(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
24 de agosto de 2017 (24.08.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/142388 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/MX2017/000012

(22) Fecha de presentación internacional: 17 de febrero de 2017 (17.02.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad: MX/a/2016/002188
18 de febrero de 2016 (18.02.2016) MX

(71) Solicitante: **LABORATORIOS SILANES S.A. DE C.V.** [MX/MX]; Amores 1304, Colonia Del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Ciudad de México (MX).

(72) Inventores: **POSSANI POSTAY, Lourival Domingos**; Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Ciudad de México (MX). **BALTAZAR BECERRIL, Luján**; Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Ciudad de México (MX). **QUINTERO HERNÁNDEZ, Verónica**; Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Ciudad de México (MX). **GONZÁLEZ MORALES, Lidia**; Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Ciudad de México (MX). **JIMÉNEZ VARGAS, Juana María**; Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Ciudad de México (MX). **ORTIZ SURI, Ernesto**; Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Ciudad de México (MX). **CORZO BURGUETE, Gerardo**; Amores 1304, Colonia del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Ciudad de México (MX).

(74) Mandatario: **FUENTES CARRASCO, Ariel**; Calle Cracovia #72, Torre B, Piso 2 oficina 208, Colonia San Ángel, Delegación Álvaro Obregón, C.P. 01000 Ciudad de México (MX).

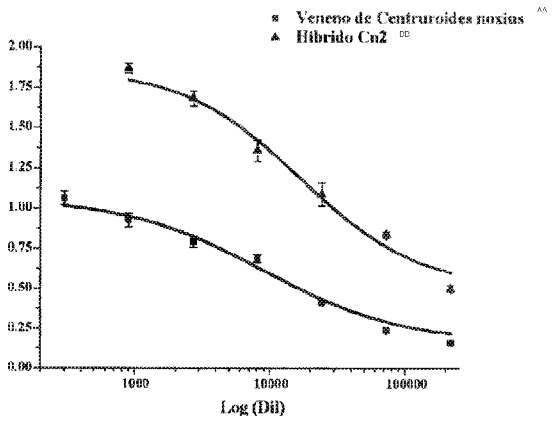
(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF RECOMBINANT HYBRID PROTEINS THAT CAN GENERATE SCORPION-VENOM-NEUTRALISING ANTIBODIES

(54) Título : COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE PROTEÍNAS HÍBRIDAS RECOMBINANTES CAPACES DE GENERAR ANTICUERPOS NEUTRALZANTES EN CONTRA DEL VENENO DE ALACRANES

FIGURA 19



Antígeno	Títulos del suero
Veneno *C. noxius*	9165
Híbrido Cn2	16997

(57) **Abstract**: The present invention relates to a specific mixture of hybrid proteins formed with toxins selected from the venom of scorpions from different parts of the world and thioredoxin protein, which are expressed heterologously, by means of genetic engineering, as hybrid proteins, and which can act as antigens (immunogens) effective in the production of antibodies in mammals, which in turn neutralise full venom from species of scorpions from which the genetic information regarding the toxins was obtained. The invention also relates to a pharmaceutical composition containing said mixture or combination for use as a scorpion antivenom.

(57) **Resumen**: La presente invención se refiere a una mezcla específica de proteínas híbridas formadas con toxinas seleccionadas del veneno de alacranes de distintas partes del mundo y la proteína tiorredoxina, las cuales se expresan heterólogamente, por ingeniería genética, como proteínas híbridas, y son capaces de funcionar como antígenos (inmunógenos) eficientes en la producción de anticuerpos en mamíferos, que a su vez neutralizan el veneno completo de las especies de alacranes de los cuales se obtuvo la información genética de las toxinas, así como a una composición farmacéutica que contiene dicha mezcla o combinación para usarse como antiveneno de alacrán.

WO 2017/142388 A2

SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*

— *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE PROTEÍNAS HÍBRIDAS RECOMBINANTES CAPACES DE GENERAR ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN CONTRA DEL VENENO DE ALACRANES

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al diseño de proteínas recombinantes formadas con toxinas seleccionadas del veneno de alacranes de varias partes del mundo (géneros *Androctonus, Buthacus, Buthus, Leiurus, Parabuthus, Centruroides, Tityus*) las cuales se expresan heterólogamente, por ingeniería genética, con plegamiento adecuado, como proteínas híbridas, capaces de funcionar como antígenos (inmunógenos) eficientes en la producción de anticuerpos en mamíferos, funcionan así de manera individual o bien en determinadas mezclas de las mismas quedando como composiciones adecuadas para inmunización y generación de anticuerpos con capacidad neutralizante del veneno completo de las especies de alacranes de los cuales se obtuvo la información genética de las toxinas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El conocimiento generado en los laboratorios de investigación de la UNAM, primeramente en el Instituto de Investigación en Fisiología Celular, después en el Instituto de Investigaciones Biomédicas ha permitido identificar los componentes tóxicos del veneno de alacranes de muchas partes del mundo (Possani y col., 1999). El uso de los péptidos tóxicos para la generación de antivenenos capaces de neutralizar el efecto dañino de estas proteínas del veneno, posibilitó el diseño de una estrategia tecnológica capaz de producir dichos anti-venenos de una manera más racional y efectiva, objeto de esta invención.

De este modo se describe la síntesis de los genes que codifican para las toxinas mayoritarias del veneno de alacranes peligrosos al humano, se trata de especies comunes de diversas regiones del planeta. Estos genes se incorporaron a vectores moleculares capaces de expresar en bacterias (*Escherichia coli*) las proteínas de forma recombinante, como un producto híbrido no tóxico. Estos fueron utilizados en modelos animales (ratones y/o conejos y/o caballos) demostrando que son capaces de generar anticuerpos protectores.

Estudios previos han demostrado que las neurotoxinas de arácnidos son inmunogénicas y que los anticuerpos generados contra éstas, no solo son capaces de neutralizar a la toxina misma, sino al veneno total de la especie correspondiente (Calderon-Aranda y col., 1993). También se han reportado casos de anticuerpos que son generados contra un componente no tóxico, natural o sintético, y que también neutralizan al veneno total de la especie correspondiente. Así, se ha observado que la generación de anticuerpos contra un solo componente de un veneno, puede ser una alternativa eficaz para la producción de anti-

venenos. Para definir al componente del veneno que una vez aislado es el adecuado para generar la respuesta neutralizante deseada se requiere de un vasto conocimiento en el campo y diversas pruebas y diseños experimentales muy minuciosos, para concluir de manera exitosa. Ejemplos de componentes de venenos que pueden generar anticuerpos neutralizantes de los venenos son: la anatoxina AmmVIII del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Norte de África) (Martin-Eauclaire et al., 2006), la neurotoxina Ts1 (TsVII o Tsγ) del alacrán *Tityus serrulatus* (Mendes et al., 2008), la enzima SMD-Lb1C de la araña violinista *Loxoceles boneti* (Olvera et al., 2006), la neurotoxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius* (Licea et al., 1996), entre otros.

El desarrollo de la terapia con anticuerpos ha evolucionado rápidamente en los últimos veinte años, especialmente con las inmunoglobulinas como proteínas modulares (Espino-Solis et al., 2009), lo que ha llevado a un mayor número de estudios en los que se pretende evaluar las propiedades inmunológicas de las neurotoxinas. Hasta ahora los resultados esenciales de los estudios inmunológicos para toxinas de alacranes son la identificación, purificación, caracterización estructural y farmacológica de toxinas individuales y de familias de toxinas, obtención de suero y anticuerpos neutralizantes, localización y descripción estructural de los determinantes antigénicos, epítopes relativos a sitios tóxicos, y ensayos de neutralización y capacidad de protección de los anticuerpos generados para las toxinas y para venenos totales. Actualmente la producción de anti-venenos se realiza inmunizando caballos con el veneno total de los alacranes de interés, siendo que unas pocas toxinas presentes en los venenos son las que en verdad son tóxicas para los humanos u otros mamíferos (Zamudio et al., 1992; Calderon-Aranda et al., 1993; Olvera et al., 2006; Hernández-Salgado et al., 2009). Debido a esto, una de las desventajas de los actuales anti-venenos es la gran cantidad de proteína no-específica que contienen. Estos anticuerpos no específicos pueden ser los responsables de efectos secundarios en los pacientes bajo tratamiento, especialmente en menores de edad. La producción de Faboterápicos (i.e. $F(ab')_2$, producto de la eliminación del fragmento cristalizable por digestión de la inmunoglobulina con la enzima Pepsina), representa un avance para mejorar la calidad de los anti-venenos (Ismail, 2003); sin embargo, estos aún podrían mejorarse al disminuir aquellos anticuerpos generados contra fracciones del veneno que no estén involucradas en la toxicidad al humano, de esta manera se aumentaria la especificidad del anti-veneno. Las proteínas antigénicas híbridas, en las cuales se sustituye parte de la proteína cuyo reconocimiento por anticuerpos es irrelevante para neutralizar sus efectos tóxicos, y solo permanece la parte antigénica relevante (determinantes antigénicos) para generar anticuerpos neutralizantes, también representan una ventaja en el desarrollo de anti-venenos.

Existen conocimientos para la producción de antígenos recombinantes para la producción de anti-venenos en contra de la picadura de alacrán (García-Gómez et al., 2008; Corona et al., 2008; Corzo-Burguete et al., 2011). De esta manera, un objetivo principal de esta invención es obtener mezclas definidas de neurotoxinas recombinantes que al ser usadas como inmunógenos en caballos permita la generación de anticuerpos altamente específicos contra los principales componentes tóxicos de un determinado veneno y neutralizar los efectos tóxicos producidos por la picadura de dicha especie o dichas especies de alacrán y su aplicación en una composición farmacéutica para su uso como antiveneno. En la presente se describen la selección de las clonas, la construcción de los vectores moleculares, la expresión de los genes híbridos, la composición farmacéutica usada de las proteínas híbridas y su uso en animales experimentales, quedando demostrado que son eficientes para la generación de anticuerpos neutralizantes en contra del veneno de los alacranes estudiados.

Las especies de alacrán de los generos *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus* y *Parabuthus* son de las mas peligrosas en las regiones del Norte de África, Sahel Áfricano, Este y Sur de África, Cercano y Medio Oriente. Se estima que en estas regiones el número de picaduras de alacrán es de cerca de 637,000 picaduras al año, lo cual provoca aproximadamente 2421 muertes (Chippaux and Goyffon, 2008). Algunas de las toxinas recombinantes indicadas en este desarrollo provienen precisamente de venenos de alacranes de estos géneros y además son las toxinas mas potentes de sus respectivos venenos, éstas fueron seleccionadas, una por una, en base a los reportes existentes respecto a ellas en cuanto a toxicidad y porcentaje que representan dentro de su respectivo veneno.

Datos epidemiológicos publicados por la Dirección Adjunta de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México indican que en los últimos 10 años ha ocurrido un número registrado de accidentes por picadura de alacrán que rebasa anualmente un cuarto de millón de personas. Específicamente, para 2005 se reportaron 247,976 casos y para los años subsecuentes los datos fueron (se enlistan los años y el número de personas picadas) 2006: 282,598; 2007: 271,440; 2008: 271,976; 2009: 287,666; 2012: 280,160; 2011: 296,392; 2012: 313,559. Las áreas geográficas más afectadas corresponden a los Estados de Jalisco, Guerrero, Morelos y Michoacán. Los alacranes de importancia médica más importantes, según reportan Chippaux y Goyffon (Chippaux y Goyffon, 2008) son: *C. elegans*, *C. infamatus*, *C. limpidus limpidus*, *C. noxius*, *C. suffusus suffusus*, *C. tecomanus* y *C. sculpturatus*. Como puede observarse estas especies de alacranes pertenecen todos al género *Centruroides*. Algunas de las toxinas recombinantes de este desarrollo son precisamente de venenos de alacranes de este género y ademas son las toxinas mas potentes de sus respectivos venenos. Estas toxinas fueron

seleccionadas una por una en base a los reportes existentes acerca de ellas en cuanto a toxicidad y porcentaje que representan dentro de su respectivo veneno.

En Sudamérica, y especialmente en Brasil, las picaduras de especies de alacranes del género Tityus representan un grave problema de Salud. Datos provistos por el sistema de información del Ministerio de Salud de Brasil (SINAN, Sistema Nacional de Informação de Agravos de Notificação), muestran que de enero del 2007 a diciembre del 2011, se presentaron 235, 892 casos de picaduras de alacrán tan solo en Brasil y 414 muertes debido a ésto. El género Tityus contiene el número más grande de especies peligrosas de alacrán en Sudamérica. En Brasil, tres especies de este género: *Tityus serrulatus* (alacrán amarillo), *Tityus bahiensis* (Alacrán café) y *Tityus stigmurus* son los principales responsables de escorpionismo en humanos (Bucaretchi et al., 1995; Eickstedt et al., 1996). *Tityus serrulatus* es el alacrán Brasileño que causa los accidentes mas serios con una tasa de mortalidad de aproximadamente 1% entre niños y ancianos. Esta especie está ampliamente distribuida en todo el País, abarcando los estados de Sao Paulo, Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Paraná y Rio de Janeiro (Ministério da Saúde, 2001).

El componente tóxico mayoritario del veneno de *T. serrulatus* es la neurotoxina Ts1, también conocida como Ts-□ (Martin-Eauclaire et. al., 1992.), pero también existen otros componentes tóxicos, tales como la toxina Ts2 y la toxina Ts3 (Martin-Eauclaire et al., 1994, Becerril et al., 1997.), las cuales comparten una identidad con la toxina Ts1 del 72% y 38%, respectivamente. La toxina Ts3 se une a otros sitios en el canal de sodio en comparación a la Ts1 y Ts2, así como a diferentes parátopos de anticuerpos que las reconocen. epítopes. Debido a esto, anticuerpos producidos solamente contra la toxina Ts1 no son capaces de neutralizar al veneno completo. Por otra parte, del veneno de *Tityus serrulatus*, se ha aislado un péptido no tóxico, llamado TsNTxP (Guatimosim et al., 1999), que comparte una identidad de secuencia con la toxina Ts1 del 65 %, con la toxina Ts2 del 59 % y con la toxina Ts3 del 43%. El uso del péptido TsNTxP como inmunogeno genera anticuerpos policlonales que tienen una reactividad cruzada contra varias toxinas del veneno, mostrando una capacidad neutralizante tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*. El suero generado es capaz de neutralizar 1.75 DL_{100} del veneno del alacrán *T. serrulatus* (Guerra-Duarte et al., 2010). Debido a ésto, el péptido TsNTxP es considerado como una anatoxina natural importante en la seroterapia anti-Tityus.

Debido a los fundamentos anteriores algunas de las toxinas recombinantes incluidas en la presente invención son precisamente Ts1, Ts3 y TsNTxP de *Tityus serrulatus*.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1A. Generación del gen que codifica para la toxina AaHI, del alacrán *Androctonus australis* Hector con uso preferencial de codones de *E. coli*. A) Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina AaHI. Los cuatro primeros Rev1-AaHI, Dir2-AaHI, Rev2-AaHI y Dir3-AaHI son los oligonucleótidos internos y Dir1-BEK-AaHI y Rev3-XhoI-AaHI son los dos oligonucleótidos externos. Nucleótidos subrayados corresponden a las secuencias de los sitios de restricción y del sitio de corte de la enterocinasa (itálicas).

Figura 1B. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos: Secuencia nucleotídica del gen que codifica para la toxina AaHII.

Figura 1C. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos: Secuencia nucleotídica del gen que codifica para la toxina AmmV. Los oligonucleótidos externos Amm5_Up1 y Amm5_Lw6 introducen los sitios de clonación BamHI y XhoI respectivamente.

Figura 1D. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos: Secuencia nucleotídica del gen que codifica para la toxina AmmVIII. Los oligonucleótidos externos Amm8_Up1 y Amm8_Lw6 introducen los sitios de clonación BamHI y XhoI, respectivamente.

Figura 1E. Generación del gen que codifica para la toxina BotI, del alacrán *Buthus occitanus tunetanus* con uso preferencial de codones de *E. coli*.

Figura 1F. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos: Secuencia nucleotídica del gen que codifica para la toxina LqhII y su correspondiente traducción en aminoácidos. Los oligonucleótidos externos introducen los sitios de restricción necesarios para la clonación del gen en el vector de expresión pET22B.

Figura 1G. Generación del gen que codifica para la toxina LqhIV, del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* con uso preferencial de codones de *E. coli*. Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina LqhIV.

Figura 1H. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos. Secuencia nucleotídica del gen que codifica para la toxina Pg8 y su correspondiente traducción en aminoácidos. Los oligonucleótidos utilizados para el ensamble con uso preferencial de codones de *E. coli* son aquellos reportados en el artículo: Toxicon 53 (2009) 770–778. El gen ensamblado fue utilizado como templado para clonarlo en el vector de expresión pET22b con los oligos externos señalados en la Figura 1H.

Figura 1I. Generación del gen que codifica para la toxina Acra4, del alacrán *Androctonus crassicauda* con uso preferencial de codones de *E. coli*. Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el

ensamble del gen de la toxina Acra4. Los oligonucleótidos REV1-Acra4, Dir2- Acra4, Rev2-Acra4 y Dir3- Acra4 son los oligonucleótidos internos y Dir1-BEK- Acra4 y Rev3-XhoI- Acra4 son los dos oligonucleótidos externos. Nucleótidos subrayados corresponden a las secuencias de los sitios de restricción y en cursivas los nucleótidos del sitio de corte de la enterocinasa.

Figura 1J. Generación del gen que codifica para la toxina Bu1, del alacrán *Buthacus macrocentrus* con uso preferencial de codones de *E. coli*. Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina Bu1. Los oligonucleótidos REV1-Bu1, Dir2-Bu1, Rev2-Bu1 y Dir3-Bu1 son los oligonucleótidos internos y Dir1-BEK-Bu1 y Rev3-XhoI-Bu1 son los dos oligonucleótidos externos. Nucleótidos subrayados corresponden a las secuencias de los sitios de restricción y en cursivas los nucleótidos del sitio de corte de la enterocinasa.

Figura 2. Vector de Expresión pET22b-Thio y clonación del gen ensamblado de la toxina. AaHI. Se muestra un esquema del ensamble del gen de la toxina AaHI usando seis oligonucleótidos y los sitios de restricción dentro del vector de expresión pET22b-Thio donde fue clonado el gen de la toxina AaHI (BamHI y XhoI). Puede visualizarse un esquema de la proteína de fusión que se expresa, la cual contiene en el N-terminal la proteína Tiorredoxina seguida de un sitio de corte para enterocinasa, luego la toxina AaHI y finalmente, en el C-terminal hay 6 histidinas que permiten purificar la proteína de fusión.

Figura 3. Electroforesis en gel de acrilamida de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmV-6His. SDS-PAGE. La figura muestra un gel de acrilamida al 12%, en el cual se visualiza en el carril 1: el marcador de peso molecular, en el carril 2: la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmV-6His y en el carril 3: la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmV-6His. Estas muestras son resultado de la elusión de la cromatografía de afinidad a NI-NTA agarosa. La flecha indica a la proteína de fusión.

Figura 4A: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHI-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHI-6His.

Figura 4B: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHII-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHII-6His.

Figura 4C: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmV-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmV-6His.

Figura 4D: Purificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmVIII-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmVIII-6His.

Figura 4E: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-BotI-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-BotI-6His.

Figura 4F: Purificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhII-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhII-6His.

Figura 4G: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhIV-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhIV-6His.

Figura 4H: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Pg8-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Pg8-6His.

Figura 4I. Purificación de la proteína de fusión Thio-EK-Acra4-6His mediante HPLC. Se muestra el cromatograma de la purificación de la proteína de fusión Thio-EK-Acra4-6His mediante cromatografía de líquidos de alta presión por fase reversa (RP-HPLC). Para lo cual se empleó una columna analítica C18 (Vydac, U.S.A) y un gradiente de buffer A (Agua + 0.12% de TFA) a buffer B (Acetonitrilo + 0.1% de TFA) de 20- 65 % en 45 minutos. El tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión de Acra4 es el tiempo 30.2.

Figura 4J. Purificación de la proteína de fusión Thio-EK-Bu1-6His mediante HPLC. Se muestra el cromatograma de la purificación de la proteína de fusión Thio-EK-Bu1-6His mediante cromatografía de líquidos de alta presión por fase reversa (RP-HPLC). Para lo cual se empleó una columna analítica C18 (Vydac, U.S.A) y un gradiente de buffer A (Agua + 0.12% de TFA) a buffer B (Acetonitrilo + 0.1% de TFA) de 20-65 % en 45 minutos. El tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión de Bu1 es el tiempo 29.4.

Figura 5. Título de anticuerpos de los conejos 05, 06 y 08 después de ser inmunizados por quinta vez con las toxinas recombinantes fusionadas a la Tiorredoxina.

Figura 6: Título de anticuerpos de los conejos 05, 06 y 08 contra el veneno de 5 diferentes especies del Norte de África después de la quinta inmunización.

Figura 7. Título de anticuerpos del conejo 05, contra el veneno de 4 diferentes especies de alacrán del Norte de África después de la segunda, tercera y cuarta sangría.

Figura 8: Título de anticuerpos del conejo 06, contra el veneno de 4 diferentes especies de alacrán del Norte de África después de la segunda, tercera y cuarta sangría.

Figura 9. Título de anticuerpos del conejo 08, contra el veneno de 4 diferentes especies del Norte de África después de la segunda, tercera y cuarta sangría.

Figura 10. Fracciones de la columna de afinidad a Proteína A. Las fracciones de interés corresponden al volumen de elución de 42 a 55 ml.

Figura 11. Gráfica y tabla que ilustran el título de anticuerpos obtenido con el reconomiento de las toxinas recombinantes AaHI, AaHII, AmmV, AmmVII, LqhII, LqhIV, BotI.

