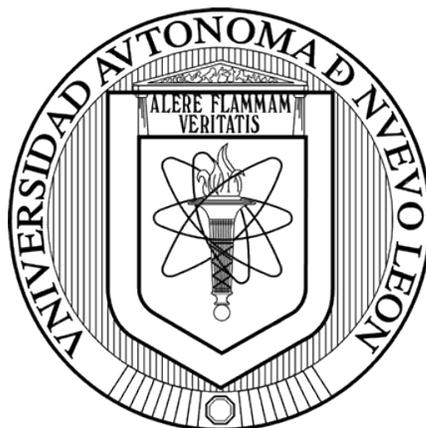


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

**PRODUCCIÓN DE LA INMUNOTOXINA 4D5scFv-BmKAGAP UTILIZANDO
UN SISTEMA DE EXPRESIÓN PROCARIÓTICO Y EUCARIÓTICO**

Por

MC EVELYN MARTÍNEZ MORA

**Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTORADO EN
CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada**

Diciembre 2022

PRODUCCIÓN DE LA INMUNOTOXINA 4D5scFv-BmKAGAP UTILIZANDO UN SISTEMA DE EXPRESIÓN PROCARIÓTICO Y EUCARIÓTICO

Aprobación de la Tesis:

DR. XRISTO ZÁRATE KALFÓPULOS

Presidente

DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO

Secretario

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Vocal

DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ

Vocal

DR. SERGIO ARTURO GALINDO RODRÍGUEZ

Vocal

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Sub-Directora de Posgrado

PRODUCCIÓN DE LA INMUNOTOXINA 4D5scFv-BmKAGAP UTILIZANDO UN SISTEMA DE EXPRESIÓN PROCARIÓTICO Y EUCARIÓTICO

Revisión de la Tesis:

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Comité Tutorial

DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO

Comité Tutorial

DR. ANGEL LEÓN BUITIMEA

Comité Tutorial

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Sub-Directora de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL por sus instalaciones, materiales y conocimientos aportados para estudiar un doctorado en ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización del doctorado.

Al Dr. Xristo Zárate Kalfópulos por su asesoría y apoyo a la realización de este proyecto de tesis, y darme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo del laboratorio de Expresión y Purificación de Proteínas como estudiante de doctorado.

Al Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza por su orientación y contribución en el proyecto.

A los Dres.: María Elena Cantú Cárdenas, Jesús Alberto Gómez Treviño y Angel León Buitimea por sus comentarios oportunos y correcciones de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Jessy, David, Bryan, Memo, Tere, Felipe, Eduardo y Juan por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias. Y principalmente a Dios y a mi querida familia.

¡Gracias!

RESUMEN

MC Evelyn Martínez Mora

Fecha de Graduación: 19 de Diciembre de 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: **PRODUCCIÓN DE LA INMUNOTOXINA 4D5scFv-BmKAGAP UTILIZANDO UN SISTEMA DE EXPRESIÓN PROCARIÓTICO Y EUCARIÓTICO**

Número de páginas: 88 Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias
con orientación en Microbiología Aplicada

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y método de estudio: Los biofármacos se caracterizan por ser altamente efectivos y tener menos efectos secundarios que algunos medicamentos convencionales. Entre estos se encuentran algunas proteínas recombinantes, las cuales se emplean para prevención, diagnóstico o terapia. El fragmento variable de una sola cadena 4D5scFv y el péptido BmKAGAP, son ejemplos de proteínas recombinantes que tienen el potencial para emplearse como agentes terapéuticos contra células cancerígenas, y al unirse químicamente o expresarse en conjunto crean una inmunotoxina que es específica contra células cancerígenas que sobreexpresan el receptor HER2, el cual es un indicador asociado con la progresión del cáncer. Para mejorar la solubilidad, estabilidad y facilitar la purificación por medio de cromatografía de afinidad de las proteínas recombinantes se utilizó SmbP, y se expresaron en cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para cambiar el estado redox del citoplasma y puedan formarse los enlaces disulfuro. La inmunotoxina 4D5scFv-BmKAGAP con un His tag se expresó en la línea celular ExpiSf9™, ya que tiene la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales, utilizando el vector viral baculovirus. Se purificaron por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP, se removió la proteína de fusión con la enzima enteroquinasa y se realizó una segunda cromatografía de afinidad. Se expresó la inmunotoxina en ExpiSF9™, pero se encontró en la fracción insoluble de la lisis celular. Por lo anterior, solo se determinó la actividad antiproliferativa de la proteína recombinante BmKAGAP en la línea celular MCF-7.

Conclusiones y contribuciones: La proteína de fusión SmbP demostró ser eficiente para la obtención de proteína soluble expresada en el citoplasma de las cepas de *E. coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3). Se logró la expresión y purificación de las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP etiquetadas con SmbP. La proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP se encontró en la fracción insoluble de la lisis de la línea celular ExpiSf9™. Se probó la actividad antiproliferativa de BmKAGAP en la línea celular MCF-7 y se obtuvo un IC₅₀ de 54.59 µg/mL.

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Director de Tesis

Tabla de Contenido

| Capítulo | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 12 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 22 |
| 4.1 Hipótesis..... | 22 |
| 4.2.1 Objetivo general..... | 22 |
| 4.2.2 Objetivos específicos..... | 22 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 24 |
| 5.1 Material, reactivos y equipo..... | 24 |
| 5.2 Metodología general de trabajo..... | 25 |
| 5.3 Construcción y propagación de los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv, pET30a_SmbP_BmKAGAP..... | 26 |
| 5.3.1 Clonación, propagación y extracción de los plásmidos pET30a_SmbP, pUC57_4D5scFv y pUC57_BmKAGAP..... | 26 |
| 5.3.2 Amplificación de los genes <i>4D5scFv</i> y <i>BmKAGAP</i> | 27 |
| 5.3.3 Doble digestión enzimática de los amplicones de los genes <i>4D5scFv</i> y <i>BmKAGAP</i> y del vector de expresión pET30a_SmbP..... | 29 |
| 5.3.4 Reacción de ligación del vector de expresión pET30a_SmbP con los genes <i>4D5scFv</i> y <i>BmKAGAP</i> | 30 |
| 5.3.5 Clonación de <i>Escherichia coli</i> DH5α con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP..... | 30 |
| 5.4 Construcción y propagación del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP..... | 32 |
| 5.4.1 Transposición del plásmido pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP en el bacmid..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 5.4.2 Amplificación del sitio mini-Att Tn7 | 33 |
| 5.5 Transfección del ADN del baculovirus con el gen que codifica a la inmunotoxina His_4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular de insecto <i>Spodoptera frugiperda</i> | 34 |
| 5.5.1 Proliferación de la línea celular ExpiSf9™ | 34 |
| 5.5.2 Transfección del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular ExpiSf9™ | 35 |
| 5.6 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP | 36 |
| 5.6.1 Clonación de <i>Escherichia coli</i> Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3) con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP | 36 |
| 5.6.2 Microexpresión de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP | 37 |
| 5.6.3 Escalamiento de la expresión de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP | 39 |
| 5.6.4 Purificación de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP | 39 |
| 5.6.5 Cuantificación de proteínas | 40 |
| 5.6.6 Remoción de la proteína de fusión | 40 |
| 5.7 Expresión y purificación de la proteína recombinante 4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular de insecto <i>Spodoptera frugiperda</i> | 42 |
| 5.7.1 Microexpresión de la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP | 42 |
| 5.7.2 Purificación de la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP | 43 |
| 5.8 Evaluación de la actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> | 44 |
| 5.8.1 Proliferación de las líneas celulares MCF-7..... | 44 |
| 5.8.2 Evaluación de la actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> | 45 |
| 5.9 Disposición de los residuos generados..... | 46 |
| 6. RESULTADOS | 47 |

| | |
|---|----|
| 6.1 Construcción y propagación de los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv, pET30a_SmbP_BmKAGAP | 47 |
| 6.1.1 Clonación, propagación y extracción de los plásmidos pET30a_SmbP, pUC57_4D5scFv y pUC57_BmKAGAP | 47 |
| 6.1.2 Amplificación de los genes <i>4D5scFv</i> y <i>BmKAGAP</i> | 48 |
| 6.1.3 Doble digestión enzimática de los amplicones de los genes <i>4D5scFv</i> y <i>BmKAGAP</i> y del vector de expresión pET30a_SmbP | 49 |
| 6.1.4 Reacción de ligación del vector de expresión pET30a_SmbP con los genes <i>4D5scFv</i> y <i>BmKAGAP</i> | 51 |
| 6.1.5 Clonación de <i>Escherichia coli</i> DH5α con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP | 52 |
| 6.2 Construcción y propagación del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP | 53 |
| 6.2.1 Transposición del plásmido pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP en el bacmid | 53 |
| 6.2.2 Amplificación del sitio mini-Att Tn7 | 54 |
| 6.3 Transfección del ADN del baculovirus con el gen que codifica a la inmunotoxina His_4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular de insecto <i>Spodoptera frugiperda</i> | 56 |
| 6.3.1 Proliferación de la línea celular ExpiSf9™ | 56 |
| 6.3.2 Transfección del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular ExpiSf9™ | 56 |
| 6.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP en <i>Escherichia coli</i> SHuffle T7(DE3)..... | 57 |
| 6.4.1 Clonación de <i>Escherichia coli</i> Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3) con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP | 57 |
| 6.4.2 Microexpresión de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP | 58 |
| 6.4.3 Escalamiento de la expresión de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP | 59 |

| | |
|--|----|
| 6.4.4 Purificación de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP | 60 |
| 6.4.5 Cuantificación de proteínas | 63 |
| 6.4.6 Remoción de la proteína de fusión | 63 |
| 6.5 Expresión y purificación de la proteína recombinante 4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular de insecto <i>Spodoptera frugiperda</i> | 66 |
| 6.5.1 Microexpresión de la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP | 66 |
| 6.5.2 Purificación de la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP | 67 |
| 6.6 Evaluación de la actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> | 69 |
| 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 71 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 79 |
| REFERENCIAS..... | 81 |

Índice de Tablas

| Tabla | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación de los genes 4D5scFv y BmKAGAP..... | 28 |
| Tabla 2. Primers empleados para la amplificación de los genes 4D5scFv y BmKAGAP..... | 28 |
| Tabla 3. Programa de PCR establecido en el termociclador para la amplificación de los genes 4D5scFv y BmKAGAP. | 28 |
| Tabla 4. Doble digestión enzimática de los amplicones de los genes 4D5scFv y BmKAGAP y el plásmido pET30a_SmbP. | 29 |
| Tabla 5. Reacción de ligación del vector pET30a_SmbP con los insertos 4D5scFv y BmKAGAP..... | 30 |
| Tabla 6. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación de los genes 4D5scFv y BmKAGAP..... | 31 |
| Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación del sitio mini-Att Tn7 del bacmid..... | 33 |
| Tabla 8. Programa de PCR establecido en el termociclador para la amplificación del sitio mini-Att Tn7 del bacmid. | 34 |
| Tabla 9. Fase concentradora al 4% SDS-PAGE..... | 38 |
| Tabla 10. Fase separadora al 12 y 15% SDS-PAGE..... | 38 |
| Tabla 11. Fase concentradora al 4% Tricina-SDS-PAGE..... | 41 |
| Tabla 12. Fase separadora al 12 y 15% Tricina-SDS-PAGE..... | 41 |

Índice de Figuras

| Tabla | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Diagrama general de un anticuerpo. | 8 |
| Figura 2. Representación esquemática de la metodología general de trabajo. | 26 |
| Figura 3. Secuencia de 243 aminoácidos del 4D5scFv. | 48 |
| Figura 4. Secuencia de 66 aminoácidos de BmKAGAP. | 48 |
| Figura 5. Amplificación de los genes 4D5scFv y BmKAGAP. | 49 |
| Figura 6. Doble digestión enzimática de los genes 4D5scFv y BmKAGAP. | 50 |
| Figura 7. Doble digestión enzimática del vector de pET30a_SmbP. | 50 |
| Figura 8. Representación esquemática de la construcción del vector pET30a_SmbP_4D5scFv. | 51 |
| Figura 9. Representación esquemática de la construcción del plásmido pET30a_SmbP_BmKAGAP. | 52 |
| Figura 10. Análisis por PCR de las clonas de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP. | 53 |
| Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la inmunotoxina His_4D5scFv-BmKAGAP. | 54 |
| Figura 12. Análisis por PCR del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP de las clonas de <i>E.</i> <i>coli</i> DH10Bac TM transformadas con pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP. | 55 |
| Figura 13. Morfología de la línea celular ExpiSf9 TM | 57 |
| Figura 14. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de la expresión de SmbP_4D5scFv. | 58 |
| Figura 15. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 15% de la expresión de SmbP_BmKAGAP. | 59 |
| Figura 16. Cromatograma de purificación de SmbP_4D5scFv. | 60 |
| Figura 17. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de la purificación de SmbP_4D5scFv. | 61 |
| Figura 18. Cromatograma de purificación de SmbP_BmKAGAP. | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 19. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 15% de la purificación de SmbP_BmKAGAP..... | 62 |
| Figura 20. Curva de calibración de la concentración de albúmina sérica bovina. | 63 |
| Figura 21. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de la purificación de 4D5scFv. | 64 |
| Figura 22. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 15% de la purificación de SmbP_BmKAGAP..... | 65 |
| Figura 23. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de la expresión de His_4D5scFv-BmKAGAP..... | 67 |
| Figura 24. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de las fracciones solubles e insolubles de la expresión de His_4D5scFv-BmKAGAP..... | 68 |
| Figura 25. Porcentajes de viabilidad de la línea celular MCF-7 expuesta a BmKAGAP y SmbP_BmKAGAP determinados por el ensayo de WST-1..... | 69 |

Nomenclatura

| | |
|----------------|---|
| ° C | Grados centígrados |
| µg | Microgramo |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| 4D5scFv | Fragmento variable de una sola cadena del anticuerpo anti-HER2/ <i>neu</i> 4D5 humanizado |
| AcMNPV | <i>Autographa californica</i> nucleopolihedrovirus múltiple |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| Amp | Ampicilina |
| <i>attTn7</i> | Sitio diana del transposón Tn7 |
| Bacmid | Genoma viral del baculovirus recombinante |
| BbFGF | Factor de crecimiento de fibroblastos bovino |
| BL21(DE3) | Cepa de <i>Escherichia coli</i> contiene el gen de la ARN polimerasa del fago T7 para expresión de proteínas |
| BmKAGAP | Péptido antitumoral-analgésico del escorpión chino <i>Buthus martensii</i> Karsh |
| BmNPV | <i>Bombyx mori</i> |
| BT-474 | Línea celular de carcinoma ductal de glándula mamaria |
| BV | Virus brotados |
| CDR | Regiones determinantes de complementariedad |
| CHO | Línea celular de ovario de hámster chino |
| DARPs | Proteína diseñada de repetición de anquirina |
| DH5α | Cepa de <i>Escherichia coli</i> resistente al fago T1 y deficiente en <i>endA</i> para preparaciones de plásmidos de alta calidad |
| DMEM | Medio Eagle modificado de Dulbecco |
| DO | Densidad óptica |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| FDA | Administración de Medicamentos y Alimentos |
| FPLC | Cromatografía líquida rápida de proteínas |
| Fv | Fragmento variable |
| GalT3 | α-1,4-galactosil transferasa |
| Gen | Gentamicina |
| GnT2 | N-acetilglucosaminil transferasa II |
| <i>gor</i> | Gen que codifica a la enzima glutatión reductasa |
| GST | Glutatión S-transferasa |
| h | Hora |

| | |
|------------------|--|
| HBscFv | Cadena simple Fv del anticuerpo humano anti-HBsAg |
| HER | Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano |
| HER2 | Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 |
| His | Etiqueta de histidinas |
| IC ₅₀ | Concentración inhibitoria media |
| IgG1 | Inmunoglobulina G1 |
| IL-2 | Interleucina-2 |
| IMAC | Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados |
| IPTG | Isopropil-β-tiogalactósido |
| Kan | Kanamicina |
| kDa | Kilodalton |
| kpb | Kilo pares de bases |
| L | Litro |
| <i>lacZ</i> | Gen que codifica a la enzima β-galactosidasa |
| LB | Luria-Bertani |
| mAb | Anticuerpo monoclonal |
| MBP | Proteína de unión a maltosa |
| MCF-7 | Línea celular de carcinoma ductal de glándula mamaria |
| MDA-MB-231 | Línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)2,5difeniltetrazol |
| ng | Nanogramo |
| nM | Nanomolar |
| OB | Cuerpos de oclusión |
| ODV | Virus derivados de oclusión |
| Origami 2(DE3) | Cepa de <i>Escherichia coli</i> con mutaciones en los genes <i>trxB</i> y <i>gor</i> para la adecuada formación de enlaces disulfuro |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Buffer de fosfatos salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PE40 | Fragmento de la exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| pM | Picomolar |
| <i>Polh</i> | Gen que codifica la polihedrina |
| pPolh | Promotor de polihedrina |

| | |
|----------------------|---|
| Rosetta-gami(DE3) | Cepa de <i>Escherichia coli</i> con modificaciones para la formación de enlaces disulfuro, contiene codones raros |
| rpm | Rotaciones por minuto |
| s | Segundo |
| <i>S. frugiperda</i> | <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| scFv | Fragmento variable de una sola cadena |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio |
| Sf9 | Línea celular de ovario de <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| Shuffle T7 | Cepa de <i>Escherichia coli</i> con mutaciones en los genes <i>trxB</i> y <i>gor</i> , y expresa DsbC para la adecuada formación de enlaces disulfuro |
| SKBR-3 | Línea celular de adenocarcinoma de mama humano |
| SKOV-3 | Línea celular de adenocarcinoma de ovario humano que sobreexpresa el receptor HER2 |
| SmbP | Proteína pequeña de unión a metales |
| SPDP | N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato |
| <i>T. ni</i> | <i>Trichoplusia ni</i> |
| TAE | Tris-Acetato-EDTA |
| TEMED | Tetrametiletilendiamina |
| Tet | Tetraciclina |
| TEV | Virus del grabado del tabaco |
| TGF α | Factor de crecimiento transformante α |
| TGS | Tris-Glicina-SDS |
| Tn7 | Transposón bacteriano |
| Tn7L | Elemento regulador del extremo izquierdo del transposón Tn7 |
| Tn7R | Elemento regulador del extremo derecho del transposón Tn7 |
| TrxA | Tiorredoxina 1 |
| <i>trxB</i> | Gen que codifica a la enzima tiorredoxina reductasa |
| U | Unidades |
| x g | Fuerza centrífuga |

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología es el uso de organismos vivos o productos derivados de ellos para utilizarlos con diversos fines^{1,2}. Una de las principales áreas en las que se ha visto un gran avance es en la industria farmacéutica para la producción de biofármacos, estos se caracterizan por ser altamente efectivos y tener menos efectos secundarios^{2,3}. Entre estos se encuentran las proteínas recombinantes, vacunas compuestas por organismos modificados genéticamente, anticuerpos monoclonales y vectores para terapia génica; los cuales se emplean para prevención, diagnóstico o terapia; comúnmente este tipo de fármacos son administrados por vía parenteral^{3,4}.

