to solving the antimicrobial resistance problem? *MBio* 7, e00428-16 (2016)

Medini K, Annavaiah, Angela Gomez-Simmonds, Anne-Catrin Uhlemann. Multidrug – Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front Microbiol.*, 31 January 2019.

Marta Rendón-Anaya y Alejandro Alagón. Mecanismos moleculares de diversificación de inmunoglobulinas. Instituto de Biotecnología, UNAM. *REB* 27(1): 19-29, 2008

Maria Lina Mezzatesta, Floriana Gona<sup>1</sup> y Stefania Stefan. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* (2012) 7(7), 887–902.

Martin B. Oleksiewicz, Gábor Nagy, Eszter Nagy, “Antibacterial monoclonal antibodies: Back to the future?”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 526 (2012) 124–131, 13 June 2012.

Meissner P, Pick H, Kulangara A, Chatellard P, Friedrich K, Wurm FM. Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells. *Biotechnol Bioeng* (2001) 75:197–203. doi:10.1002/bit.1179

Miho E, Yermanos A, Weber CR, et al. Computational strategies for dissecting the high-dimensional complexity of adaptive immune repertoires. *Front Immunol* 2018;9:224.

Paauw A, Caspers MP, Schuren FH *et al.* Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. *PLoS One* 3, e3018 (2008).

Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016;89:629-61

Płusa T. “Pathogenetic conditions of treatment of infections caused by antibiotic-resistant strains *Klebsiella pneumoniae*”. 28 de junio de 2019; 46 (276): 251-256.

Rabinovich A., López J., y Otrwski M. Generación de la diversidad de los anticuerpos y su uso diagnóstico y terapéutico. *Inmunología molecular: Nuevas fronteras de la medicina*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. 2004

Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol.* 2005;23:1073–1078.

Richard A Norman, Francesco Ambrosetti, Alexandre M J J Bonvin, Lucy J Colwell, Sebastian Kelm, Sandeep Kumar, Konrad Krawczyk. Computational approaches to therapeutic antibody design: established methods and emerging trends. *Briefings in Bioinformatics*, 18 october 2018

Rino Rappuoli, Matthew J. Bottomley, Ugo D'Oro, Oretta Finco, and Ennio De Gregorio. "Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design". *J Exp Med.* 2016 Apr 4; 213(4): 469–481.

Rodrigo Orrego. Fagoterapia: alternativa para el control de enfermedades bacterianas. *Salmon expert.* 18.06.2015 23:16.

World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas

## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **FLORES HERNANDEZ MARIA GUADALUPE** con número de matrícula **20154007249** cuyo título es:

**“Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales quiméricos anti *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*”.**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular.**

Cuernavaca, Mor a 05 de noviembre del 2020

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DRA. MARIA ANGÉLICA SANTANA CALDERON**  
**DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA**  
**DR. JUAN MAURICIO TELLEZ SOSA**  
**DRA. SONIA DÁVILA RAMOS**  
**DR. RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE**

**PRESIDENTE**  
**SECRETARIO**  
**VOCAL**  
**PRIMER SUPLENTE**  
**SEGUNDO SUPLENTE**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2020-12-09 16:20:36 | Firmante**

0uzHNh8pru/TH0o4T+MXq6QhLFN38DkHyunXB/4uNIKYiZ73wE3Fj8V4Gt7S2+wf0jcwxa1+HbQgV7A9zOJ7v534MJ9PILDp6VUYBdP73h009hk0Val1ov/RajqrmtTn6JstZXwc1fQ  
S6yKoAUcvueNxsErDN32x/k3xfEoh9dIEX1SzRelZyU+VqlAYEO6SrPgPgDVREOnbebDcjCPT0w+/AcHY5i36klISWWxuBPXkGXQ1rGn+Qz+jpb4123TwLHG84bS4BmJ0d7ItNzVW  
4DNnxmmp5LA71QNZJc7zEnCKgJVfZhhHaHve6+zXBmtUcf6JyHGCEYodZgw/HNKIUeA==

**RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2020-12-09 16:55:14 | Firmante**

YYmZ2ldRdUbyFodXrjZytKlqCRuch1hfbD1UB/v5T6xTvT3UAGyTABnb8RHIs5C/vjbnwssAVMN1dbB6njYRLtvKR6Bs90MJGfW5uPZvPnsID1j3IL5sf0grYCseNvx5LHcDOz5o3  
Jre4KoyYHQYIM1N1LTd7D3jG4+7/nEDZ184sv3o7r7WXR2sCA6Os8Nvy8ZjfP7N/rf8yYIR4kqaV/BBtCrEMZ2yVjkd2TL0Qba6X/16wWx+Rcr6y0hD8izsoz7PVwefdqIPxtu4b11IP  
AfoR15073zwWfibATFaw7SfYv5uqL3ixiSmV7PT2x/37n9OyTN5o/Cvvn0JLA==

**JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA | Fecha:2020-12-09 17:05:25 | Firmante**

Vo03LHKQJEfQORMRPjtwHUAAnieGZI7Z6N7bMMFIfduqs19yA0MYRH8iDDFNQB4mgF9j6596xcsGDtUgDvFjuvQbH2gpJ1rBxtTKUyIjPKHca+sHsiR0MwlpNoBHQAc+0/pSHM  
C2Xt5Dhyil0g6NqXYNzCVZD2PMFOqd5jaa491mgcScZH7F6CeMZZUtaYFwJQFXmwl3/AVyagrZ2BYto7toeHX7PnXrWszv9nGe7UxYmv9k7yjs27TQ3i2nje3IMs/M9bgNwm  
3Yy+6lb1KwXSbkd4WFNRLobVt5Q0LIF5q3teWveooPpYi4JF9aGfI4Sjbaes4ps6xH4Xjqw==

**SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2020-12-10 18:27:28 | Firmante**

dR1VDI/g9fioY7Qv7NiX03QixkW6fghwpl2+gnvJx+Hskn5KodfFvw4SMOw9zfv/ClniO9MQjLSP1NgA9tuGFWYz9VE1A3biTouCEXWgy+ehIJW5Z44MDY+wcntCVvJS1d5x5yRk/D  
DJeeBNBgnRgn7Av7Ag6B92iZtiU/hH9ppaVhjueF209do/jwloF1ziGXpbytkIBnR4dtROtYaOp/HeDN7ZWiDwMSayM+Xc40pv4QuD/Te5Z5wqmT/8YjRfVbHlJxOGnBNM66n9Pd1  
MGB+x/0pOumsQtVzWmpBnJHxhM95WpL7WWaZz9FjdpJau2VPjBQd2w2+rkK938g==

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2020-12-10 18:43:37 | Firmante**

Mv8SQspl6oUHSZvUSGZE6vd12PTZacj4/lw0pkB0yoNVwOHMcnyMbAH8/PXha63k6egnpgRQVSEEG3p/qcAFDy1AvLUAA4w35ronzI7htruKZmf+BFW02cVM6Gk+iDlrqvn1hJ  
Wv6TFIjR5U3gtWHLTlrRapzaUFBw2RNn9Oo/WHL/U/ajnzXLBybiivWHDH74RhoWqvOtnSRbvuiMiNZiOdM0t+GNNwJHeKrGU8fad8gvTfaspJlhDHT7lblLgG8GgOY3PFaSUyT  
kvkKtm4TLUJyZuse2N2kn0O7jdK4ypR2zOuVb9W0Hkb7rfrTQE+PrIA2u+A3d4WKWww0a7A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



lpkE0T

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VfmQrKsKzWy9Vucwvacd0AydCHZ8ERp6>