Figura 12. A. Gel SDS-PAGE al 12% de las proteínas de fusión recombinante. 1). Thio-EK-AaHI (20,677 Da); 2). Thio-EK-AaHII (21,117 Da); 3). Thio-EK-AmmV (21,176.9 Da); 4). Thio-EK-AmmVII (21,292 Da), 5). Thio-EK-LqhII (21,150.9 Da), 6). Thio-EK-LqhIV (21,085.9 Da), 7). Thio-EK-BotI (21,133.8 Da), 8). Marcador de proteínas (Page Plus Ruler, Thermo scientific). B. Western Blot. Se sigue el mismo orden de las muestras del gel.

Figura 13. Ensamble del gen que codifica para la toxina Cn2 del alacrán *C. noxius* con uso preferencial de codones de *E. coli*. En la parte superior se indica la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la toxina Cn2 ensamblada con el uso preferencial de codones para *E. coli*; dicha preferencia pudo ser corroborada al utilizar el programa *E. coli* Codon Usage Analysis 2.0. (http://faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm). En la parte inferior se indica cada uno de los codones que codifican para los aminoácidos de la toxina Cn2, así como también la frecuencia con la cual *E. coli* utiliza ese codón.

Figura 14A. Generación del gen que codifica para la toxina Cn2, del alacrán *C. noxius* con uso preferencial de codones de *E. coli*. a y b) Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina Cn2. Los nucleótidos en negritas corresponden a las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción y las que codifican al sitio de corte de la enzima enterocinasa. c) Secuencia nucleotídica del gen ensamblado de la toxina Cn2, con uso preferencial de codones de *E. coli* y su traducción en aminoácidos. En la hebra codificante del DNA se encuentra subrayada, en negro, la secuencia de los oligonucleótidos directos internos Cn2UpA y Cn2UpC y en la hebra complementaria de DNA se encuentran subrayados, en itálicas, los oligonucleótidos reversos internos Cn2LwB y Cn2LwD.

Figura 14B. Generación del gen que codifica para la toxina CII1, del alacrán *C. limpidus limpidus* con uso preferencial de codones de *E. coli*. a y b) Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina CII1. Los cuatro primeros CII1UpA, CII1LwB, CII1UpC, CII1LwD son los oligonucleótidos internos, B-EK-CII1corr y Rev-XhoI-CII1 son los dos oligonucleótidos externos. Los nucleótidos en negritas corresponden a las secuencias de los sitios de restricción y del sitio de corte de la enterocinasa. c) Secuencia nucleotídica del gen

ensamblado de la toxina CII1, con uso preferencial de codones de *E. coli* y su traducción en aminoácidos. En la hebra codificante del DNA se encuentra subrayada la secuencia de los oligonucleótidos directos internos CII1UpA y CII1UpC y en la hebra complementaria de DNA se encuentran subrayados los oligonucleótidos reversos internos CII1LwB y CII1LwD.

Figura 14C. Generación del gen que codifica para la toxina CII2, del alacrán *C. limpidus limpidus* con uso preferencial de codones de *E. coli*. a y b) Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina CII2. Los cuatro primeros CII2UpA, CII2LwB, CII2UpC, CII2LwD son los oligonucleótidos internos y B-EK-CII2 y Rev-XhoI-CII2 son los dos oligonucleótidos externos. Nucleótidos en negritas corresponden a las secuencias de los sitios de restricción y del sitio de corte de la enterocinasa. c) Secuencia nucleotídica del gen ensamblado de la toxina CII2, con uso preferencial de codones de *E. coli* y su traducción en aminoácidos. En la hebra codificante del DNA se encuentra subrayada la secuencia de los oligonucleótidos directos internos CII2UpA y CII2UpC y en la hebra complementaria de DNA se encuentran subrayados los oligonucleótidos reversos internos CII2LwB y CII2LwD.

Figura 14D. Generación del gen que codifica para la toxina CssII, del alacrán *C. suffusus suffusus* con uso preferencial de codones de *E. coli*. a) Secuencia nucleotídica de los cuatro oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina CssII. b) Secuencia nucleotídica del gen ensamblado de la toxina CssII, con uso preferencial de codones de *E. coli* y su traducción en aminoácidos. Se utilizo como DNA templado de la secuencia nucleotídica de la toxina CssII, la reportada en el artículo: Estrada, et. al., 2007. Oligo Directo: introduce el sitio de BamHI (negritas) y sitio de corte de enterocinasa en el amino-terminal de la secuencia. Oligo Reverso: introduce el sitio de XhoI (negritas), en el carboxilo terminal de la secuencia.

Figura 15. Expresión y detección de la proteína de fusión de la toxina Cn2 recombinante A) Electroforésis en gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, al 12%, en el cual se visualiza la proteína de fusión presente en extractos periplásmicos de diferentes cepas de bacteria, despues de la inducción I: *E.coli* cepa OrigamiDE3 II: *E.coli* cepa BI21DE3 y III: proteína de fusión de la toxina Cn2 purificada por columna de afinidad a Níquel. La flecha indica la proteína de fusión expresada o purificada . B) Inmunodetección de la proteína de fusión de la toxina Cn2 recombinante, mediante un ensayo de ELISA, en el cual se incluyo un control negativo (BSA) y un control positivo (toxina Cn2 nativa), para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo recombinante Fab6009F especifico contra la toxina Cn2 (además solo reconoce a la Cn2 correctamente estructurada). C) Aminoácidos detectados mediante la metodología de

degradación de Edman, se detectaron los 10 primeros aminoacidos correspondientes al N-terminal de la proteína de fusión).

Figura 16. Vector de Expresión pET22b-Thio y clonación del gen ensamblado de la toxina Cn2. Se muestra un esquema del ensamble del gen de la toxina Cn2 mediante seis oligonucleótidos y los sitios de restricción dentro del vector de expresión pET22b-Thio, donde fue clonado el gen de la toxina Cn2 (BamHI y XhoI). Puede visualizarse un esquema de la proteína de fusión que se expresa, la cual contiene en el N-terminal la proteína Tiorredoxina seguida de un sitio de corte para enterocinasa (EK), luego la toxina Cn2 y finalmente, en el C-terminal hay 6 histidinas que permiten purificar a la proteína de fusión.

Figura 17A: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Cn2-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Cn2-6His.

Figura 17B: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-CII1-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-CII1-6His.

Figura 17C: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-CII2-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-CII2-6His.

Figura 17D: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-CssII-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-CssII-6His.

Figura 18. Ensayo de reconocimiento de las toxinas nativas por los anticuerpos policlonales obtenidos después del esquema de inmunización. Las toxinas nativas Cn2 y CII1 fueron inmunoabsorbidas en placas de ELISA y posteriormente fueron reconocidas por anticuerpos policlonales obtenidos de la inmunización de ratones con las respectivas toxinas recombinantes. Se indica la dilución que se uso del suero y las determinaciones se hicieron por duplicado.

Figura 19. Títulos de sueros obtenidos de ratones inmunizados con la proteína de fusión Cn2 recombinante. La titulación del suero de los ratones inmunizados se llevó a cabo utilizando como antígenos el veneno total de *C. noxius* y a la proteína recombinante Cn2. Se indica las curvas de absorbancia con respecto a la dilución del suero y los títulos obtenidos en cada caso.

Figura 20. Títulos de sueros obtenidos de ratones inmunizados con la proteína de fusión CssII recombinante. La titulación del suero de los ratones inmunizados se llevó a cabo utilizando como antígenos el veneno total de *Centruroides suffusus suffusus* y a la proteína

recombinante CssII. Se indica las curvas de absorbancia con respecto a la dilución del suero y los títulos obtenidos en cada caso.

Figura 21. Análisis de la secuencia del gen que codifica para la toxina Ts1, del alacrán *Tityus serrulatus* con el uso preferencial de codones de *E. coli*. La entrada de la secuencia de DNA del gen al programa *E. coli* Codon Usage Analysis 2.1 genera un diagrama conformado por una barra horizontal para cada codón. El largo de la barra es proporcional a la frecuencia en la que se expresa cada codón. En la parte inferior de cada codón se indica el aminoácido codificante.

Figura 22. Análisis de la secuencia del gen que codifica para la toxina TsNTxP, del alacrán *Tityus serrulatus* con el uso preferencial de codones de *E. coli*. La entrada de la secuencia de DNA del gen al programa *E. coli* Codon Usage Analysis 2.1 genera un diagrama conformado por una barra horizontal para cada codón. El largo de la barra es proporcional a la frecuencia en la que se expresa cada codón. En la parte inferior de cada codón se indica el aminoácido codificante.

Figura 23A. Generación del gen que codifica para la toxina Ts1, del alacrán *Tityus serrulatus* con uso preferencial de codones de *E. coli*. A) Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina Ts1. Los cuatro primeros GamTserUp1, GamTserLw2, GamTserUp3 y GamTserLw4, son los oligonucleótidos internos y Ts1_4TRXUp y Ts1_4TRXLw, son los dos oligonucleótidos externos. Los nucleótidos en negritas corresponden a las secuencias de los sitios de restricción y en itálicas el sitio de corte de la enterocinasa. B) Secuencia nucleotídica del gen ensamblado de la toxina Ts1, con uso preferencial de codones de *E. coli* . En la hebra codificante del DNA se encuentra resaltada en itálicas la secuencia de los oligonucleótidos directos GamTserUp1 y GamTserUp3 y en la hebra complementaria de DNA se encuentran subrayados los oligonucleótidos reversos GamTserLw2 y GamTserLw4.

Figura 23B. Generación del gen que codifica para la toxina TsNTxP, del alacrán *Tityus serrulatus* con uso preferencial de codones de *E. coli*. A) Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina TsNTxP. Los cuatro primeros son los oligonucleótidos internos y los dos últimos son oligonucleótidos externos. Nucleótidos en negritas corresponden a las secuencias de los sitios de restricción y del sitio de corte de la enterocinasa (itálicas). B) Secuencia nucleotídica del gen ensamblado de la toxina TsNTxP, con uso preferencial de codones de *E. coli*.

Figura 23C. Generación del gen que codifica para la toxina Ts3, del alacrán *Tityus serrulatus* con uso preferencial de codones de *E. coli*. A) Secuencia nucleotídica de los seis oligonucleótidos diseñados con uso preferencial de codones de *E. coli* y sintetizados para el ensamble del gen de la toxina Ts3. Los cuatro primeros son los oligonucleótidos internos y los dos últimos son oligonucleótidos externos. Nucleótidos en negritas corresponden a las secuencias de los sitios de restricción y del sitio de corte de la enterocinasa (itálicas). B) Secuencia nucleotídica del gen ensamblado de la toxina Ts3, con uso preferencial de codones de *E. coli*.

Figura 24. Vector de expresión pET22b-Thio y clonación del gen ensamblado de la toxina Ts1. Se muestra un esquema del ensamble de la toxina Ts1 mediante seis oligonucleótidos y los sitios de restricción dentro del vector de expresión pET22b-Thio donde fue clonado el gen de la toxina Ts1 (BamHI y XhoI). Puede visualizarse un esquema de la proteína de fusión que se expresa, la cual contiene en el N-terminal la proteína Tiorredoxina seguida de un sitio de corte para enterocinasa, luego la toxina Ts1 y finalmente, en el C-terminal hay 6 histidinas que permiten purificar la proteína de fusión.

Figura 25. Expresión y purificación de la proteína de fusión Thio-EK-TsNTxP. A. Gel SDS-PAGE al 12%. 1). Extracto de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) antes de la inducción, 2). Extracto de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) después de las 6 horas de inducción con IPTG, 3). Extracto periplásmico con PPB, 4). Fracción de agua, 5). Elución de la proteína de fusión de la columna de afinidad a Ni+2; 6). Proteína de fusión purificada por HPLC en una columna analítica C18 (Tiempo de retención de 34.9 min), 7). Marcador de peso molecular, B. Western Blot. 1). Marcador de peso molecular, 2). Extracto de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) antes de la inducción, 3). Extracto de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) después de las 6 horas de inducción, 4). Fracción de PPB, 5). Fracción de agua, 6). Elución de la proteína de fusión por la columna de afinidad. 7). Proteína de fusión purificada por HPLC (Tiempo de retención de 34.9 min). La flecha indica el lugar de migración de la proteína de fusión alrededor de los 20 kDa, tanto en el gel como en el Western blot. Se emplearon anticuerpos anti-histidinas en el revelado del western blot.

Figura 26A: Purificación y repurificación de la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Ts1-6His por HPLC. Cromatograma de HPLC, en el cual la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Ts1-6His.

Figura 26B. Purificación por HPLC de la proteína de fusión Thio-EK-TsNTxP-6His. A la fracción correspondiente al tiempo de retención de 34 minutos, se le determinó la masa molecular a través de un espectrómetro de masas, obteniendo la serie iónica esperada, la

cual indica que la masa experimental es la misma que la teórica, la cual corresponde a 20,630 Da.

Figura 26C. Purificación por HPLC de la proteína de fusión Thio-EK-Ts3-6His. A la fracción correspondiente al tiempo de retención 34 minutos se le determinó la masa molecular a través de un espectrómetro de masas y resultó ser similar a la masa teórica, la cual corresponde a 21,323 Da.

Figura 27. Ensayo de reconocimiento de las toxinas recombinantes (Mezcla de los híbridos de Ts1, TsNTxP y Ts3) por los anticuerpos policlonales obtenidos después del esquema de inmunización aplicado al conejo 34. Las toxinas recombinantes fueron inmunoabsorbidas en placas de ELISA y posteriormente fueron reconocidas por anticuerpos policlonales obtenidos de la 2a, 4a y 5a inmunización del conejo 34 con la mezcla de los híbridos de Ts1, TsNTxP y Ts3. Se indica la dilución que se uso del suero (3,000, 9,000, 27000 y 81000 corresponden a las diluciones 1:3000, 1:9000, 1:27000 y 1:81000) y las determinaciones se hicieron por duplicado.

Figura 28. Vector de expresión pQE-30 y clonación del gen ensamblado de la toxina Ts1. Representación del ensamble de los 6 oligonucleótidos para construir el gen del péptido Ts1, el cual esta flanqueado por los sitios de restricción BamHI y PstI para ser clonado en el vector de expresión pQE-30. De tal manera, que la construcción quedará conformada por la cuatro aminoácidos del vector (MRGS), seis residuos de histidina, seguidos por un sitio de corte para la proteasa FXa (IEGR) y finalmente la secuencia de la toxina Ts1.

Figura 29. Expresión y purificación por afinidad de la proteína de fusión M-6His-FXa-Ts1. Gel SDS-PAGE al 15%. 1). Marcador de Peso Molecular, 2). Extracto de la cepa Origami de *E. coli* en el tiempo 0, 3). Extracto de la cepa Origami de *E. coli* antes de inducir, 4). Extracto de la cepa Origami de *E. coli* después de inducir, 5). Fracción soluble, 6). Fracción insoluble, 7 y 8). Elución de la proteína M-6His-FXa-Ts1 de la columna de afinidad. 9). Proteína de fusión purificada por HPLC (16 min, ver figura 2). La flecha indica el lugar de migración de la proteína de fusión alrededor de los 8.7 kDa.

Figura 30. Purificación y repurificación por HPLC de la proteína de fusión M-6His-FXa-Ts1. En el cromatograma la flecha indica la fracción y el tiempo de retención correspondiente a la proteína de fusión.

Figura 31. Espectro de masas. Representa la abundancia relativa de los iones producidos con respecto a su relación masa/carga. La masa teórica para la proteína fusión M-6His-FXa-Ts1 es de 8,742.98 Da.

Figura 32. Expresión y purificación por afinidad de la proteína de fusión M-6His-EK-Ts3. Gel SDS-PAGE al 15%. 1). Marcador de Peso Molecular, 2). Extracto de la cepa Origami de *E.*

coli antes de inducir, 3). Extracto de la cepa Origami de *E. coli* después de inducir, 4). Fracción soluble, 5). Fracción insoluble, 6). Elución de la proteína M-6His-FXa-Ts1 de la columna de afinidad a níquel. 7). Proteína de fusión purificada por HPLC (15.8 min, ver figura 33). La flecha indica el lugar de migración de la proteína de fusión alrededor de los 9.4 kDa.

Figura 33. Purificación por HPLC de la proteína de fusión M-6His-EK-Ts3. En el cromatograma se muestra que la proteína es eluída a los 15.8 min.

Figura 34. Espectro de masas. Representa la abundancia relativa de los iones producidos con respecto a su relación masa/carga. La masa determinada experimentalmente es de 9,493.8 Da.

Figura 35. Expresión y purificación por afinidad de la proteína de fusión M-6His-EK-TsNTxP. Gel SDS-PAGE al 15%. 1). Extracto de la cepa Origami de *E. coli* antes de inducir, 2). Extracto de la cepa Origami de *E. coli* después de inducir, 3). Fracción soluble, 4). Fracción insoluble, 5). Elución de la proteína M-6His-FXa-Ts1 de la columna de afinidad. 6). Proteína de fusión purificada por HPLC (15 min, ver figura 36), 7). Marcador de Peso Molecular. La flecha indica el lugar de migración de la proteína de fusión alrededor de los 8.7 kDa.

Figura 36. Purificación por HPLC de la proteína de fusión M-6His-EK-TsNTxP. En el cromatograma se muestra que la proteína es eluída a los 15 min.

Figura 37. Espectro de masas. Representa la abundancia relativa de los iones producidos con respecto a su relación masa/carga. La serie iónica observada indica que la masa teórica es de 8,742.23 Da.

Figura 38: Títulos de anticuerpos de los sueros de los conejos inmunizados con la mezcla de las proteínas M-6His-Fxa-His, M-6His-EK-Ts3, M-6His-EK-TsNTxP. El suero preinmune de los conejos 71, 72y 73, así como el suero de la primera sangría se evaluaron contra el veneno de Tityus serrulatus.

Figura 39: Títulos de anticuerpos de los sueros obtenidos de la inmunización de conejos con la mezcla de las proteínas M-6His-Fxa-His, M-6His-EK-Ts3, M-6His-EK-TsNTxP. En la gráfica se muestra la titulación de anticuerpos de los sueros obtenidos en la 2da y 7a sangría contra el veneno de *Tityus serrulatus.*

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se puede constatar existe un problema de Salud Pública generalizado en varios países, causado por la picadura de alacranes que contienen toxinas que causan síntomas de intoxicación graves, que si no son tratados en tiempo adecuado pueden ocasionar la muerte de las personas picadas. El tratamiento de elección indicado en la práctica clínica es la utilización de fragmentos de anticuerpos de caballos híper-inmunizados con los venenos correspondientes, los cuales son fragmentos funcionales en su capacidad de neutralizar los

síntomas de intoxicación de los pacientes. Estos fragmentos se denominan "faboterápicos", cuyo significado viene de la abreviación "Fab" de la literatura inglesa "fragment of antigen binding", que en Español se traduce por "fragmento de pegado a antígeno". Esto es, son los segmentos de las inmunoglobulinas, sinónimo de anticuerpos, que se pegan a los antígenos, que son los componentes extraños a los organismos. Los antígenos son todas las substancias extrañas a un organismo que no son aceptados por el sistema inmunológico, el cual es capaz de sintetizar un anticuerpo que reconoce y se pega al antígeno, impidiendo que este cause daño al organismo en contacto con el antígeno no deseado. La práctica médica consiste en utilizar los "fragmentos de pegado a antígeno" de anticuerpos generados por caballos, los cuales se purifican de la sangre de los animales y se preparan para su uso terapéutico, quedando como el principio activo de los antivenenos, de donde surge el término "faboterápico" utilizado ya de manera genérica en alguna de la literatura científica del campo. Entonces los faboterápicos, para el caso del piquete de alacranes, son fragmentos neutralizantes de la acción de las toxinas del veneno de alacrán. Así mismo, existen distintos tipos de faboterápicos dependiendo del tipo de antígeno, en contra del cual queremos tener una inmunoglobulina (anticuerpo) que lo reconozca y neutralice su posible acción dañina al individuo en cuestión.

Para el caso específico de los faboterápicos anti-alacrán estos se producen por medio de la inyección de mezclas de varios venenos, o de homogeneizados de las glándulas venenosas de alacranes de diferentes especies peligrosas a los humanos, a caballos que se tornan inmunes al veneno. En México se usa una mezcla de los venenos de las especies de alacrán *Centruroides noxius, Centruroides limpidus limpidus, Centruroides suffusus suffusus y Centruroides limpidus tecomanus* (Alacramyn™ faboterápico del Instituto Biocón, México). Una vez inmunizado el caballo, su sangre es obtenida y sus inmunoglobulinas son tratadas para producir solamente los fragmentos "$F(ab')_2$", entre los cuales hay algunas moléculas que son capaces de neutralizar las toxinas del veneno.

Parte de la invención describe la selección de una mezcla específica de proteínas (toxinas de alacrán fusionadas a la proteína tiorredoxina) que son capaces de generar anticuerpos en caballos y en otros animales como ratón y conejo, sin requerir el uso de los venenos totales o del homogeneizado de glándulas venenosas para producir fragmentos de anticuerpos protectores en contra de las toxinas de varias especies de alacranes, y a continuación se describe la estrategia y los productos (inmunógenos) utilizados.