Para la producción de proteínas recombinantes se emplea la tecnología del ADN recombinante, en la cual se puede controlar la expresión del o los genes de interés a través de la clonación y transformación molecular, y su posterior expresión en un organismo modelo^{2,3,5}. Estas proteínas pueden ser sintetizadas en células procarióticas, como las bacterias, y eucarióticas, como las levaduras, hongos filamentosos, microalgas, líneas celulares de mamíferos y de insectos, plantas y animales transgénicos; la elección del sistema de expresión depende

principalmente de las características de la proteína, su estructura y actividad biológica^{3,4}.

Las proteínas recombinantes son más difíciles de producir que los medicamentos convencionales, además de sus altos costos y mayores tiempos de producción, resulta un gran reto llevar de una expresión piloto a una expresión a mayor escala teniendo los cuidados pertinentes para, al final del proceso, tener una proteína biológicamente activa^{2,3}. Por lo cual se requiere mejorar las técnicas ya establecidas o la creación de nuevas que mejoren la estabilidad de las macromoléculas, se obtengan mejores rendimientos y en menos pasos de producción.

El sistema bacteriano es el más fácil de cultivar y los costos son menores, que algunos sistemas eucarióticos como las líneas celulares de mamíferos y animales transgénicos⁴.

Escherichia coli (*E. coli*) es considerado el microorganismo más conveniente, por ser ampliamente conocido, para la producción de proteínas recombinantes por su facilidad de incorporar el gen de interés, controlar la expresión, fácil manipulación, rápido crecimiento, mayores rendimientos, menos tiempos de producción; todo en comparación con las levaduras, células de insectos, mamíferos y plantas^{4,5}.

Los sistemas de expresión eucariótico se prefieren utilizar para la producción de proteínas recombinantes provenientes de genomas eucarióticos, por su capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales, como la

glucosilación, formación de puentes disulfuro, fosforilación o procesamiento proteolítico; las cuales son necesarias para el ensamblaje, estabilidad y actividad biológica^{4,5}. Por lo tanto, estas proteínas expresadas en las bacterias podrían estar mal plegadas, no ser activas o agregarse en el citoplasma de la célula formando cuerpos de inclusión^{4,6}.

Los cuerpos de inclusión también pueden formarse por una rápida producción de la proteína, por lo cual se emplean vectores de expresión que tienen como característica controlar la cantidad de proteína que se expresa, un ejemplo de expresión por inducción es el vector pET regulado por el operón lac, el vector codifica a la proteína represora LacI que reconoce al operador lac e impide la transcripción; por medio de un inductor, como el isopropil- β -tiogalactósido (IPTG), se logra la expresión de la proteína de interés al unirse este a la proteína represora y disminuir su afinidad al operador⁷.

Una de las técnicas empleadas para mejorar la solubilidad y estabilidad de las proteínas es la utilización de proteínas de fusión, incluso ayudan a facilitar la purificación por medio de cromatografía de afinidad⁸. Se obtiene una sola proteína codificada por la unión de dos o más genes, el gen de la proteína de interés y el gen de la proteína de fusión⁴. Una de estas proteínas de fusión es la proteína pequeña de unión a metales (SmbP, por sus siglas en inglés) aislada del periplasma de la bacteria *Nitrosomonas europaea*, con un tamaño de 9.9 kDa, se encuentra involucrada en el mecanismo de resistencia al cobre^{8,9}. SmbP tiene la capacidad de unirse a los iones metálicos: Cu(II), Ni(II) y Zn(II), y por medio de

esta cualidad se puede purificar la proteína a la que SmbP se encuentra unida mediante cromatografía de afinidad⁸.

Para que se puedan formar enlaces disulfuro en *E. coli* se utilizan plásmidos específicos que envían a la proteína de interés al periplasma⁴. También se han modificado genéticamente cepas microbianas para mejorar la calidad de las proteínas recombinantes, como *E. coli* Origami, la cual es una cepa deficiente en reductasa, por lo tanto hay menos probabilidades de reducir los enlaces disulfuro que se forman instantáneamente en el citoplasma⁶.

Un sistema de expresión eucariótico es el cultivo de células de insecto, el cual es una alternativa para resolver los problemas que se presentan tanto en el sistema bacteriano como en el cultivo de células de mamífero, ya que en esta última, a pesar de que la calidad de las proteínas recombinantes que se expresan en este sistema es mayor, resulta ser más costosa, requerimientos nutricionales complejos, se necesitan mayores tiempos de producción, es menos escalable, más difícil de propagar, se obtienen menores rendimientos y tiene un mayor riesgo de contaminación⁴.

El empleo de las líneas celulares de insecto es una técnica para mejorar la calidad de las proteínas recombinantes que requieran modificaciones post-traduccionales, y más aún, para aumentar los rendimientos se ha empleado el organismo completo del insecto (la larva)^{4,10}. Para lograr esto se emplean vectores virales, los cuales han sido modificados genéticamente para garantizar su seguridad, la transferencia rápida y correcta del gen de interés⁵.

Baculoviridae es una familia extensa de virus, su genoma es de ADN circular bicatenario con un tamaño entre 80 – 180 kpb^{11,12}. Los baculovirus tienen un número limitado de huéspedes, son patógenos de insectos utilizados principalmente para controlar plagas en los plantíos, por lo que son seguros para los vertebrados¹⁰. El sistema de expresión basado en baculovirus es el que más se emplea para la transducción a células de insecto, como *Spodoptera frugiperda*, *Autographa californica*, *Trichoplusia ni*, *Bombyx mori* y *Drosophila melanogaster*⁴.

Las dos especies de baculovirus que más se emplean como vectores de expresión son: *Autographa californica* nucleopolihedrovirus múltiple (AcMNPV) y *Bombyx mori* (BmNPV)¹⁰. Estos pertenecen al género de *Alphabaculovirus*, los cuales son virus derivados de oclusión (ODV por sus siglas en inglés), ya que su ensamblaje se lleva a cabo en el núcleo de la célula huésped, cerca del final del ciclo de infección viral, y se encierran en cuerpos de oclusión (OB, por sus siglas en inglés); estos consisten de viriones protegidos por una matriz paracristalina compuesta de una sola proteína llamada polihedrina, y una o más nucleocápsides pueden empacarse por virión; los OB se liberan por medio de la lisis celular^{10,11}. Estas especies de virus son llamados nucleopolihedrovirus por la forma poliédrica del cuerpo de oclusión que forman; esta estructura protege a las partículas virales del medio ambiente mientras encuentran a su próximo huésped; este ingiere los OB, se digieren y se liberan los ODV e infectan a las células epiteliales del intestino medio del huésped^{7,10,12}. Posteriormente, las células epiteliales basales del intestino pueden formar los dos fenotipos del virus: los

ODV y los virus brotados (BV, por sus siglas en inglés), este último no forma los OB, los BV brotan de las células para infectar a otras células directamente o circulan por la hemolinfa para diseminar la infección¹².

AcMNPV es el que más se ha estudiado, en comparación con los demás baculovirus tiene un mayor rango de huéspedes, distintos insectos lepidópteros así como las líneas celulares provenientes de estos insectos¹¹. Se ha observado que la polihedrina que este baculovirus forma en las células que infecta llega a representar más de la mitad de la proteína total que se encuentra en el medio¹¹. Esta característica fue importante para el desarrollo de este tipo de virus como sistemas de expresión, tomando en cuenta si llega a producir grandes cantidades de su proteína polihedrina también podría producir en esas cantidades otras proteínas de interés particular¹¹.

En el sistema de expresión de baculovirus se utiliza el promotor de polihedrina (pPolh) para expresar el gen de interés, el cual se encontrará en el locus de polihedrina del genoma viral del baculovirus recombinante (bacmid) sustituyendo al gen de polihedrina, ya que esta proteína no es esencial para que el virus se desarrolle y lleve a cabo su ciclo de infección¹¹.

Una de las formas para producir el vector de expresión de baculovirus es por medio de la transposición genética entre el bacmid y el plásmido de transferencia, usando el transposón bacteriano Tn7¹¹. Este proceso se lleva a cabo en el citoplasma de una cepa de *E. coli* como DH10Bac, esta cepa contiene el bacmid, donde en el locus de polihedrina se encuentra el gen *lacZ* de *E. coli* y el sitio mini-Att Tn7, el cual es usado para la transposición, además se encuentra

un plásmido auxiliar que codifica una transposasa¹¹. Por medio de técnicas de transformación el plásmido de transferencia es introducido a *E. coli*, este plásmido contiene el promotor pPolh seguido del gen de interés y ambos se encuentran rodeados en cada extremo por los elementos reguladores cis: Tn7L y Tn7R; cuando se lleva a cabo la transposición se eliminará el gen *lacZ*¹¹.

En los sistemas de expresión mencionados se han llevado a cabo expresiones de inmunotoxinas, las cuales entran en la categoría de proteínas recombinantes de uso terapéutico, ya que son sustancias inmunes, como anticuerpos monoclonales o citocinas, que se encuentran químicamente unidas a una sustancia tóxica (fármaco, radioisótopo o toxina)^{7,13}. Las inmunotoxinas son moléculas quiméricas bifuncionales, porque se encuentran formadas por una parte que le brinda especificidad y la otra toxicidad¹⁴.

Existen tres generaciones de inmunotoxinas, la primera se trata de la unión de las moléculas completas como el anticuerpo y la toxina, unidas covalentemente por medio de la conjugación química utilizando un reactivo de entrecruzamiento que cuente con un enlace disulfuro; en la segunda se han realizado modificaciones químicas al anticuerpo y/o a la toxina, como la eliminación de algún dominio de estas proteínas; y la tercera generación son las inmunotoxinas recombinantes, donde se emplea la tecnología del ADN recombinante para expresar en conjunto el anticuerpo con la toxina¹⁴.

Estas inmunotoxinas pueden llegar a ser agentes inmunogénicos, ya que al entrar al organismo son reconocidas como moléculas extrañas debido a sus

orígenes externos al cuerpo humano¹⁴. Estos agentes estimulan al sistema inmunitario para producir anticuerpos que los neutralicen e inactiven.

Una de las maneras para disminuir la inmunogenicidad que pueden llegar a provocar las inmunotoxinas recombinantes, es disminuyendo su peso molecular. En lugar de utilizar el tamaño completo del anticuerpo, se puede emplear el fragmento variable de una sola cadena (scFv). scFv está formado por el fragmento variable de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo unidas mediante un péptido conector, compuesto de residuos de glicina y serina, generando como resultado una sola cadena de aminoácidos (ver figura 1)¹⁴. Este fragmento variable es la región del anticuerpo a la que se unen los antígenos.

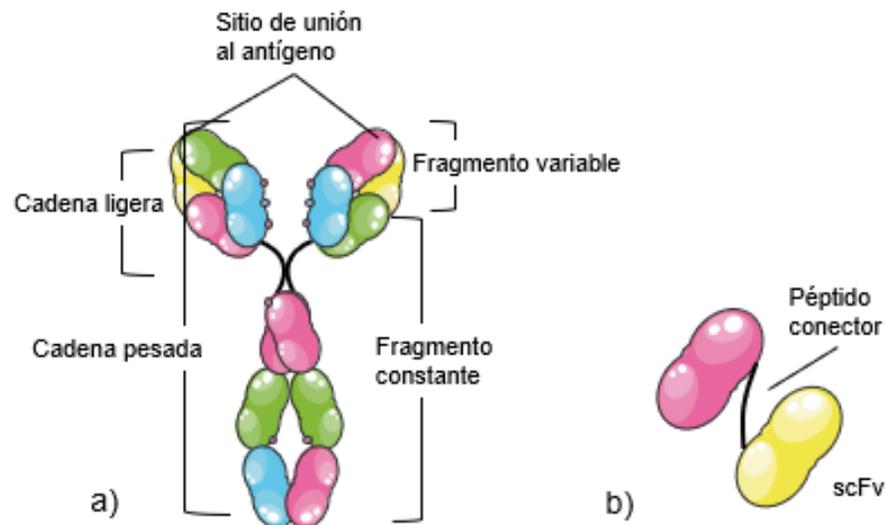


Figura 1. Diagrama general de un anticuerpo. a) Partes de un anticuerpo intacto: una cadena pesada y una ligera, un fragmento variable y uno constante, dos sitios de unión al antígeno. b) Fragmento variable de una sola cadena: fragmentos variables de las cadenas pesada y ligera unidas por un péptido conector.

Las inmunotoxinas entran en la categoría de inmunoterapia, porque son derivados de los anticuerpos monoclonales, conducen la sustancia tóxica hacia las células malignas por medio de marcadores superficiales característicos, como el anticuerpo monoclonal trastuzumab que es utilizado para combatir el cáncer de mama positivo al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), el cual es un tipo de clasificación de cáncer de mama, además del origen anatómico y la receptividad a hormonas^{13,15,16}.

HER2 (o ErbB2) es un receptor de tirosina quinasa, perteneciente a la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER), es codificado por el protooncogén *neu* y es un receptor huérfano, es decir, no se le conoce un ligando específico. Está implicado en la señalización de la proliferación y transformación celular al formar homo o heterodímeros con los demás receptores pertenecientes a la familia (HER1, HER3 y HER4). Los ligandos de estos receptores son una variedad de factores de crecimiento: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante α (TGF α), anfirregulina, factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina, betacelulina, epirregulina y neurregulina^{17,18}. Si el receptor HER2 se encuentra sobreexpresado, ya sea por amplificación del gen o una alteración en la transcripción, aumenta la formación de los heterodímeros y por consiguiente, la señalización celular no puede controlarse^{17,18}. Esta sobreexpresión la presentan algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, por lo que se le considera un objetivo para terapia específica¹⁷.

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal (mAb) de cadena ligera *kappa* de IgG1 humanizado unido por ingeniería genética a las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) del mAb específico al receptor HER2 de ratón; es expresado en la línea celular CHO (células de ovario de hámster chino) como cultivo en suspensión en biorreactores, seguido de varios pasos de purificación por cromatografía de afinidad, intercambio iónico e interacción hidrofóbica^{17,19,20}. Trastuzumab ejerce una actividad antitumoral, ya que al unirse promueve la endocitosis y la degradación del receptor, inhibe la señalización de la progresión del ciclo celular y promueve la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos^{17,19}.

A pesar de los grandes avances en la producción de biofármacos, es necesario seguir mejorando y comparando entre los sistemas de expresión para saber cuál sería el más adecuado para la síntesis de aquellas proteínas que podrían llegar a ser potenciales biofármacos, que sean desarrollados con base al concepto de terapia dirigida establecido en las diferencias entre las células normales y las células cancerígenas.

Por lo anterior, en el presente trabajo de investigación se propone la expresión de la inmunotoxina 4D5scFv-BmKAGAP, compuesta por el fragmento variable de una sola cadena del anticuerpo anti-HER2/*neu* 4D5 humanizado (es el fragmento que dirige) fusionado con el péptido BmK AGAP derivado del veneno del escorpión chino *Buthus martensii* Karsh (es el fragmento efector), se expresará utilizando dos sistemas de expresión, uno procariótico, en la bacteria

E. coli, y uno eucariótico en la línea celular de insecto del gusano cogollero *S. frugiperda*, en esta última se empleará el sistema de expresión de baculovirus.

CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

El primer biofármaco producido por la tecnología del ADN recombinante en el microorganismo *E. coli* fue la insulina (Humulin), aprobada en 1982 por la Food and Drug Administration (FDA), antes esta hormona era obtenida a partir de páncreas de animales como cerdos y vacas, por lo que se requería una gran cantidad de ellos para cubrir el tratamiento de un paciente por un año y en algunos pacientes desencadenaba una respuesta inmune debido a las diferencias estructurales de la insulina de los animales con la humana³⁻⁵.

Como *E. coli* sigue siendo la primera opción para la expresión de proteínas heterólogas, se han realizado trabajos de investigación para comparar la eficiencia en la producción de proteínas recombinantes entre diversas cepas de la bacteria.

Uno de estos trabajos es el de Xiong y su equipo de investigación, quienes en el 2005 expresaron el factor de crecimiento de fibroblastos bovino (BbFGF, por sus siglas en inglés), portador de un enlace disulfuro; y la cadena simple Fv del anticuerpo humano anti-HBsAg (HBscFv), con dos enlaces disulfuro, y evaluaron el efecto del entorno redox del citoplasma de *E. coli* en la formación de estos enlaces. Utilizaron *E. coli* BL21(DE3) y Origami para expresar BbFGF, y *E.*

coli M15 y Origami para HBscFv. Compararon la solubilidad y la bioactividad de las proteínas. Obtuvieron una forma soluble de BbFGF y una parcialmente soluble de HBscFv en Origami, mientras que en BL21, el 65% de BbFGF producido se encontraba agregado en cuerpos de inclusión, y en M15 toda la proteína HBscFv se encontraba en esa forma⁶.

Con respecto a la bioactividad, el BbFGF expresado en la cepa Origami tuvo una mayor actividad citotóxica, para el ensayo utilizaron la sal de tetrazolio: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)2,5difeniltetrazol (MTT); y no hubo diferencia significativa entre las dos HBscFv en la actividad de unión en el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto. A pesar de que las proteínas provenientes de *E. coli* Origami presentaron los mejores resultados de actividad, en esta cepa se obtuvieron los menores rendimientos⁶.

También en el trabajo de Fathi-Roudsari y coautores en el 2016, compararon la expresión de reteplasa en tres cepas de *E. coli*: BL21(DE3), Rosetta-gami(DE3) y SHuffle T7(DE3). Reteplasa es una proteína recombinante con 9 enlaces disulfuro, realizaron la optimización de los codones y la clonaron en un vector con el promotor T7 para inducir la expresión con 1 mM de IPTG a 37 °C con agitación de 180 rpm. En las tres cepas observaron la expresión de la proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), pero permaneció depositada en la fracción insoluble y no se observó en la fracción soluble. *E. coli* BL21 fue la cepa que produjo mayor cantidad de reteplasa en la fracción insoluble, ya que representó el 70% de la proteína total de esa fracción. Intentaron modificar las condiciones de expresión

reduciendo la temperatura, la concentración de IPTG y la disponibilidad de oxígeno, pero esto no modificó los resultados²¹.

Vargas y colaboradores en el 2016, probaron la eficiencia de SmbP como proteína de fusión y etiqueta de afinidad para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Expresaron proteínas recombinantes unidas en el extremo N-terminal a SmbP, en comparación con otras proteínas de fusión: la proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés) y glutatión S-transferasa (GST). Las proteínas expresadas etiquetadas con SmbP y purificadas por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) mostraron tener una mayor solubilidad y menor formación de cuerpos de inclusión, además de tener mayores rendimientos al remover la proteína de fusión, ya que SmbP tiene un tamaño pequeño de 9.9 kDa⁸.

Además de *E. coli* se han utilizado otros sistemas de producción de biofármacos; por ejemplo, la vacuna que protege contra el cáncer cervical (Cervarix) fue la primera vacuna aprobada para humanos producida con un vector de baculovirus (AcMNPV) en la línea celular High FiveTM (*T. ni*)²².

Este sistema de expresión de baculovirus se sigue desarrollando y mejorando para la producción de proteínas recombinantes, como en el trabajo de Nika y coautores en el año 2017, quienes utilizaron este sistema para expresar un biomarcador de algunos tipos de cáncer: el receptor completo HER2, en la línea celular de insecto Sf9, ya que requiere glucosilaciones. El objetivo era expresar el receptor HER2 en Sf9, analizar su funcionalidad y similitud con respecto al receptor nativo por medio de citometría de flujo, ELISA, Western Blot

e interferometría de biocapa; todo lo anterior con la finalidad de utilizar el receptor recombinante HER2 como un modelo de antígeno tumoral para el desarrollo de nuevos anticuerpos²³.

