

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA  
RECOMBINANTE (HGH<sub>r</sub>) BIOSINTESIS,  
PURIFICACION Y PRODUCCION DE  
ANTICUERPOS MONOCLONALES

Por

RAMIRO MENDOZA MALDONADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad  
en Biología Molecular e Ingeniería Genética

SEPTIEMBRE 1996



TM

QP572

.S6

M4

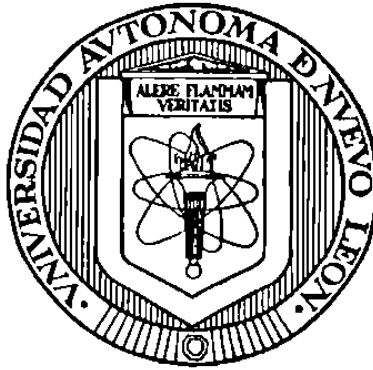
c.1



1080071290

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE (HGHR):  
BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN  
DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Por

RAMIRO MENDOZA MALDONADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad  
en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Septiembre 1996

TM  
QP57Z  
.5  
M4

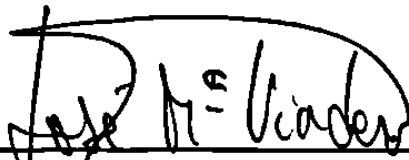


HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE (HGHr):

BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN

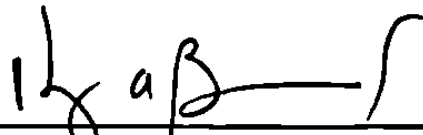
DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Aprobación de Tesis:




---

Dr. José Ma. Viader Salvadó  
Asesor



---

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña  
Coasesor



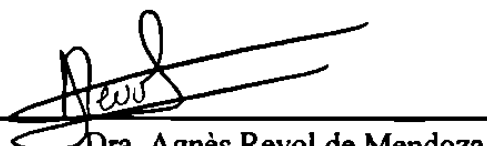
---

Dra. Martha Guerrero Olazarán  
Coasesor



---

Dr. Mario César Salinas Carmona  
Coasesor



---

Dra. Agnès Revol de Mendoza



---

Dr. Roberto Mercado Longoria  
Subdirector de Estudios de Postgrado

## ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios de Química Biomolecular, Biotecnología y Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica y en el laboratorio de Inmunología Celular del Departamento de Inmunología, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de el Dr. José María Viader Salvadó y la coasesoría de el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, la Dra. Martha Guerrero Olazarán y el Dr. Mario César Salinas Carmona.

Parte de este trabajo fue presentado en congresos:

R. Mendoza Maldonado, L.F. Ruíz-Montiel, M. Guerrero Olazarán, J.M. Viader Salvadó, H.A. Barrera Saldaña. "Evaluación de los niveles de expresión de hormona del crecimiento humana recombinante en *Escherichia coli* empleando vectores de expresión." XII Encuentro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., México, Octubre 1994.

L.L. Escamilla Treviño, R. Mendoza Maldonado, J.M. Viader Salvadó, M. Guerrero Olazarán, H.A. Barrera Saldaña. "Optimización de la producción de hormona del crecimiento humana recombinante fusionada a la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr) en *Escherichia coli*." XIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., México, Octubre 1995; y en I Simposio de Ciencia y Tecnología Monterrey 400. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Asociación Neolonesa de Investigación Científica y Tecnológica, Monterrey, México, Mayo 1996.

R. Mendoza Maldonado, M. Guerrero de Viader, H.A. Barrera Saldaña, J.M. Viader Salvadó. "Purificación de Hormona de Crecimiento Humana Recombinante (HGHr) por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución" XIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., México, Octubre 1995.