De forma específica, seleccionamos las siguientes secuencias de aminoácidos de toxinas del veneno de los siguientes alacranes:

Para Norte de África, Marruecos, Este de la cuenca Mediterránea, Sahel Africano, Turquía, Cercano y Medio Oriente:

1. AaHI del alacrán *Androctonus australis* (Norte de África, de Argelia a Egipto), SEQ ID No:1
2. AaHII del alacrán *Androctonus australis* (Norte de África, de Argelia a Egipto), SEQ ID No:2
3. AmmV del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Norte de África, Marruecos), SEQ ID No:3
4. AmmVIII del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Norte de África, Marruecos), SEQ ID No:4
5. BotI del alacrán *Buthus occitanus tunetanus* (Norte de África, Este de la cuenca mediterránea y el Sahel Africano), SEQ ID No:5
6. LqhII del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (África y Medio Oriente), SEQ ID No:6
7. LqhIV del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (África y Medio Oriente), SEQ ID No:7
8. Pg8 del alacrán *Parabuthus granulatus* (Sur de África), SEQ ID No:8
9. Acra4 del alacrán *Androctonus crassicauda* (Norte de África a Arabia Saudita y Turquía), SEQ ID No:9
10. Bu1 del alacrán *Buthacus macrocentrus* (Norte de África a Arabia Saudita y Turquía), SEQ ID No:10

De forma específica, seleccionamos las siguientes secuencias de aminoácidos de toxinas del género Centruroides para México:

11. Cn2 del alacrán *Centruroides noxius* (México), SEQ ID No:21
12. CII1del alacrán *Centruroides limpidus* (México), SEQ ID No:22
13. CII2 del alacrán *Centruroides limpidus* (México), SEQ ID No:23
14. CssII del alacrán *Centruroides suffusus* (México), SEQ ID No:24

De forma específica, seleccionamos las siguientes secuencias de aminoácidos de toxinas de *Tityus serrulatus* para Sudamérica:

15. Ts1 del alacrán *Tityus serrulatus* (Brasil), SEQ ID No:13
16. Ts3 del alacrán *Tityus serrulatus* (Brasil), SEQ ID No:14
17. TsNTXP del alacrán *Tityus serrulatus* (Brasil), SEQ ID No:15

Al final de la presente, se proporcionan listados de 38 secuencias de las toxinas recombinantes ya sea maduras o bien híbridas (fusiones) obtenidas y probadas, agrupadas por región geográfica. Las híbridas pueden ser con tiorredoxina o con colas de histidinas y

contienen las secuencias de reconocimiento de las endopeptidasas EK y de FXa como se explica más adelante para cada caso.

Una vez conocidas las secuencias de aminoácidos de las toxinas seleccionadas, se procede al diseño de la estrategia para obtener una secuencia nucleotídica capaz de expresar en un sistema heterólogo dichas toxinas. La selección de dichas toxinas hace parte de la presente invención, pues no obstante que las secuencias fueron determinadas previamente y constan en publicaciones científicas y banco de datos (Rochat et al., 1970; Rochat et al., 1972; Rosso y Rochat, 1985; Alami et al., 2003; Gregoire y Rochat, 1983; Borneman y Hahin, 1993; Corzo et al., 2001; García-Gómez et al., 2009; Caliskan, et al., 2013; Caliskan et al., 2012, Vazquez et. al., 1995; Ramirez et. al., 1994; Dehesa-Davila et. al., 1996; Martin et, al., 1987, Martin-Eauclaire et. al., 1992; Martin-Eauclaire et. al., 1994; Guatimosim et al., 1999) no es obvio ni está al alcance de cualquier experto en el campo del arte, poder establecer que dichas secuencias funcionarán como inmunógenos, o sea como antígenos, capaces de generar anticuerpos protectores. La presente invención es una innovación tanto en la selección de las toxinas que generan los anticuerpos neutralizantes, así como en la prueba y selección de las mezclas que aportan ventajas al campo técnico, con respecto a lo que implica el uso de los venenos nativos.

Las toxinas seleccionadas se encuentran en cantidades limitadas en sus respectivos venenos, por lo cual fue necesario generar un sistema de expresión capaz de producir en cantidad suficiente a las toxinas recombinantes y principalmente en forma estructuralmente plegada, ya que este tipo de toxinas poseen 8 cisteínas que forman 4 puentes disulfuro, por lo cual aquella toxina recombinante que no esté plegada como la nativa tiene muy baja probabilidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes.(Pedroso De Lima & Düzgünes N. Eds. 1995). Existen ejemplos en la literatura de toxinas de alacrán expresadas en citoplasma de bacterias, pero éstas son producidas sin plegamiento, es decir, carecen de los puentes de disulfuro que mantienen la estructura tridimensional requerida para su función, por lo cual se requiere de un paso extra posterior a su purificación que permite que se formen los puentes disulfuro correctamente. Esto resulta bastante costoso para la producción del antígeno. Además el rendimiento de la proteína plegada final es bajo. En nuestro sistema de expresión bacterial, fusionamos el gen de la proteína tiorredoxina con la toxina deseada y con el plegamiento adecuado.

La tiorredoxina incluída como parte de la fusión protéica en los casos probados, funciona como una proteína que brinda, por una parte, estabilidad a la toxina a la cual esta fusionada y por otra parte, tiene actividad de chaperona de plegamiento intramolecular por lo cual favorece el plegamiento de la toxina a la que esta unida. Además de todos estos beneficios,

el hecho de que la toxina recombinante este fusionada a la tiorredoxina y este híbrido se utilice para inmunizar, hace posible que se pueda aplicar una mayor cantidad de toxina porque en su forma de híbrido no es tóxica, de esta manera representa a un inmunógeno ideal, estructuralmente plegado, estable y no tóxico para inmunizar a los animales experimentales.

Inmunógenos recombinantes de alacranes del Norte de África, Marruecos, Este de la cuenca Mediterránea, Sahel Africano, Turquía, Cercano y Medio Oriente

Se diseñaron oligonucleótidos externos e internos para ensamblar a cada una de las toxinas, AaH Iy AaH II del alacrán *Androctonus australis* Hector, AmmV y AmmVIII del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, Bot I del alacrán *Buthus occitanus tunetanus*, LqhII y LqhIV del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, Pg8 del alacrán *Parabuthus granulatus*, Acra4 del alacrán *Androctonus crassicauda* y Bu1 del alacrán *Buthacus macrocentrus*, con uso preferencial de codones de *E. coli*. Estos oligonucleótidos se sintetizaron mediante síntesis química, en la unidad de síntesis y secuenciación del ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Véanse Figuras 1A-1J

Se realizó el ensamble de la secuencia nucleotídica de los genes mediante PCR recursivo y clonación posterior en el vector pBluescriptKS(-). El PCR de ensamble de cada toxina fue realizado utilizando Vent DNA polimerasa (New England Biolabs, USA), siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Los dos oligonucleótidos externos se usaron a una concentración final de 0.2 pmol/µl y los oligonucleótidos internos a una concentración de 0.02 pmol/µl. Las condiciones de PCR fueron: 5 minutos a 94°C, seguido por 8 ciclos con una temperatura baja de alineamiento (94°C 30 seg, 50°C 1 min, 72°C 1 min), y luego 25 ciclos cortos con una temperatura alta de alineamiento (94°C 30 seg, 60°C 30 seg, 72°C 30 seg), finalizando con 5 min de incubación a 72°C.

Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa y purificados con el kit QIAQuick gel extraction (QIAGEN, USA). Los productos de PCR fueron clonados con extremos romos dentro del vector pBluescriptKS(-) (Stratagene, USA), digerido previamente con la enzima *EcoR*V, usando T4 DNA ligasa (Fermentas, Canada), de acuerdo al protocolo suministrado por el proveedor. El producto de ligación fue electrotransformado dentro de células electrocompetentes DH5 alpha las cuales fueron subsecuentemente plateadas en cajas Petri con medio 2XYT conteniendo además IPTG/X-Gal/Ampicilina para selección de clonas blancas o azules y las clonas positivas (blancas) fueron verificadas por PCR de colonia con los oligonucleótidos T7-like (5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TA-3') y T3-like (5'-CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC-3'). Las clonas que dieron el PCR con el tamaño esperado fueron amplificadas y se obtuvo DNA plasmídico de ellas por medio del método de lisis alcalina. Las

construcciones fueron secuenciadas para verificar que el ensamble y secuencia clonada de cada gen de cada toxina fuera correcta.

Se continuó con la preparación del vector de expresión pET22b-Tiorredoxina-sitio de corte para Enterocinasa. Para construir el vector de expresión, se ocupó el vector pThioHis C (invitrogen) para obtener el gen que codifica para la tiorredoxina y el sitio de corte para enterocinasa (EK), para lo cual se realizó un PCR utilizando oligonucleótidos que incluían el sitio de restricción *Nco*I en el amino-terminal de la tiorredoxina y el sitio *Xho*I en el carboxilo terminal del sitio EK. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *Nco*I y *Xho*I y se clonó en el vector de expresión pET22b (Novagen). Este vector de expresión fue llamado pET22b-Thio. Véase la Figura 2.

Una vez preparado el vector de expresión pET22b-Thio, procedimos a la Inserción de los genes ensamblados dentro del mismo. Las secuencias que codifican para cada toxina clonada en el vector pBluescriptKS (-), descritas anteriormente, fueron usadas como templados para reaamplificar por PCR los genes de las toxinas y proseguir con su subclonación en el vector de expresión pET22b-Thio. Los oligonucleótidos externos que codifican para el N-terminal de cada toxina contienen un sitio de clonación *BamH*I el cual permite clonar al gen de la toxina en el mismo marco de lectura que el gen de la tiorredoxina del vector de expresión, seguido por una secuencia que codifica para el sitio de corte de la enterocinasa bovina (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) para poder separarla del último gen que codifica para la toxina. Esta construcción se hizo para cada una de las toxinas recombinantes utilizadas en el proyecto. El oligonucleótido reverso introduce un sitio de restricción *Xho*I diseñado para mantener la construcción en el marco de lectura de la secuencia que codifica para las 6 histidinas del vector de expresión.

Por lo tanto, los plásmidos conteniendo a los genes de las toxinas fueron digeridos con las enzimas *BamH*I y *Xho*I (New England Biolabs, USA) y los insertos liberados fueron purificados por electroforesis de gel de agarosa utilizando el kit "QIAQuick gel extraction" (QIAGEN). Los fragmentos de restricción purificados fueron ligados al vector de expresión pET22b-Thio previamente digerido con *BamH*I y *Xho*I. Véase la Figura 2.

Cada uno de los vectores de expresión conteniendo el gen codificante para la toxina fue electrotransformado dentro de células bacterianas. La bacteria que se utiliza es *E. coli* cepa BL21 (DE3) (Stratagene, Agilent Technologies Co.), esta cepa no es patógena, está modificada genéticamente en funciones relacionadas con recombinación de su material genético, síntesis de aminoácidos, producción de proteasas, entre otras funciones, con el fin de hacerla más eficiente para la expresión de proteínas recombinantes. La principal característica de BL21 (DE3) es que incluye DE3, un profago □, que contiene el gen de la T7

RNA polimerasa bajo el control del promotor lacUV5, por lo cual es posible utilizarla para producir proteínas a partir de un gen clonado en un vector de expresión bajo el control del promotor T7.

La *E. coli* cepa BL21 (DE3) es descendiente de la cepa *E. coli* B utilizada por el Instituto Pasteur en París, en los primeros estudios con bacteriófagos. *E. coli* B es el hospedero más común de los fagos T1-T7, por lo cual las cepas derivadas de *E. coli* B son ampliamente usadas junto con los derivados de *E. coli* K-12. Ambas consideradas como organismos de bajo riesgo (Nivel 1) (NIH Guidelines, U.S. Departament of Health and Human Services, 1986). *E. coli* BL21 (DE3) codifica para proteínas que le otorgan resistencia al antibiótico ampicilina. El gen que codifica para la proteína que confiere la resistencia al antibiótico, es obtenido de la naturaleza y es utilizado en ingeniería genética para seleccionar e identificar al organismo ya modificado. Los métodos utilizados para la introducción de material genético en la cepa modificada son transformación, conjugación o transfección. En nuestro proyecto de investigación solo utilizamos el método de electrotransformación para introducir en *E. coli* BL21 (DE3), el plásmido portador del gen que codifica para la toxina de interés.

Para la expresión de las proteínas de fusión Tiorredoxina-Toxina, se procedió de la siguiente manera: Se creció pre-inóculo en medio LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. El cultivo se obtiene de cepas recién transformadas con el vector correspondiente o directamente de un vial de glicerol de la cepa de interés. Se crecieron cultivos de 750 ml de LB a 37°C y 200 rpm de la cepa BL21 transformada con el plásmido de expresión. Previamente, se adicionó ampicilina al medio de cultivo, a una concentración final de 200 µg/ml. Después de crecer hasta una DO entre 0.7-1, medida a 600 nm, se indujo la expresión con IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) a concentración final de 1 mM por un periodo de 6 a 12 h manteniendo los cultivos a 30 °C. Después se centrifugó a 5,000 x g durante 10 min a 4°C en tubos para centrífuga de 250 ml, con el fin de obtener todo el precipitado celular. Se congelaron las células -20°C, hasta su uso.

Para la obtención del extracto periplásmico bacteriano conteniendo a la proteína de fusión expresada, se resuspendieron completamente las células precipitadas en 20 ml de buffer PPB (200 mg/ml de sacarosa, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl pH8) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó 20 minutos a 5,000 x g y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió el precipitado celular en 20 ml de H_20, se incubó por una hora en hielo y se centrifugó nuevamente a 5,000 x g por 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 ml de Tris 50 mM, pH 8. Las células se rompieron utilizando sonicador, dando pulsos de 30 segundos de encendido y 10 segundos de descanso. Esto se realizó siempre en hielo, para evitar que se calentase la

muestra. Luego se centrifugó a 5,000 x g a 4°C durante 20 min y se recuperó el sobrenadante. Se adicionó DNAsa a los sobrenadantes recuperados (5µg de DNAsa por cada 1 ml de células lisadas), se incubó 15 minutos en hielo y se centrifugó 5,000 x g a 4°C durante 20 min o hasta eliminar completamente los restos celulares de la muestra. Se recuperó el sobrenadante y se filtraba la muestra, en caso de ser necesario. Se adicionó azida de sodio (concentración final 0,02%) para evitar contaminación. Este extracto se utilizó para la purificación de la proteína utilizando columnas de afinidad. Véase la Figura 3 (carriles 2 y 3).

Las proteínas de fusión expresadas se purificaron mediante cromatografía de afinidad y HPLC. Utilizamos columnas de afinidad que contenían resina Ni-NTA agarose (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Una vez obtenido el extracto, se empacó la resina en una columna adecuada al volumen usado (10 ml), se equilibró con tampón fosfato salino, comúnmente conocido como buffer PBS (por sus siglas en inglés, PBS, de *phosphate buffered saline*) concentración 1X y pH=8, adicionando 20 mM de imidazol. Previo a la elución de las proteínas, se realizó un lavado con PBS + 30 mM de imidazol. Las proteínas se eluyeron con 400 mM de imidazol en PBS 1X (véase ejemplo en la Figura 3). Se colectaron de 3-5 fracciones de 1 ml cada una. Posteriormente se realizó la repurificación por RP HPLC, usando como solvente A 0.1% TFA en H_20 y solvente B 0.1% TFA en acetonitrilo. Los péptidos obtenidos fueron separados en una columna C18 (25mm x 4.1mm) con un gradiente de 20 a 80% de solvente B en un lapso de 40 min y se colectaron manualmente por monitoreo de absorbancia a 230 nm. Véanse Figuras 4A – 4J.

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel discontinuo de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizó una cámara Mighty small II (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA), con geles de 0.75 mm de espesor. Un gel concentrador al 5 % precede al gel de separación al 12%. Cada una de las muestras se diluyó en una solución de desnaturalización que contiene 125 mM Tris pH 6.8, 4% dodecil sulfato de sodio (SDS), 20% de glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 0.05% (v/v) de azul de bromofenol y se incubaron durante 5 min a 95 °C. La separación se efectuó a corriente constante de 30 mA. Después de la migración el gel se incubó en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) y azul de Coomassie (0.2% v/v). Posteriormente se realizaron lavados del gel en una solución de agua: metanol: ácido acético en una relación 6:3:1 respectivamente, para quitar el exceso de colorante. Véase ejemplo en la Figura 3 (carriles 2 y 3).

Las digestiones de las proteínas de fusión se realizaron con la proteasa enterocinasa (EK) (Roche Applied Science, Alemania), siguiendo las especificaciones del proveedor. La

reacción de proteólisis se llevó a cabo después de purificar la proteína con aprox. 98 % de pureza. La concentración final de proteína de fusión para la proteólisis fue de 1 mg/ml en una solución de Tris 10 mM, pH 8. La reacción se realizó a 16 °C durante 14 h.

Las masas moleculares de los péptidos recombinantes obtenidos fueron determinadas mediante MALDI-TOF o ESI-ION-TRAP (Romeo et al., 2008), en el laboratorio de proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Los inmunoensayos ligados a enzima (ELISA) se realizaron en placas de polivinilo de 96 pozos (Costar, Cambridge MA. U.S.A.) acoplando 3 µg por pozo de la toxina nativa disuelta en una solución de $NaHCO_3$ 0.05 M pH 9.4 incubado a 37 °C por 1 h. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X adicionado con 0.1% de tween 20 (a esta solución de PBS 1X + Tween lo abreviamos como PBST). Los sitios de unión no específica fueron bloqueados con una solución saturante de BSA (albumina sérica bovina) al 0.5% en PBST colocando 200 µl por pozo e incubando a 37 °C durante 2 h ó a 4°C durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados con PBST. Se prepararon diluciones seriales del suero con PBS colocando 100 µl de cada dilución por triplicado e incubando a 37°C durante 1 h. Después de los correspondientes 3 lavados con PBST se adicionaron 100 µl de una dilución 1:2,000 (v/v) del anticuerpo cabra-antiratón acoplado a peroxidasa en PBST incubando a 37°C durante 1 h. Para la reacción enzimática se preparó una solución de fosfatos 0.1 M a pH 5 adicionado con 0.4 µg de orto-fenildiamina, y 0.4 µl de peróxido de hidrógeno al 30% por mililitro. Se colocaron 100 µl por pozo. Se incubó protegiendo de la luz por 10 min a 37°C y se detuvo la reacción adicionando 100 µl de HCl 6 N en cada pozo. Se midió la absorbancia a 492 nm inmediatamente, ya que la reacción de oxidación continúa.

La actividad tóxica de cada antígeno recombinante fue evaluada en ratones cepa murina CD1, a los cuales se les inyectó vía intraperitoneal diez veces la dosis letal media (DL_{50}) reportada para cada toxina.

El resultado obtenido fue que a esa concentración la proteína no ejerce ningún efecto tóxico sobre el ratón, debido a que la toxina al tener fusionada a la tiorredoxina en su extremo N-terminal, afecta su actividad probablemente por impedimento estérico. Sin embargo, el hecho de que como proteína de fusión la toxina no sea tóxica es una de las principales ventajas al utilizarla como antígeno, ya que al inmunizar animales no hay peligro de que el animal sujeto al proceso de inmunización sufra el efecto tóxico de la recombinante, permitiendo de esta forma inmunizarlos con altas dosis del antígeno.

Además en varios experimentos (se describe con detenimiento más adelante) se inmunizaron ratones y conejos con las toxinas recombinantes y al realizar experimentos de desafío, estos mostraron haber desarrollado anticuerpos que son capaces de reconocer el

veneno y proteger en contra de las toxinas. Por esta razón resolvimos también realizar los experimentos de inmunización en caballos, que son los animales experimentales de elección para la producción de faboterápicos (anticuerpos neutralizantes), y que además son los procedimientos autorizados por las autoridades de salud, tanto nacional como de la Organización Mundial de la Salud. Los antivenenos actualmente en uso para humanos, en su mayoría son hechos mediante híper-inmunización de caballos. Ejemplo de esto es el llamado "Alacramyn", que es uno de los antivenenos actualmente en uso en la población Mexicana que requiere de este producto.

Los venenos totales de alacranes empleados en los experimentos que sustentan la presente descripción fueron comprados a la compañía Latoxan (Francia).

A continuación se describe la inmunización en ratones y los resultados de neutralización utilizando los sueros obtenidos. Se inmunizaron inicialmente grupos de 10 ratones de la cepa CD1 de 17 g en promedio. Los inmunógenos utilizados fueron las proteína de fusión r(toxina)His (SEC ID No 12, SEC ID No 13, SEC ID No 14, SEC ID No 16, y SEC ID No 18). La inyección de las toxinas se realizó por vía subcutánea. La emulsión se preparó con la toxina disuelta en PBS al 1X con adyuvante completo de Freund (rockland) en la primera inmunización, e incompleto o alúmina en las siguientes inmunizaciones. La inmunización se realizó inyectando la toxina en 100 µl de solución por ratón en cada ocasión, con un periodo de aproximadamente 10 días entre inmunizaciones. Se comprobó la generación y el incremento de anticuerpos en suero contra el veneno total y las toxinas nativas o recombinantes por ensayos de ELISA. Después de la última inmunización se realizaron pruebas de neutralización de 1 a 3 DL_{50} de veneno total con grupos de 3 o más ratones (Ver Tablas 1-3 de datos de neutralización, de acuerdo al esquema de inmunización que les precede.