Guijarro-Pardo y sus colaboradores en el 2017, infectaron a través de la alimentación a larvas de insecto de *T. ni* con vectores infecciosos orales provenientes del sistema de expresión de baculovirus con AcMNPV, los llamados ODV. Los infectaron para la expresión de proteínas recombinantes a través de un vector con polihedrina negativa (*Polh-*) que pueden ser co-ocuidos por un vector con polihedrina positiva (*Polh+*), es decir, este último expresa la proteína polihedrina recombinante, esta se encuentra en mayor proporción en la matriz de los cuerpos de oclusión, los cuales son necesarios para proteger a los ODV hasta el intestino medio de la larva, en donde la cubierta de poliedro es disuelta por el ambiente alcalino y ocurre la liberación de los viriones²⁴.

Lograron la infección de las larvas por vía oral, y la expresión de dos proteínas funcionales: la proteína fluorescente mCherry, para supervisar la infección, y la proteína P30 del virus de la peste porcina africana, comercialmente utilizada para el diagnóstico serológico de esta enfermedad. Obtuvieron rendimientos similares a los obtenidos mediante inyección directa de los vectores a las larvas²⁴.

Egashira y su equipo en el 2018, expresaron tres anticuerpos monoclonales anti-HER2 utilizando como sistema de expresión el gusano de seda infectado con el baculovirus recombinante. Dos anticuerpos presentaron patrones de glucosilación similares a los provenientes de células de mamífero ya que también

coexpresaron las enzimas GnT2 (N-acetilglucosaminil transferasa II) y GalT3 (α -1,4-galactosil transferasa), y al tercero no le realizaron modificaciones extras en la glucosilación. Además, compararon el rendimiento, la estabilidad térmica, la actividad citotóxica mediada por células dependientes de anticuerpos y la agregación de las proteínas a pH bajo con el anticuerpo expresado en la línea celular CHO. Obtuvieron mayores rendimientos de expresión en el insecto que en la línea celular y los anticuerpos con modificaciones en la glucosilación presentaron una mayor actividad citotóxica, en las demás pruebas fueron resultados similares²⁵.

Se han descubierto y creado nuevas proteínas recombinantes que podrían llegar a ser, en un futuro, biofármacos que combatan distintos padecimientos, como la primera inmunotoxina aceptada por la FDA, la DAB389IL2 (Ontak™), para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T, la cual está formada por la interleucina-2 (IL-2) y un fragmento de la toxina diftérica¹⁴.

Sokolova y su equipo de investigación en el 2014, crearon una inmunotoxina recombinante 4D5scFv-PE40 específica al receptor HER2, consiste en el fragmento variable de una sola cadena del anticuerpo anti-HER2/*neu* 4D5 humanizado (4D5scFV) y el fragmento de la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE40), ambos unidos por una cadena polipeptídica flexible. Expresaron la inmunotoxina en *E. coli* BL21(DE3) utilizando el vector pSD para asegurar que la proteína se dirija al espacio periplásmico. 4D5scFv-PE40 presentó una alta afinidad al receptor comparable con el anticuerpo 4DscFv libre, y una alta actividad citotóxica en el ensayo con MTT en la línea celular SKOV-3 (línea

celular de adenocarcinoma de ovario humano que sobreexpresa el receptor HER2), con una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 22 nM, y en la línea celular CHO (no sobreexpresa HER2) no tuvo actividad citotóxica significativa. El anticuerpo y la toxina por separado no presentaron citotoxicidad en estas líneas celulares²⁶.

Deyev y colaboradores en el 2016, expresaron dos inmunotoxinas, una específica al receptor HER2 (4D5scFv) y la otra de una proteína diseñada de repetición de anquirina (DARPin, por sus siglas en inglés), ambas fusionadas con un fragmento de la exotoxina A de *Pseudomonas* y con dos rutas distintas de expresión bacteriana en *E. coli* (C41, BL21 y SB536), en el citoplasma y en el periplasma; para probarlas ante dos líneas celulares cancerígenas que sobre expresan el receptor HER2, SKBR-3 (línea celular de adenocarcinoma de mama humano) y SKOV-3, y como control la línea celular CHO. Todas las proteínas recombinantes tuvieron una alta afinidad al receptor y una alta actividad antiproliferativa en las líneas cancerígenas con IC₅₀ de concentraciones de picomolar y en el control de nanomolar. La diferencia fue en el rendimiento, obtuvieron 160 mg de proteína de DARPin expresada en el citoplasma en 1 L de cultivo de *E. coli* BL21, de las demás el rango se encontró entre 15.2 y 37.5 mg, esto debido a su tamaño más pequeño y a su ausencia de cisteínas, es decir, es una proteína que no requiere de la formación de enlaces disulfuro, ya que en el ambiente reductor del citoplasma de *E. coli* se rompen estos enlaces generando proteínas mal plegadas²⁷.

Otra estrategia para la producción de inmunotoxinas es la conjugación química, como en el trabajo de Lee y su equipo en el 2019, en donde realizaron la conjugación química de una toxina, el fragmento de la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE24), y el fragmento de un anticuerpo, scFv de trastuzumab. Ambas proteínas fueron expresadas por separado en *E. coli* BL21 para posteriormente ser conjugadas usando un enlazador químico, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), que contiene un enlace disulfuro. Se probó la citotoxicidad de la inmunotoxina creada en líneas celulares que sobreexpresan el receptor HER2, SKBR-3 y BT-474 (línea celular de carcinoma ductal de glándula mamaria), siendo altamente citotóxico con un IC₅₀ de 43 pM ± 8 para SKBR-3 y 6.7 ± 3 pM para BT-474; y en líneas celulares que tienen baja expresión de este receptor, MDA-MB-231 (línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria) y MCF-7 (línea celular de carcinoma ductal de glándula mamaria), sus IC₅₀ fueron de 9.44 ± 3 nM para MDA-MB-231 y 1.01 nM ± 0.38 para MCF-7; por lo que la citotoxicidad de la inmunotoxina es dependiente del receptor²⁸.

Liu y su grupo de investigación en el 2003, expresaron el péptido antitumoral-analgésico (BmKAGAP) proveniente de *Buthus martensii* Karsch con una etiqueta de histidinas (His tag) en el N-terminal en la cepa de *E. coli* BL21, a pesar de que la mayor cantidad del péptido expresado se encontró en cuerpos de inclusión, este mostró una actividad analgésica y antitumoral del 80% en los ensayos *in vivo* en ratones *Kunming* en comparación con el péptido nativo BmKAGAP purificado directamente del escorpión, y mostró pocas deficiencias en

comparación con el péptido sin el His tag, por lo que esta etiqueta tiene poca interferencia en la bioactividad del péptido²⁹.

Para mejorar la solubilidad del péptido, Cui y su equipo en el 2010, utilizaron el plásmido pSYPU para co-expresar BmKAGAP y la enzima tiorredoxina (TrxA), ya que esta última tiene actividad oxidoreductasa que promueve la formación de los enlaces disulfuro, debido a que el péptido tiene 4 de estos enlaces que se forman con las cisteínas de su secuencia de aminoácidos. La mayor cantidad de proteína se obtuvo de forma soluble, la cual se utilizó para analizar la relación estructura-actividad del péptido con los canales de sodio dependientes de voltaje (Navs) relacionados a su efecto analgésico³⁰.

Kampo y colaboradores en el 2019, determinaron el efecto citotóxico del péptido BmK AGAP en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, en las cuales observaron que disminuía la viabilidad celular, inhibía la transición epitelial-mesenquimatosa, la migración y la capacidad de invasión de estas células. Determinaron el IC₅₀ de BmK AGAP en líneas celulares: 40 µM para MCF-7 y 50 µM para MDA-MB-231³¹.

CAPÍTULO III

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es el cáncer más prevalente y con la mayor tasa de mortalidad del mundo. En el año 2020 se presentaron 685,000 defunciones a causa de esta enfermedad³². Entre el 20 y el 25% de los casos diagnosticados de cáncer de mama son HER2 positivo, siendo un indicador de mal pronóstico, ya que es uno de los más agresivos por su rápido crecimiento y propagación celular en comparación con otros tipos de cáncer de mama^{18,19,33}. Existe tratamiento específico para este tipo de cáncer, como es el uso de anticuerpos monoclonales³³. Uno de los principales anticuerpos monoclonales es el trastuzumab (Herceptin), tiene actividad antitumoral en células que sobreexpresan el receptor HER2¹⁷. No obstante, las células cancerígenas desarrollan resistencia a trastuzumab un año después de iniciar el tratamiento, generando un mal pronóstico; más del 30% de los pacientes presentan una resistencia primaria, y más del 70% presentan una resistencia secundaria^{16,34}.

Por lo tanto, es necesario mejorar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos o realizar la combinación entre estos para crear sinergismo, como es el caso de la inmunotoxina que se desarrollará 4D5scFv-BmKAGAP, cuyas propiedades son

prometedoras para aplicaciones terapéuticas como anticancerígeno, buscando un sistema de expresión más adecuado para su producción de manera eficiente.

CAPÍTULO IV

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

La inmunotoxina 4D5scFv-BmKAGAP expresada en *Escherichia coli* y en la línea celular de insecto *Spodoptera frugiperda* presentará una mayor actividad antiproliferativa *in vitro* en la línea celular SK-BR-3 que sobreexpresa el receptor HER2 que en la línea celular MCF-7.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo general

Expresar y purificar la inmunotoxina 4D5scFv-BmKAGAP en el sistema bacteriano *Escherichia coli* y en el sistema de expresión de baculovirus en la línea celular de insecto *Spodoptera frugiperda*, y evaluar su actividad antiproliferativa *in vitro*.

4.2.2 Objetivos específicos

1. Construir y propagar los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv, pET30a_SmbP_BmKAGAP y pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP

2. Transfectar el ADN del baculovirus con el gen que codifica a la inmunotoxina His_4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular de insecto *Spodoptera frugiperda*
3. Expresar y purificar las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP en *Escherichia coli* y 4D5scFv-BmKAGAP en *Spodoptera frugiperda*
4. Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro*

CAPÍTULO V

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material, reactivos y equipo

Los genes *4D5scFv*, *BmKAGAP* y *His_4D5scFv-BmKAGAP* fueron sintetizados e insertados en los plásmidos pUC57 y pFastBac1 por la empresa GenScript y los oligonucleótidos por la empresa T4OLIGO. El vector pET30a_SmbP fue proporcionado por el Laboratorio de Expresión y Purificación de Proteínas de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Enzimas de restricción utilizadas: NcoI y XhoI; ADN polimerasas: Vent (New England Biolabs), GreenTaq (GenScript); enzimas: T4 DNA Ligasa (Bio Basic Inc) y Enterokinase, His, Bovine (GenScript).

Cepas y líneas celulares utilizadas: *E. coli* DH5 α , DH10Bac (Gibco), Origami 2(DE3) y SHuffle T7 Express (New England Biolabs Inc.); ExpiSf9TM (Gibco), SK-BR-3 ATCC[®]HTB-30TM y MCF-7 ATCC[®]HTB-22TM.

Kits de extracción de ADN: DNA-spinTM Plasmid DNA Purification y DNA-maxiTM Endotoxin-Free Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology), y QIAquick[®] Gel Extraction Kit (250) (QIAGEN). Los reactivos y medios de cultivo

que se requirieron se adquirieron de Sigma, GenScript, Bio Basic Inc., Bio Rad, Gibco, New England Biolabs Inc., J. T. Baker, Jalmek, Marvelgent Biosciences Inc, Roche.

Material: tubos de 200 μ L, 1.5 mL y 2 mL; tubos cónicos de 15 mL y 50 mL, puntillas para micropipeta de 10 μ L, 200 μ L y 1000 μ L, frascos de cultivo y placas de 96 pocillos; matraces de 150 mL y 250 mL; matraces triptinizados de 500 mL; membrana de diálisis Economical Biotech Dialysis (Bio Basic Canada Inc.); columna cromatográfica HiTrap IMAC FF (GE Healthcare).

Equipos: Espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific, espectrofotómetro Jenway 7305, incubadora con agitación Lab Tech, incubadora con CO₂ Thermo Scientific, White/UV transiluminador UVP, fuente de poder PowerPac Bio Rad, cámara para electroforesis Mini-Sub Bio Rad, microcentrífuga refrigerada Thermo Scientific, centrífuga refrigerada Thermo Scientific Sorval, termociclador Thermo Fisher Scientific Simpli Amp, cromatógrafo FPLC ÄKTAprime plus General Electric, lector de placas ELISA Biotek ELX800, microscopio invertido Carl Zeiss Primovert, campana de bioseguridad nivel II Esco, plancha de calentamiento Lab Companion, balanza analítica Sartorius, pH-metro Orion 3 Start pH Benchtop Thermo, sistema de purificación de agua Elga, esterilizador eléctrico autoclave All American.

5.2 Metodología general de trabajo

En la figura 2 se esquematiza la metodología general del presente trabajo de investigación.

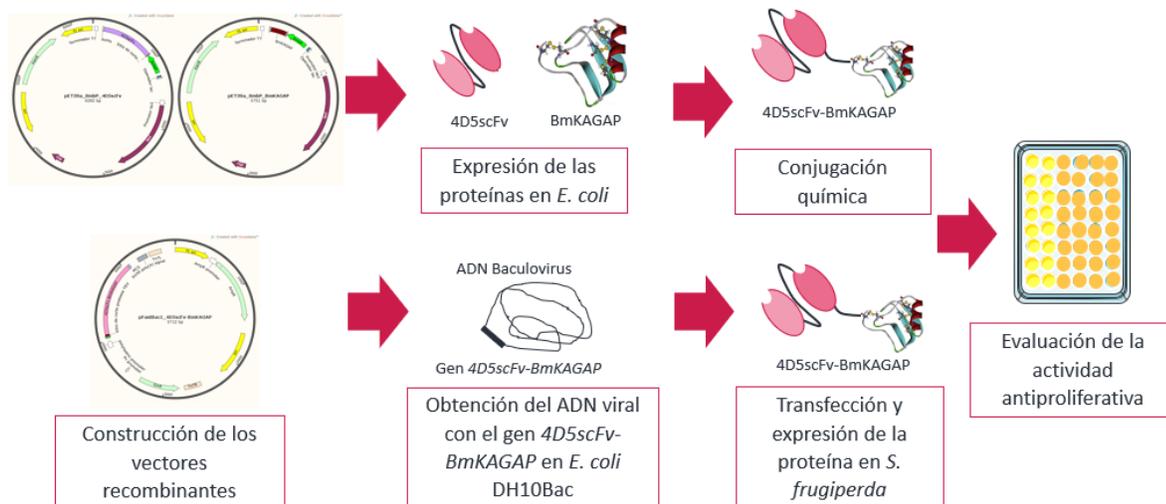


Figura 2. Representación esquemática de la metodología general de trabajo.

5.3 Construcción y propagación de los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv, pET30a_SmbP_BmKAGAP

5.3.1 Clonación, propagación y extracción de los plásmidos pET30a_SmbP, pUC57_4D5scFv y pUC57_BmKAGAP

Los plásmidos pUC57_4D5scFv y pUC57_BmKAGAP fueron sintetizados por la empresa GenScript, contienen los genes optimizados que codifican las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP para su expresión en *E. coli*.

Por la técnica de choque térmico se transformaron células de *E. coli* DH5 α rubidio competentes con el plásmido pET30a_SmbP utilizado como vector de expresión, el cual tiene la proteína de fusión SmbP; y los plásmidos pUC57_4D5scFv y pUC57_BmKAGAP, todos por separado. A 30 μ L de células se les añadió 60 ng de plásmido, se incubó en hielo por 20 min, después se realizó el choque térmico a 42 °C en baño de agua por 45 s y se regresó al hielo

por 2 min más. Se agregaron 800 µL del medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y se incubó con agitación a 37 °C por 45 min. Después se centrifugó a 13000 rpm por 4 min, se decantaron 700 µL de sobrenadante y con lo que quedó se resuspendió el pellet celular y se sembró en una caja con medio LB más antibiótico y agar bacteriológico, se incubó a 37 °C por 16 h.

Para las células transformadas con pET30a_SmbP se utilizó el antibiótico Kanamicina (Kan 30 µg/mL) y para las que se transformaron con pUC57_4D5scFv y pUC57_BmKAGAP se utilizó Ampicilina (Amp 100 µg/mL).

De las colonias obtenidas se tomó una colonia de cada transformación, se sembraron en tubos de ensayo conteniendo 6 mL de LB/Antibiótico y se incubaron a 37 °C con agitación de 200 rpm por 16 h. Después se realizó la extracción de ADN plasmídico siguiendo las instrucciones del kit empleado “DNA-spin™ Plasmid DNA Purification” (iNtRON Biotechnology) y se cuantificó el ADN obtenido utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000.

5.3.2 Amplificación de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*

Se realizó la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes que codifican a las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP para su posterior digestión enzimática.

Los componentes de la mezcla de reacción se mencionan en la tabla 1, se utilizó la enzima Vent DNA polimerasa (New England BioLabs) y los primers específicos para cada gen con los sitios de restricción para las enzimas NcoI y XhoI se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*.

| Componente | Cantidad | |
|-------------------------------|----------------|----------------|
| | <i>4D5scFv</i> | <i>BmKAGAP</i> |
| H ₂ O ultrapura | 30.9 µL | 29.5 µL |
| Thermopol Reaction Buffer 10X | 5 µL | 5 µL |
| dNTPs 10 mM | 1 µL | 1 µL |
| Forward 20 pmol | 3 µL | 3 µL |
| Reverse 20 pmol | 3 µL | 3 µL |
| ADN | 1 µg | 1 µg |
| Vent DNA polimerasa 5 U/µL | 2.5 U | 2.5 U |
| Volumen | 50 µL | 50 µL |

Tabla 2. Primers empleados para la amplificación de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*.

| Primers | Secuencias |
|-----------------|--|
| 4D5scFv Forward | 5' ACGTACGTACCATGGGTGAGGTGCAGCT 3' |
| 4D5scFv Reverse | 5' ACTGACTGACTCGAGTTAGCACTTGATTTCAACTTTGG 3' |
| BmKAGAP Forward | 5' ACGTACGTACCATGGGTGTGCGTGACG 3' |
| BmKAGAP Reverse | 5' ACTGACTGACTCGAGTTAGCCACCGTTGCATTTACC 3' |

En la tabla 3 se encuentran las condiciones que se programaron en el termociclador. Para verificar la amplificación se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.

Tabla 3. Programa de PCR establecido en el termociclador para la amplificación de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C | 3 min | 1 |
| Desnaturalización | 95 °C | 30 s | 30 |
| Alineación | 60 °C | 30 s | |
| Extensión | 72 °C | 50 s | |
| Extensión final | 72 °C | 10 min | 1 |

Posteriormente se purificaron los amplicones a partir del gel de agarosa de acuerdo con las instrucciones del kit “QIAquick® Gel Extraction” (QIAGEN) y se cuantificó el ADN obtenido.