## PRÓLOGO

El impacto que han causado la Biología Molecular y la Genética Molecular en la ciencia básica ha sido sorprendente, ya que actualmente se conoce con gran detalle la estructura molecular de genes de organismos inferiores y superiores y se ha conseguido un avance importante en el entendimiento de los mecanismos de regulación que participan en su expresión. Así mismo, han sido o están siendo resueltos importantes enigmas de la Biología Molecular tales como las bases moleculares del cáncer, la diferenciación celular y la diversidad de anticuerpos. Por otro lado, el impacto que han tenido sobre la industria ha sido tal, que se ha visto un incremento en el surgimiento a nivel mundial de nuevas compañías dedicadas a la explotación de la Ingeniería Genética como herramienta poderosa de la Biotecnología Molecular, con la cual se ha logrado la producción de proteínas de importancia biomédica en microorganismos, células eucariotes en cultivo, plantas e incluso en fluidos biológicos como sangre o leche de animales de granja. Por tal motivo, en dicho campo ha tomado gran importancia el desarrollo de nuevas tecnologías para incrementar los estudios de expresión, biosíntesis y análisis de proteínas recombinantes.

El principal objetivo de este trabajo de tesis se centra en la estandarización de técnicas que apoyen los estudios sobre la Hormona del Crecimiento Humana Recombinante (HGHR), una de las principales líneas de investigación en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) en el Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.. Dicho trabajo está constituido en tres secciones principales, el estudio de la biosíntesis de HGHR en un sistema de expresión bacteriano, la purificación de HGHR a partir del sistema de expresión anterior mediante métodos cromatográficos y la producción de anticuerpos monoclonales anti-HGHR empleando la tecnología del hibridoma. Un aspecto importante de señalar en el campo de investigación sobre HGHR, es que el desarrollo de estas tecnologías ya ha sido descrito. Sin embargo, este trabajo representa el esfuerzo de nuestro laboratorio de incrementar las líneas de investigación sobre HGHR empleando las técnicas estandarizadas y los productos biotecnológicos obtenidos, que por otro lado, representan la base para el estudio de otras hormonas de crecimiento y proteínas relacionadas como los lactógenos placentarios.

La culminación de este trabajo se ha logrado gracias al valioso apoyo de muchos. Por este motivo, es importante agradecer el apoyo de:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con No. de Registro 85948.
- Universidad Autónoma de Nuevo León y Universidad Autónoma de México por la Estancia de Entrenamiento en Bioquímica de Péptidos dirigida por el Dr. Lourival Domingos Possani Postay, Jefe del Depto. de Bioquímica. Instituto de



Biotecnología, U.N.A.M. Desarrollado dentro del Programa de Intercambio Académico existente entre la U.A.N.L. y U.N.A.M.

- Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado, de la Fac. de Medicina de la U.A.N.L. por lo apoyos económicos con fines académicos y de investigación.
- Personal Administrativo, Docente, No Docente y de Investigación del Departamento de Bioquímica de la Fac. de Medicina de U.A.N.L.
- Personal Administrativo, Docente, No Docente y de Investigación del Departamento de Inmunología de la Fac. de Medicina de U.A.N.L., del cual es jefe el Dr. Mario César Salinas Carmona.
- Miembros del Comité de Tesis por su enorme esfuerzo en la revisión del documento.
- Dr. Hugo A. Barrera Saldaña jefe del Departamento de Bioquímica de la Fac. de Medicina de U.A.N.L.
- Dr. José María Viader Salvadó por su constante, responsable y enriquecedora asesoría; además, de su gran calidad humana.

## **DEDICATORIA**

### **A mi Familia Nativa:**

**A mi Padre.**

**A mi Madre.**

**A mi Hermano.**

**A mi Hermana.**

### **A mi Familia Recombinante:**

**El Doctor.**

**La Doctora.**

**y Los Pequeños.**

## Resumen

**Ramiro Mendoza Maldonado**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Medicina**

**Fecha de Graduación: Septiembre de 1996**

**Título del Estudio: HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE:  
BIOSINTESIS, PURIFICACION Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES**

**Número de Páginas: 107c**

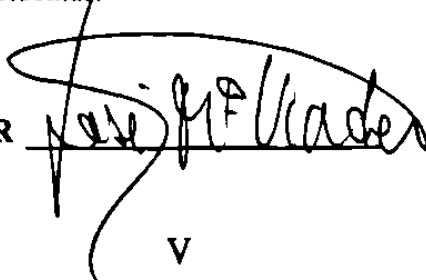
**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con  
especialidad en Biología Molecular en Ingeniería Genética**