Para la presente invención se inmunizaron grupos de ratones: con cada uno de los híbridos de las toxinas recombinantes (formato de proteína de fusión): rThio-toxina (rThio-EK-toxina-6His) (SEC ID No 11- SEC ID No 20). Se realizaron dos esquemas de inmunización: a) para las toxinas recombinantes rThioAaHII, y rThioAmmV + rThioAmmVIII (se inmunizo con ambas toxinas), se llevaron a cabo 5 inmunizaciones usando cantidades de rThio-toxina (desde 5 a 25 µg) y volumen de PBS (en µl) variables (ver detalles en el esquema I). b) Para la toxina rThioLqh2 se realizaron 6 inmunizaciones usando una cantidad de toxoide (30 µg) y volumen de PBS (en µl) fijos (ver detalles en el Esquema II). Para ambos esquemas, en la primera inmunización se inyectó un adyuvante completo de Freund (Rockland), para desarrollar la respuesta inmunológica del ratón; las siguientes fueron con adyuvante

incompleto o alúmina, alternadamente. A continuación se muestran los esquemas de inmunización y los resultados de la neutralización correspondiente:

Esquema de inmunización I: Se inmunizaron 10 ratones con la proteína de fusión:

Tiorredoxina-EK-AaHII-6His

Tiorredoxina-EK-AmmV-6His

Tiorredoxina-EK-AmmVIII-6His

1ª. Inmunización 5 μg de proteína total / Adyuvante completo

2ª. Inmunización 10 μg de proteína total / Adyuvante incompleto

3ª. Inmunización 15 μg de proteína total / Alúmina

4ª. Inmunización 20μg de proteína total / Adyuvante incompleto

5ª. Inmunización 25 μg de proteína total / Alúmina

Volumen inyectado a cada ratón: 50 μl

Una vez terminado el protocolo de inmunización se procedió a desafiar la capacidad protectora del proceso de inmunización con las proteíns híbridas, inyectando directamente el los animales previamente inmunizados los venenos solubles de lo alacranes a las dosis indicadas en la Tablas 1 a 3.

Tabla 1. Reto directo de los ratones inmunizados con la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHII-6His con el veneno de *Androctonus australis*.

Suero	**DL_{50} veneno usado**	Proporción de ratones sobrevivientes con respecto al total de ratones ensayados
Suero de ratones inmunizados con la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHII-6His	3 DL_{50} de veneno de *Androctonus australis*	8/11
Controles	3 DL_{50} de veneno de *Androctonus australis*	0/3
Síntomas observados en el ratón de prueba: 6 de los ratones retados mostraron síntomas severos de intoxicación, pero sobrevivieron a la inyección. En el caso de los ratones controles: todos murieron entre un tiempo de 25 minutos a 1 y media hora.		

Tabla 2. Reto directo de los ratones inmunizados, con las proteínas de fusión Tiorredoxina-EK-AmmVIII-6His y Tiorredoxina-EK-AmmV-6His, con el veneno de *Androctonus australis*.		
Suero	DL_{50} veneno usado	Proporción de ratones sobrevivientes con respecto al total de ratones ensayados
Suero de ratones inmunizados con las proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmVIII-6His y Tiorredoxina-EK-AmmV-6His	3 DL_{50} de veneno de *Androctonus australis*	8/10
Controles	3 DL_{50} de veneno de *Androctonus australis*	0/3
Síntomas observados en los ratones inmunizados: Se observaron síntomas de intoxicación severa en 4 ratones, pero 3 horas posteriores a la inyección y sobrevivieron 8 ratones de un grupo de 10 Síntomas observados en los ratones control: todos murieron entre un tiempo de 25 minutos a 1 hora y media. Nota: Es importante notar que los ratones fueron inmunizados con la mezcla de las proteínas de fusión de AmmV y AmmVIII (de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*) y el reto fue con veneno de *Androctonus australis*.		

Esquema de inmunización II:

Esquema de inmunización utilizado para inmunizar un grupo de ratones (cepa CD1) con la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhII-6His.

No. INMUNIZACIÓN	**No. DE RATONES**	**CANTIDAD DE Toxina (µg) total**	**ADYUVANTE (tipo)**
1	**10**	**30**	**Completo**
2	**10**	**30**	**Incompleto**
3	**10**	**30**	**Alúmina**
4	**10**	**30**	**Incompleto**
5	**10**	**30**	**Alúmina**
6	**10**	**30**	**Incompleto**

Tabla 3. Reto directo de los ratones inmunizados con la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhII-6His con el veneno de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*.

	DL_{50} veneno usado	Proporción de ratones sobrevivientes con respecto al total de ratones ensayados
Ratones inmunizados con la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhII-6His	1 DL_{50} de veneno de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*	8/8
Controles	1 DL_{50} de veneno de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*	3/6
Volumen inyectado: 100 µl intraperitoneal NOTA: es importante mencionar que los ratones fueron inmunizados con la toxina recombinante LqHII (Tiorredoxina-EK-LqhII-6His), esta toxina es del veneno de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* y aquí el reto fue usando el veneno de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*		

También obtuvimos los títulos de anticuerpos en conejos después de someterse a inmunizaciones con la mezcla de las proteínas de fusión correspondientes a las toxinas recombinantes AaHI y AaHII de *Androctonus australis,* AmmV y AmmVIII de *Androctonus mauretanicus*, LqhII y LqhIV de *Leirus quinquestriatus* y BotI de *Buthus occitanus,* mediante ensayos de ELISA. Así como, la evaluación de la capacidad neutralizante de los sueros obtenidos contra el veneno total de los alacranes ya antes mencionados, tal y como se describe a continuación:

A partir de los sueros obtenidos se purificaron anticuerpos mendiante la cromatografía de afinidad a Proteína A. Los anticuerpos purificados se evaluaron mediante ensayos de ELISA y Western blot para determinar la capacidad de reconcimiento hacia cada una de las toxinas recombinantes.

Partiendo de las proteínas de fusión correspondientes a las toxinas AaHI, AaHII, AmmV, AmmVIII, LqhII, LqhIV y BotI tratando de cubrir los tres grupos inmunogénicos:

I

AaHI KRDGYIVYPNNCVYHCVPP--CDGLCKKNGGSSGSCS---
VPSGLACWCKDLPDNVPIKDTSRKCTR

LqhIV GVRDAYIADDKNCVYTCGANSYCNTECTKNGAESGYCQWFGKY-
GNACWCIKLPDKVPIRIPG-KC-R

II

AaH2 VKDGYIVDDVNCTYFCGRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPY-
GNACYCYKLPDHVRTKGPGR-CH

AmmV III LKDGYIVNDINCTYFCGRNAYCNELCIKLKGESGYCQWASPY-
GNSCYCYKLPDHVRTKGPGR-CN

LqhII IKDGYIVDDVNCTYFCGRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPY-
GNACYCYKLPDHVRTKGPGR-C-R

AmmV LKDGYIIDDLNCTFFCGRNAYCDDECKKKGGESGYCQWASPY-
GNACWCYKLPDRVSIKEKGR-CN

III

BotI GRDAYIAQPENCVYECAQNSYCNDLCTKNGATSGYCQWLGKY-
GNACWCKDLPDNVPIRIPGK-CHF

Al incluir las toxinas en los tres grupos inmogénicos en los protocolos de inmunización en conejos de la cepa Nueva Zelanda, se espera obtener anticuerpos con la capacidad de neutralizar al veneno completo de los diversos alacranes que contienen estas toxinas. A continuación se muestra el esquema de inmunización en conejos que se siguió:

Esquema de inmunización en conejos (05, 06, 08) con las toxinas recombinantes AaHI, AaHII, AmmV, AmmVIII, LqhII, LqhIV y BotI.

Inmunización	Fecha (año 2014-15)	Adyuvante (µl)		µg de Toxina Recombinante	µl subcutáneo/ conejo	Sangría
1ª	31 de Octubre	Completo	250	30	500	Preinmune
2ª	14 de Noviembre	Incompleto	300	50	600	--
3ª	28 de Noviembre	Alúmina	300	100	600	--
4ª	12 de Diciembre	Incompleto	300	200	600	
5ª	26 de Diciembre	Alúmina	300	250	600	
6ª	09 de Enero	Incompleto	300	300	600	1ª Sangría
7ª	27 de Enero	Alúmina	300	350	600	
8ª	13 Febrero	Incompleto	300	400	600	2ª Sangría
9ª	27 Febrero	Alúmina	300	450	600	
10ª	13 de Marzo	Incompleto	300	500	600	3ª Sangría
11ª	28 de Marzo	Alúmina	300	700	600	
	7 de Abril					4ª Sangría
12ª	14 de Abril	Incompleto	300		600	
	23 de Abril					5ª Sangría

Para evaluar la capacidad del suero de los conejos hiperinmunizados se determinaron los títulos de los anticuerpos mediante ensayos ELISA por el método convencional con anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa se detectó absorbancia a 490 nm.

Quince días después de la quinta inmunización se realizó la primera sangría y se evaluaron los títulos de anticuerpos contra las toxinas recombinantes así como con veneno total. En la tabla 4 se muestran los valores obtenidos contra las toxinas recombinantes y contra la

proteína acarreadora Tiorredoxina. En la figura 5 Se puede observar que las toxinas son más inmunogénicas que el acarreador.

Tabla 4. Títulos de anticuerpos posteriores a la quinta inmunización

Proteínas recombinantes	Conejo 05	Conejo 06	Conejo 08
Thio-AaHI	1'869,160 ± 6287	592,722 ± 46,266	595,159 ± 22,260
Thio-AaHII	697,286 ± 79,379	595,159 ± 22,260	579,181 ± 41,776
Thio-AmmV	668, 783 ± 120,032	670,495 ± 90,886	598,674 ± 43,226
Thio-AmmVIII	664,833 ± 89,345	645,389 ± 75328	567,389 ± 38,356
Thio-AcraIV	1'930, 130 ± 1626	777,992 ± 71,774	613,240 ± 35,887
Thio-Bu1	1'993,470 ± 1306	1'904,190 ± 3983	1'829,900 ± 6,248
Thio-BotI	1'863,990 ± 6382	1'867,530 ± 6062	626,897 ± 50,253
Thio-LqhII	1'933,790 ± 1365	1'923,600 ± 2228	620,368 ± 68,194
Thio-LqhIV	1'952,350 ± 571	1'880,530 ± 5389	652,782 ± 43,795
Tiorredoxina	219,064 ± 35,379	265,115 ± 30,777	258,486 ± 27.815

Los títulos de anticuerpos obtenidos después de la quinta inmunización contra el veneno de diversos alacranes del norte de África se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 6.

Tabla 5. Títulos de anticuerpos posteriores a la quinta inmunización

Veneno	Conejo 05	Conejo 06	Conejo 08
Androctonus australis	854 ± 177	897 ± 236	6,341 ± 693
Androctonus mauretanicus	3,628 ± 455	3,746 ± 480	2,751 ± 309
Buthus occitanus	786 ± 91	748 ± 105	775 ± 97
Leiurus quinquestriatus	869 ± 181	745 ± 114	746 ± 100

Como se puede observar en la Figura 6 hay un mejor reconocimiento del veneno de *Androctonus mauretanicus* en los tres conejos, mientras que el suero del conejo 08 comienza a tener reconocimiento del veneno de *A. australis*.

Posteriormente, se realizaron cuatro sangrías con una diferencia de un mes cada una. Con los sueros obtenidos se evaluaron los títulos de anticuerpos contra el veneno de las especies de alacrán ya empleadas, mediante ensayos de ELISA. Los resultados se muestran en la tabla 6 y en la figura 7.

Tabla 6. Títulos de anticuerpos del Conejo 05			
Veneno	Segunda Sangría	Tercera Sangría	Cuarta Sangría
Androctonus australis	3,353 ± 642	7,497 ± 1,004	10,465 ± 1,231
Androctonus mauretanicus	2,494 ± 480	5,653 ± 918	10,510 ± 1,111
Buthus occitanus	3,994 ± 1,067	6,591 ± 1,237	6,976 ± 959
Leiurus quinquestriatus	3,519 ± 686	6,873 ± 649	7,997 ± 857

Tabla 7. Títulos de anticuerpos del Conejo 06			
Veneno	Segunda Sangría	Tercera Sangría	Cuarta Sangría
Androctonus australis	3,160 ± 629	6,725 ± 750	10,228 ± 978
Androctonus mauretanicus	2,491 ± 551	6,617 ± 900	13,165 ± 839
Buthus occitanus	24,895 ± 2,068	6,649 ± 901	7,589 ± 584
Leiurus quinquestriatus	12,422 ± 1,068	6,998 ± 635	9,120 ± 1,390

Tabla 8. Títulos de anticuerpos del Conejo 08			
Veneno	Segunda Sangría	Tercera Sangría	Cuarta Sangría
Androctonus australis	2,230 ± 304	6,718 ± 746	8,321 ± 1,057
Androctonus mauritanicus	2,155 ± 614	6,631 ± 832	8,371 ± 708
Buthus occitanus	14,009 ± 1,593	21,196 ± 2,114	7,146 ± 711
Leirus quinquestriatus	11,437 ± 1,255	8,995 ± 387	7,330 ± 780

Como se puede observar en los datos anteriores, el conejo 06 es el que presenta mejores títulos contra los venenos de *A. australis, A. mauretanicus, B. occitanus* y *L. quinquestriatus*, por lo que se decidió usar el suero de este conejo para realizar de ensayos de neutralización contra los cuatro venenos en ratones hembra de la cepa CD1 de 18 a 20 g de peso. Ver figuras 8 y 9. Debido a que los títulos contra los venenos no fueron tan altos se decidió comenzar a probar 2 DL_{50} de cada veneno solo en dos ratones control y dos más para el ensayo de neutralización con 250 µl de suero. En los casos en donde hubo muerte de los ratones en presencia del suero se redujo a 1 DL_{50}, mientras que en otro caso se dejaron las 2 DL_{50} debido a que se observaron síntomas severos de intoxicación de los ratones y en otro se aumentó a 3 DL_{50}.

En las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos del ensayo de neutralización realizado con el suero obtenido del conejo 06 después de la doceava inmunización. Para todos los experimentos se usaron 250 µl de suero.

Tabla 9 . Ensayos de neutralización del veneno de *Androctonus australis*						
	Peso (g)	Dosis (µg)	µl	Hora inyec. (min)	Hora muerte (min)	Tiempo de muerte (min)
Ratones Control con 2 DL_{50} de Veneno						
R-1	19.3	34.2	28.5	0	1:57	1:57
R-2	19.2	34.0	28.3	1:29	17:57	16:28
Ratones con 2 DL_{50} de Veneno + 250 µl de suero						
R-1	19.5	34.5	28.8	0	25:12	25:12
R-2	20.2	35.8	29.9	1:40	25:12	23:32
Ratones Control con 1 DL_{50} de Veneno						
R-1	15.9	14.1	11.7	0	37:04	37:04
R-2	16.8	14.9	12.4	0:46	32:07	31:21
R-3	17.1	15.1	12.6	1:50	32:07	30:17
R-4	16.3	14.5	12.1	3:03	31:00	28:57
R-5	16.1	14.2	11.9	2:59	37:24	34:35
R-6	22.2	19.7	16.4	5:19	37:24	32:05
Ratones con 1 DL_{50} de Veneno + 250 µl de suero						
R-1	18.0	16.0	13.3	0	77:30	77:30
R-2	16.6	14.7	12.2	0:50	77:30	76:40
R-3	18.8	16.6	13.9	2:04	2:04	--
R-4	17.1	15.1	12.6	2:59	2:59	--
R-5	17.8	15.7	13.1	3:56	3:56	--
R-6	16.7	14.8	12.3	5:22	77:30	72:08
1 DL_{50} =17.7 µg/ 20g ratón. 2 DL_{50} =35.4 µg/ 20g ratón. Stock veneno = 1.2 µg/µl *Androctonus australis*. NOTA: El guión (--) indica que el ratón no murió.						

En la tabla 9 se muestran los ensayos de neutralización del veneno de *A. australis*, en donde se observa que con 2 DL_{50} el 100% de la población de los ratones tanto en los controles como con el suero mueren. Por lo que se retaron los ratones solo con 1 DL_{50} de veneno y en los ratones control se observa la muerte en 30 minutos, aquí se esperaría solo la muerte del 50 % de la población por lo que esto indica que tal vez no estamos usando la cantidad de veneno correcta o este grupo de ratones fue muy sensible, por lo que habría que hacer más ensayos. Ahora bien, cuando se compara el grupo control con los del suero se observa que muere el 50% de la población y el tiempo en el que se presentan los síntomas se retarda, en el control los ratones mueren alrededor de los 30 minutos, mientras que en el otro grupo mueren a los 70 minutos.

Tabla 10. Ensayos de neutralización del veneno de *Androctonus mauretanicus*

	Peso (g)	Dosis (µg)	µl	Hora inyec. (min)	Hora muerte (min)	Tiempo de muerte (min)
Ratones Control con 2 DL_{50} de Veneno						
R-1	17.8	17.9	11.2	0	29:46	29:46
R-2	18.7	18.9	11.8	1:00	39:22	38:22
Ratones con 2 DL_{50} de Veneno + 250 µl de suero						
R-1	17.9	17.7	11.1	0	113:00	113:00
R-2	19.5	19.3	12.1	1:05	--	--
Ratones Control con 1 DL_{50} de Veneno						
R-1	16.0	8.1	5.1	0	35:00	35:00
R-2	16.9	8.5	5.3	0:50	33:00	32:10
R-3	17.0	8.6	5.4	1:50	36:40	34:50
R-4	16.0	8.1	5.1	3:03	40:00	36:57
R-5	16.1	8.1	5.1	2:59	38:00	35:01
R-6	20	10.1	6.3	5:19	38:20	33:01
Ratones con 1 DL_{50} de Veneno + 250 µl de suero						
R-1	17.8	9.0	5.6	0	--	--
R-2	17.8	9.0	5.6	0:58	--	--
R-3	17.5	8.9	5.5	2:22	--	--
R-4	16.8	8.5	5.3	3:17	--	--
R-5	17.5	8.7	5.4	4:42	--	--
R-6	15.9	8.0	5.0	5:52	--	--

1 DL_{50} =10.1 µg/ 20g ratón. 2 DL_{50} =20.2 µg/ 20g ratón. Stock veneno = 1.6 µg/µl *Androctonus mauretanicus*. NOTA: El guión (--) indica que el ratón no murió.

En la tabla 10, se muestra que con 2 DL_{50} del veneno de *A. mauretanicus* muere el 100% de la población, mientras que aplicando el suero solo muere un 50%. Por esta razón, se decidió retarlos solo con una DL_{50} y se observa que el 100% de la población control muere, mientras que al inyectar esta misma dosis del veneno con el suero hay una sobrevivencia del 100%. Estos resultados indican que los anticuerpos del suero del conejo 06 son capaces de neutralizar una DL_{50} del veneno de *A. mauretanicus*.

Tabla 11. Ensayos de neutralización del veneno del *Leiurus quinquestriatus*

	Peso (g)	Dosis (µg)	µl	Hora inyec. (min)	Hora muerte (min)	Tiempo de muerte (min)
Ratones Control con 3 DL_{50} de Veneno						
R-1	19.2	37.3	12	0	22:03	22:03
R-2	19.8	38.6	12.5	2:06	22:48	20:42
Ratones Control con 3 DL_{50} de Veneno + 250 µl de suero						
R-1	15.9	30.9	10	2:18	43:30	41:12
R-2	16.2	29.8	9.6	3:29	68:41	65:12
Ratones Control con 2 DL_{50} de Veneno						
R-1	21.8	28.2	9.1	5:45	35:24	29
R-2	20.6	26.7	8.6	7:10	27:36	20
R-3	19.9	25.7	8.3	8:16	56:58	48
R-4	19.3	25.0	8.0	9:20	26:22	17
R-5	19.2	24.9	8.0	0	22:03	22
R-6	19.9	25.8	8.3	2:06	22:42	20
Ratones Control con 2 DL_{50} de Veneno + 250 µl de suero						
R-1	16.3	21.1	6.8	0	--	
R-2	16.2	21.0	6.8	1:04	--	
R-3	19.7	25.5	8.2	0	--	
R-4	19.3	25.0	8.0	1:14	--	
R-5	20.9	27.1	6.7	2:40	--	
R-6	22.4	29	9.4	3:48	--	

1 DL_{50} =12.95 µg/ 20g ratón. 2 DL_{50} =25.9 µg/ 20g ratón, 3 DL_{50} =38.8 µg/ 20g ratón Stock veneno = 3.1 µg/µl *Leiurus quinquestriatus*. NOTA: El guión (--) indica que el ratón no murió.

En la tabla 11, se muestra que se inyectan solo dos ratones con 3 DL50 del veneno total de L. quinquestriatus. Se observa que el 100% de la población muere tanto en el grupo de los ratones control como en los que se administra el veneno mezclado con los 250 µl de suero. Con base en estos resultados, se decidió retar a un grupo de 6 ratones solo con 2 DL50 del veneno con y sin suero. Se observa que el 100% de los ratones control muere mientras que en el otro grupo sobreviven el 100%. Estos resultados indican que el suero del conejo 06 es capaz de neutralizar 2 DL50 del veneno de L. quinquestriatus.

Tabla 12. Ensayos de neutralización del veneno de *Buthus occitanus*						
	Peso (g)	Dosis (µg)	µl	Hora inyec. (min)	Hora muerte (min)	Tiempo de muerte (min)
Ratones Control con 2 DL_{50} de Veneno						
R-1	18.79	52.8	26.4	0	52:32	52:32
R-2	18.9	53.0	26.5	1:27	37:13	35:46
R-3	20.9	58.7	29.4	6:27	58:00	51:33
R-4	19.4	54.5	27.3	7:22	--	--
Ratones Control con 2 DL_{50} de Veneno + 250 µl de suero						
R-1	20.4	57.3	28.6	5:22	--	--
R-2	19.1	53.7	26.9	6:30	--	--
R-3	20.4	57.4	28.7	7:42	--	--
R-4	17.9	50.5	25.3	8:30	--	--
R-5	20.3	38	5.8	0	--	--
R-6	18.6	34.9	5.4	4:20	--	--
1 DL_{50} =28.1 µg/ 20g ratón. 2 DL_{50} =56.2 µg/ 20g ratón. Stock veneno = 2.0 µg/µl *Buthus occitanus*. NOTA: El guión (--) indica que el ratón no murió.						