5.3.3 Doble digestión enzimática de los amplicones de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP* y del vector de expresión pET30a_SmbP

Una vez obtenidos los amplicones de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP* y el plásmido pET30a_SmbP se procedió a realizar una doble digestión enzimática utilizando las enzimas de restricción NcoI y XhoI para exponer los sitios cohesivos para su posterior ligación de los genes con el vector de expresión. Los componentes y las condiciones de la digestión se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Doble digestión enzimática de los amplicones de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP* y el plásmido pET30a_SmbP.

| Componente | Cantidad | | | Condiciones |
|----------------------------|-------------|----------------|----------------|-----------------------------------|
| | pET30a_SmbP | <i>4D5scFv</i> | <i>BmKAGAP</i> | |
| H ₂ O ultrapura | 30.4 µL | 4.5 µL | 4.5 µL | Temperatura: 37 °C Tiempo: 3 h |
| NEBuffer 3.1 10X | 5 µL | 5 µL | 5 µL | |
| ADN | 2 µg | 1.28 µg | 1.19 µg | |
| NcoI 10 U/µL | 20 U | 15 U | 15 U | |
| XhoI 20 U/µL | 20 U | 20 U | 20 U | |
| Volumen | 50 µL | 50 µL | 50 µL | |

Después de las 3 h de digestión al plásmido se le agregó 1 U de la enzima fosfatasa alcalina para su desfosforilación para impedir que se vuelva a unir durante la ligación, y se incubó a 37 °C por 1 h. Luego se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X para posteriormente purificar los fragmentos digeridos a partir del gel de agarosa.

5.3.4 Reacción de ligación del vector de expresión pET30a_SmbP con los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*

La reacción de ligación se llevó a cabo con una relación molar vector:inserto 1:3 (pET30a_SmbP:*4D5scFv* y pET30a_SmbP:*BmKAGAP*) utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Bio Basic). Los componentes y las condiciones de reacción se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Reacción de ligación del vector pET30a_SmbP con los insertos *4D5scFv* y *BmKAGAP*.

| Componente | Cantidad | | | Condiciones |
|---------------------------------|----------------|----------------|---------|-----------------------------------|
| | <i>4D5scFv</i> | <i>BmKAGAP</i> | Control | |
| H ₂ O ultrapura | 9.5 µL | 9.5 µL | 10.5 µL | Temperatura: 4 °C Tiempo: 24 h |
| Buffer T4 DNA Ligasa 10X | 2 µL | 2 µL | 2 µL | |
| Vector | 32.2 ng | 32.2 ng | 32.2 ng | |
| Inserto | 12.9 ng | 3.6 ng | ---- | |
| T4 DNA ligasa 5 U/µL | 5 U | 5 U | 5 U | |
| Volumen | 20 µL | 20 µL | 20 µL | |

5.3.5 Clonación de *Escherichia coli* DH5α con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP

Se transformaron células de *E. coli* DH5α rubidio competentes con 10 µL de la solución de reacción de ligación de los plásmidos construidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP y el control, por la técnica de choque térmico (5.3.1) utilizando 50 µL de células competentes. De las colonias obtenidas se tomó una colonia de cada transformación, se sembraron en tubos de ensayo conteniendo 6 mL de LB/Kan (30 µg/mL) y se incubaron a 37 °C con agitación de 200 rpm por 16 h. Después se realizó la extracción de ADN plasmídico por medio del kit y se cuantificó el ADN obtenido.

Posteriormente se realizó una PCR para corroborar la construcción de los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP amplificando la secuencia de ADN de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP* utilizando la Green Taq DNA polimerasa (GenScript) y los primers que se mencionan en la tabla 2. Los componentes de la reacción se encuentran en la tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*.

| Componente | Cantidad | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | <i>4D5scFv</i> | <i>BmKAGAP</i> |
| H ₂ O ultrapura | 36.5 µL | 36.5 µL |
| 10X Taq Buffer | 5 µL | 5 µL |
| dNTPs 10 mM | 1 µL | 1 µL |
| Forward 20 pmol | 3 µL | 3 µL |
| Reverse 20 pmol | 3 µL | 3 µL |
| ADN | 100 ng | 100 ng |
| Green Taq DNA polimerasa 5 U/µL | 2.5 U | 2.5 U |
| Volumen | 50 µL | 5 µL |

En la tabla 3 se encuentran las condiciones programadas en el termociclador. Posteriormente se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X para observar si se amplificó la secuencia de los genes.

5.4 Construcción y propagación del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP

5.4.1 Transposición del plásmido pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP en el bacmid

El plásmido pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP fue sintetizado por la empresa GenScript, contiene el gen optimizado que codifica la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP para su expresión en la línea celular de insecto.

Por la técnica de choque térmico se transformaron células de *E. coli* DH10Bac™ con el plásmido pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP. A 100 µL de células se les añadió 200 ng de plásmido, se incubó en hielo por 30 min, después se realizó el choque térmico a 42 °C en baño de agua por 45 s y se regresó al hielo por 2 min más. Se agregaron 800 µL del medio de cultivo SOC y se incubó con agitación de 225 rpm a 37 °C por 4 h. Después se prepararon diluciones seriadas de 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ con el medio SOC, de cada dilución se tomaron 100 µL para sembrar en cajas con medio LB, agar bacteriológico, 50 µg/mL Kan, 10 µg/mL Tetraciclina (Tet), 7 µg/mL Gentamicina (Gen), 100 µg/mL X-gal y 0.5mM IPTG; para identificar las clonas por medio de generación de colonias azules y blancas, ya que si se llevó a cabo la transposición del mini-Tn7 del plásmido de transferencia en el sitio mini-Att Tn7 del bacmid se eliminará el gen *lacZ* de este sitio³⁵. Se incubaron las cajas a 37 °C por 24 h.

Se tomaron 9 colonias blancas y se resembraron por estría en cajas con el medio mencionado en el párrafo anterior y se incubaron las cajas a 37 °C por 24 h para corroborar el color blanco de las colonias. Luego, se tomaron 4 colonias

blancas, se sembraron en tubos de ensayo conteniendo 7 mL de LB/Kan, Tet y Gen (50, 10 y 7 µg/mL), y se incubaron a 37 °C con agitación de 200 rpm por 16 h. Después se realizó la extracción de ADN del bacmid con el kit “DNA-spin™ Plasmid DNA Purification” (iNtRON Biotechnology) y se cuantificó el ADN obtenido utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000.

5.4.2 Amplificación del sitio mini-Att Tn7

Se realizó una PCR para verificar la presencia del gen *His_4D5scFv-BmKAGAP* en el bacmid, se utilizaron los primers M13 Forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' y M13 Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' que hibridan el sitio mini-Att Tn7 del bacmid. Los componentes de la reacción se encuentran en la tabla 7.

Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR para la amplificación del sitio mini-Att Tn7 del bacmid.

| Componente | Cantidad |
|---------------------------------|-----------------|
| | Bacmid |
| H ₂ O ultrapura | 39 µL |
| 10X Taq Buffer | 5 µL |
| dNTPs 10 mM | 1.5 µL |
| Forward 20 pmol | 1.5 µL |
| Reverse 20 pmol | 1.5 µL |
| ADN | 100 ng |
| Green Taq DNA polimerasa 5 U/µL | 2.5 U |
| Volumen | 50 µL |

En la tabla 8 se encuentran las condiciones programadas en el termociclador. Posteriormente se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X para observar el tamaño de los productos de PCR; si se llevó a cabo la transposición se observará una amplificación de

alrededor de 3317 pb: 2300 pb que corresponden del plásmido pFastBac1 más 1017 pb del tamaño del gen *His_4D5scFv-BmKAGAP*, si no se realizó se obtendrá una amplificación de alrededor de 300 pb.

Tabla 8. Programa de PCR establecido en el termociclador para la amplificación del sitio mini-Att Tn7 del bacmid.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|--------------------|---------------|---------------|
| Desnaturalización inicial | 93 °C | 3 min | 1 |
| Desnaturalización | 94 °C | 45 s | |
| Alineación | 55 °C | 45 s | 35 |
| Extensión | 72 °C | 5 min | |
| Extensión final | 72 °C | 7 min | 1 |

A la clona que presentó la amplificación de alrededor de 3329 pb se le extrajo el bacmid *His_4D5scFv-BmKAGAP* con el kit maxiprep: DNA-maxi™ Endotoxin-Free Plasmid DNA Purification para obtener una alta concentración de bacmid para transfectar.

5.5 Transfección del ADN del baculovirus con el gen que codifica a la inmunotoxina *His_4D5scFv-BmKAGAP* en la línea celular de insecto *Spodoptera frugiperda*

5.5.1 Proliferación de la línea celular ExpiSf9™

Se realizó el descongelamiento de la línea celular ExpiSf9™ (derivada de la línea celular Sf9) en un baño de agua a 37 °C, después se desinfectó el vial con etanol al 70%, se transfirió el contenido del criovial a un frasco de cultivo Erlenmeyer con 25 mL del medio ExpiSf9™ CD y se incubó a 27 °C a 125 rpm para un cultivo en suspensión³⁵.

Se realizó pase celular cuando el cultivo alcanzó una densidad entre $5 - 10 \times 10^6$ células/mL y una viabilidad celular mayor o igual al 80% determinada por la técnica de exclusión con azul de tripano³⁶. Para determinar la viabilidad celular se tomó una alícuota de suspensión celular (5×10^5 células/mL) para centrifugar a $100 \times g$ por 5 min y decantar, se resuspendió el pellet celular con 1 mL de buffer de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés), se tomaron 50 μ L y se mezclaron con 50 μ L de azul de tripano al 0.4%, se incubó 3 min a temperatura ambiente, se tomaron 10 μ L de esta solución para observar en la cámara de Neubauer, se contaron células viables y no viables (azules) por separado y, se determinó la viabilidad celular con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{No. células viables}}{\text{No. total células}} \times 100$$

Para realizar el pase celular se calculó el volumen inicial para una densidad de siembra de 0.7×10^6 células/mL, se transfirió el volumen calculado a medio fresco y se incubó con las mismas condiciones; se repite este paso para mantener o propagar las células.

5.5.2 Transfección del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular ExpiSf9TM

Se determinó la densidad y viabilidad celular, para tomar 62.5×10^6 células y transferirlas a un tubo cónico de 50 mL, se centrifugó a $300 \times g$ por 5 min y se decantó, se resuspendió el pellet con 25 mL de medio de cultivo fresco y se transfirió al frasco de cultivo Erlenmeyer, se incubó a 27°C a 125 rpm por 30 min. Por medio de lipofección se llevó a cabo la transfección de las células con el

reactivo de transfección ExpiFectamine™ Sf, se añadió al cultivo 30 µL del reactivo mencionado, 1 mL del medio de suero reducido Opti-Mem™ I y 12.5 µg del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP, y se incubó a 27 °C a 125 rpm hasta una disminución de la viabilidad entre el 60 – 80% o por 72 – 96 h³⁵. También se transfectó el bacmid sin modificaciones como control negativo para la expresión de proteínas.

Posteriormente el cultivo se centrifugó a 300 x g por 5 min, se recolectó el sobrenadante (Stock P0) y se almacenó a 4 °C protegido de la luz para su uso posterior.

5.6 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP

5.6.1 Clonación de *Escherichia coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3) con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP

Se transformaron células de *E. coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3) rubidio competentes con 60 ng de los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP, por la técnica de choque térmico (5.3.1) utilizando 25 µL de células competentes. De las colonias obtenidas se tomaron dos colonias de cada transformación, se sembraron en tubos de ensayo conteniendo 2 mL de LB/Kan (30 µg/mL) y se incubaron a 37 °C con agitación de 200 rpm por 16 h, para usarlos como inóculos.

5.6.2 Microexpresión de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP

Se inocularon tubos de ensayo conteniendo 4 mL de LB/Kan (30 µg/mL) a una concentración de 1:1000 a partir de los cultivos de *E. coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3) transformados con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP por separado, se incubaron a 37 °C hasta que llegaron a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) entre 0.4 – 0.6. Posteriormente a 2 mL de cada cultivo se les añadió 2 µL de IPTG 0.1 M, para inducir la expresión de las proteínas a una concentración final de IPTG de 1 mM, se llevaron a cabo las expresiones a 25 °C con agitación de 200 rpm por 16 h.

Después se centrifugaron los cultivos a 13000 rpm por 2 min y se decantó el sobrenadante, a los pellets celulares se les añadieron microesferas de vidrio y 100 µL de buffer de equilibrio (Tris 50 mM y NaCl 500 mM; pH 8) y se les aplicó vortex por 4 min para lisar las células. Luego se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por 10 min y se recolectó el sobrenadante para la caracterización de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Las composiciones de las fases del gel de poliacrilamida se encuentran en las tablas 9 y 10 para hacer 2 geles, siendo de 4% para la fase concentradora y de 12 y 15% para la fase separadora para las proteínas SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP respectivamente.

Tabla 9. Fase concentradora al 4% SDS-PAGE.

| Componente | Cantidad |
|---|-----------------|
| H ₂ O ultra pura | 6.4 mL |
| Acrilamida/Bis 40% | 1 mL |
| Gel buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 | 2.5 mL |
| SDS 10% | 100 µL |
| Persulfato de amonio 10% | 100 µL |
| TEMED | 20 µL |

Tabla 10. Fase separadora al 12 y 15% SDS-PAGE.

| Componente | Cantidad | |
|---|-----------------|---------|
| | 12% | 15% |
| H ₂ O ultra pura | 4.4 mL | 3.65 mL |
| Acrilamida/Bis 40% | 3 mL | 3.75 mL |
| Gel buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 | 2.5 mL | 2.5 mL |
| SDS 10% | 100 µL | 100 µL |
| Persulfato de amonio 10% | 100 µL | 100 µL |
| TEMED | 10 µL | 10 µL |

Se tomaron 10 µL de cada muestra y se mezclaron con 2 µL de buffer de carga para proteínas 6X, se cargaron las muestras en el gel de poliacrilamida, se aplicó una primera corriente de 80 V por 10 min y una segunda de 130 V por 90 min en buffer Tris-Glicina-SDS 1X (TGS, tris 0.25 M, glicina 1.92 M y SDS 1%). Después de ese tiempo se dejaron tiñendo los geles con la solución colorante de Coomassie (azul brillante de Coomassie R-250 0.5%, metanol 50% y ácido acético 10%) en agitación por una noche y se destiñeron con la solución decolorante (metanol 50% y ácido acético 10%) para observar las bandas azules correspondientes a las proteínas.

5.6.3 Escalamiento de la expresión de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP

Para el escalamiento de las expresiones se decidió continuar solo con la cepa de *E. coli* SHuffle T7(DE3). Se inocularon ocho matraces triptinizados de 500 mL conteniendo 125 mL de LB/Kan (30 µg/mL) a una concentración de 1:100 a partir de los cultivos de *E. coli* SHuffle T7 transformados con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP por separado, se incubaron a 37 °C hasta que llegaron a una DO₆₀₀ entre 0.4 – 0.6. Posteriormente a cada cultivo se le añadió 12.5 µL de IPTG 1 M, para inducir la expresión de las proteínas a una concentración final de IPTG de 1 mM, se llevaron a cabo las expresiones a 25 °C con agitación de 200 rpm por 16 h.

5.6.4 Purificación de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP

Después de la expresión se centrifugaron los cultivos a 8500 rpm a 4 °C por 10 min y se decantó el sobrenadante. Los pellets celulares se resuspendieron con buffer de equilibrio y se le añadieron microesferas de vidrio de 0.1 mm para lisar las células mediante agitación mecánica a 300 rpm por 1 h. Posteriormente los lisados se centrifugaron a 8500 rpm a 4 °C por 15 min, y se volvieron a centrifugar los sobrenadantes con las mismas condiciones mencionadas.

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) utilizando el equipo de cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) ÄKTAprime plus

(General Electric), la columna cromatográfica empleada fue HiTrap IMAC FF de 1 mL (GE Healthcare) cargada con Ni(II) (NiSO_4 0.1 M).

Primero se equilibró la columna con 5 volúmenes del buffer de equilibrio, luego se cargó la muestra, se lava la columna con el buffer de equilibrio hasta que la absorbancia disminuya. Una vez que la absorbancia se mantuvo constante, se realizó la elución por gradiente de concentración al 100% con 40 volúmenes del buffer de elución que contiene imidazol (tris 50 mM, NaCl 500 mM e imidazol 200 mM; pH8), se recolectaron las fracciones y se analizaron por SDS-PAGE aquellas que presentaron un incremento en la absorbancia, para observar la presencia de las proteínas recombinantes.

5.6.5 Cuantificación de proteínas

Las fracciones que contenían la proteína recombinante se unieron y se dializaron con el buffer de equilibrio. Para la determinación de las proteínas totales de los dializados se utilizó la técnica de Bradford, en la cual se tomaron 25 μL de las muestras a analizar por triplicado y se mezclaron con 1 mL del reactivo Bradford 1X (20 mg de azul brillante de Coomassie G-250, 10 mL de etanol 95% y 20 mL de ácido fosfórico 85%, y aforar a 100 mL) se incubó a temperatura ambiente por 5 min, y se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro Uv-Vis (Jenway 7305)³⁷. Se realizó una curva de calibración con un estándar de albúmina sérica bovina.

5.6.6 Remoción de la proteína de fusión

Para remover la proteína de fusión SmbP de las proteínas 4D5scFv y BmKAGAP, se añadieron 25 unidades de la enzima enteroquinasa para cortar 1

mg de las proteínas recombinantes, las soluciones fueron incubadas a 25 °C por 24 h.

Luego el fragmento variable y el péptido se purificaron por cromatografía en columna empacada con resina de agarosa ProtelIndex™ HiBond™ cargada con Ni(II) (NiSO₄ 0.1 M), la solución de reacción de la enteroquinasa de cada proteína se añadió a la columna y se incubó a 4 °C por 1 h, se eluyó la solución por gravedad y se analizó por Tricina-SDS-PAGE.

Las composiciones de las fases del gel de poliacrilamida se encuentran en las tablas 11 y 12, siendo de 4% para la fase concentradora y de 12 y 15% para la fase separadora para las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP respectivamente.

Tabla 11. Fase concentradora al 4% Tricina-SDS-PAGE.

| Componente | Cantidad |
|---|-----------------|
| H ₂ O ultra pura | 3.42 mL |
| Acrilamida/Bis 30% | 0.66 mL |
| Gel buffer Tris-HCl 2.5 M pH 8.8 | 0.76 mL |
| Persulfato de amonio 10% | 150 µL |
| TEMED | 5 µL |

Tabla 12. Fase separadora al 12 y 15% Tricina-SDS-PAGE.

| Componente | Cantidad | |
|---|-----------------|---------|
| | 12% | 15% |
| H ₂ O ultra pura | 0.89 mL | 0.29 mL |
| Acrilamida/Bis 30% | 4 mL | 5 mL |
| Gel buffer Tris-HCl 2.5 M pH 8.8 | 5 mL | 4.6 mL |
| Persulfato de amonio 10% | 100 µL | 100 µL |
| TEMED | 6 µL | 6 µL |

Se cuantificó la cantidad de proteína de las fracciones no unidas por la técnica de Bradford mencionada en el apartado 5.6.5, y la pureza fue determinada por densitometría usando el software ImageJ³⁸.