**Propósito y Método de Estudio:** Con el fin de ampliar los estudios sobre las hormonas de crecimiento y proteínas relacionadas como los lactógenos placentarios, se llevó a cabo el estudio de la biosíntesis de HGHR y de ésta fusionada a la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr) en un sistema de expresión en *E.coli* con los plásmidos pBHx y pMALchGH22K, respectivamente. Se evaluó la influencia de la concentración de glucosa en el medio de cultivo (% Gluc), la densidad óptica al inicio de la inducción (D.O.) y el tiempo de inducción (T.I.) sobre los niveles de producción y el porcentaje relativo de HGHR ó HGH-MBPr en homogenados celulares, mediante la determinación de proteínas totales por el método de Bradford y un análisis densitométrico de geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Además, se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos. Por otro lado, se evaluó una estrategia de purificación de HGHR a partir del sistema de expresión con el plásmido pBHx, la cual involucró un paso cromatográfico de fase reversa, previa precipitación con sulfato de amonio. La evaluación de esta estrategia se realizó empleando la determinación de proteínas totales, análisis densitométrico de geles de SDS-PAGE y un ELISA contra HGH. Por último, se llevó a cabo la estrategia de producción de anticuerpos monoclonales contra HGHR, empleando la tecnología del hibridoma y una estrategia de inmunización con diferentes antígenos.

**Contribuciones y Conclusiones:** Los resultados de la evaluación de la biosíntesis de HGHR y HGH-MBPr indican una influencia decreciente de T.I., % Gluc y D.O. sobre los niveles de producción de HGHR y HGH-MBPr. Sin embargo, se observó un efecto diferente de dichas variables en los dos sistemas de expresión sobre los niveles de producción y sobre todo sobre los porcentajes relativos de las proteínas recombinantes. Esto indica la importancia de la evaluación de las variables de fermentación en un sistema de expresión recombinante para optimar los niveles de producción.

Por otro lado, la estrategia de purificación evaluada mostró bajos rendimientos en la obtención de HGHR. Sin embargo, la pureza de HGH obtenida fue alta, lo cual indica la eficacia del empleo de una columna de fase reversa en la purificación y además, la utilidad de dicha técnica de separación para la cuantificación y/o análisis cualitativo de HGHR en sistemas de expresión recombinantes. En la producción de anticuerpos monoclonales, los resultados mostraron que la estrategia de inmunización empleada fue adecuada para conseguir altos niveles de producción de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados. Sin embargo, no se obtuvieron los rendimientos esperados en la obtención de hibridomas productores de anticuerpos específicos contra HGHR. Lo anterior podría ser debido a la falta de control en las condiciones de incubación empleadas durante el proceso, lo cual provoca una baja sobrevivencia de los hibridomas.

**FIRMA DEL ASESOR**



V

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Historia Breve de la Biotecnología .....	1
1.2 Hormona del Crecimiento Humana (HGH) .....	5
1.3 Biosíntesis de HGH (HGHR) .....	7
1.3.1 Sistemas de Expresión en <i>Escherichia coli</i> .....	7
1.3.2 Biosíntesis de HGHR en <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.3.3 Biosíntesis de HGHR en Otros Hospederos .....	13
1.4 Purificación de Hormonas del Crecimiento (GHs) .....	14
1.4.1 Purificación de GHs a partir de su Fuente Natural .....	14
1.4.2 Purificación de GHs Recombinantes .....	15
1.4.2.1 Purificación de HGHR .....	17
1.5 Producción de Anticuerpos Monoclonales .....	19
1.5.1 La Tecnología del Hibridoma y la Producción de Anticuerpos Monoclonales .....	19
1.5.2 Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGH .....	21
1.6 Objetivos .....	23
1.6.1 Objetivos Generales .....	23
1.6.2 Objetivos Específicos .....	23
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
2.1 Área de Trabajo y Equipo .....	25
2.2 Métodos .....	26
2.2.1 Estrategia General .....	26
2.2.2 Biosíntesis de HGHR y HGH-MBPr en <i>E. coli</i> .....	27
2.2.2.1 Ensayos de Transformación y Caracterización de <i>E. coli</i> TB1 con pBHX y <i>E. coli</i> TB1 con pMALchGH22K ...	28