En la tabla 12 se muestra el ensayo de neutralización con el veneno de *Buthus occitanus*, en la cual es evidente que el suero del conejo 06 es capaz de neutralizar 2 DL_{50} del veneno total.

Como se puede observar en las tablas anteriores, el suero del conejo 06 no solo tiene una buena capacidad de reconocer a los diferentes venenos de los alacranes del norte de África, sino que también es capaz de neutralizar 1 DL_{50}, 2 DL_{50} y 3 DL_{50} de los venenos de *A. australis, A. mauretanicus, B. occitanus* y *L. quinquestriatus*, respectivamente.

En los resultados anteriores se muestra que los anticuerpos obtenidos en este protocolo de inmunización no fueron capaces de neutralizar 3 DL_{50} de todos los venenos empleados. Como se recordará nosotros empleamos en el protocolo de inmunización las toxinas recombinantes que conforman los tres grupos inmunogénicos, por lo que tal vez al inyectarlas todas se está generando una distracción inmunológica. Sin embargo, resultados previos obtenidos tanto en caballos como en ratones, muestran que al inmunizar estos animales con las toxinas recombinantes que pertenecen al grupo inmonogénico II (AaHII, Lh2, Amm5 y Amm8) los anticuerpos que se generan son capaces de neutralizar a 3 DL_{50} de los venenos de *A. australis, A. mauretanicus* y *L. quinquestriatus*. Por lo tanto, para protocolos posteriores se recomienda inmunizar con las toxinas que pertenecen a cada grupo por separado. De acuerdo con los resultados anteriores se decidió purificar los

anticuerpos del suero del conejo 03 mediante cromatografía de afinidad a Proteína A. Ver resultado en la figura 10. La Proteína A tiene la característica de unirse a la región Fc (fragmento constante) de las inmunoglobulinas a través de la interacción con la cadena pesada. El protocolo para la purificación de los anticuerpos se basa en el uso de cromatografía de afinidad con agarosa acoplada a Proteína A, ésta permite que los anticuerpos presentes en el suero diluido en buffer de unión queden unidos a la columna como lo marca la técnica convencional y utilizando un flujo lento se van colectando fracciones de 1 ml. Se deja de pasar buffer hasta que la absorbancia a 280 nm sea igual o menor a 0.07, se usa buffer 2M Tris-HCl pH 8.0 para prevenir la desnaturalización de los anticuerpos. Las fracciones de interés se dializan contra 10 volúmenes de la muestra con PBS1X, se realizan cuatro cambios de 1 hora a 4 °C. Los anticuerpos se almacenan en PBS1X + 50% de Glicerol + 0.02% NaN_3, se preparan alícuotas de 750 µg/1.5 ml y se guardan a -70°C. Con estas alícuotas se determinó el título de anticuerpos contra las toxinas recombinantes AaHI, AaHII, AmmV, AmmVII, LqhII, LqhIV y BotI. Ver Figura 11.

Con los anticuerpos purificados se puede monitorear la expresión de las toxinas recombinantes ya mencionadas. Para evaluar el reconocimiento de estos anticuerpos, se corrió un gel de SDS-PAGE al 12%, aplicando en cada carril 10 µg de proteína de fusión recombinante pura (Thio-EK-AaHI, Thio-EK-AaHII, Thio-EK-AmmV, Thio-EK-AmmVIII, Thio-EK-LqhII, Thio-EK-LqhIV, Thio-EK-BotI). Cada proteína se cargó por duplicado en el gel; una parte se tiñó con azul de Coomassie y la otra mitad se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para el inmunoensayo Western Blot (WB), empleando el método Semihúmedo de Kyhse-Andersen. El anticuerpo purificado se utilizó a una dilución típicamente de 1:50000, sin embargo, la dilución usada depende del suero del respectivo conejo inmunizado. Se incubó 1 h a 37° C. En la Figura 12 se muestra el reconocimiento de las proteínas de fusión recombinante por el anticuerpo purificado. Como se muestra en la Figura 12A, se observan bandas alrededor de los 20 kDa correspondiente a las proteínas de fusión de interés, así como un dímero de estas proteínas entre 35 y 40 kDa. En el caso del WB, se observa un buen reconocimiento de las proteínas obteniéndose bandas alrededor de los 20, 40 y 60 kDa, indicando que el anticuerpo está reconociendo también dímeros y trímeros de las proteínas de fusión.

Estos resultados indican que estos anticuerpos pueden ayudar a monitorear tanto la expresión como la purificación de las proteínas de fusión Thio-EK-AaHI, Thio-EK-AaHII, Thio-EK-AmmV, Thio-EK-AmmVIII, Thio-EK-LqhII, Thio-EK-LqhIV, Thio-EK-BotI.

Posteriormente, se procedió a la realización de ensayos ahora para la especie Parabuthus *granulatus*. Con el fin de obtener el suero suficiente para realizar ensayos de neutralización

contra el veneno de esta especie, se propuso un esquema de inmunización en conejos que se detalla enseguida, como inmunógenos se empleó tanto la toxina recombinante Pg8 digerida sin tiorredoxina (para evitar distracción del sistema inmune), y también se usó la proteína recombinante Pg8 sin digerir.

Se inmunizaron dos grupos de conejos Nueva Zelanda de 2.5 Kg con cada uno de estos inmunógenos, la administración fue vía subcutánea, inyectando la toxina recombinante en un volumen final de 500 µl de PBS 1X. Se realizaron 8 inmunizaciones con lapsos de 10 días entre ellas. Una vez terminado el protocolo de inmunización, se llevaron a cabo ensayos de neutralización del veneno total con los sueros obtenidos. Se emplearon 3 grupos de ratones con peso aproximado de 17 a 20 gramos e inoculados vía intraperitoneal. Para el control se usaron 4 ratones a los que se les inyectó únicamente el veneno total de *Parabuthus granulatus*. Para cada uno de los retos se emplearon 6 ratones a los que se les inyectaron 250 µl de suero preinmune previamente incubado a 37°C durante 60 min con 3 DL_{50} del veneno total.

Durante este ensayo murieron los 4 ratones control, sobrevivieron 5 de 6 ratones inmunizados con la toxina digerida y 3 de 5 con la toxina sin digerir. Los resultados de ELISA indican que la proteína digerida promueve la generación de títulos más altos de anticuerpos contra el veneno total de *Parabuthus granulatus*, lo cual correlaciona con la neutralización. Los títulos obtenidos fueron de 158,206 para los sueros obtenidos de ratones inmunizados con la proteína digerida y de 66,724 para los generados con la toxina sin digerir.

Un protocolo similar de inmunización se llevo a cabo para tres conejos inmunizados con los híbridos de las toxinas Acra4 y Bu1.

De forma resumida, para la generación de anticuerpos en otros mamíferos se inmunizaron grupos de dos conejos con las siguientes toxinas: a) con toxina recombinante rThioPg8 (SEQ ID NO: 18, fusionada a tiorredoxina), b) con toxina recombinante rPg8 digerida (sin la proteína tiorredoxina), (SEC ID No 8 más 6 histidinas en el carboxilo terminal) y usando tres conejos c) inmunizando simultáneamente con las toxinas recombinantes Acra4 (SEC ID No 19) y Bu1 (C ID No 20).

Las inmunizaciones se realizaron de manera similar a la realizada en el sistema con ratones y en las siguientes tablas de esquemas de inmunización (III y IV) se pueden observar los detalles de cada inmunización y al final de cada esquema se encuentra la tabla de la neutralización correspondiente donde se valoró la capacidad protectora de cada suero:

Esquema III. Inmunizaciones en conejos con la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Pg8-6His o Proteína Pg8 sola (digerida). Se usaron 2 conejos por cada inmunógeno, 500 µl subcutáneo/conejo.

Inmunización	Fecha de Inmunización (Año 2011)	Adyuvante	Toxina de fusión- Pg8 recombinante (µg)	Toxina Recombinante Pg8 sola, digerida (µg)
Sangrado Pre-inmune	6 mayo			
1ª	6 mayo	Completo	30	30
2ª	16 mayo	Incompleto	30	30
3ª	26 mayo	Alúmina	50	50
1ª Sangría	6 junio			
4ª	6 junio	Incompleto	50	50
5ª	16 junio	Alúmina	80	80
6ª	27 junio	Incompleto	80	80
2ª Sangría	7 julio			
7ª	7 julio	Alúmina	100	100
8ª	19 julio	Incompleto	100	100
Sangrado total	29 julio			

Tabla 13. Ensayos de neutralización utilizando el veneno de *Parabuthus granulatus y el* suero de los conejos inmunizados con la toxina recombinante Pg8 digerida (Pg8 – histidinas).

Prueba	DL_{50} de veneno de *Parabuthus granulatus*	Suero de conejo inmunizados con la proteína recombinante Pg8 digerida	Proporción de ratones sobrevivientes respecto a los ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	2 DL_{50}	-	1/4
Ratones inyectados con veneno y suero del Conejo 45, inmunizado con la toxina recombinante Pg8 digerida	2 DL_{50}	250 µl	6/6
Ratones inyectados con veneno y suero del Conejo 46, inmunizado con la toxina recombinante Pg8 digerida	2 DL_{50}	250 µl	4/4
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	3 DL_{50}	-	1/4
Ratones inyectados con veneno y suero del Conejo 45, inmunizado con la toxina recombinante Pg8 digerida	3 DL_{50}	250 µl	5/6
Ratones inyectados con veneno y suero del Conejo 46, inmunizado con la toxina recombinante Pg8 digerida	3 DL_{50}	250 µl	2/6

1 DL_{50} de veneno de *P. granulatus*= 44.9 µg/20 g de ratón, via intraperitoneal

Tabla 14. Ensayos de neutralización utilizando el veneno de *Parabuthus granulatus* y el suero de los conejos inmunizados con la toxina de fusión con Pg8 recombinante.

Prueba	DL_{50} de Veneno de *Parabuthus granulatus*	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	2 DL_{50}	1/4
Ratones inyectados con veneno y suero del Conejo 47, inmunizado con la toxina de fusión de Pg8 recombinante	2 DL_{50}	6/6
Ratones inyectados con veneno y suero del Conejo 48, inmunizado con la toxina de fusión de Pg8 recombinante	2 DL_{50}	4/4

Esquema IV. Inmunización de 3 conejos (números 37, 38 y 39) con la proteína de fusión de la toxina Acra4 y con la proteína de fusión de la toxina Bu1. Este esquema de inmunización se realizó inmunizando con una mezcla equimolar de proteína de fusión de la toxina Acra4 más proteína de fusión de la toxina Bu1, debido a que ambas provienen de venenos de alacranes de Turquía.

No. de Inmunización	Adyuvante (µl)		Toxina recombinante Acra4 + Bu1 (µg)	µl subcutáneo/ conejo
1ª	Completo	250	30	500
2ª	Incompleto	250	30	500
3ª	Alúmina	250	50	500
4ª	Incompleto	250	50	500
5ª	Alúmina	250	80	500
6ª	Incompleto	250	80	500
7ª	Alúmina	250	100	500

Tabla 15. Ensayos de neutralización utilizando el veneno de *Androctonus crassicauda* y el suero de los conejos inmunizados con la toxina de fusión con Acra4 recombinante.

Prueba	DL_{50} de Veneno de *Androctonus crassicauda*	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	1 DL_{50}	0/3
Ratones inyectados con veneno y suero del Conejo 37	1 DL_{50}	3/3
Ratones inyectados con veneno y suero del Conejo 38	1 DL_{50}	2/3
Ratones inyectados con veneno y suero del Conejo 39	1 DL_{50}	2/3

Debido a los resultados obtenidos en las inmunizaciones realizadas en ratones y conejos, se decidió inmunizar caballos con la mezcla de las toxinas de los alacranes del norte de África. Se propuso un sistema de inmunización empleando las proteínas hibridas de las toxinas recombinantes AaHII de *Androctonus australis* Hector; Amm5 y Amm8 de *Androctonus mauretanicus mauretanicus* y Lqh2 de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, todas ellas consideradas las más tóxicas de su respectivo veneno. Se emplearon 3 caballos a los que se les inyectó la mezcla de las 4 toxinas recombinantes mencionadas. Se realizaron 9 inoculaciones, la primera se inyectó con adyuvante completo de Freunds (Rockland) para desarrollar la respuesta inmunológica del caballo; las siguientes fueron con adyuvante incompleto o alúmina. Los volúmenes de las inoculaciones y cantidad de antígeno (μg) variaron durante el esquema de inmunización (Ver esquema V). A continuación se muestra el esquema V de inmunización en caballos y diferentes tablas con los resultados de la neutralizacion utilizando el suero obtenido.

Esquema V de inmunización en caballos con mezcla de las proteínas de fusión de AaHII, AmmV, AmmVIII y LqhII. Se usaron 3 caballos: caballo 42, caballo 43 y caballo 44:

No. de inmunización	Día (fecha) (año 2011)	Adyuvante	Toxina por caballo (µg de la mezcla)	Volumen por caballo (ml)	Vía de inmunización
1	0 (20 abril)	Completo	250	2.0	Intradérmica
2	7 (27 abril)	Incompleto	250	2.0	Subcutánea
3	21 (11 mayo)	Alúmina	250	1.5	Subcutánea
4	35 (25 mayo)	Incompleto	250	2.0	Subcutánea
5	49 (8 junio)	Alúmina	250	1.5	Subcutánea
6	63 (22 junio)	Sin acarreador	250	1.0	Subcutánea
7 (Sangría)	77 (6 julio)	Incompleto	300	2.0	Subcutánea
8 (Sangría)	91 (20 julio)	Alúmina	300	1.5	Subcutánea
9 (Sangría)	105 (3 agosto)	Incompleto	500	2.0	Subcutánea
Sangría	119 (17 agosto)				

Al finalizar la novena inmunización se realizaron pruebas de neutralización en ratones contra el veneno de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, *Androctonus australis* y *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (ver Tabla 16), utilizando el suero de los caballos inmunizados. Para fines prácticos solamente se muestran los resultados obtenidos con el suero de un solo caballo, pero los resultados obtenidos son comparables a los dos otros caballos también inmunizados.

Tabla 16. Ensayos de neutralización con el suero de caballos inmunizados con la mezcla de las proteínas de fusión de AaHII, AmmV, AmmVIII y LqhII. Para facilidad se muestran los resultados de solo uno de los caballos.

Prueba	DL_{50} de Veneno	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	2 DL_{50} de Veneno de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*	0/2
Ratones inyectados con veneno y 300 µl de suero del Caballo 43	2 DL_{50} de Veneno de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*	2/2
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	2 DL_{50} de Veneno de *Androctonus australis*	1/2
Ratones inyectados con veneno y 300 µl de suero del Caballo 43	2 DL_{50} de Veneno de *Androctonus australis*	2/2 Nota: Los ratones presentaron síntomas ligeros de intoxicación pero 30 minutos después con respecto a los ratones control
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	2 DL_{50} de Veneno de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*	0/2
Ratones inyectados con veneno y 300 µl de suero del Caballo 43	2 DL_{50} de Veneno de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*	1/2 Se observaron síntomas ligeros como parálisis de las patas traseras. El veneno de *Leiurus* tiene otras toxinas de importancia médica, y solo se uso una de ellas para inmunizar al caballo, lo cual puede ser la razón de la parcial neutralización que se obtuvo.

Con los resultados de neutralización anteriores (Tabla 16) se puede observar que los híbridos de las toxinas recombinantes empleadas funcionaron muy bien como inmunógenos. Se hizo una verificación de esos resultados utilizándose una cantidad reducida de suero (300

microlitros), logrando neutralizar hasta 2 DL_{50} tanto del veneno de *Androctonus australis* Hector como del veneno de *Androctonus mauretanicus mauretanicus* y un 50% de neutralización con 2 DL_{50} del veneno de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Es importante considerar que este último veneno es más complejo ya que tiene otras toxinas que participan en el envenenamiento por la picadura de este alacrán). Con el objetivo de incrementar la potencia del suero de los caballos previamente inmunizados, se decidió aplicar inmunizaciones extras con los venenos de *Androctonus australis* Hector, *Androctonus mauretanicus mauretanicus* y *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, a los caballos 42, 43 y 44 previamente inmunizados con las proteínas de fusión de AaHII, AmmV, AmmVIII y LqhII. El esquema de estos refuerzos con veneno se muestran a continuación en el Esquema VI. La idea de esta ampliación del proceso de inmunización tiene dos razones de ser: La primera es que confirma la eficiencia de las toxinas híbridas como primadoras de una respuesta inmune. Por tratarse de inmunógenos híbridos la toxicidad de los péptidos se ve inhibida de tal forma que se pueden hacer protocolos de inmunización con una cantidad más elevada de antígeno. El segundo punto, como se demostrará a continuación, con un refuerzo dado con el material completo (veneno soluble completo de los alacranes) esto madura la respuesta inmune en un periodo muy corto y produce sueros altamente neutralizantes.

Esquema VI. Refuerzos de inmunización con la mezcla del veneno total de *Androctonus australis* Hector, *Androctonus mauretanicus mauretanicus* y *Leiurus quinquestriatus hebraeus* a caballos previamente inmunizados con la mezcla de las proteínas de fusión de AaHII, AmmV, AmmVIII y LqhII.

No. de inmunización	**Día /Fecha (año 2011)**	**Adyuvante/ml**	**Veneno (µg de la mezcla)**	**Volumen por caballo (ml)**	**Vía de inmunización**
10 sangría	0 /6 jul	Incompleto/1.3	1000	2.0	Subcutánea
11 sangría	14 /20 jul	Alúmina/1.0	3000	2.0	Subcutánea
12 sangría	28 /3 ago	Incompleto/1.3	6000	2.0	Subcutánea
Sangría	35/17ago				

Para evaluar la efectividad del suero de los caballos previamente inmunizados con los híbridos recombinantes de las toxinas AaHII, AmmV, AmmVIII y LqhII y reforzados con tres inmunizaciones de veneno total de los alacranes *Androctonus australis* Hector, *Androctonus mauretanicus mauretanicus* y *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, se realizaron ensayos de

neutralización por cada veneno total y para ello se utilizaron ratones cepa CD1 con peso aproximado de 17 a 20 gramos. Se usaron grupos de 4 ratones, un grupo se empleó como control al que únicamente se le inyectó a cada ratón 3 DL_{50} del veneno a neutralizar. A los otros grupos de ratones se les inyectó diferentes cantidades del suero obtenido de los caballos inmunizados, previamente incubado a 37°C durante 60 min con 3 DL_{50} del veneno total a evaluar (ver Tablas 17 a 20). Para fines prácticos solamente se muestran los resultados obtenidos con el suero de un solo caballo, sin embargo, esencialmente el mismo tipo de resultados se obtuvieron con los otros dos caballos ensayados. Para el caso de la neutralización del veneno de *Androctonus australis* Hector, los 4 ratones del grupo control inyectados con 3 DL_{50} de veneno murieron, en contraste el grupo de cuatro ratones inyectados con la mezcla de este veneno y con 100 µl de suero del caballo 43 (Tabla 17) todos sobrevivieron, además se logró neutralizar 3 DL_{50} del veneno de *A. australis* con tan solo 40 µl de este suero (Tabla 20). Estos resultados son extremadamente positivos, pues con un mililitro de este suero seguramente se puede neutralizar 75 DL_{50} del veneno en cuestión. Para el caso de la neutralización del veneno de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, todos los ratones del grupo control inyectados solo con veneno, murieron, mientras que los cuatro ratones que se inyectaron con la mezcla de 100 µl de suero del caballo 43 más 3 DL_{50} de veneno sobrevivieron (Tabla 18). Para el caso del ensayo de neutralización del veneno de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, se evaluaron dos grupos control de ratones, con 4 ratones cada uno, a los cuales se les inyectó, respectivamente, 1.5 DL_{50} y 3 DL_{50} de veneno total de *L. quinquestriatus hebraeus*, en ambos grupos todos los ratones murieron. Las mismas dosis de veneno (1.5 DL_{50} y 3 DL_{50}), pero adicionando 300 µl, 150, 100 µl o tan solo 70 µl del suero del caballo 43, fue aplicada a otros grupos de ratones y el resultado fue que todos los ratones sobrevivieron (Tabla 19 y Tabla 20).

Tabla 17. Ensayos de neutralización contra el veneno de *Androctonus australis Hector* y usando el suero de caballos reforzados con el veneno total de *Androctonus australis Hector, Androctonus mauretanicus mauretanicus* y *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Vía: intraperitoneal. Para facilidad se muestran los resultados de solo uno de los caballos.

Prueba	DL_{50} de Veneno de *Androctonus australis* Hector	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	3 DL_{50}	0/4
Ratones inyectados con veneno y 300 µl de suero del Caballo 43	3 DL_{50}	2/2
Ratones inyectados con veneno y 100 µl de suero del Caballo 43	3 DL_{50}	4/4

Tabla 18. Ensayos de neutralización contra el veneno de *Androctonus mauretanicus mauretanicus* y usando el suero de caballos reforzados con el veneno total de *Androctonus australis Hector, Androctonus mauretanicus mauretanicus* y *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Vía: intraperitoneal. Para facilidad se muestran los resultados de solo uno de los caballos.

Prueba	DL_{50} de Veneno de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	3 DL_{50}	0/4
Ratones inyectados con veneno y 300 µl de suero del Caballo 43	3 DL_{50}	2/2
Ratones inyectados con veneno y 100 µl de suero del Caballo 43	3 DL_{50}	4/4

Tabla 19. Ensayos de neutralización contra el veneno de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* y usando el suero de caballos reforzados con el veneno total de *Androctonus australis Hector, Androctonus mauretanicus mauretanicus* y *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Vía: intraperitoneal. Para facilidad se muestran los resultados de solo uno de los caballos.