5.7 Expresión y purificación de la proteína recombinante 4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular de insecto *Spodoptera frugiperda*

5.7.1 Microexpresión de la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP

A un cultivo de ExpiSf9TM se determinó la densidad y viabilidad celular ($\geq 90\%$), para sembrar un nuevo cultivo de 25 mL con una densidad final de 5×10^6 células/mL, y se le añadieron 100 μ L del reactivo ExpiSfTM enhancer perteneciente al kit: ExpiSfTM Protein Production; se incubó el cultivo a 27 °C a 125 rpm por 16 h. Después, se determinó la densidad celular para verificar que se encuentre entre $5 - 10 \times 10^6$ células/mL, y su viabilidad celular sea $\geq 80\%$. Una vez comprobados los parámetros se añadieron al cultivo 500 μ L del Stock P0 viral del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP y se incubó a 27 °C a 125 rpm por 72 – 96 h, para que el baculovirus infecte a las células de insecto y se lleve a cabo la expresión de la proteína recombinante³⁵. Como control negativo se infectó un cultivo con un Stock P0 de partículas virales sin el gen *His_4D5scFv-BmKAGAP*.

Después se centrifugaron los cultivos a 300 x g por 5 min y se decantó el sobrenadante, a los pellets celulares se les añadieron 7.5 g de microesferas de vidrio de 0.1 mm y 5 mL de buffer de lisis (Tris 50 mM, KCl 150 mM y Tritón – X

100 0.1%; pH 7.7). Se lisaron las células mediante agitación mecánica a 300 rpm por 30 min. Posteriormente los lisados se centrifugaron a 8000 rpm a 4 °C por 15 min y se recolectó el sobrenadante para la caracterización de las proteínas por SDS-PAGE.

Las composiciones de las fases del gel de poliacrilamida se encuentran en las tablas 9 y 10, siendo de 4% para la fase concentradora y de 12% para la fase separadora.

Se tomaron 10 µL de cada muestra y se mezclaron con 2 µL de buffer de carga para proteínas 6X, se cargaron las muestras en el gel de poliacrilamida, se aplicó una primera corriente de 80 V por 10 min y una segunda de 130 V por 90 min en buffer TGS 1X. Después de ese tiempo se dejaron tiñendo los geles con la solución colorante de Coomassie en agitación por una noche y se destiñeron con la solución decolorante para observar las bandas azules correspondientes a las proteínas.

5.7.2 Purificación de la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP

Después de la expresión de un cultivo de 60 mL de las células infectadas con las partículas virales del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP, se centrifugó el cultivo a 300 x g a 4 °C por 10 min y se decantó el sobrenadante. Los pellets celulares se resuspendieron con buffer de lisis y se le añadieron microesferas de vidrio de 0.1 mm para lisar las células mediante agitación mecánica a 300 rpm por 30 min. Posteriormente los lisados se centrifugaron a 8500 rpm a 4 °C por 20 min, se removió el sobrenadante y al pellet se le añadió 15 mL de buffer Tris y 5 mL de urea 8 M para solubilizar las proteínas, se volvió a centrifugar con las

condiciones mencionadas y se tomó el sobrenadante para su posterior purificación.

La purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía en columna empacada con resina de agarosa ProtelIndex™ HiBond™ cargada con Ni(II) (NiSO₄ 0.1 M), el sobrenadante se añadió a la columna y se incubó a 4 °C por 1 h, se eluyó la solución por gravedad y se analizó por SDS-PAGE.

5.8 Evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro*

5.8.1 Proliferación de las líneas celulares MCF-7

Se realizó el descongelamiento de la línea celular MCF-7 en baño de agua a 37 °C, se desinfectó el vial con etanol al 70% para manipularlo en la campana de flujo laminar de bioseguridad de clase II, se tomaron 500 µL de la suspensión celular y se transfirieron a un frasco de cultivo de 25 cm, y se agregaron 3 mL del medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se incubó el frasco a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ hasta la formación de la monocapa³⁹. Se renovó el medio de cultivo cada 2 o 3 días.

Para mantener a las células en crecimiento exponencial se realizaron posteriores pases celulares cuando el cultivo alcanzó un nivel de confluencia de aproximadamente el 80%. Para llevar a cabo el pase celular, primero se retiró el medio de cultivo, se hizo un lavado con PBS, se retiró el buffer y se añadieron 500 µL de la enzima proteolítica tripsina 0.25% - EDTA, la cual desprende la

monocapa rompiendo las uniones intercelulares, se incubó a 37 °C de 3 – 5 min, se observó al microscopio el desprendimiento de la monocapa, posteriormente se añadió 1 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina, esta solución se transfirió a un tubo cónico para centrifugar las células a 1300 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 5 mL de medio de cultivo fresco, se tomaron 10 µL para calcular la concentración celular de la suspensión en la cámara de Neubauer⁴⁰. Después se realizaron diluciones de la suspensión celular para preparar un nuevo cultivo en el frasco con una densidad de 50,000 células/mL o en placas de 96 pocillos, cada uno con 5,000 células en 100 µL. Las células se incubaron con las condiciones antes mencionadas.

5.8.2 Evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro*

Para evaluar la actividad antiproliferativa se utilizó el ensayo de WST-1 (4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-bencenodisulfonato), el cual es una técnica colorimétrica cuantitativa donde WST-1 es escindido a formazán por el sistema mitocondrial succinato-tetrazolio reductasa perteneciente al proceso metabólico de fosforilación oxidativa de las células que se encuentren metabólicamente activas^{41,42}.

Se evaluó la actividad antiproliferativa de SmbP_BmKAGAP y BmKAGAP en la línea celular MCF-7.

Después de 24 h de incubación de las células en la placa de 96 pocillos se añadió la proteína recombinante a evaluar por microdilución siendo 100 µg/mL la concentración más alta; cada una de las concentraciones a analizar se realizaron por triplicado. Se incubó la placa por 24 h a 37 °C en una atmósfera humidificada

con 5% de CO₂. Después de ese tiempo se retiró el medio de cultivo y se añadió a cada pocillo 95 µL de medio fresco más 5 µL del reactivo WST-1, y se incubó por 2 h. Posteriormente se midió la DO₄₅₀ en el lector de placas, el blanco fue medio de cultivo con WST-1 y como control negativo las células sin el tratamiento.

Con los resultados de las absorbancias obtenidas se puede calcular el porcentaje de viabilidad celular con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \left(\frac{\text{Abs. analito} - \text{Abs. blanco}}{\text{Abs. control negativo} - \text{Abs. blanco}} \right) \times 100$$

El IC₅₀ se determinó por el programa GraphPad Prism 5.03.

5.9 Disposición de los residuos generados

Se identificaron, clasificaron y se dispusieron los residuos generados en los diferentes colectores que se encuentran en los laboratorios de: Expresión y Purificación de Proteínas, y Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la División de Estudios de Posgrado; de acuerdo con el reglamento del Departamento de Manejo y Control de Residuos de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

6.1 Construcción y propagación de los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv, pET30a_SmbP_BmKAGAP

6.1.1 Clonación, propagación y extracción de los plásmidos pET30a_SmbP, pUC57_4D5scFv y pUC57_BmKAGAP

Se buscó la secuencia de aminoácidos del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal Trastuzumab con la clave 1N8Z en la base de datos de Protein Data Bank, de la cual solo se tomó la secuencia de aminoácidos del dominio variable⁴³. Se utilizó el servidor Paratome para la identificación de las regiones de unión al antígeno^{44,45}. En la figura 3 se encuentra la secuencia de aminoácidos del 4D5scFv, los dominios variables de la cadena pesada y de la ligera se encuentran unidos por un enlazador flexible: (GGGS)₃, además se le añadió una cisteína al C-terminal de la cadena para posteriormente sea utilizado para la formación del enlace disulfuro con el reactivo de entrecruzamiento²⁸.

001 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK **DTYIHWVRQA** PGKGLEWVAR **IYPTNGYTRY**
061 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG **GDGFYAMDYW** GQGTLTVSS
121 **GGGSGGGGS** **GGGSDIQMT** QSPSSLASV GDRVITTCRA **SQDVNTAVAW** YQKPGKAPK
181 **LLIYSASFLY** **SGVPSRFSGS** RSGTDFTLTI SSLQPEDFAT **YYCQQHYTTP** **PTFGQGTKVE**
241 **IKC**

Figura 3. Secuencia de 243 aminoácidos del 4D5scFv. En negrita se encuentran las regiones de unión al antígeno y en cursiva el enlazador flexible.

En el caso de la secuencia de aminoácidos de BmKAGAP se buscó en la base de datos de GenBank con la clave AAP34332.1, y se presenta en la figura 4.

001 VRDGYIADDK NCAYFCGRNA YCDDECKKNG AESGYCQWAG VYGNACWCYK LPDKVPIRVP
061 GKCNGG

Figura 4. Secuencia de 66 aminoácidos de BmKAGAP.

Los genes que codifican estas proteínas se mandaron a sintetizar y optimizar para su expresión en *E. coli*, con los sitios de restricción para las enzimas NcoI y XhoI.

Se obtuvieron cepas de *E. coli* DH5α rubidio competentes transformadas con los plásmidos pET30a_SmbP, pUC57_4D5scFv y pUC57_BmKAGAP. De estas construcciones se obtuvo el ADN plasmídico por lisis alcalina.

6.1.2 Amplificación de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*

En la figura 5 se encuentra un gel de agarosa al 1% donde se observan los amplicones de 765 pb (pares de bases) del gen *4D5scFv* y de 234 pb del gen

BmKAGAP cada uno con sus respectivos sitios de restricción para las enzimas *NcoI* y *XhoI*.

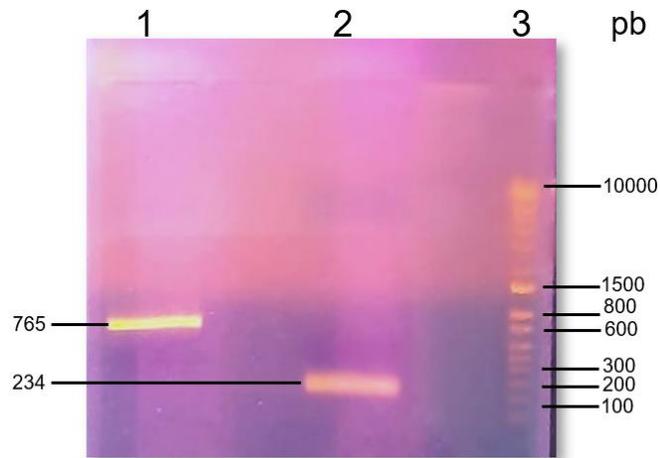


Figura 5. Amplificación de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Amplicón de *4D5scFv*. Carril 2: Amplicón de *BmKAGAP*. Carril 3: Marcador de peso molecular wide range DNA logical marker (Biobasic).

6.1.3 Doble digestión enzimática de los amplicones de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP* y del vector de expresión pET30a_SmbP

La doble digestión enzimática del gen *4D5scFv* generó 1 fragmento de 740 pb y el gen *BmKAGAP* generó 1 fragmento de 209 pb, estos corresponden al gen con la exposición de los sitios de restricción de las enzimas *NcoI* y *XhoI*, en la figura 6 se observan estas bandas en el gel de agarosa al 1%.

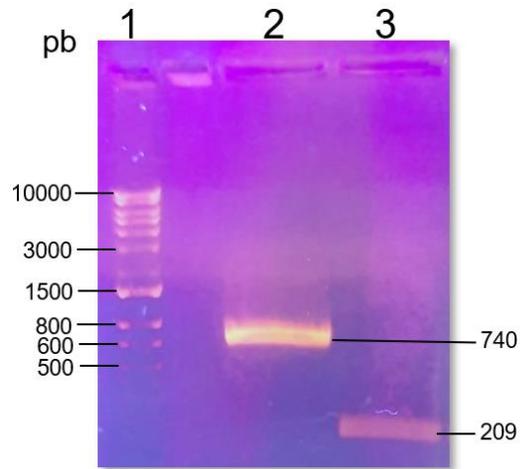


Figura 6. Doble digestión enzimática de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: *4D5scFv* digerido con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. Carril 3: *BmKAGAP* digerido con las enzimas *NcoI* y *XhoI*.

En la figura 7 se encuentra el fragmento de 5368 pb del vector pET30a_SmbP digerido con las dos enzimas mencionadas.

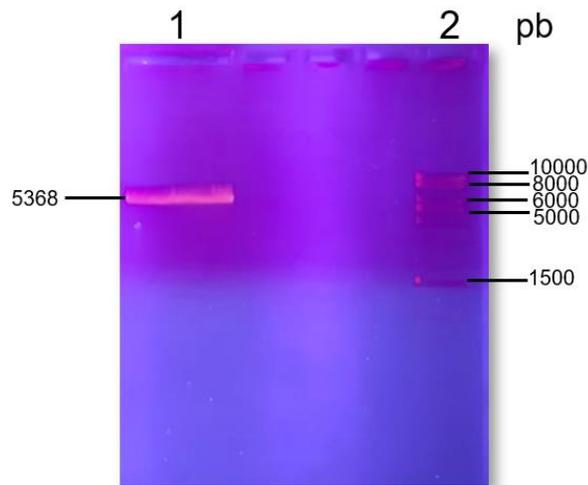


Figura 7. Doble digestión enzimática del vector de pET30a_SmbP. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: pET30a_SmbP digerido con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. Carril 2: Marcador de peso molecular.

6.1.4 Reacción de ligación del vector de expresión pET30a_SmbP con los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*

Las reacciones de ligación del vector pET30a_SmbP con los insertos *4D5scFv* y *BmKAGAP* se realizaron con la relación molar 1:3. En la figura 8 y 9 se encuentran las representaciones esquemáticas de las construcciones.

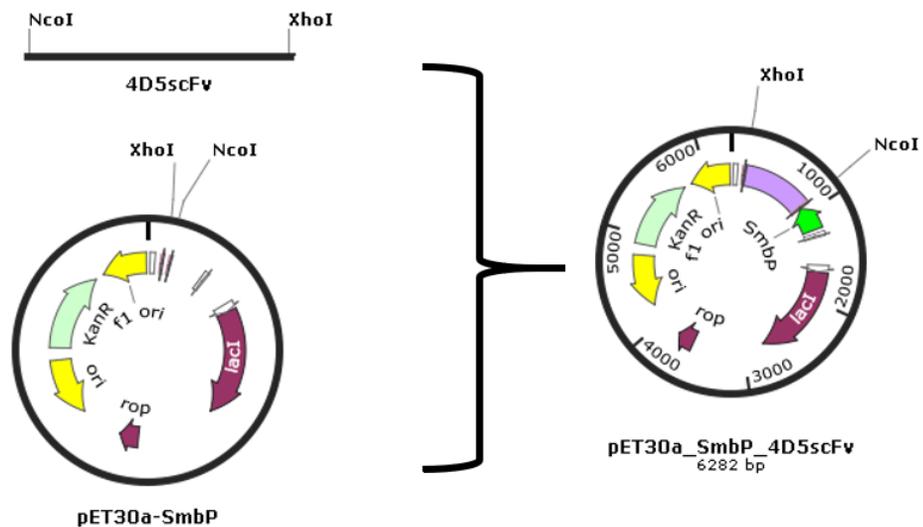


Figura 8. Representación esquemática de la construcción del vector pET30a_SmbP_4D5scFv.

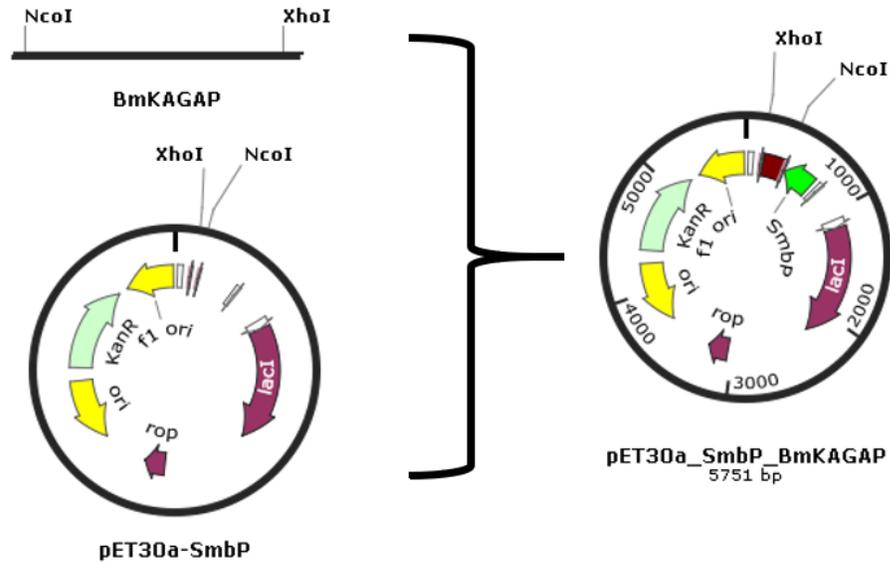


Figura 9. Representación esquemática de la construcción del plásmido pET30a_SmbP_BmKAGAP.

6.1.5 Clonación de *Escherichia coli* DH5α con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP

De las dos transformaciones con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP se obtuvieron colonias transformadas de *E. coli* DH5α rubidio competentes. Para corroborar la construcción de los plásmidos se realizó una PCR de las clonas para la amplificación de la secuencia de ADN de los genes *4D5scFv* y *BmKAGAP*. En la figura 10 se encuentra un gel de agarosa al 1%, en el carril 3 se observa una banda entre las líneas de 800 y 600 pb del marcador de peso molecular, lo que nos indica que se trata del amplicón esperado de 765 pb del plásmido pET30a_SmbP_4D5scFv; y en el carril 5 se observa una banda entre las líneas de 300 y 200 pb del marcador de peso molecular, lo que nos indica que se trata del amplicón esperado de 234 pb del plásmido pET30a_SmbP_BmKAGAP.

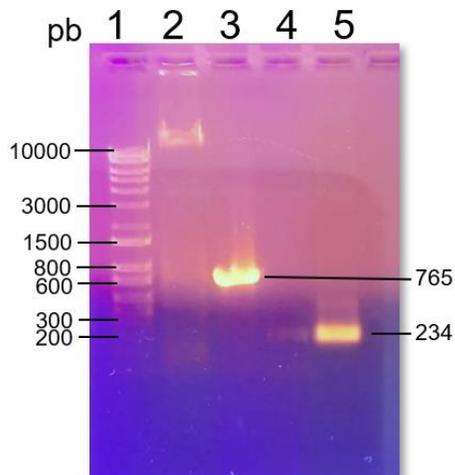


Figura 10. Análisis por PCR de las clonas de *E. coli* DH5 α transformadas con pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Control de pET30a_SmbP con los primers para 4D5scFv. Carril 3: Amplicón de 4D5scFv. Carril 4: Control de pET30a_SmbP con los primers para BmKAGAP. Carril 5: Amplicón de BmKAGAP.

6.2 Construcción y propagación del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP

6.2.1 Transposición del plásmido pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP en el bacmid

Se decidió expresar la inmunotoxina completa en el sistema de expresión eucariótico, las células de insecto ExpiSf9TM, para lo cual se unieron las secuencias de aminoácidos de 4D5scFv y de BmKAGAP mediante un enlazador flexible: EFPKPSTPPGSSGGAP para que cada proteína ejerza su función sin que ocurra impedimento estérico, además en el extremo N' se le añadió el aminoácido de inicio de la síntesis de la cadena (metionina), una etiqueta de histidinas (His₆) seguido del sitio de corte de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV, por sus siglas en inglés) para poder escindir la etiqueta His₆ de la

inmunotoxina. En la figura 11 se muestra la secuencia de aminoácidos de la inmunotoxina His_4D5scFv-BmKAGAP.

```
001 MHHHHHENL YFQGEVQLVE SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FNIKDTYIHW VRQAPGKGLE
061 WVARIYPTNG YTRYADSVKG RFTISADTSK NTAYLQMNSL RAEDTAVYYC SRWGGDGFYA
121 MDYWGQGTLV TVSSGGGGSG GGGSGGGGSD IQMTQSPSSL SASVGDRVTI TCRASQDVNT
181 AVAWYQKPG KAPKLLIYSA SFLYSGVPSR FSGSRSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQH
241 YTPPTFGQG TKVEIKEFPK PSTPPGSSGG APVRDGYIAD DKNCAVFCGR NAYCDDECKK
301 NGAESGYCQW AGVYGNACWC YKLPDKVPIR VPGKCNNG
```

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la inmunotoxina His_4D5scFv-BmKAGAP.