2.2.2.2	Ensayos de Fermentación de Clonas Recombinantes de <i>E. coli</i> .....	32
2.2.2.3	Análisis de los Sistemas de Expresión Bacterianos .....	34
2.2.2.3.1	Determinación de Proteínas Totales .....	35
2.2.2.3.2	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) y Análisis Densitométrico .....	36
2.2.2.3.3	Evaluación Analítica del Sistema de Expresión .....	38
2.2.2.3.4	Inmunodetección .....	39
2.2.2.4	Evaluación de la Influencia de Variables en la Fermentación de los Sistemas de Expresión Recombinantes .....	40
2.2.3	Aislamiento de HGH-MBPr y Aislamiento y Purificación de HGHr .....	42
2.2.3.1	Aislamiento de HGH-MBPr .....	43
2.2.3.2	Purificación de HGHr por CLAR-FR .....	44
2.2.3.2.1	Aislamiento de HGHr .....	45
2.2.3.2.2	Método de Separación e Identificación de HGHr por CLAR-FR .....	46
2.2.3.2.3	Estrategia de Purificación: Separación, Recolección y Análisis de HGHr por CLAR-FR .....	47
2.2.3.3	Evaluación del Proceso de Purificación de HGHr .....	47
2.2.4	Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGHr .....	48
2.2.4.1	Esquema de Inmunización .....	48
2.2.4.2	Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos contra HGHr .....	49
2.2.4.3	Obtención de Hibridomas .....	50
2.2.4.3.1	Sensibilidad a Aminopterina de Líneas Celulares de Mieloma de Ratón .....	50
2.2.4.3.2	Ensayos de Fusión Celular .....	51
2.2.4.4	Selección de Hibridomas Productores de anti-HGHr .....	54
2.2.4.4.1	Ensayos de Inmunodot .....	54
2.2.4.4.2	Ensayos de ELISA .....	56
2.2.4.4.3	Ensayos de Western-Blot .....	57
2.2.4.5	Clonación de Hibridomas Productores de anti-HGHr .....	59
2.2.4.5.1	Ensayo de Clonación a Dilución Limitante .....	59

<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	60
3.1 Biosíntesis de HGHR en <i>E. coli</i> .....	60
3.1.1 Transformación y Caracterización de la clona de <i>E. coli</i> con pBHX .....	60
3.1.2 Detección y Análisis de la Producción de HGHR .....	62
3.1.3 Evaluación de la Influencia de Variables en el Proceso de Fermentación .....	65
3.2 Biosíntesis de HGH-MBPr en <i>E. coli</i> .....	69
3.2.1 Transformación y Caracterización de la clona de <i>E. coli</i> con pMALchGH22K .....	69
3.2.2 Detección y Análisis de la Producción de HGH-MBPr .....	71
3.2.3 Evaluación de la Influencia de Variables en el Proceso de Fermentación .....	74
3.3 Aislamiento de HGH-MBPr y Aislamiento y Purificación de HGHR ...	78
3.3.1 Análisis del Extracto Enriquecido con HGH-MBPr y del Extracto Enriquecido con HGHR .....	78
3.3.2 Identificación de HGHR por CLAR-FR .....	79
3.3.3 Análisis Cromatográfico del Extracto Enriquecido con HGHR por CLAR-FR .....	81
3.3.4 Evaluación de la Purificación .....	82
3.4 Producción de Anticuerpos Monoclonales anti-HGHR .....	84
3.4.1 Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos contra HGHR .....	84
3.4.2 Sensibilidad a Aminopterina de las Líneas Celulares .....	86
3.4.3 Ensayos de Fusión .....	87
3.4.4 Selección de Hibridomas Productores de anti-HGHR .....	89
3.4.4.1 Ensayos de Inmunodot .....	89
3.4.4.2 Ensayos de ELISA .....	90
3.4.4.3 Ensayos de Western-Blot .....	91
3.4.5 Clonación de Hibridomas Productores de anti-HGHR .....	93
3.4.5.1 Ensayo de Clonación a Dilución Limitante .....	93
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	94
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	96
<b>6. ANEXOS</b> .....	103