Prueba	LD_{50} de Veneno De *Leiurus quinquestriatus hebraeus*	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyecto veneno)	1.5 LD_{50}	0/4
Ratones inyectados con veneno y 300 µl de suero del Caballo 43	1.5 LD_{50}	2/2
Grupo de ratones control (solo se les inyecto veneno)	3 LD_{50}	0/4
Ratones inyectados con veneno y 150 µl de suero del Caballo 43	3 LD_{50}	4/4

Tabla 20. Ensayos de neutralización contra diferentes venenos y usando el suero de caballos reforzados con el veneno total de *Androctonus australis Hector, Androctonus mauretanicus mauretanicus* y *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Para facilidad se muestran los resultados de solo uno de los caballos.

Sangría	Veneno de reto	resultado (µL AV/ratón)
Caballo 43 (08-Octubre-11).	*Androctonus australis* (3 DL_{50})	100 (3/3 ratones viven = 100 %)
	Androctonus australis (3 DL_{50})	70 (3/3 ratones viven =100 %)
	Androctonus australis (3 DL_{50})	40 (3/3 ratones viven =100 %)
	Leiurus q. Bo-28/Jun/08-IBT-COR (3 DL_{50})	100 (3/3 ratones viven = 100 %)
	Leiurus q. Bo-28/Jun/08-IBT-COR (3 DL_{50})	70 (0/3 ratones viven = 0 %)
	*Leiurus q.*Lq03H1101 (3 DL_{50})	100 (3/3 ratones viven = 100 %)
	*Leiurus q.*Lq03H1101 (3 DL_{50})	70 (3/3 ratones viven = 100 %)
	*Leiurus q.*Lq03H1101 (3 DL_{50})	40 (0/3 ratones viven = 0 %)

Los resultados anteriores destacan la eficacia del uso de los híbridos recombinantes (proteínas de fusión) de las toxinas de alacrán para generar anticuerpos neutralizantes contra el veneno de las especies de alacrán de los géneros *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus* y *Parabuthus* que son de las mas peligrosas en las regiones del Norte de África, Sahel Africano, Este y Sur de África, Cercano y Medio Oriente y se prueba también, que estos híbridos recombinantes de toxinas de alacrán funcionan perfectamente como inmunógenos y tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en diferentes mamíferos desde ratones hasta caballos.

Adicionalmente, con el objetivo de optimizar la generación de anticuerpos neutralizantes para los venenos de los alacranes peligrosos de las regiones del Norte de África, Sahel Africano, Este y Sur de África, Cercano y Medio Oriente, permitieron confirmar que las alfa-toxinas del

veneno de alacranes de las regiones mencionadas se agrupan en 4 grupos antigénicos. Esto significa que una toxina de un grupo antigénico dado, puede inducir anticuerpos que reconocen a toxinas de ese mismo grupo pero no reconocen a toxinas de los otros grupos antigénicos (Delori et al., 1981; El Ayeb y Pierre Delori, 1984). Por tal razón se incluye en la presente a un representante de cada grupo antigénico: la toxina AaHI del alacrán *Androctonus australis* (perteneciente al grupo antigénico 1), la toxina AaHII del alacrán *Androctonus australis* (perteneciente grupo antigénico 2), la toxina Bot1 del alacrán *Buthus occitanus tunetanus* (perteneciente al grupo antigénico 3) y la toxina LqhIV del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (perteneciente al grupo antigénico 4). Con esta estrategia, aunada a la capacidad inmunogénica que tienen los híbridos de todas las toxinas recombinantes propuestas en la presente, se tiene una combinación de inmunógenos recombinantes que producen sueros neutralizantes (o sus derivados) de venenos de diversas especies de alacrán de los géneros *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus* y *Parabuthus*, que son de los mas peligrosos a nivel mundial.

Dicha combinación inmunogénica puede acompañarse de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para conformar una composición farmacéutica utilizable como inmunógeno que permita inducir la generación de antivenenos contra diversas especies de alacrán.

Inmunógenos recombinantes de alacranes de México.

Para estos inmunógenos de manera similar a los anteriores, se diseñaron 2 oligonucleótidos externos y 4 internos para ensamblar a cada una de las toxinas: Cn2 del alacrán *Centruroides noxius*, CII1del alacrán *Centruroides limpidus*, CII2 del alacrán *Centruroides limpidus*, CssII del alacrán *Centruroides suffusus*, con uso preferencial de codones de *Escherichia coli*. Ver figura 13. Estos oligonucleótidos se sintetizaron mediante síntesis química, en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Véanse Figuras 14A-14D.

Realizamos el ensamble de la secuencia nucleotídica mediante PCR recursivo y la clonación del producto en el vector pBluescriptKS(-)tal y como se describió para el grupo de antígenos recombinantes del primer grupo. Las construcciones fueron secuenciadas para verificar que el ensamble y secuencia clonada de cada toxina fuera correcta. Se muestra un ejemplo con la toxina Cn2 en la Figura 15. De manera similar al grupo anterior, se preparó el vector de expresión pET22b-Tiorredoxina-sitio de corte para Enterocinasa. (Ver Figura 16).

Las secuencias que codifican para cada toxina de Centruroides clonada en el vector pBluescriptKS (-), descritas anteriormente, fueron usadas como templados para obtener los genes de las toxinas mediante subclonación en el vector de expresión pET22b-Thio. La

inserción en este vector de expresión de los genes que codifican para las toxinas, se realizó de la misma manera que la descrita para el grupo de recombinantes anteriores.

Cada uno de los vectores de expresión conteniendo el gen codificante para la toxina fue electroporado en *E. coli* cepa BL21 (DE3) de la misma manera que la ya descrita para el primer grupo de antígenos. El proceso de expresión se inició al crecer un preinóculo en medio LB con ampicilina. Después de crecer el cultivo hasta una DO entre 0.7-1, determinada a 600 nm, se indujo la expresión con IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) durante 6 a 12 h a 30 °C. El cultivo se centrifugó a 5,000 x g durante 10 min a 4 °C en tubos para centrífuga de 250 ml, con el fin de obtener todo el precipitado celular. Se congelaron las células -20°C, hasta su uso. Se procedió a obtener un extracto periplásmico bacteriano conteniendo a la proteína de fusión expresada, de la misma manera descrita anteriormente. Este extracto se utilizó para la purificación de la proteína utilizando columnas de afinidad.

Las proteínas de fusión expresadas se purificaron mediante cromatografía de afinidad y HPLC, tal y como se describió para el grupo anterior, Las proteínas se eluyeron con 400 mM de imidazol en PBS 1X (vease ejemplo en la Figura 15 (A) III). Los péptidos obtenidos fueron separados en una columna C18 (25mm x 4.1mm) con un gradiente de 20 a 80% de solvente B en un lapso de 40 min y se colectaron manualmente por monitoreo de absorbancia a 230 nm (Figuras 17A-17D).

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel discontinuo de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), por el método también ya descrito anteriormente Véase como ejemplo la Figura 15 A.

Las digestiones de las proteínas de fusión de centruroides, se realizaron con la proteasa enterocinasa (EK), también se obtuvieron sus masas moleculares mediante MALDI-TOF o ESI-ION-TRAP como ya se describió para otras proteínas. Los ensayos de ELISA también se realizaron de manera similar a la descrita y los resultados se muestra en la Figura 15 (B) y en la Figura 18.

La actividad tóxica de cada antígeno recombinante de fusión (híbrido) de centruroides, fue evaluada la cepa murina CD1, a los cuales se les inyectó vía intraperitoneal la cantidad de proteína de fusión calculada para contener el equivalente a diez veces la dosis letal media (DL_{50}) reportada para cada toxina. El resultado obtenido fue que a esa concentración la proteína no ejerce ningún efecto tóxico sobre el ratón, debido a que la toxina al tener fusionada a la tiorredoxina en su extremo N-terminal, afecta su actividad sobre los canales de sodio probablemente por impedimento estérico. Sin embargo, el hecho de que como proteína de fusión la toxina no sea tóxica es precisamente una de las principales ventajas al

utilizarla como antígeno, ya que al inmunizar animales no hay peligro de que el animal sujeto al proceso de inmunización sufra el efecto tóxico de la recombinante, permitiendo de esta forma inmunizarlos con altas dosis del antígeno.

Si bien que para los experimentos de neutralización se utilizaron los venenos totales de los animales inmunizados con las toxinas recombinantes, también se purificaron las toxinas correspondientes, con la posibilidad de ensayarlas separadamente. En en el caso de que los anticuerpos generados no fueran capaces de proteger en contra del veneno total, al menosse sabría si neutralizan a las toxinas. Sin embargo, los resultados obtenidos como se demuestra a seguir fueron excelentes y no se necesitó usar las toxinas puras. No obstante lo anterior, los protocolos fueron ejecutados y la toxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius* fue purificada de acuerdo a la metodología reportada en: Zamudio et al., 1992. Las toxinas CII1 y CII2 fueron purificadas de acuerdo a la metodología reportada en: Ramírez et al.,1994. La toxina CssII fue purificada de acuerdo a la metodología reportada en Martin et al., 1987.

Para los ensayos de neutralización se inmunizaron inicialmente grupos de 10 ratones de la cepa CD1 de 17 g en promedio (ver esquemas de inmunización 1, 2 y 3 siguientes). Los inmunógenos utilizados fueron las proteínas de fusión r(toxina)His (SEC ID No. 25 - SEC ID No. 28). La inyección de las toxinas se realizó por vía subcutánea. La emulsión se preparó con la toxina disuelta en PBS 1X con adyuvante completo de Freund (aceite mineral y micobacterias muertas) en la primera inmunización, e incompleto (aceite mineral) o alúmina en las siguientes inmunizaciones. La inmunización se realizó inyectando la toxina en 100 µl de solución por ratón en cada ocasión, con un periodo de aproximadamente 10 días entre inmunizaciones. Se comprobó la generación y el incremento de anticuerpos en suero contra el veneno total y las toxinas nativas por ensayos de ELISA (ver ejemplo en la Figura 19). Después de la última inmunización se realizaron pruebas de neutralización en ratones usando de 1 a 3 DL_{50}. Ver Tablas 21 a 25.

A continuación se describe el esquema de inmunización 1 que se llevó a cabo utilizando 2 grupos de 6 ratones de la cepa CD1. Uno de los grupos se inmunizó con la proteína de fusión de la toxina Cn2 recombinante de *Centruroides noxius*, y otro grupo con la proteína de fusión de la toxina CII1 recombinante de *C. limpidus limpidus*. Los 15 µg inyectados, corresponden a la cantidad de toxina Cn2 presente en la proteína de fusión:

1ª inmunización: 15 µg + Adyuvante completo	**10 días**
2ª inmunización: 15 µg + Adyuvante incompleto	**10 días**
3ª inmunización: 15 µg + Adyuvante incompleto	**10 días**
(sangrado para evaluar titulación del suero)	

4ª inmunización: 15 µg + Adyuvante incompleto 10 días

5ª inmunización: 15 µg + Adyuvante incompleto 10 días

obtención de suero

Tabla 21. Neutralización de la toxina nativa Cn2, utilizando suero de ratones inmunizados con la proteína de fusión de Cn2 recombinante.

Prueba	DL_{50} de Cn2 nativa	Suero inmunizado con la proteína de fusión TEkCn2His	Proporción de ratones sobrevivientes respecto a los ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó toxina)	2 DL_{50}	-	2/6
Grupo de ratones inyectados con mezcla de toxina y suero de ratones inmunizados con Cn2	2 DL_{50}	250 µl	6/6
1 ratón inyectado con mezcla de toxina y suero de ratones inmunizados con Cn2	3 DL_{50}	250 µl	1/1

1 DL_{50} de Cn2= 0.25 µg de toxina Cn2 por cada 20 gr de ratón

2 DL_{50} de Cn2= 0.50 µg de toxina Cn2 por cada 20 gr de ratón

Tabla 22. Neutralización de la toxina nativa Cll1, utilizando suero de ratones inmunizados con la proteína de fusión de Cll1 recombinante.

Prueba	DL_{50} de Cll1 nativa	Suero inmunizado con la proteína de fusión TEkCll1His	Proporción de ratones Sobrevivientes respecto a los ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó toxina)	2 DL_{50} de Cll1	-	1/4
Grupo de ratones inyectados con mezcla de toxina y suero de ratones inmunizados con Cll1	2 DL_{50} de Cll1	250 µl	6/6

1 DL_{50} de CII1= 1.73 µg de toxina CII1 por cada 20 g de ratón (determinada en ratones cepa Balb/C, por la Dra. Georgina Gurrola, IBT-UNAM)

2 DL_{50} de CII1= 3.46 µg de toxina CII1 por cada 20 g de ratón

Como puede observarse en los resultados de las Tablas 21 y 22, tanto la proteína de fusión con la toxina Cn2 recombinante, como la proteína de fusión con la toxina CII1 recombinante, funcionan como excelentes inmunógenos ya que tienen la capacidad de inducir en los ratones inmunizados la producción de anticuerpos neutralizantes de las respectivas toxinas nativas Cn2 o CII1 (aisladas directamente del veneno de *C. noxius* o *C. limpidus limpidus*, respectivamente). En el caso del suero de ratones inmunizados con la proteína de fusión de la toxina Cn2, este tiene la capacidad de neutralizar 2 y 3 DL_{50} de toxina nativa Cn2 (Tabla 21) y los ratones a los cuales se les inyectó la mezcla de toxina Cn2 nativa y el suero de los ratones inmunizados no presentaron síntomas de intoxicación.

Respecto al suero de ratones inmunizados con la proteína de fusión de la toxina CII1, éste tiene la capacidad de neutralizar 2 DL_{50} de toxina nativa CII1 (Tabla 22) y los ratones a los cuales se les inyectó la mezcla de toxina CII1 nativa y el suero de los ratones inmunizados tampoco presentaron síntomas de intoxicación.

Con el éxito de los resultados anteriores, se decidió realizar otro esquema de inmunización con la proteína de fusión de la toxina Cn2, con el objetivo de evaluar la capacidad del suero neutralizante y evaluarlo contra el veneno total de *C. noxius*. Se realizó el siguiente esquema (2) de inmunización:

Esquema de inmunización 2 en ratones (CD1) ensayando el híbrido de la toxina Cn2 de *Centruroides noxius:*

No. DE INMUNIZACIÓN	DÍA	No. DE RATONES	CANTIDAD DE Toxina (µg)	PBS (µl)	ADYUVANTE (tipo)
1	1	10	5	95	CF
2	11	10	10	90	IF
3	21	10	15	85	Alúmina
4	31	10	20	80	IF
5	41	10	25	75	Alúmina
Reto	51				
Sangría total	53				

Tabla 23. Reto de ratones inmunizados con el híbrido de la toxina Cn2		
Prueba	DL_{50} de Veneno de *Centruroides noxius*	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	3 DL_{50}	0/3
Grupo de ratones inmunizados con la toxina recombinante Cn2	3 DL_{50}	9/10

Siguiendo el esquema de inmunización descrito anteriormente, detallaremos los resultados obtenidos con el híbrido (proteína de fusión) de la toxina recombinante Cn2 de *Centruroides noxius*. Primero, se inmunizaron 10 ratones de la cepa CD1. Se comenzó inyectando 5 μg de híbrido rCn2His hasta llegar a 25 μg en la ultima inoculación, en un volumen final de 100 μl de solución. Con el fin de evaluar la efectividad de los anticuerpos generados por los ratones inmunizados, estos mismos se retaron directamente (mediante inyección) con veneno total de *C. noxius*. Para el reto se usaron un grupo control de 3 ratones (a los cuales se les inyectó solo veneno total de *C. noxius*) y el grupo de los ratones previamente inmunizados. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea con 3 DL_{50} de veneno total de *C. noxius* en un volumen final de 200 μl de PBS. En este ensayo murieron todos los ratones del grupo control mientras que en el grupo de los ratones previamente inmunizados únicamente murió uno de los 10 ratones (Tabla 23). Los 9 ratones inmunizados y retados con el veneno total de C. noxius que sobrevivieron (Tabla 23) fueron sangrados 48 horas después del reto para determinar los títulos de anticuerpos presentes en el suero obtenido. La inmunización dió como resultado la generación de anticuerpos que reconocen específicamente a la toxina recombinante Cn2 y al veneno total. La titulación de los sueros por ELISA, reveló que los títulos finales de la mezcla de suero, de los 9 ratones sobrevivientes, fueron de 16997 contra el hibrido de la toxina Cn2 recombinante y de 9165 contra el veneno total (Figura 19).

Dado el éxito obtenido con el híbrido de la toxina Cn2 y sus propiedades inmunogénicas para generar suero neutralizante del veneno total de *C. noxius*, se decidió realizar otro esquema de inmunización con una mezcla de la proteína de fusión de la toxina CII1 y la proteína de

fusión de la toxina CII2, con el objetivo de evaluar la capacidad del suero neutralizante generado y evaluarlo contra el veneno total de *C. limpidus limpidus*. De manera similar, se inmunizaron ratones con la proteína de fusión de la toxina CssII, con el objetivo de evaluar la capacidad neutralizante del suero generado contra el veneno total de C. suffusus suffusus. En ambos casos se siguio el siguiente esquema (3) de inmunización:

Esquema de inmunización 3 en ratones (CD1) empleado con la mezcla de los híbridos de las toxinas CII1 y CII2 de *Centruroides limpidus limpidus* y para la toxina CssII de *Centruroides suffusus suffusus:*

No. DE INMUNIZACIÓN	DÍA	No. DE RATONES	CANTIDAD DE Toxina (µg) total	ADYUVANTE (tipo)
1	13 Oct 2012	10	30	Completo
2	25 Oct 2012	10	30	Incompleto
3	4 Nov 2012	10	30	Alúmina
4	16 Nov 2012	10	30	Incompleto
5	26 Nov 2012	10	30	Alúmina
6	6 Dic 2010	10	30	Incompleto
Reto	16 Dic 2010			

Tabla 24. Reto de ratones inmunizados con los híbridos de las toxinas CII1 y CII2, contra el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*.

Prueba	DL_{50} de veneno de *C. limpidus* (recién ordeñado)	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	1 DL_{50}	4/6
Grupo de ratones inmunizados con la toxina recombinante CII1 y CII2	1 DL_{50}	5/6 el único ratón que murió tardó 3 horas más que el control

Nota: se determinó previamente la DL_{50} para el veneno usado en esta prueba: 1 DL_{50}= 15 µg por 20 g peso de ratón. Vía intraperitoneal.

Tabla 25. Reto de ratones inmunizados con el híbrido de la toxina CssII de *Centruroides suffusus suffusus.*

	DL_{50} de veneno de *C. suffusus suffusus*	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	3 DL_{50}	0/3
Grupo de ratones inmunizados con la toxina recombinante CssII	3 DL_{50}	10/10

Nota: 1 DL_{50} de veneno de *C. suffusus suffusus* = 10.3 μg por 20 g peso de ratón. Vía intraperitoneal.

Una vez concluido el esquema de inmunización se decidio retar directamente a los ratones inmunizados con el veneno total correspondiente. Para el caso del reto con el veneno total de *C. limpidus limpidus*, se utilizó un grupo control de 6 ratones a los cuales se les inyectó 1 DL_{50} de veneno de *C. limpidus limpidus* y un segundo grupo integrado por 6 de los ratones inmunizados con la mezcla de los híbridos de las toxinas CII1 y CII2, a los cuales se les inyectó directamente 1 DL_{50} de veneno de *C. limpidus limpidus.* Dos de los seis ratones del grupo control murieron pero los cuatro ratones restantes presentaron síntomas graves de intoxicación por mas de 24 horas (Tabla 24). En el grupo de los ratones inmunizados retados con el veneno, solo murió un ratón pero este sobrevivió tres horas mas con respecto a los ratones que murieron en el grupo control (Tabla 24). Los 5 ratones sobrevivientes no presentaron sintomatología grave de intoxicación. Este resultado sugiere que los híbridos de las toxinas recombinantes CII1 y CII2 funcionan como inmunogenos y son capaces de generar en el animal inmunizado, anticuerpos que reconocen a las toxinas nativas CII1 y CII2, respectivamente y por lo tanto logran neutralizar el veneno del alacrán *C. limpidus limpidus.*

De la misma forma se evaluó el híbrido de la toxina CssII recombinante y su capacidad de generar anticuerpos neutralizantes contra el veneno total de *Centruroides suffusus suffusus.* Para el objetivo mencionado se inmunizaron 10 ratones de la cepa CD1 bajo el esquema de inmunización anterior: Se realizaron 6 inmunizaciones vía subcutánea inyectando 30 μg de rCssIIHis en cada una de ellas, en un volumen final de 100 μl de solución de PBS 1X. Se

obtuvieron dos sangrías a lo largo de las inmunizaciones para estimar y comparar los anticuerpos que iban generando los ratones. Una vez terminado el protocolo de inmunización, se evaluó la efectividad de los anticuerpos generados retando a los ratones inmunizados con veneno total. Se usaron como control un grupo de 3 ratones de aproximadamente 20 gramos. Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 3 DL_{50} de veneno total de *Centruroides suffusus suffusus* en un volumen final de 200 µl de PBS 1X. No se observó sobrevivencia de ninguno (lo que era esperado pues se usaron 3 DL_{50}) de los ratones control mientras que de los ratones retados, sobrevivió el 100% (Tabla 25). Los ratones inmunizados y que sobrevivieron al ser retados con el veneno de *C. suffusus suffusus*, fueron sangrados 48 horas después del reto para determinar el título de los anticuerpos generados y esto se determinó mediante ensayo de ELISA utilizando a la toxina rCn2 y al veneno total como antígenos, el título de los anticuerpos generados. Los títulos finales de la mezcla de suero de los 10 ratones fueron de 11,011 contra la toxina de fusión con CssII recombinante y de 1,890 contra el veneno total (Figura 20).