El gen que codifica esta proteína se mandó a sintetizar y optimizar para su expresión en la línea celular de insecto.

Se obtuvieron colonias blancas y azules aisladas de *E. coli* DH10Bac™ transformada con el plásmido pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP en la caja con la dilución 10^{-3} . Se sembraron por estría 9 colonias blancas en cajas con medio LB, agar bacteriológico, 50 µg/mL Kan, 10 µg/mL Tetraciclina (Tet), 7 µg/mL Gentamicina (Gen), 100 µg/mL X-gal y 0.5 mM IPTG para corroborar que el bacmid no tenga todavía el gen *lacZ* que codifique la enzima β-galactosidasa e hidrolice el X-gal y se genere el color azul en las células; 7 colonias presentaron de nuevo el color blanco y 2 el color azul. Se tomaron 4 colonias blancas y se les extrajo el ADN del bacmid por lisis alcalina.

6.2.2 Amplificación del sitio mini-Att Tn7

Para corroborar que se haya realizado la transposición y verificar la presencia del gen *His_4D5scFv-BmKAGAP* en el bacmid se realizó una PCR de

las 4 clonas aisladas. En la figura 12 se encuentra un gel de agarosa al 1%, en el carril 3 se observa una banda por encima de la línea de 3000 pb del marcador de peso molecular, se trata del amplicón esperado de alrededor de 3329 pb; en los carriles 4, 5 y 6 se observa esta banda muy delgada, además en el carril 6 se encuentra también la banda de alrededor de 300 pb; los carriles 2 y 7 son controles negativos y, en el carril 8 esta como control positivo el bacmid sin el inserto y presenta la banda de ~300 pb.

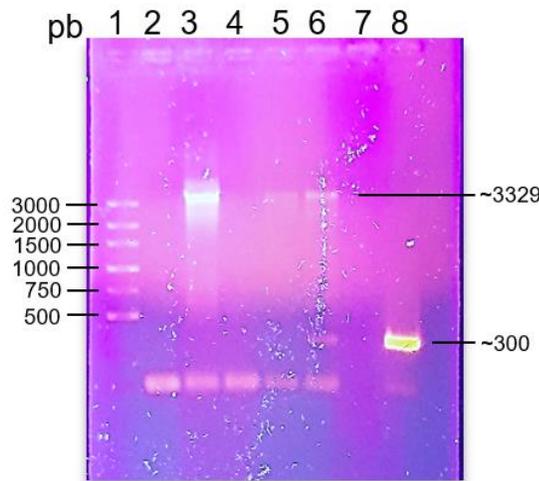


Figura 12. Análisis por PCR del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP de las clonas de *E. coli* DH10Bac™ transformadas con pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular Ready-to-Use™ Pluse 100 bp DNA Ladder (GenScript). Carril 2: Control negativo sin muestra.

Carril 3, 4, 5 y 6: Amplicón del sitio mini-Att Tn7 con el gen *His_4D5scFv-BmKAGAP*.

Carril 7: Control negativo sin polimerasa. Carril 8: Amplicón del sitio mini-Att Tn7 sin el inserto.

La clona del carril 3 se eligió para extraer y purificar el bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP con el kit de extracción de ADN libre de endotoxinas para que sea

empleado en la transfección de ExpiSf9™, se obtuvo una concentración de 489.3 ng/μL.

6.3 Transfección del ADN del baculovirus con el gen que codifica a la inmunotoxina His_4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular de insecto *Spodoptera frugiperda*

6.3.1 Proliferación de la línea celular ExpiSf9™

Después de que el cultivo de las células en suspensión de ExpiSf9™ tuvo su primer pase celular, los cultivos posteriores a los tres días de incubación alcanzan densidades superiores a 5×10^6 células/mL con viabilidades celulares $\geq 94\%$.

6.3.2 Transfección del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular ExpiSf9™

El cultivo de la línea celular ExpiSf9™ transfectado con el bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP se mantuvo incubando hasta la disminución de la viabilidad celular del 60% por 96 h. En la figura 13 se muestra que las células presentaron cambios en la morfología, se observaron más grandes y granulares en comparación con las células no transfectadas.

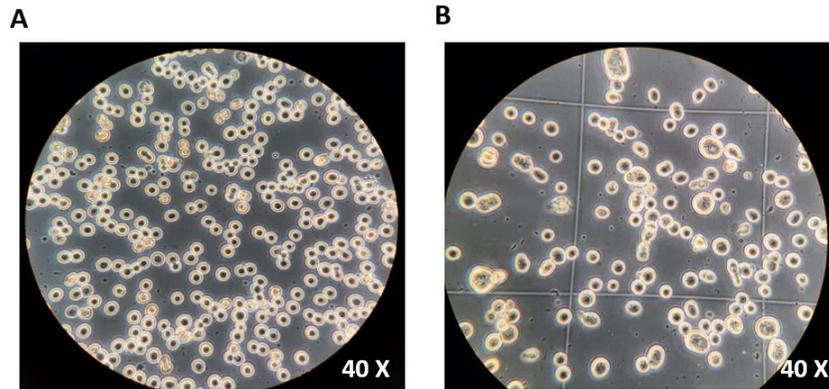


Figura 13. Morfología de la línea celular ExpiSf9™. A: Células no transfectadas con el bacmid. B: Células transfectadas con el bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP.

Después de las 96 h se recolectó el sobrenadante libre de células, llamado Stock P0, el cual contiene los virus (baculovirus recombinante) formados por las células. Este Stock P0 se mantuvo a 4 °C protegido de la luz hasta su utilización.

6.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP en *Escherichia coli* SHuffle T7(DE3)

6.4.1 Clonación de *Escherichia coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3) con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP

De las dos transformaciones con los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP se obtuvieron colonias transformadas de *E. coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3) rubidio competentes, las cuales se usaron como inóculo para las posteriores expresiones.

6.4.2 Microexpresión de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP

Se realizó una electroforesis de proteínas SDS-PAGE para observar una banda de 36.88 kDa correspondiente a la expresión de SmbP_4D5scFv y una de 18.27 kDa para SmbP_BmKAGAP; pesos moleculares predichos por el servidor virtual ExPASy – ProtParam.

En la figura 14 se encuentra un gel de poliacrilamida al 12% que corresponde al análisis de proteínas de la expresión de SmbP_4D5scFv en *E. coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3), en los carriles de la expresión se observa una banda gruesa que se encuentra entre las bandas de 35 y 45 kDa del marcador de peso molecular que difiere de los controles de *E. coli* sin transformar y sin inducir.

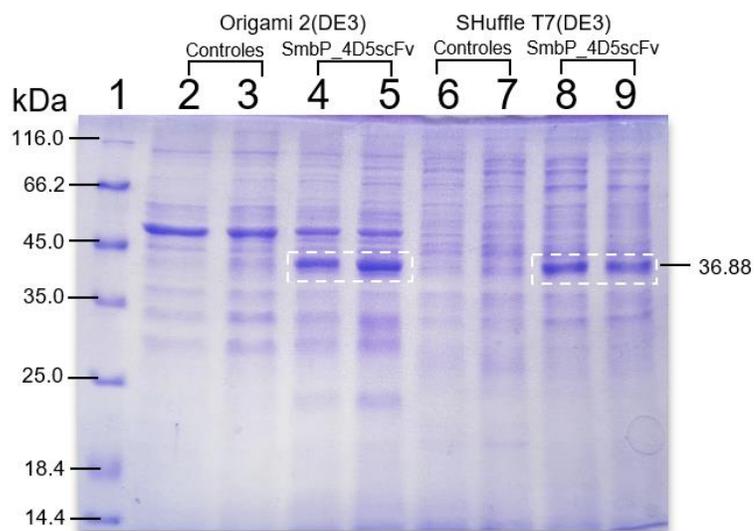


Figura 14. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de la expresión de SmbP_4D5scFv. Carril 1: Marcador de peso molecular de proteínas sin teñir Pierce™ (Thermo Scientific™). Carriles 2 y 6: Controles sin transformar. Carriles 3 y 7: Controles sin inducir. Carriles 4, 5, 8 y 9: Expresión de SmbP_4D5scFv (36.88 kDa).

En la figura 15 se encuentra un gel de poliacrilamida al 15% que corresponde al análisis de proteínas de la expresión de SmbP_BmKAGAP en *E. coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3), en los carriles de la expresión se observa una banda gruesa que se encuentra alrededor de la banda de 18.4 kDa del marcador de peso molecular, esta banda difiere de los controles de *E. coli* sin transformar y sin inducir.

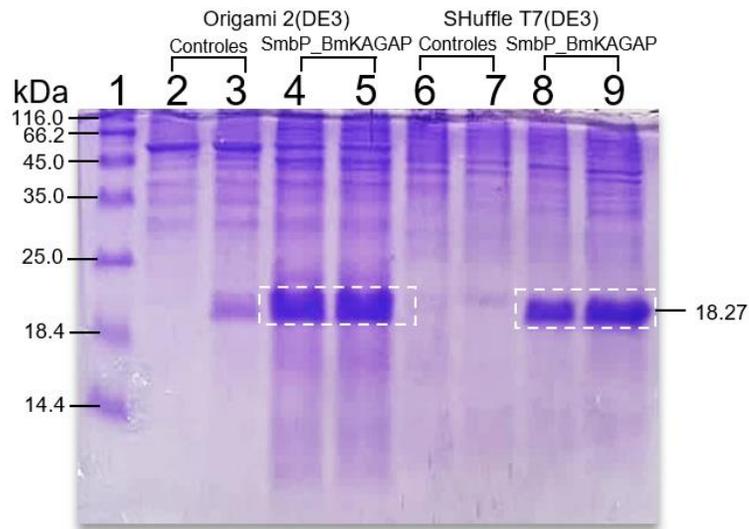


Figura 15. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 15% de la expresión de SmbP_BmKAGAP. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2, 3, 6 y 7: Controles sin transformar y sin inducir. Carriles 4, 5, 8 y 9: Expresión de SmbP_BmKAGAP (18.27 kDa).

6.4.3 Escalamiento de la expresión de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP

Para escalar la expresión de las proteínas recombinantes se decidió emplear solo *E. coli* SHuffle T7(DE3) ya que visualmente en los geles de poliacrilamida de las figuras 14 y 15 no se observa alguna diferencia en la

concentración de las proteínas expresadas en las dos cepas, además SHuffle T7(DE3) llega a la DO_{600} en menos tiempo que Origami 2(DE3).

6.4.4 Purificación de las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP

Las proteínas recombinantes expresadas en 1 L de medio de cultivo LB fueron purificadas por medio de IMAC, se recolectaron fracciones de 500 μ L y se analizaron por SDS-PAGE aquellas que presentaron un incremento en la absorbancia.

SmbP_4D5scFv empezó a eluir al 18% en la concentración del gradiente de elución al observar la banda de 36.88 kDa en los geles de poliacrilamida al 12% de la figura 17, las fracciones en donde se encontró la proteína recombinante se observaron con otras proteínas contaminantes.

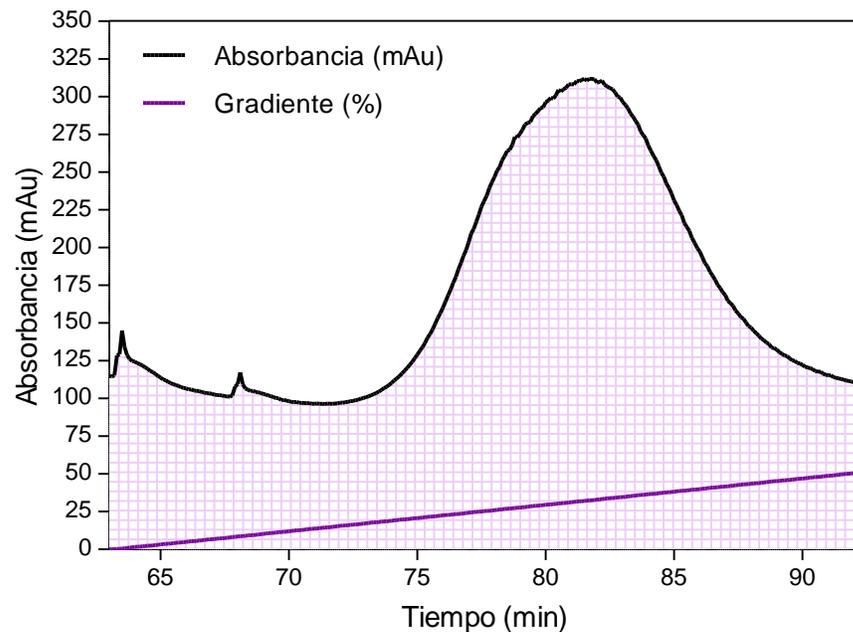


Figura 16. Cromatograma de purificación de SmbP_4D5scFv.

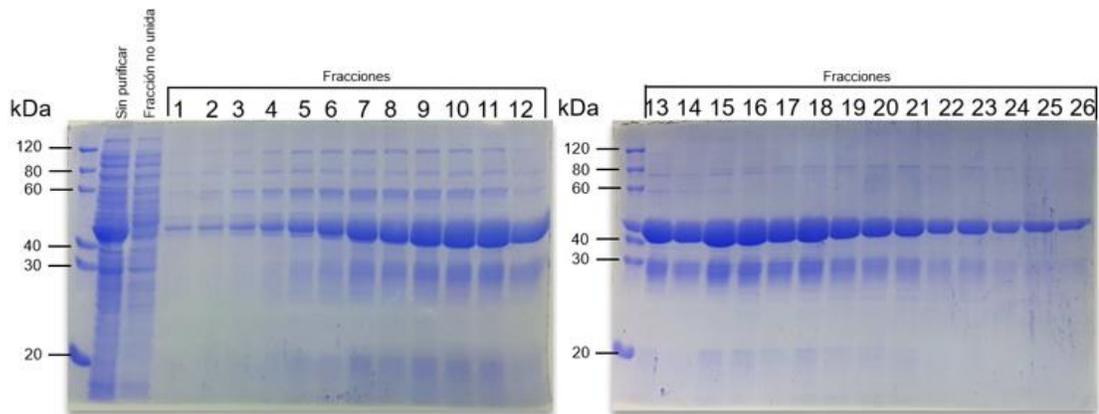


Figura 17. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de la purificación de SmbP_4D5scFv. Marcador de peso molecular: PAGE-MASTER Protein Standard (GenScript). Muestra sin purificar. Fracción no unida. Carriles 1 – 26: Fracciones de purificación.

SmbP_BmKAGAP empezó a eluir al 16% en la concentración del gradiente de elución al observar la banda de 18.27 kDa en los geles de poliacrilamida al 15% de la figura 19, las fracciones en donde se encontró la proteína recombinante también se observaron con otras proteínas contaminantes.

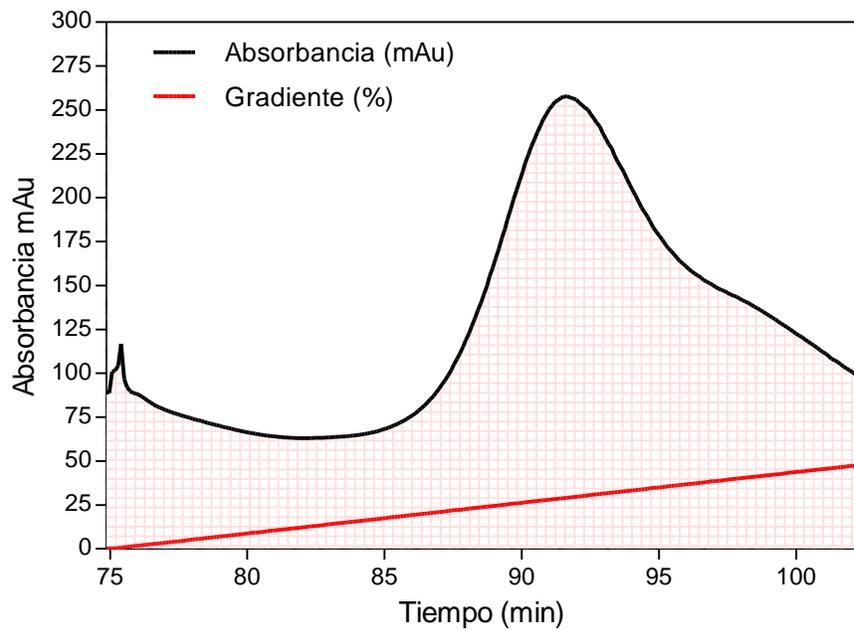


Figura 18. Cromatograma de purificación de SmbP_BmKAGAP.

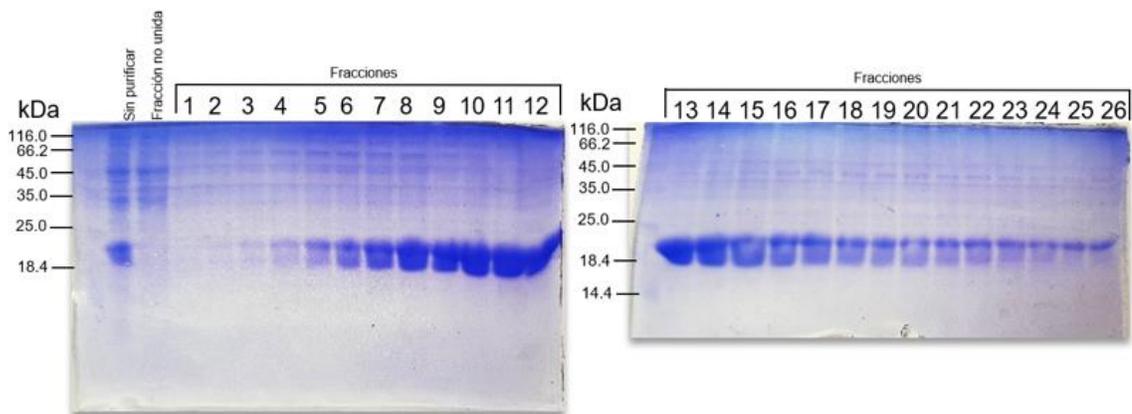


Figura 19. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 15% de la purificación de SmbP_BmKAGAP. Marcador de peso molecular. Muestra sin purificar. Fracción no unida. Carriles 1 – 26: Fracciones de purificación.

6.4.5 Cuantificación de proteínas

En la figura 20 se encuentra la curva de calibración de la albúmina sérica bovina para obtener la ecuación de la recta y cuantificar la concentración de proteína de las muestras.