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	Modelo Estructural de la HGH Basado en el Modelo Trazado para la Cadena Polipeptídica de la Hormona del Crecimiento Porcina . . . .	6
2.	Plásmido Típico de Expresión Procariótica . . . . .	9
3.	Mapa de Restricción de los Plásmidos pMAL . . . . .	13
4.	Estrategia General . . . . .	26
5.	Estrategia para la Biosíntesis . . . . .	28
6.	Estrategia de Transformación y Caracterización de los Sistemas de Expresión . . . . .	29
7.	Estrategia para los Ensayos de Fermentación . . . . .	33
8.	Estrategia de Análisis de los Sistemas de Expresión . . . . .	35
9.	Estrategia de Aislamiento de HGHr y HGH-MBPr . . . . .	42
10.	Estrategia de Purificación de HGHr . . . . .	44
11.	Caracterización Enzimática del Plásmido pBHX . . . . .	61
12.	Análisis Cualitativo de HGHr en el Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pBHX . . . . .	62
13.	Análisis Densitométrico de HGHr en el Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pBHX . . . . .	63
14.	Influencia de las Variables de Fermentación sobre la Producción de HGHr . . . . .	65
15.	Influencia de las Variables de Fermentación sobre el Porcentaje Relativo de HGHr . . . . .	66

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
16. Caracterización Enzimática del Plásmido pMALchGH22K . . . . .	70
17. Análisis Cualitativo de HGH-MBPr en el Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pMALchGH22K . . . . .	71
18. Análisis Densitométrico de HGH-MBPr en el Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pMALchGH22K . . . . .	72
19. Influencia de las Variables de Fermentación sobre la Producción de HGH-MBPr . . . . .	74
20. Influencia de las Variables de Fermentación sobre el Porcentaje Relativo de HGH-MBPr . . . . .	75
21. Análisis por SDS-PAGE de los Extractos Enriquecidos de HGH-MBPr y HGHR . . . . .	76
22. Análisis Densitométrico de los Extractos Enriquecidos de HGH-MBPr y HGHR . . . . .	79
23. Análisis Cromatográfico del Sistema de Expresión de <i>E. coli</i> con pBHX . . . . .	80
24. Análisis Cromatográfico del Extracto Enriquecido con HGHR . . . . .	81
25. Respuesta de Anticuerpos anti-HGHR en Ratones BALB/c . . . . .	85
26. Sensibilidad a Aminopterina de la Línea Celular P3/X63/Ag8U.1 . . . . .	86
27. Sensibilidad a Aminopterina de la Línea Celular P3/X63/Ag8.653 . . . . .	87
28. Fotografías de Hibridomas en Cultivo Obtenidas por Microscopía de Contraste de Fases . . . . .	89
29. Detección de Hibridomas Productores de anti-HGHR por Inmunodot . . . . .	90
30. Detección de Hibridomas Productores de anti-HGHR por ELISA . . . . .	91
31. Detección de Hibridomas Productores de anti-HGHR por Western-Blot . . . . .	92



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I.	Análisis de Restricción del Plásmido pMALchGH22K . . . . .	32
II.	Variables de Fermentación para los Sistemas de Expresión . . . . .	41
III.	Esquema de Inmunización . . . . .	49
IV.	Análisis de la Producción de HGhr . . . . .	64
V.	Análisis de t de Student en la Biosíntesis de HGhr . . . . .	68
VI.	Análisis de la Producción de HGH-MBPr . . . . .	73
VII.	Análisis de t de Student en la Biosíntesis de HGH-MBPr . . . . .	77
VIII.	Evaluación de la Purificación de HGhr . . . . .	82
IX.	Evaluación de la Etapa Cromatográfica en la Purificación de HGhr . .	83
X.	Título de Anticuerpos anti-HGhr en Ratones BALB/c . . . . .	85
XI.	Ensayos de Fusión Celular . . . . .	88