Los resultados anteriores permiten concluir que las toxinas recombinantes fueron capaces de inducir la generación de anticuerpos neutralizantes y con ello proteger a los ratones contra de la intoxicacion por veneno de alacranes de este género.

Inmunógenos recombinantes de alacranes de Sudamérica.

También se diseñaron oligonucleótidos externos e internos para ensamblar los segmentos de DNA que codifican para cada una de las 3 toxinas del veneno del alacrán *Tityus serrulatus*: Ts1, Ts3 y TsNTXp del alacrán *Tityus serrulatus* con uso preferencial de codones de *Escherichia coli*. Ver figuras 21 y 22. Estos oligonucleótidos se sintetizaron mediante síntesis química. Véase Figuras 23A-23C.

Realizamos el ensamble de la secuencia nucleotídica mediante PCR recursivo y su clonación en el vector pBluescriptKS(-)tal y como se describió para los antígenos recombinantes anteriores. Las construcciones fueron secuenciadas para verificar que el ensamble y secuencia clonada de cada segmento de DNA que codifica para la toxina corespondiente fuera correcta. De manera similar al grupo anterior, se preparó el vector de expresión pET22b-Tiorredoxina que contiene también un sitio de corte para la enzima enteroquinasa. La inserción en este vector de expresión, de los segmentos de DNA que codifican para las respectivas toxinas, se realizó de la misma manera que la descrita para las recombinantes anteriores. Ver Figura 24.

Cada uno de los vectores de expresión conteniendo el gen codificante para la toxina fue electroporado en *E. coli* cepa BL21 (DE3) también de la misma manera que la ya descrita para los antígenos anteriores. Se procedió a obtener un extracto periplásmico bacteriano

conteniendo a la proteína de fusión bajo el control del promotor T7. Este extracto se utilizó para la purificación de la proteína utilizando columnas de afinidad. Véase ejemplo en la figura 25.

Las proteínas de fusión expresadas se purificaron mediante cromatografía de afinidad y HPLC, tal y como se describió para el grupo anterior, Las proteínas se eluyeron con 400 mM de imidazol en PBS 1X (vease ejemplo en la Figura 25 (A) III). Los péptidos obtenidos fueron separados en una columna C18 (25mm x 4.1mm) con un gradiente de 20 a 80% de solvente B en un lapso de 40 min y se colectaron manualmente por monitoreo de absorbancia a 230 nm (Figuras 26A-26C).

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel discontinuo de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes(SDS-PAGE), por el método también ya descrito anteriormente Véase como ejemplo la Figura 25 A.

Las digestiones de las proteínas de fusión de Tityus se realizaron con la proteasa enterocinasa (EK), también se obtuvieron sus masas moleculares mediante MALDI-TOF o ESI-.ION-TRAP como ya se describió. Los ensayos de ELISA tambien se realizaron de manera similar a la descrita y los resultados se muestran en la Figura 27.

La actividad tóxica de cada antígeno recombinante de *T. serrulatus* fue evaluada en ratones cepa CD1, a los cuales se les inyectó vía intraperitoneal diez veces la dosis DL_{50} reportada para cada toxina. El resultado obtenido fue que a esa concentración la proteína no ejerce ningún efecto tóxico sobre el ratón, debido a que la toxina al tener fusionada a la tiorredoxina en su extremo N-terminal, afecta su actividad sobre los canales de sodio probablemente por impedimento estérico. Sin embargo, el hecho de que como proteína de fusión la toxina no sea tóxica es una de las principales ventajas al utilizarla como antigeno, ya que al inmunizar animales no hay peligro de que el animal sujeto al proceso de inmunización sufra el efecto tóxico de la recombinante, permitiendo de esta forma inmunizarlos con altas dosis del antígeno.

Para los ensayos de neutralización, primero se inmunizaron 10 ratones de la cepa CD1 de 17 g en promedio (ver Esquema de inmunización 1). El inmunógeno utilizado fue la proteína de fusión de Ts1 (SEC ID No1a). La inyección del inmunógeno se realizó por vía subcutánea. La emulsión se preparó con la toxina disuelta en PBS al 1X con adyuvante completo de Freund en la primera inmunización, e incompleto (aceite mineral) o alúmina en las siguientes inmunizaciones. La inmunización se realizó inyectando la toxina en 100 µl de solución por ratón en cada ocasión, con un período de aproximadamente 10 días entre inmunizaciones. Se comprobó la generación y el incremento de anticuerpos en suero contra el veneno total y las toxinas nativas por ensayos de ELISA.

Esquema de inmunización 1: Inmunización de ratones cepa CD1 con la proteína de fusión de Ts1 de *Tityus serrulatus*.

No. DE INMUNIZACIÓN	DÍA	No. DE RATONES	CANTIDAD DE Toxina (µg) total	ADYUVANTE (tipo)
1	13 Oct 2012	10	30	Completo
2	25 Oct 2012	10	30	Incompleto
3	4 Nov 2012	10	30	Alúmina
4	16 Nov 2012	10	30	Incompleto
5	26 Nov 2012	10	30	Alúmina
6	6 Dic 2010	10	30	Incompleto
Reto	16 Dic 2010			
Sangría total	21 Dic 2010			

Después de la última inmunización se realizaron pruebas de neutralización de 1 y 3 DL_{50} de veneno (ver Tabla 26).

Tabla 26. Reto directo de ratones inmunizados con el híbrido de la toxina Ts1 de *Tityus serrulatus* contra el veneno total de *T. serrulatus*.

Prueba	DL_{50} de veneno de *T. serrulatus*	Proporción de ratones sobrevivientes respecto al total de ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	1 DL_{50}	5/6
Grupo de ratones inmunizados con la toxina recombinante Ts1	1 DL_{50}	6/7
Grupo de ratones inmunizados con la toxina recombinante Ts1	3 DL_{50}	0/2

Nota: 1 DL_{50} de veneno de *T. Serrulatus*= 13.2 µg por 20 g peso de ratón. Vía intraperitoneal.

Como puede observarse en los resultados de neutralización del veneno total de *Tityus serrulatus* (Tabla 26), el híbrido de la toxina Ts1 recombinante funciona como inmunógeno, ya que seis de los siete ratones inmunizados con esta proteína sobrevivieron al ser retados directamente con 1 DL_{50} de veneno total de *T. serrulatus*. Dos de los ratones inmunizados

con el híbrido de la toxina Ts1 no sobrevivieron al ser retados directamente con 3 DL_{50} el veneno total, pero esto era de esperarse ya que como se mencionó en la introducción de este documento, existen otras toxinas en el veneno de *T. serrulatus* que participan de manera importante en el envenenamiento por la picadura de este alacrán.

Con el fin de obtener un suero mas potente y capaz de neutralizar el veneno de *Tityus serrulatus*, se propuso un esquema de inmunización en conejos. Con la finalidad de neutralizar no solo a la toxina Ts1 presente en dicho veneno sino a otras toxinas importantes, se decidió emplear, como inmunógenos, los híbridos de las toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP. Para este fin, se inmunizaron tres conejos Nueva Zelanda de 2.5 kg, con la mezcla de los tres inmunógenos recombinantes, la administración fue vía subcutánea, inyectando la mezcla de toxinas recombinantes en un volumen final de 500 µl de PBS 1X.

Los 3 conejos (números 33, 34 y 36) se inmunizaron, como se mencionó anteriormente, con la mezcla de las toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP del Alacrán *Tityus serrulatus* (ver esquema de inmunización 2). En el caso del conejo 33 se realizaron solo 6 inmunizaciones con la mezcla de las toxinas recombinantes y los conejos 34 y 36 recibieron además 3 inmunizaciones adicionales con veneno de *Tityus serrulatus* (ver esquema de inmunización 3). Las inmunizaciones se aplicaron con un lapso aproximado de 10 días entre ellas.

Esquema de inmunización 2: Inmunización de los conejos 33, 34 y 36, con la mezcla de los híbridos de toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP del alacrán *Tityus serrulatus*.

CONEJO 33	**Adyuvante (µl)**		**Toxinas recombinantes Ts1+Ts3+TsNTxP (µg)**	**µl subcutáneo/ conejo**
1ª inmunización	**Completo**	**250**	**30**	**500**
2ª inmunización	**Incompleto**	**250**	**30**	**500**
3ª inmunización	**Alúmina**	**250**	**50**	**500**
4ª inmunización	**Incompleto**	**250**	**50**	**500**
5ª inmunización	**Alúmina**	**250**	**80**	**500**
6ª inmunización	**Incompleto**	**250**	**80**	**500**

Únicamente los conejos 33 y 34 recibieron 3 refuerzos de veneno total como se muestra en el siguiente esquema:

Esquema de inmunización 3: refuerzos con veneno a los conejos 34 y 36.

REFUERZO CON VENENO TOTAL

	Adyuvante (µl)		Veneno total (µg)	µl subcutáneo/ conejo
7ª inmunización	**Alúmina**	**250**	**30**	**500**
8ª inmunización	**Incompleto**	**250**	**30**	**500**
9ª inmunización	**Alúmina**	**250**	**30**	**500**

Después del último refuerzo, ya sea con la mezcla de los híbridos de las toxinas recombinantes, para el caso del conejo 33, o con refuerzo de veneno total, para el caso de los conejos 34 y 35, se realizaron ensayos de ELISA con el suero de los conejos, para observar el reconocimiento de los anticuerpos generados por las inmunizaciones contra las toxinas recombinantes y contra el veneno de *Tityus serrulatus*. Un ejemplo de esta evaluación puede verse en la Figura 27.

Posterior a los ensayos de ELISA, se evaluó la capacidad neutralizante de cada uno de los sueros de los conejos inmunizados con las toxinas recombinantes en contra del veneno de Tityus serrulatus (ver Tabla 27). A continuación se muestra los datos del ensayo de neutralización y los resultados obtenidos:

Tabla 27. Ensayos de neutralización con veneno de *Tityus serrulatus* utilizando el suero de los conejos inmunizados con la mezcla de los híbridos de las toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP.

Prueba	DL_{50} de veneno de *Tityus serrulatus*	Proporción de ratones sobrevivientes respecto a los ratones inyectados
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	2 DL_{50}	0/6
Grupo de ratones inyectados con veneno y **suero del conejo 33**	2 DL_{50}	0/6
Grupo de ratones inyectados con veneno y **suero del conejo 34**	2 DL_{50}	5/6
Grupo de ratones inyectados con veneno y **suero del conejo 36**	2 DL_{50}	**6/6**
Grupo de ratones control (solo se les inyectó veneno)	3 DL_{50}	0/6
Grupo de ratones inyectados con veneno y **suero del conejo 34**	3 DL_{50}	1/6
Grupo de ratones inyectados con veneno y **suero del conejo 36**	3 DL_{50}	**6/6**

1 DL_{50} =13.2 µg/ 20g ratón; 2 DL_{50} = 26.4 µg/ 20g ratón; 3 DL_{50} = 39.6 µg/ 20g ratón

Stock veneno = 2.5 µg/µl.

Con base en los resultados de neutralización mostrados en la Tabla 27, puede notarse que, como era de esperarse, los grupos de ratones control que fueron inyectados con 2 DL_{50} ó 3 DL_{50} de veneno total de *Tityus serrulatus*, todos murieron.

El suero del conejo 36, fue el mejor en cuanto a capacidad neutralizante, ya que se pudieron neutralizar tanto 2 DL_{50} como 3 DL_{50} de veneno total de *Tityus serrulatus*. Este resultado indica que la mezcla de los híbridos recombinantes de las toxinas Ts1, Ts3 y TsNTxP induce una buena respuesta inmune, la cual se ve incrementada al aplicar veneno total en los ultimos refuerzos de inmunización.

Es importante señalar que solamente dos inmunizaciones con veneno total no serían suficientes para lograr los títulos de anticuerpos encontrados con el uso de las mezclas de las proteínas de fusión. Es evidente que las toxinas de fusión descritas enriquecen la respuesta inmunológica.

Con el objetivo de no utilizar ningun refuerzo extra de veneno en las inmunizaciónes, se planteó la estrategia de inmunizar solo con las toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP, pero sin proteína de fusión (tiorredoxina), por lo cual se decidió expresarlas en el sistema de expresión pQE30. Se produjeron las proteínas recombinantes solo fusionadas a 6-His y al sitio de corte para enterocinasa (EK) de manera contigua para conferir estabilidad y un plegamiento adecuado. Con esto se espera que al inmunizar con ellas se enriquezca más la respuesta inmunológica, o mejor aún, no se requiera refuerzo con veneno total. Al final se obtendrían sueros con mayor potencia en su capacidad neutralizante. Esta alternativa fue exitosa en el caso de la expresión de las toxinas Pg8 y CssII (ambas toxinas protegidas con sus respectivas patentes García-Gómez et al., 2008 y Corzo-Burguete et al., 2011).

Para expresar las toxinas Ts1, Ts3 y TsNTxP, sin la proteína de fusión, se decidió utilizar el sistema de expresión en el vector pQE30 que como mencionamos, fue exitoso en el caso de la expresión de la toxina Pg8 y CssII (ambas toxinas protegidas en sus respectivas patentes García-Gómez et al., 2008 y Corzo-Burguete et al., 2011). Esto con el objetivo de centralizar la generación de anticuerpos neutralizantes enriquecidos solo contra las toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP.

La secuencia nucleotídica del gen que codifica para el péptido Ts1, del alacrán *Tityus serrulatus* con uso preferencial de codones de *E. coli* y su traducción en aminoácidos es la siguiente:

```
K   E   G   Y   L   M   D   H   E   G   C   K   L   S   C   F   I
aaa gaa ggc tat ctg atg gat cat gaa ggc tgc aaa ctg agc tgc ttt att
ttt ctt ccg ata gac tac cta gta ctt ccg acg ttt gac tcg acg aaa taa

 R   P   S   G   Y   C   G   R   E   C   G   I   K   K   G   S   S
cgc ccg agc ggc tat tgc ggc cgc gaa tgc ggc att aaa aaa ggc agc agc
gcg ggc tcg ccg ata acg ccg gcg ctt acg ccg taa ttt ttt ccg tcg tcg

 G   Y   C   A   W   P   A   C   Y   C   Y   G   L   P   N   W   V
ggc tat tgc gcg tgg ccg gcg tgc tat tgc tat ggc ctg ccg aac tgg gtg
ccg ata acg cgc acc ggc cgc acg ata acg ata ccg gac ggc ttg acc cac

 K   V   W   D   R   A   T   N   K   C
```

aaa gtg tgg gat cgc gcg acc aac aaa tgc
ttt cac acc cta gcg cgc tgg ttg ttt acg

La secuencia nucleotídica del gen que codifica para el péptido TsNTxP, del alacrán *Tityus serrulatus* con uso preferencial de codones de *E. coli* y su traducción en aminoácidos es la siguiente:

G R E G Y P A D S K G C K I T C F
ggt cgt gaa ggt tac ccg gcg gac tct aaa ggt tgc aaa atc acc tgc ttc
cca gca ctt cca atg ggc cgc ctg aga ttt cca acg ttt tag tgg acg aag

L T A A G Y C N T E C T L K K G S
ctg acc gcg gcg ggt tac tgc aac acc gaa tgc acc ctg aaa aaa ggt tct
gac tgg cgc cgc cca atg acg ttg tgg ctt acg tgg gac ttt ttt cca aga

S G Y C A W P A C Y C Y G L P D S
tct ggt tac tgc gcg tgg ccg gcg tgc tac tgc tac ggt ctg ccg gac tct
aga cca atg acg cgc acc ggc cgc acg atg acg atg cca gac ggc ctg aga

V K I W T S E T N K C G
gtt aaa atc tgg acc tct gaa acc aac aaa tgc ggt
caa ttt tcg acc tcc aga ctt tgg ttg ttt acg cca

La secuencia nucleotídica del gen que codifica para la toxina Ts3, del alacrán *Tityus serrulatus* con uso preferencial de codones de *E. coli* y su traducción en aminoácidos es la siguiente:

K K D G Y P V E Y D N C A Y I C W
aaa aaa gac ggt tac ccg gtt gaa tac gac aac tgc gcg tac atc tgc tgg
ttt ttt ctg cca atg ggc cgg ctt atg ctg ttg acg cgc atg tag acg acc

N Y D N A Y C D K L C K D K K A D
aac tac gac aac gcg tac tgc gac aaa ctg tgc aaa gac aaa aaa gcg gac
ttg atg ctg ttg cgc atg acg ctg ttt gac acg ttt ctg ttt ttt cgc ctg

S G Y C Y W V H I L C Y C Y G L P
tct ggc tac tgc tac tgg gtt cac atc ctg tgc tac tgc tac ggt ctg ccg
aga ccg atg acg atg acc caa gtg tag gac acg atg acg atg cca gac ggc

D S E P T K T N G K C K S
gac tct gaa ccg acc aaa acc aac ggt aaa tgc aaa tct
ctg aga ctt ggc tgg ttt tgg ttg cca ttt acg ttt aga

Una vez obtenido el gen recombinante por PCR que codifica para Ts1, se analizó la secuencia nucleotídica para observar el uso preferencial de codones de *E. coli* y el resultado de este analisis puede verse en la Figura 21.

El vector utilizado para su expresión fue el vector pQE-30 (QIAGEN) y la cepa Bacteriana: *Escherichia coli* Origami. En la figura 28 se muestra unb esquema de la construcción del vector de expresión. Para la clonación en pQE30 se realizó PCR recursivo. El ensamble de cada gen se realizó utilizando Vent DNA Polymerase (New England Biolabs, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los dos oligonucleótidos externos se usaron a una concentración final de 0.2 pmol/µl y los oligonucleótidos internos a una concentración de 0.02 pmol/µl. Las condiciones de PCR fueron: 5 min a 94°C, seguido por 8 ciclos con una temperatura baja de alineamiento (94°C 30 seg, 50°C 1 min ,72°C 1 min), y luego 25 ciclos cortos con una temperatura alta de alineamiento (94°C 30 seg, 55°C 30 seg, 72°C 30 seg), finalizando con 10 min de incubación a 72°C.

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% y purificados con el kit QIAQuick gel extraction kit (QIAGEN, USA). Se empleó la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas, Canadá) para clonar los productos de PCR dentro del vector pQE30 (digeridos previamente con las enzimas *BamH*I y *Pst*I; New England BioLabs, USA). Con el producto de la ligación se transforma a las células electrocompetentes DH5α y subsecuentemente son plaqueadas en cajas Petri con medio 2xYT adicionado con ampicilina (200 µg/ml). Las clonas resultantes se verifican por PCR con los oligonucleótidos pQE30Forw (5'-GAG CGG ATA ACA ATT ATA A-3') y pQE30Rev (5'-GGT CAT TAC TGG ATC TAT-3'). Las clonas que por PCR dieron el tamaño esperado (~250 pb), se amplificaron y el DNA plasmídico se purificó por medio del método de lisis alcalina.

Las construcciones se secuenciaron para verificar que la secuencia clonada que codifica para cada toxina se encuentre en el marco de lectura correcto. A continuación se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes a cada una de las toxinas recombinantes clonadas en el vector de expresión pQE30.

M-6His-Fxa-**Ts1** *(77 aa)*

Peso Molecular = 8744.9 Da

SEQ ID NO: 36

M R G S H H H H H H G S I E G R **K E G Y**

atgagaggatcgcatcaccatcaccatcacggatccatcgagggaaggaaagaaggctat

L M D H E G C K L S C F I R P S G Y C G

ctgatggatcatgaaggctgcaaactgagctgctttattcgcccgagcggctattgcggc

R E C G I K K G S S G Y C A W P A C Y C

cgcgaatgcggcattaaaaaaggcagcagcggctattgcgcgtggccggcgtgctattgc

Y G L P N W V K V W D R A T N K C

tatggcctgccgaactgggtgaaagtgtgggatcgcgcgaccaacaaatgc

M-6His-EK-**Ts3** *(82 aa)*

Peso Molecular = 9499.4 Da

SEQ ID NO: 37

M R G S H H H H H H G S G D D D D K K K

atgagaggatcgcatcaccatcaccatcacggatccggtgatgacgatgacaaaaaaaaa

D G Y P V E Y D N C A Y I C W N Y D N A

gacggttacccggttgaatacgacaactgcgcgtacatctgctggaactacgacaacgcg

Y C D K L C K D K K A D S G Y C Y W V H

tactgcgacaaactgtgcaaagacaaaaaagcggactctggctactgctactgggttcac

I L C Y C Y G L P D S E P T K T N G K C

atcctgtgctactgctacggtctgccggactctgaaccgaccaaaaccaacggtaaatgc

K S

aaatct

M-6His-EK-**TsNTxP** *(81 aa)*

Peso Molecular = 8746.7 Da

SEQ ID NO: 38

M R G S H H H H H H G S G D D D D K G R

atgagaggatcgcatcaccatcaccatcacggatccggtgatgacgatgacaaaggtcgt

E G Y P A D S K G C K I T C F L T A A G
gaaggttacccggcggactctaaaggttgcaaaatcacctgcttcctgaccgcggcgggt

Y C N T E C T L K K G S S G Y C A W P A
tactgcaacaccgaatgcaccctgaaaaaaggttcttctggttactgcgcgtggccggcg

C Y C Y G L P D S V K I W T S E T N K C
tgctactgctacggtctgccggactctgttaaaatctggacctctgaaaccaacaaatgc

G
ggt

Para la expresión de las toxinas recombinantes M-6His-FXa-Ts1, M-6His-FXa-Ts3 y M-6His-FXa-TsNTxP, se utilizó a la cepa *E. coli* Origami, transformada mediante choque térmico. Después de que el cultivo llegó a la DO recomendada, se indujo la expresión de las recombinantes con IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se mantuvo el crecimiento por 6 a 8 h más a 30 °C agitando a 120 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 6,500 x g durante 5 min a 4 °C en botellas para centrífuga de 250 ml. El paquete celular se lavó con 200 ml de una solución de Tris 50 mM, pH 8 y se centrifugó nuevamente a 6,500 x g por 5 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 25 ml de la misma solución adicionada con 0.3 mg lisozima/ml. Las células se rompieron utilizando 3 ciclos de sonicación de 6 minutos con pulsos de 40 s y 20 s de reposo permitiendo 10 minutos entre cada ciclo, las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. El extracto se centrifugó a 8,000 x g por 20 min, y se eliminó el sobrenadante (Fracción soluble). La pastilla celular se lavó con 20 ml de Tris 20 mM pH 8, se centrifugó a 8000 x g por 15 min, se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados más. La pastilla resultante se trató con 15 ml de una solución desnaturalizante de Tris 50 mM, 6 M de cloruro de guanidina a pH 8 y agitación suave, para extraer la proteína insoluble que se aglomera como cuerpos de inclusión. Finalmente la preparación se centrifugó a 8,000 x g a 4 °C durante 1h. La proteína de interés se obtiene tanto en forma insoluble como soluble, por lo que se purifica la proteína de ambas fracciones.