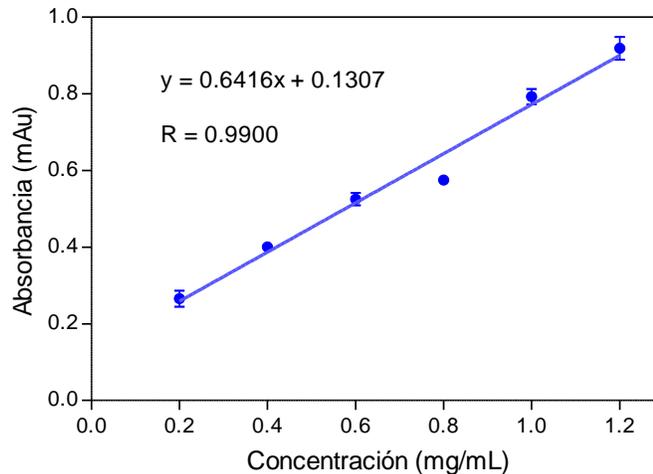


Figura 20. Curva de calibración de la concentración de albúmina sérica bovina.

La cantidad de proteína total del dializado de la purificación de SmbP_4D5scFv fue 7.6 mg y para SmbP_BmKAGAP fue de 6.5 mg.

6.4.6 Remoción de la proteína de fusión

Para remover la proteína de fusión de las proteínas recombinantes se utilizó la enzima enteroquinasa, ya que entre la secuencia de aminoácidos de SmbP y 4D5scFv, y SmbP y BmKAGAP se encuentra el sitio de corte de la enteroquinasa (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys). Se realizó una segunda purificación IMAC para obtener el fragmento variable y el péptido sin la proteína de fusión por lo que se recolectó la fracción no unida a la columna cromatográfica.

En el gel de poliacrilamida al 12% de la figura 21 en el carril de la fracción no unida de la segunda purificación se observó una sola banda que se encuentra por debajo del peso molecular de la proteína recombinante SmbP_4D5scFv, esa banda concuerda con el peso molecular calculado para el fragmento variable que es de 26.15 kDa (Ala-Met-Gly-4D5scFv) y el calculado para SmbP es de 10.74 kDa. En el carril 7 se observa en la mezcla de reacción del corte que faltó más cantidad de enteroquinasa para cortar en la totalidad la proteína SmbP_4D5scFv.

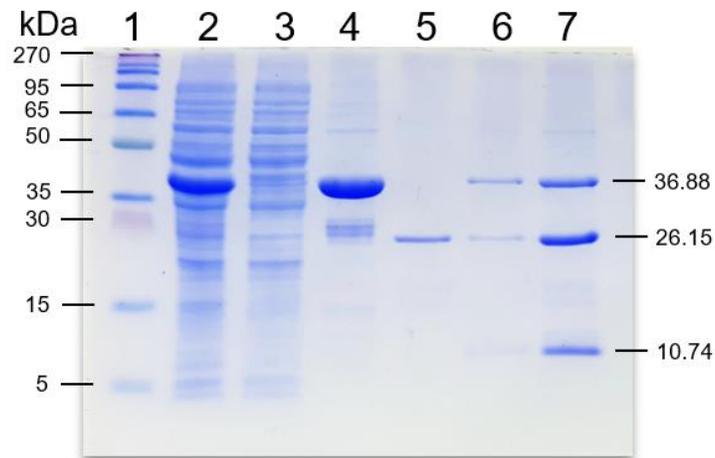


Figura 21. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de la purificación de 4D5scFv. Carril 1: Marcador de peso molecular Broad Multi Pre-Stained, Protein Standard (GenScript). Carril 2: Muestra sin purificar. Carril 3: Fracción no unida (FPLC). Carril 4: SmbP_4D5scFv (36.88 kDa). Carril 5: 4D5scFv (26.15 kDa) Carril 6: Elución de SmbP (10.74 kDa). Carril 7: Mezcla de reacción del corte con enteroquinasa.

La cantidad de proteína que se obtuvo de la purificación de 4D5scFv fue de 4.66 mg con una pureza de 97%.

En el gel de poliacrilamida al 15% de la figura 22 en el carril de la fracción no unida de la segunda purificación se observó una sola banda que se encuentra por debajo del peso molecular de la proteína recombinante SmbP_BmKAGAP, esa banda concuerda con el peso molecular calculado para el péptido que es de 7.54 kDa (Ala-Met-Gly-BmKAGAP).

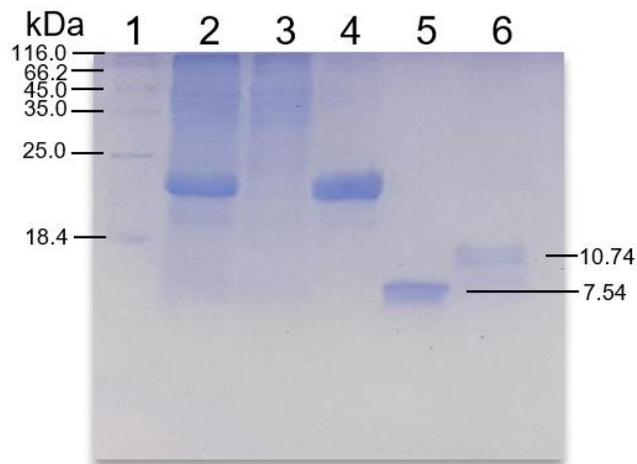


Figura 22. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 15% de la purificación de SmbP_BmKAGAP. Carril 1: Marcador de peso molecular Pierce™ Unstained Protein (Thermo Scientific™). Carril 2: Muestra sin purificar. Carril 3: Fracción no unida (FPLC). Carril 4: SmbP_BmKAGAP. Carril 5: BmKAGAP (7.54 kDa). Carril 6: SmbP (10.74 kDa).

La cantidad de proteína que se obtuvo de la purificación de BmKAGAP fue de 1.8 mg con una pureza de 98%.

6.5 Expresión y purificación de la proteína recombinante 4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular de insecto *Spodoptera frugiperda*

6.5.1 Microexpresión de la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP

Se realizó una electroforesis de proteínas SDS-PAGE para observar una banda de 36.4 kDa correspondiente a la expresión de His_4D5scFv-BmKAGAP; peso molecular predicho por el servidor virtual ExPASy – ProtParam.

En la figura 23 se encuentra un gel de poliacrilamida al 12% que corresponde al análisis de proteínas de la expresión de His_4D5scFv-BmKAGAP en ExpiSf9™ a las 72 y 96 h. En los carriles de expresión de las células transfectadas con el bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP (carriles 3 y 6) no se observó, entre las bandas 30 y 40 kDa del marcador de peso molecular, una banda que difiera con los controles de células sin transfectar (carriles 1 y 4) y células transfectadas con el bacmid sin el gen de interés (carriles 2 y 5).

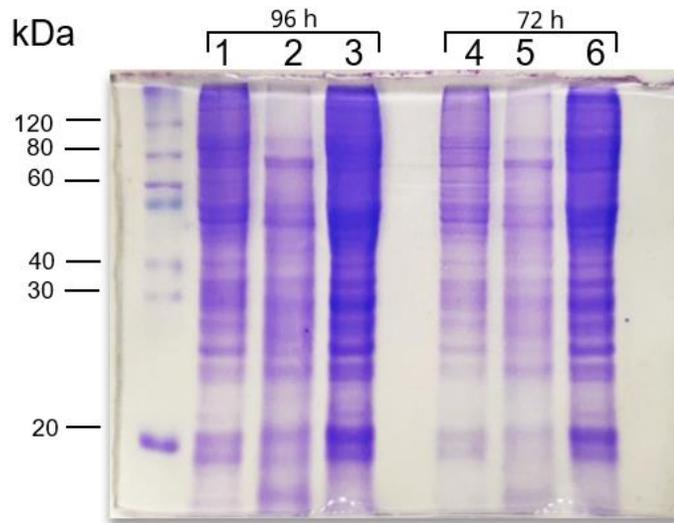


Figura 23. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de la expresión de His_4D5scFv-BmKAGAP. Marcador de peso molecular: PAGE-MASTER Protein Standard (GenScript). Carriles 1 y 4: Controles sin transfectar. Carriles 2 y 5: Controles transfectados con bacmid. Carriles 3 y 6: Muestras transfectadas con bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP.

6.5.2 Purificación de la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP

Para verificar la presencia de la proteína recombinante, además de analizar la fracción soluble, también se analizó la fracción insoluble de la expresión de un cultivo de 60 mL de las células infectadas con las partículas virales del bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP, ya que en la figura 23 no se observa alguna diferencia con los controles.

En el gel de poliacrilamida de la figura 24 se encuentran las fracciones solubles e insolubles de la expresión de His_4D5scFv-BmKAGAP. En los carriles correspondientes a las fracciones insolubles de la expresión se observa una banda gruesa que se encuentra entre las bandas de 30 y 40 kDa del marcador

de peso molecular que difiere de la fracción insoluble del control de las células infectadas con las partículas del virus del bacmid sin el gen; inclusive también la consistencia de las fracciones insolubles de la expresión fue más viscosa que las del control.

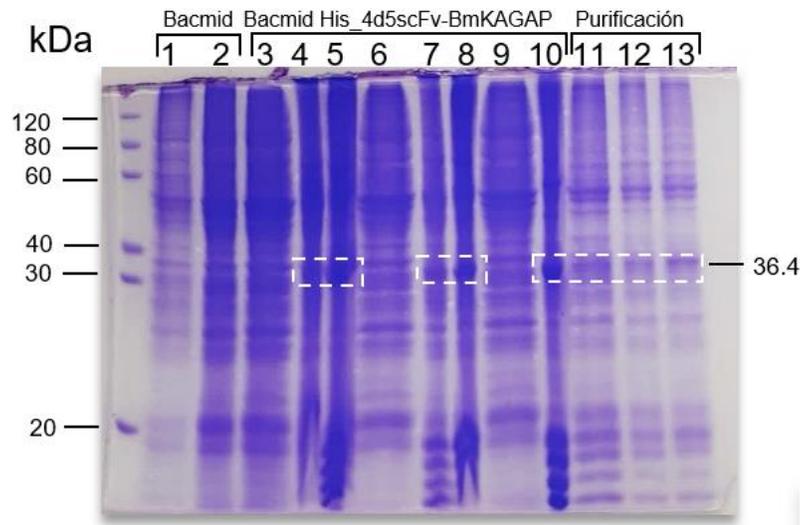


Figura 24. Análisis por electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% de las fracciones solubles e insolubles de la expresión de His_4D5scFv-BmKAGAP. Marcador de peso molecular: PAGE-MASTER Protein Standard (GenScript). Carril 1: Control fracción soluble. Carril 2: Control fracción insoluble. Carril 3, 6 y 9: Fracciones solubles de la expresión. Carriles 4, 5, 7, 8 y 10: Fracciones insolubles de la expresión. Carril 11: Fracción no unida de la purificación. Carril 12: Fracción de lavado. Carril 13: Fracción eluída.

Posteriormente se procedió a realizar una purificación IMAC en columna de esas fracciones insolubles para saber si la proteína de la banda gruesa que se ve en esas fracciones tiene afinidad al Ni(II). Los últimos tres carriles del gel de poliacrilamida de la figura 24 corresponden a la purificación, en el carril de elución se observa esa banda, pero con otras proteínas contaminantes.

6.6 Evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro*

Se evaluó la actividad antiproliferativa del péptido BmKAGAP en distintas concentraciones: 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, utilizando el ensayo WST-1. También se evaluó el péptido sin removerle la proteína de fusión SmbP para conocer si tiene algún efecto sobre la viabilidad de las células.

Se calculó el porcentaje de viabilidad celular con los resultados de las absorbancias del ensayo, los valores se muestran en la figura 25, son el promedio de tres experimentos independientes y cada concentración se evaluó por triplicado. A partir de la concentración de 50 µg/mL de BmKAGAP se observó una disminución de la viabilidad notoria de $72.66 \pm 4.66\%$. SmbP_BmKAGAP no presentó actividad antiproliferativa en MCF-7.

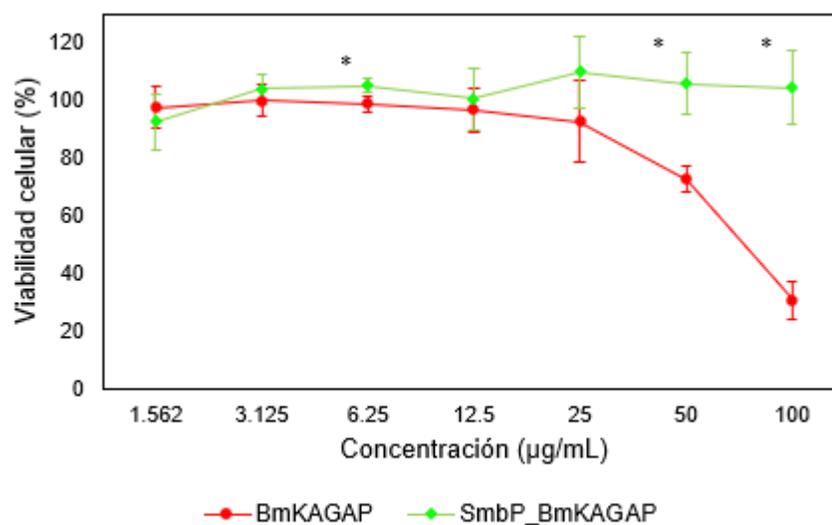


Figura 25. Porcentajes de viabilidad de la línea celular MCF-7 expuesta a BmKAGAP y SmbP_BmKAGAP determinados por el ensayo de WST-1. *ANOVA estadísticamente significativo en comparación con el control negativo, considerando un valor de $p < 0.05$.

También a partir de las absorbancias se determinó el IC₅₀ de BmKAGAP en la línea celular MCF-7, fue de 54.59 µg/mL calculado por el programa GraphPad Prism 5.03.

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se llevó a cabo la construcción de la inmunotoxina llamada 4D5scFv-BmKAGAP, compuesta por dos partes, el fragmento que dirige y el fragmento efector, para emplearlo como un agente que evite la proliferación de células cancerígenas que sobreexpresan el receptor HER2.

El fragmento 4D5scFv es derivado del trastuzumab, este es un anticuerpo monoclonal humanizado de cadena ligera *kappa* IgG1 donde las CDR son derivados del anticuerpo monoclonal de ratón específico a HER2, creado por ingeniería genética (por la empresa Genentech) para el tratamiento del cáncer de mama que sobreexpresa el receptor HER2^{19,46}. El péptido BmKAGAP fue descubierto al momento de analizar los componentes del veneno del escorpión chino *Buthus martensii* Karsch, lo aislaron, purificaron y determinaron la secuencia N-terminal de los primeros 25 aminoácidos por primera vez en el trabajo de Liu, además de su actividad antitumoral contra los modelos tumorales Erlich Ascites y S-180 fibro sarcoma en ratones Kunming⁴⁷.

Las secuencias genéticas que codifican las proteínas 4D5scFv y BmKAGAP fueron optimizadas, por el laboratorio de servicios moleculares, para su expresión en el microorganismo *E. coli*; ya que cada organismo, tanto procariótico como

eucariótico, tiene un uso preferencial a ciertos codones sinónimos y se encuentra correlacionado con los niveles de tRNAs afines a ellos, 18 de los 20 aminoácidos estándar pueden ser codificados por dos o hasta seis codones sinónimos; la optimización incrementa la expresión genética de proteínas heterólogas y regula su estructura⁴⁸. Estas secuencias se insertaron en el vector de expresión para inducción con IPTG. El plásmido pET30a_SmbP, formado en nuestro equipo de trabajo, para que las proteínas fueran etiquetadas con la proteínas de fusión SmbP⁸. En ambas secuencias genéticas se les añadió un codón extra (Gly) en el extremo 5' para no modificar el marco abierto de lectura al ser insertadas en pET30a_SmbP. Al final se obtuvo el gen *SmbP_4D5scFv* de 1044 pb que codifica a una proteína de 347 aminoácidos, y el gen *SmbP_BmKAGAP* de 513 pb que codifica a una proteína de 170 aminoácidos.

Ambas proteínas poseen enlaces disulfuro, 4D5scFv tiene dos y BmKAGAP tiene cuatro, los cuales son difíciles de formar en el ambiente reductor del citoplasma bacteriano, por lo que se están expresando en cepas de *E. coli* que han sido modificadas genéticamente para cambiar el estado redox del citoplasma y permitir la formación de los enlaces disulfuro y así un adecuado ensamblaje de las proteínas^{30,43,49}. Las cepas que se emplearon fueron *E. coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3) ambas tienen mutaciones en los genes tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*), por lo que las rutas reductivas que realizan estas enzimas están disminuidas facilitando la formación de los enlaces disulfuro^{49,50}. Además de esas modificaciones, SHuffle T7(DE3) tiene integrado en su cromosoma, para expresión constitutiva, el gen de la isomerasa de enlace

disulfuro (*dsbC*) sin la secuencia señal que la dirige al periplasma, para que realice su actividad de isomerasa corrigiendo los enlaces disulfuro que se encuentran unidos incorrectamente en comparación con la proteína nativa^{49,51}.

Las proteínas recombinantes 4D5scFv y BmKAGAP etiquetadas con la proteína de fusión SmbP y expresadas en el citoplasma de ambas cepas de *E. coli* se encontraban en la fracción soluble de la lisis celular. SmbP_4D5scFv con un peso molecular de 36.88 kDa y SmbP_BmKAGAP de 18.27 kDa. Solo se analizó esa fracción ya que no se recupera toda solución de la fracción insoluble en la lisis celular con las microesferas de vidrio.

Visualmente en los geles de poliacrilamida de las figuras 14 y 15 no se observa alguna diferencia en la concentración de las proteínas expresadas en las dos cepas, por lo cual se empleó *E. coli* SHuffle T7(DE3) para los siguientes experimentos, como en lo reportado por Ahmadzadeh (2020) para la expresión de anti-HER2 scFv, ellos concluyen que SHuffle proporciona un mejor ambiente para el ensamblaje de proteínas recombinantes, provee mayor cantidad de proteína soluble y mayor actividad biológica (mayor unión al antígeno HER2, determinado por ELISA y citometría de flujo) que el anti-HER2 scFv expresado en el periplasma de *E. coli* BL21⁵².

Las proteínas recombinantes expresadas fueron purificadas por gradiente de elución en el FPLC para mejorar la purificación disminuyendo la cantidad de proteínas contaminantes en las fracciones. Se cuantificó la concentración de proteína total de las fracciones juntas y dializadas, para saber la cantidad aproximada de proteína recombinante que se cortaría con la enzima

enteroquinasa, para remover la proteína de fusión. Las proteínas resultantes del corte fueron 4D5scFv (Ala-Met-Gly-4D5scFv) de 26.15 kDa, BmKAGAP (Ala-Met-Gly-BmKAGAP) de 7.54 kDa y SmbP (SmbP-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) de 10.74 kDa. Para cortar en la totalidad 1 mg de la proteína SmbP_4D5scFv se requirió el doble de unidades de enteroquinasa que SmbP_BmKAGAP, esto puede ser debido a que su tamaño es más del doble que esta última.

A partir de 1 L de cultivo en matraz se obtuvieron 4.66 mg de 4D5scFv con una pureza de 97% después de la segunda purificación por IMAC. El rendimiento es comparable con otros trabajos de investigación; en lo que difieren es en la utilización de una proteína de fusión o un His tag para la purificación del fragmento. Lee (2019) y colaboradores expresaron 4D5scFv utilizando MBP, como proteína de fusión, para facilitar la purificación y disminuir la formación de cuerpos de inclusión, ya que emplearon para la expresión la cepa *E. coli* BL21, como resultados obtuvieron que casi la mitad de la proteína se encontraba en cuerpos de inclusión a 37 °C y aumentaba la fracción soluble al disminuir la temperatura a 18 °C, y a esta temperatura obtuvieron 4.89 mg/L del fragmento con una pureza del 98%²⁸. En el trabajo de Koçer (2021) expresaron el anti-HER2 scFv con un His tag en *E. coli* SHuffle T7 Express, obtuvieron 6.2 mg/L del fragmento, sin removerle la etiqueta, y con una pureza por encima del 99%⁵³.

Se obtuvieron 1.8 mg de BmKAGAP a partir de 1 L de cultivo con un 98% de pureza después de la segunda purificación por IMAC. Se ha reportado que varía la solubilidad del péptido, como en el trabajo de Liu y colaboradores (2003) donde realizaron la expresión del péptido BmKAGAP solo empleando un His tag

en el N-terminal en *E. coli* BL21, por lo cual la mayor cantidad del péptido se encontraba en cuerpos de inclusión, ya que requiere de la formación de los enlaces disulfuro, obtuvieron 2.5 mg/L de péptido con un 95% de pureza²⁹; y en lo reportado por Cui (2010) expresaron también en *E. coli* BL21 nueve mutantes de BmKAGAP utilizando el vector de expresión pSYPU, este plásmido tiene el gen *trxA* que codifica a la tiorredoxina reductasa que cataliza las reacciones de intercambio ditiol-disulfuro; obtuvieron de 1 – 3 mg/L de las proteínas recombinantes en la fracción soluble de la lisis celular³⁰. También se ha empleado la proteína de fusión small ubiquitin-related modifier (SUMO) junto con un His tag, como en el trabajo de Cao et al. (2010) para mejorar el ensamblaje de BmKAGAP, aumentar los niveles de expresión y proteger la proteína de la degradación intracelular en *E. coli* BL21; el 80% de la proteína recombinante se encontraba en la fracción soluble, obtuvieron un rendimiento de 24.3 mg/L de péptido con un 95% de pureza⁵⁴, muy alto en comparación con lo reportado en este trabajo; ya que se ha reportado en distintos artículos que la cepa de *E. coli* BL21 tiene la capacidad de expresar mayor cantidad de proteína recombinante en comparación con otras cepas de *E. coli*, como en el trabajo de Fathi-Roudsari y coautores (2016) realizaron una comparación de la expresión de reteplasa (proteína recombinante con 9 enlaces disulfuro) en tres cepas de *E. coli*, BL21(DE3), Rosetta-gami(DE3) y SHuffle T7, aunque en las tres cepas la proteína recombinante permaneció en la fracción insoluble, BL21 fue la cepa que produjo mayor cantidad de reteplasa ya que representó el 70% de la proteína total²¹.

Dentro de las ventajas de utilizar la proteína de fusión SmbP es que ya no se requiere añadir una etiqueta de histidinas para facilitar la purificación por medio de cromatografía de afinidad al Ni(II), se llega a obtener una proteína recombinante soluble, con alto grado de pureza y biológicamente activa. El rendimiento disminuye a partir del corte con la enzima enteroquinasa y la segunda purificación IMAC. Con respecto al péptido, este representa un menor porcentaje del tamaño total de la proteína recombinante; las proteínas recombinantes se diluyen cuando son purificadas en columna empacada con resina de agarosa cargada con Ni(II), donde SmbP se une por afinidad, las proteínas eluyen con el volumen total de la reacción de digestión.

Con lo que respecta al sistema de expresión eucariótico, la secuencia genética que codifica la proteína His_4D5scFv-BmKAGAP fue optimizada, por el laboratorio de servicios moleculares, para su expresión en *S. frugiperda*. En el extremo 5' de la secuencia se le añadió el codón de inicio (Met), una etiqueta de histidinas His₆ y el sitio de corte TEV, y entre las secuencias del fragmento variable y el péptido se añadieron los codones que codifican un enlazador flexible (EFPKPSTPPGSSGGAP). Se obtuvo el gen *His_4D5scFv-BmKAGAP* de 1017 pb que codifica una proteína de 338 aminoácidos. Esta secuencia se insertó en el plásmido de transferencia pFastBac1 y por medio de la transposición se integró en el bacmid, lo cual fue corroborado por PCR. Se infectaron las células ExpiSf9™ con el bacmid His_4D5scFv-BmKAGAP construido, las cuales sufrieron cambios estructurales conforme avanza la infección, van disminuyendo sus funciones celulares normales, incrementan su diámetro y su núcleo se

agrandada⁵⁵. Posteriormente el Stock P0 (sobrenadante con el baculovirus libre de células) se empleó para infectar un cultivo de ExpiSf9TM para llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP.

Se analizaron las fracciones solubles e insolubles de la lisis celular de la expresión de His_4D5scFv-BmKAGAP en ExpiSf9TM. Solo en la fracción insoluble se observó una banda que difiere del control de expresión de células de insecto infectadas con el bacmid sin el gen de interés, y esta banda se encuentra alrededor de la banda esperada de 36.4 kDa.

En otros estudios también se ha presentado la expresión de proteínas insolubles en células Sf9, como la proteína recombinante quitinasa (52 kDa) con etiqueta de histidinas análoga a la quitinasa de los parásitos *Leishmania infantum* y *Leishmania mexicana*, en donde después de 48 h de infección por el baculovirus, la proteína se encontró en la fracción insoluble del cultivo; utilizaron diversas condiciones experimentales para poder disolver la quitinasa, solo la pudieron disolver parcialmente aplicando sonicación para la lisis celular en PBS con CHAPS 1% y Tween 20 1%⁵⁶. Sin embargo, la proteína no se unió a la columna cromatográfica de afinidad al Ni(II). Asocian su insolubilidad a características intrínsecas de la proteína que la hacen incompatible con los organelos de las células de insecto que hace que se acumule dentro de los compartimentos celulares. Entonces, para la obtención de la inmunotoxina es necesario la realización de distintas metodologías para seleccionar la adecuada que mejore la extracción y disolución de la proteína recombinante, y poder evaluar su funcionalidad como una molécula con actividad antiproliferativa.

Se realizó el ensayo de WST-1 para evaluar el péptido BmKAGAP, producido por *E. coli* Shuffle T7, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, en donde se observó que inhibe la proliferación celular de manera dosis-dependiente, a partir de la concentración de 50 µg/mL se observó una disminución de la viabilidad celular a $72.66 \pm 4.66\%$ y a la máxima concentración empleada de 100 µg/mL la viabilidad fue de $30.84 \pm 6.61\%$. SmbP_BmKAGAP no modificó la viabilidad celular en comparación con el control negativo, es posible que la proteína de fusión interfiera con la actividad del péptido.

Se ha reportado que desde el extracto del veneno del escorpión *Buthus martensii* Karsch hay inhibición en el crecimiento de las células de MCF-7 al ir incrementando la concentración del extracto y el tiempo de exposición⁵⁷; así como el péptido BmKAGAP purificado en modelos tumorales⁴⁷. Kampo y colaboradores en el 2019, evaluaron el efecto citotóxico del péptido recombinante BmKAGAP en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 utilizando el ensayo de MTT, en las cuales observaron que disminuía la viabilidad celular, además determinaron que inhibía la transición epitelial-mesenquimatosa, la migración y la capacidad de invasión de estas células; obtuvieron el IC₅₀ de BmKAGAP en esas líneas celulares, siendo 40 µM para MCF-7 y 50 µM para MDA-MB-231³¹. En el presente trabajo se obtuvo un valor de IC₅₀ de rBmKAGAP en MCF-7 de 54.59 µg/mL (7.24 µM) mayor a lo reportado anteriormente en esta línea celular.

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIONES

- Se diseñó el gen del fragmento variable de una sola cadena del anticuerpo anti-HER2/neu 4D5 humanizado (4D5scFv) al cual se le añadió un enlazador flexible para unir las cadenas variables y un último codón para añadir una cisteína a la cadena de aminoácidos de la proteína.
- Se diseñó el gen de la inmunotoxina *His_4D5scFv-BmKAGAP*, unidos por un enlazador flexible, en el extremo 5' se le añadió el codón de inicio, una etiqueta de histidinas y el sitio de corte de la proteasa del virus del grabado del tabaco.
- Se construyeron los plásmidos pET30a_SmbP_4D5scFv y pET30a_SmbP_BmKAGAP, y el plásmido pFastBac1_His_4D5scFv-BmKAGAP.
- Se obtuvo el bacmid recombinante con el inserto que contiene el gen *His_4D5scFv-BmKAGAP*.
- Se expresaron las proteínas recombinantes SmbP_4D5scFv y SmbP_BmKAGAP en *E. coli* Origami 2(DE3) y SHuffle T7(DE3), con pesos moleculares de 37 y 18 kDa respectivamente.
- A partir de la expresión de 1 L de medio de cultivo de *E. coli* SHuffle T7 se obtuvo 4.66 mg de la proteína recombinante 4D5scFv con una pureza de 97% con un peso molecular de 26.15 kDa.

- A partir de la expresión de 1 L de medio de cultivo de *E. coli* SHuffle T7 se obtuvo 1.8 mg del péptido recombinante BmKAGAP con una pureza de 98% con un peso molecular de 7.54 kDa.
- Se expresó la proteína recombinante His_4D5scFv-BmKAGAP en la línea celular de insecto ExpiSf9™ de manera insoluble con las condiciones empleadas para su extracción de la célula.
- A la concentración de 100 µg/mL de BmKAGAP la viabilidad de la línea celular MCF-7 fue de $30.84 \pm 6.61\%$ y un IC_{50} de 54.59 µg/mL, determinado por el ensayo de WST-1.

REFERENCIAS

1. Biotechnology | SpringerLink. [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-16483-5_648] Consultado el 18 de Febrero del 2019.
2. Deb PK, Al-Attraqchi OHA, Stanslas J, Al-Aboudi A, Al-Attraqchi N, Tekade RK. Chapter 5 - Biotechnology-based pharmaceutical products. In: Tekade RK, ed. *Biomaterials and Bionanotechnology: Advances in Pharmaceutical Product Development and Research*. Ahmedabad: Academic Press; 2019:153-189.
3. Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS. Biopharmaceutical industry and health care. En: Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS, eds. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*. 1st ed. Dordrecht: Springer; 2010:413-424.
4. Owczarek B, Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K. A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *Biomed Res Int*. 2019;2019:1-13.
5. Khan S, Ullah MW, Siddique R, *et al*. Role of recombinant DNA technology to improve life. *Int J Genomics*. 2016;2016:1-14.
6. Xiong S, Wang Y, Ren X, *et al*. Solubility of disulfide-bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its “oxidizing” mutant. *World J Gastroenterol*. 2005;11(7):1077-1082.
7. Clark DP, Pazdernik NJ. Chapter 10 - Recombinant proteins. In: Clark DP,

- Pazdernik NJ, eds. *Biotechnology*. 2nd ed. Academic Cell; 2016:335-363.
8. Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Zarate X. Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with a small metal-binding protein from *Nitrosomonas europaea*. *Protein Expr Purif*. 2016;118:49-54.
 9. Barney BM, LoBrutto R, Francisco WA. Characterization of a small metal binding protein from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry*. 2004;43(35):11206-11213.
 10. van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol*. 2011;107(SUPPL.):S3-S15.
 11. Jarvis DL. Chapter 14 Baculovirus-insect cell expression systems. In: *Methods in Enzymology*. Vol 463. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009:191-222.
 12. Blissard GW, Theilmann DA. Baculovirus entry and egress from insect cells. *Annu Rev Virol*. 2018;5:113-139.
 13. Jewett A, Tseng HC. 35 - Immunotherapy. In: Dowd FJ, Johnson BS, Mariotti AJ, eds. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry: Seventh Edition*. Mosby; 2017:504-529.
 14. Allahyari H, Heidari S, Ghamgosha M, Saffarian P, Amani J. Immunotoxin : A new tool for cancer therapy. *Tumor Biol*. 2017;39(2):1-11.
 15. Hermanson GT. Chapter 21 - Immunotoxin conjugation techniques. In: Hermanson GT, ed. *Bioconjugate Techniques*. 2nd ed. Academic Press;

2008:824-857.

16. Watkins EJ. Overview of breast cancer. *J Am Acad Physician Assist.* 2019;32(10):13-17.
17. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-HER2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated HER2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(12):4744-4749.
18. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol.* 2001;12(Suppl. 1):S3-S8.
19. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to trastuzumab in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(24):7479-7491.
20. *Zercepac*; INN-Trastuzumab. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zercepac-epar-public-assessment-report_en.pdf] Consultado el 10 de octubre del 2021.
21. Fathi-Roudsari M, Akhavian-Tehrani A, Maghsoudi N. Comparison of three *Escherichia coli* strains in recombinant production of reteplase. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2016;8(1):16-22.
22. Harper DM. Currently approved prophylactic HPV vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(12):1663-1679.
23. Nika L, Wallner J, Palmberger D, Koczka K, Vorauer-Uhl K, Grabherr R.

- Expression of full-length HER2 protein in Sf9 insect cells and its presentation on the surface of budded virus-like particles. *Protein Expr Purif.* 2017;136:27-38.
24. Guijarro-Pardo E, Gómez-Sebastián S, Escribano JM. *In vivo* production of recombinant proteins using occluded recombinant AcMNPV-derived baculovirus vectors. *J Virol Methods.* 2017;250:17-24.
 25. Egashira Y, Nagatoishi S, Kiyoshi M, Ishii-Watabe A, Tsumoto K. Characterization of glycoengineered anti-HER2 monoclonal antibodies produced by using a silkworm-baculovirus expression system. *J Biochem.* 2018;163(6):481-488.
 26. Sokolova EA, Zdobnova TA, Stremovskiy OA, Balalaeva I V, Deyev SM. Novel recombinant anti-HER2/neu immunotoxin: Design and antitumor efficiency. *Biochem.* 2014;79(12):1376-1381.
 27. Deyev SM, Kutova OM, Lebedenko EN, Proshkina GM, Schulga A., Sokolova EA. Proceedings of the scientific-practical conference “Research and Development - 2016.” In: Anisimov K., Dub AV, Kolpakov SK, *et al.*, eds. *Bifunctional recombinant protein agent based on Pseudomonas exotoxin A fragment for targeted therapy of HER-2 positive tumors.* Springer Open; 2016:563-572.
 28. Lee S, Park S, Nguyen MT, *et al.* A chemical conjugate between HER2-targeting antibody fragment and *Pseudomonas* exotoxin A fragment demonstrates cytotoxic effects on HER2-expressing breast cancer cells.

- BMB Rep.* 2019;52(8):496-501.
29. Liu YF, Ma RL, Wang SL, *et al.* Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2003;27(2):253-258.
 30. Cui Y, Guo GL, Ma L, *et al.* Structure and function relationship of toxin from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch (BmKAGAP): Gaining insight into related sites of analgesic activity. *Peptides.* 2010;31(6):995-1000.
 31. Kampo S, Ahmmed B, Zhou T, *et al.* Scorpion venom analgesic peptide, BmK AGAP inhibits stemness, and epithelial-mesenchymal transition by down-regulating PTX3 in breast cancer. *Front Oncol.* 2019;9:1-17.
 32. Breast cancer [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>] Consultado el 30 de Septiembre del 2022.
 33. Estado de HER2 del cáncer de seno [<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/estado-de-her2-del-cancer-de-seno.html>] Consultado el 5 de Abril del 2019.
 34. Takeda T, Yamamoto H, Kanzaki H, *et al.* Yes1 signaling mediates the resistance to Trastuzumab/Lap atinib in breast cancer. *PLoS One.* 2017;12(2):1-17.
 35. ThermoFisher. ExpiSf™ Expression System user guide. 2018:1-56.
 36. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.*

1997;21(1):A.3B.1-A.3B.2.

37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254.
38. ImageJ [<https://imagej.nih.gov/ij/>] Consultado el 24 de Mayo del 2021.
39. ATCC. *Animal Cell Culture Guide*. Manassas, Virginia: University Boulevard; 2020.
40. Martínez E. Expresión y purificación de glucosa oxidasa recombinante en *Pichia pastoris* y evaluación de la actividad citotóxica y anticancerígena *in vitro*. *Universidad Autónoma de Nuevo León*. 2018.
41. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
42. Cell Proliferation Reagent WST-1 | Sigma-Aldrich. [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=es®ion=MX&gclid=EAlaIQobChMI8vut7Lyc1wIVBZd-Ch3YXA1jEAAYASAAEgJNOvD_BwE] Consultado el 8 de Julio del 2021.
43. RCSB PDB - 1N8Z: Crystal structure of extracellular domain of human HER2 complexed with Herceptin Fab. [<https://www.rcsb.org/structure/1N8Z>] Consultado el 3 de Marzo del 2020.
44. Kunik V, Peters B, Ofra Y. Structural consensus among antibodies defines

- the antigen binding site. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(2).
45. Kunik V, Ashkenazi S, Ofran Y. Paratome: An online tool for systematic identification of antigen-binding regions in antibodies based on sequence or structure. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(W1):521-524.
 46. Genentech: Herceptin® (trastuzumab) - Information for Patients. [<https://www.gene.com/patients/medicines/herceptin>] Consultado el 29 de Junio del 2021.
 47. Liu YF, Hu J, Zhang JH, Wang SL, Wu CF. Isolation, purification, and N-terminal partial sequence of an antitumor peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Prep Biochem Biotechnol.* 2002;32(4):317-327.
 48. Liu Y. A code within the genetic code: Codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):1-9.
 49. Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact.* 2012;11(56):1-16.
 50. Li D, Ji F, Huang C, Jia L. High expression achievement of active and robust Anti- β 2 microglobulin nanobodies via *E. coli* hosts selection. *Molecules.* 2019;24(2860):1-11.
 51. dsbC - Thiol:disulfide interchange protein DsbC precursor - *Escherichia coli* (strain K12) - dsbC gene & protein.

[<https://www.uniprot.org/uniprot/P0AEG6>] Consultado el 1 de Abril del 2020.

52. Ahmadzadeh M, Farshdari F, Nematollahi L, Behdani M, Mohit E. Anti-HER2 scFv expression in *Escherichia coli* SHuffle®T7 express cells: Effects on solubility and biological activity. *Mol Biotechnol.* 2020;62(1):18-30.
53. Koçer İ, Cox EC, DeLisa MP, Çelik E. Effects of variable domain orientation on anti-HER2 single-chain variable fragment antibody expressed in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Biotechnol Prog.* 2021;37(2).
54. Cao P, Yu J, Lu W, et al. Expression and purification of an antitumor-analgesic peptide from the venom of *Mesobuthus martensii* Karsch by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 2010;26(5):1240-1244.
55. Invitrogen. Instruction manual: guide to baculovirus expression vector systems (BEVS) and insect cell culture techniques. 2002:1-30.
56. Cabral AD, Garcia FB, Suzuki RB, et al. Dataset on recombinant expression of an ancient chitinase gene from different species of *Leishmania* parasites in bacteria and in *Spodoptera frugiperda* cells using baculovirus. *Data Br.* 2020;32:106259.
57. Li W, Li Y, Zhao Y, Yuan J, Mao W. Inhibition effects of scorpion venom extracts (*Buthus matensii* Karsch) on the growth of human breast cancer MCF-7 cells. *African J Tradit Complement Altern Med.* 2014;11(5):105.