Para la purificación de las proteínas recombinantes de fusión presentes en la fracción soluble, se siguió el protocolo de afinidad a Níquel (QIAexpress® System, QUIAGEN), aprovechando que las proteínas de fusión a las toxinas contienen en el extremo N-terminal una cola de histidinas las cuales son afines al níquel y nos permiten separarlas fácilmente de otras proteínas de *E. coli*. La metodología fue la siguiente:

1. Preparar una mini columna conteniendo 1.5 ml de resina de Níquel-NTA Agarosa (Qiagen).
2. Equilibrar cada columna con 10 volúmenes de buffer 20 mM de imidazol en 50 mM Tris-HCl pH 8.0.
3. Cargar las muestras de proteína en la columna y dejar fluir por gravedad hasta pasar el total de la muestra.
4. Lavar con 10 volúmenes de buffer 30 mM de imidazol en 50 mM Tris-HCl pH 8.0, para eliminar el pegado inespecífico.
5. Eluir la proteína recombinante con 5 volúmenes de buffer 300 mM de imidazol en 50 mM Tris-HCl pH 8.0.

Para la purificación de las proteínas recombinantes de fusión de la fracción insoluble el protocolo fue el siguiente:

1. Preparar una mini columna conteniendo 1.5 ml de resina de Níquel-NTA Agarosa (Qiagen).
2. Equilibrar cada columna con 10 volúmenes de buffer 20 mM de imidazol en 50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 6 M de Cloruro de guanidinio.
3. Cargar las muestras de proteína en la columna y dejar fluir por gravedad hasta pasar el total de la muestra.
4. Lavar con 10 volúmenes de buffer 30 mM de imidazol en 50 mM Tris-HCl pH 8 y 6 M de Cloruro de guanidinio, para eliminar el pegado inespecífico.
5. Eluir la proteína recombinante con 5 volúmenes de buffer 300 mM de imidazol en 50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 6 M de Cloruro de guanidinio.

Se continuó con el ensayo de plegamiento *in vitro*. Las condiciones de plegamiento fueron las siguientes: Tris 0.2 M, cloruro de guanidina 2 M, pH 8 con GSH:GSSG 1 mM:0.1 mM respectivamente, durante 4 °C durante 72 horas. Posteriormente, las proteínas plegadas se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

Se evaluó la expresión y purificación de la proteína de fusión M-6His-FXa-Ts1 en un gel de poliacrilamida al 15% (ver figura 29).

Después de la purificación por afinidad y del ensayo de plegamiento, se realizó una purificación de la recombinante M-6His-Fxa-*Ts1* por cromatografía de líquidos de alta presión por fase reversa (RP-HPLC). Para la implementación de este paso, se empleó una columna analítica C_{18} (Vydac, U.S.A) y un gradiente de buffer A (Agua + 0.12% de TFA) a buffer B (Acetonitrilo + 0.1% de TFA) de 20- 60 % en 40 minutos. La proteína de fusión de interés eluye en un tiempo de 16 minutos, como se indica con una flecha en la Figura 30.

A la fracción correspondiente al tiempo de retención de 16 minutos se le determinó la masa molecular por espectrometría de masas, obteniendo la serie iónica observada en la Figura 31, la cual indica que la masa experimental es la misma que la teórica, la cual corresponde a 8,741.98 Da.

Para la proteína de fusión M-Fxa-EK-Ts3 también se evaluó la expresión y purificación en un gel de poliacrilamida al 15% (ver figura 32).

Para la proteína de fusión recombinante M-6His-EK-Ts3, posterior a su purificación por afinidad y al ensayo de plegamiento también se realizó su purificación por cromatografía de líquidos de alta presión por fase reversa (RP-HPLC) de manera similar que como se describe anteriormente para M-6His-Fxa-Ts1. La proteína de fusión de interés es eluída alrededor de los 15.8 minutos, como se muestra en la Figura 33.

A la fracción correspondiente al tiempo de retención de 16 minutos se le determinó la masa molecular a través de un espectrómetro de masas, obteniendo la serie iónica observada en la Figura 34, la cual indica que la masa experimental es la misma que la teórica, la cual corresponde a 9,493.8 Da.

Se evaluó la expresión y purificación de la proteína de fusión M-6His-EK-TsNTxP en un gel de poliacrilamida al 15%. Ver figura 35.

Para la proteína de fusión recombinante M-6His-EK-TsNTxP, posterior a su purificación por afinidad y al ensayo de plegamiento también se realizó su purificación por cromatografía de líquidos de alta presión por fase reversa (RP-HPLC) de manera similar que como se describe anteriormente para M-6His-Fxa-Ts1. La proteína de fusión de interés eluye a los 15 minutos, como se muestra en la Figura 36.

A la fracción correspondiente al tiempo de retención de 15 minutos se le determinó la masa molecular a través de un espectrómetro de masas, obteniendo la serie iónica observada en la Figura 37, la cual indica que la masa experimental es la misma que la teórica, la cual corresponde a 8,742.2 Da.

Una vez purificadas las proteínas de fusión correspondientes a las proteínas Ts1, Ts3 y TsNTxP se realizó la inmunización en conejos de de 2.5 kg de la cepa Nueva Zelanda, esperando producir con ello anticuerpos con la capacidad de neutralizar al veneno completo del alacrán *Tityus serrulatus*. La administración fue vía subcutánea, inyectando la mezcla de toxinas en un volumen final de 500 µl de PBS 1X. A continuación, se muestra el Esquema de inmunización empleado:

Esquema de inmunización en conejos (71, 72 y 73) con las toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP (Expresadas en pQE-30):

INMUNIZACIÓN	FECHA (AÑO 2014)	ADYUVANTE (µL)		µG POR TOXINA RECOMBINANTE	µL SUBCUTÁNEO/CONEJO	SANGRÍA
1ª	1 de Julio	Completo	250	10	500	Preinmune
2ª	11 de Julio	Incompleto	300	10	600	--
3ª	22 de Julio	Alúmina	300	20	600	--
4ª	1 de Agosto	Incompleto	300	20	600	1ª Sangría
5ª	11 de Agosto	Alúmina	300	30	600	
6ª	22 de Agosto	Incompleto	300	30	600	2ª Sangría
7ª	1 de Septiembre	Alúmina	300	40	600	
8ª	11 de Septiembre	Incompleto	300	40	600	4ª Sangría

Se realizaron ensayos de ELISA de reconocimiento del suero de los conejos inmunizados (Tablas 28 y 29) contra las toxinas recombinantes y contra el veneno total de *Tityus serrulatus*.

Tabla 28. Títulos de anticuerpos del suero de los conejos inmunizados contra los antígenos recombinantes durante la 6ª Inmunización.

Suero	Título contra la Toxina rTs1	Título contra la Toxina rTs3	Título contra la Toxina rTsNTxP
Conejo 71	90621 ± 10652	17090 ± 1236	9361 ± 1286
Conejo 72	381427 ± 37731	139034 ± 15248	84679 ± 14176
Conejo 73	305391 ± 53702	86627 ± 11816	71598 ± 7127

Tabla 29. Títulos de anticuerpos de los sueros de conejos inmunizados contra el veneno total de *Tityus serrulatus* durante la 6ª Inmunización.

suero	Título contra veneno de *Tityus serrulatus*
Conejo 71	1384 ± 228
Conejo 72	15210 ± 205
Conejo 73	887 ± 143

Los resultados de esta Tabla en la que se muestran los títulos de anticuerpos obtenidos contra el veneno total de Tityus serrulatus, indican que se estaría neutralizando completamente el veneno utilizando como inmunógeno únicamente la mezcla de las toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP.

A continuación se muestra el esquema de inmunización que se siguió:

Esquema de inmunización en conejos (71, 72 y 73) con las toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP (expresadas en pQE-30)

Inmunización	Fecha (año 2014)	Adyuvante	Adyuvante (µl)	µg por Toxina Recombinante	µl subcutáneo/ conejo	Sangría
1ª	1 de Julio	Completo	250	10	500	**Preinmune**
2ª	11 de Julio	Incompleto	300	10	600	--
3ª	22 de Julio	Alúmina	300	20	600	--
4ª	1 de Agosto	Incompleto	300	20	600	**1ª Sangría**
5ª	11 de Agosto	Alúmina	300	30	600	
6ª	22 de Agosto	Incompleto	300	30	600	**2ª Sangría**
7ª	1 de Septiembre	Alúmina	300	40	600	
8ª	11 de Septiembre	Incompleto	300	40	600	**3ª Sangría**
9ª	22 de Septiembre	PBS		60	600	
	26 de Septiembre de 2014					**4ª Sangría**
10ª	02 de Octubre	Alúmina	300	120	600	
11ª	17 de Octubre	Incompleto	300	40	600	**5ª Sangría**
REFUERZO CON VENENO						
12ª	29 de Octubre	Alúmina	300	50	600	
13ª	14 de Noviembre	Incompleto	300	50	600	**6ª Sangría**
26 de Noviembre						**7ª Sangría a blanco**

Para evaluar el suero de cada uno de los conejos inmunizados y determinar si el suero es capaz de reconocer al veneno total de *Tityus serrulatus* y se determinaron los títulos de cada uno de los sueros mediante ensayos ELISA y el protocolo a seguir fue el siguiente:

Ensayo de ELISA

1. En placas de ELISA se agregó 100 µl/ pozo del antígeno (Veneno total de *Tityus serrulatus* 10 µg/ml) en buffer de bicarbonato de sodio 50 mM pH=9.4. Se incubó toda la noche (12-16 horas) a 4°C. Se Lavó 3 veces con PBS 1X + Tween (0.1%).

2. Se agregó a cada pozo 200 µl de una solución de BSA al 0.5% en buffer de PBS 1X . Se incubaron por 2 h a 37°C y se lavaron 3 veces con PBS 1X + Tween (0.1%).
3. Se agregó el anticuerpo (las diferentes diluciones del suero del respectivo conejo inmunizado) + PBS 1X (100 µl por pozo). Se incubaron por 1 h a 37 °C y se lavaron 3 veces con PBS 1X + Tween (0.1%).
4. Se agregó anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa + PBS 1X 1:2000 (100 µl por pozo). Se incubó por 1 h a 37 °C y se lavaron 3 veces con PBS 1X + Tween (0.1%).
5. Se preparó la solución de revelado con 11 ml buffer de fosfato de Na 0.1N pH 5.0, 4.4 mg Orto-fenilendiamina y 4.4 µl H_2O_2 y se agregó a cada pozo 100 µl de la solución. Se cubrió la placa de ELISA con aluminio de 3 a 10 min a temperatura ambiente, hasta que se observó una coloración. Se agregó 10 µl de HCl 6N, para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 490 nm en el lector de ELISA.

Los sueros obtenidos en el suero preinmune y en la primera sangría se titularon contra la mezcla de toxinas recombinantes como se muestra en la siguiente tabla. Ver figura 38.

Tabla 30. Títulos de anticuerpos empleando con antígeno las toxinas recombinantes Ts1, Ts3 y TsNTxP expresadas en pQE-30

	Conejo 71	Conejo 72	Conejo 73
Suero preinmune	273 ± 36	273± 32	236 ± 56
1ª Sangría	8150 ± 614	22802 ± 89	2079.8 ± 251

A partir de la segunda sangría se realizaron las titulaciones de los sueros contra el veneno completo de *Tityus serrulatus*. En la gráfica de la Figura 39 se muestra la comparación de la segunda sangría con la séptima y en la siguiente tabla se muestran los valores de los títulos obtenidos de cada sangria.

Tabla 31. Títulos de anticuerpos contra el veneno de *Tityus serrulatus*

	1ª Sangría	2da Sangría	3ª Sangría	4ª Sangría	5ª Sangría	6ª Sangría	7ª Sangría
C71	273 ± 36	1384 ± 228	6817 ± 581	8483 ± 731	1384 ± 228	6847 ± 579	6911 ± 680
C72	273 ± 32	15210 ± 205	72042 ± 8964	31345 ± 4041	15210 ± 205	34886 ± 3776	248825 ± 40450
C73	236 ± 56	887 ± 143	6560 ± 851	7192.5 ± 851	887 ± 143	6619 ± 744	76317 ± 5747

A partir de la tercera sangría como los títulos de anticuerpos contra el veneno completo de *T. serrulatus* fueron altos sobretodo en el conejo 72 (1:70000) se comenzaron a realizar ensayos de neutralización, para evaluar la capacidad de neutralizar al veneno completo. En las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos en cada ensayo de neutralización realizado con los sueros obtenidos de la tercera, cuarta y séptima sangría. Para todos los casos el guión (--) indica que el ratón no murió.

Tabla 32. Ensayos de neutralización del suero obtenido de la tercera sangría (7ª inmunización) retados con 3 DL_{50} de veneno total de *Tityus serrulatus*

	Peso (g)	Dosis (µg)	µl	Hora inyec. (min)	Hora muerte (min)	Tiempo de muerte (min)
Grupo de Ratones Control con 3 DL_{50} de Veneno Total						
R-1	15.092	30	13.7	0	53:02	53:02
R-2	16.288	32.5	15	2:21	43:41	41:2
R-3	17.307	34.5	15.7	4:07	70:19	66:12
Grupo de Ratones retados con 3 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 71						
R-1	16.207	32.1	14.6	0	146:00	146:00
R-2	19.058	38	17.3	2:02	60:04	58:02
R-3	17.8	35.5	16.2	4:04	60:04	56:02
R-4	15.667	31	14.1	5:52	19:36	13:44
Grupo de Ratones retados con 3 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 72						
R-1	16.388	32.5	14.8	0	60:05	60:05
R-2	16.62	33	15	2:16	--	--
R-3	14.961	30	13.7	5:05	91:00	85:55
R-4	17.74	35.5	16.2	9:05	118:00	108:55
Grupo de Ratones retados con 3 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 73						
R-1	18.707	37	16.9	0	93:00	93:00
R-2	15.84	31.5	14.3	2:36	98:00	95:24
R-3	18.75	37.5	17	4:33	94:00	89:27
R-4	15.7	31.5	14.4	6:19	93:00	86:41

1 DL_{50} =13.2 µg/ 20g ratón. 3 DL_{50} = 39.6 µg/ 20g ratón. Stock veneno = 2.2 µg/µl *Tityus serrulatus.*

Tabla 33. Ensayos de neutralización del suero obtenido de la cuarta sangría (9ª inmunización) retados con 2 DL_{50} de veneno total de *Tityus serrulatus*

	Peso (gr)	Dosis (µg)	µl	Hora inyec. (min)	Hora muerte (min)	Tiempo de muerte (min)
Grupo de Ratones Control con 2 DL_{50} de Veneno Total						
R-1	15.26	20.143	5.6	0	45:31	45:31
R-2	14.61	19.28	5.5	1:54	64:40	62:46
R-3	14.64	19.32	5.5	4:51	48:23	43:32
Grupo de Ratones retados con 2 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 71						
R-1	14.90	19.27	5.6	0	69:40	69:40
R-2	14.33	18.91	5.4	2:09	83:50	81:40
R-3	14.52	19.16	5.5	3:51	34:12	30:21
R-4	14.56	20.53	5.9	5:25	86:47	81:22
Grupo de Ratones retados con 2 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 72						
R-1	14.90	19.7	5.6	0	113:00	113:00
R-2	15.19	20.1	5.7	3:38	114:15	110:37
R-3	14.31	18.9	5.4	5:57	5:57	--
R-4	18.14	23.9	6.8	7:56	7:56	--
Grupo de Ratones retados con 2 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 73						
R-1	16.05	21.19	6.05	0	112:55	112:55
R-2	18.04	23.81	6.8	0:58	103:00	102:02
R-3	18.87	24.9	7.1	1:58	60:56	58:58
R-4	18.28	24.12	6.9	4:07	198:27	194:20

1 DL_{50} =13.2 µg/ 20g ratón. 2 DL50 = 26.4 µg/ 20g ratón. Stock veneno = 3.5 µg/µl Tityus serrulatus.

Tabla 34. Ensayos de neuralización del suero obtenido de la cuarta sangría (9ª inmunización) retados con 1 DL_{50} de veneno total de *Tityus serrulatus*

	Peso (gr)	Dosis (µg)	µl	Hora inyec. (min)	Hora muerte (min)	Tiempo de muerte (min)
Grupo de Ratones Control con 1 DL_{50} de Veneno Total						
R-1	16.83	11.11	3.2	0	316:40	316:40
R-2	18.35	12.11	3.5	1:43	--	--
R-3	16.35	10.79	3	3:23	27:28	24:03
Grupo de Ratones retados con 1 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 71						
R-1	17.84	11.8	3.37	0	2:30	150:00
R-2	15.44	10.19	2.91	1:20	4:30	270:00
R-3	15.89	10.48	2.99	3:03	--	--
R-4	16.6	10.95	3.12	5:13	--	--
Grupo de Ratones retados con 1 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 72						
R-1	18.98	12.52	3.57	0	--	--
R-2	18.80	12.40	3.54	1:18	--	--
R-3	16.61	10.96	3.13	2:17	--	--
R-4	15.39	10.15	2.9	3:24	--	--
Grupo de Ratones retados con 1 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 73						
R-1	18.58	12.26	3.5	0	197:45	197:45
R-2	18.49	12.47	3.56	1:00	--	--
R-3	17.20	11.35	3.24	2:12	320:30	318:18
R-4	17.38	11.47	3.27	3:16	188:20	185:4

1 DL_{50} =13.2 µg/ 20g ratón. Stock veneno = 3.5 µg/µl *Tityus serrulatus*.

Tabla 35. Ensayos de neutralización del suero obtenido de la séptima sangría (13ª inmunización) retados con 3 DL_{50} de veneno total de *Tityus serrulatus*

	Peso (gr)	Dosis (µg)	µl	Hora inyec. (min)	Hora muerte (min)	Tiempo de muerte (min)
Grupo de Ratones Control con 3 DL_{50} de Veneno Total						
R-1	18.325	36.28	6.4	0	34:29	34:29
R-2	17.97	35.58	6.2	1:25	46:23	44:57
R-3	18.81	37.24	6.5	6:07	76:50	70:43
R-4	18.325	36.28	6.3	2:26	40:50	38:24
R-5	20.28	40.15	7.0	4:44	49:20	44:36
R-6	20.675	40.94	7.2	7:45	95:04	87:19
Grupo de Ratones retados con 3 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 71						
R-1	17.67	35	6.1	0	360:30	360:30
R-2	17.373	34.4	6.0	1:03	89:44	88:41
R-3	18.02	35.7	6.3	3:04	126:00	122:56
R-4	17.79	35.2	6.2	3:57	164:50	160:53
R-5	22.57	44.7	7.8	4:55	126:55	122:00
R-6	17.08	33.8	5.9	5:54	230:05	224:11
Grupo de Ratones retados con 3 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 72						
R-1	17.121	33.9	5.9	0:54	--	--
R-2	19.32	38.2	6.7	0	--	--
R-3	18.866	37.4	6.6	2:30	--	--
R-4	18.48	36.6	6.4	3:45	--	--
R-5	18.089	35.8	6.3	4:42	--	--
R-6	20.189	39.9	7.0	5:24	--	--
Grupo de Ratones retados con 3 DL_{50} de Veneno Total + suero de CONEJO 73						
R-1	18.746	37	6.5	0	--	--
R-2	19.870	39.3	6.9	1:04	151:13	150:11
R-3	20.432	40.5	7.1	1:59	114:57	112:58
R-4	21.096	41.8	7.3	3:08	163:00	162:52
R-5	18.45	36.5	6.4	4:00	--	--
R-6	19.908	39.4	6.9	4:48	114:29	109:41

1 DL_{50} =13.2 µg/ 20g ratón. 3 DL_{50} = 39.6 µg/ 20g ratón. Stock veneno = 5.7 µg/µl.

NOTA: El guión (--) indica que el ratón no murió.

Con base en los resultados, el mejor suero obtenido fue el del conejo 72, el cual fue capaz de neutralizar 3 DL_{50} del veneno total de *Tityus serrulatus.*

Los antígenos recombinantes son capaces de primar la respuesta inmune, lo cual se confirma al usar el suero final después de los dos refuerzos dados con el veneno total de *Tityus serrulatus*, el cual es capaz de neutralizar las 3 DL_{50}, como se observa en la tabla 7, en donde todos los ratones tratados con el suero del conejo 72 sobreviven. Sin embargo, hay una variación dependiente de la respuesta inmune de cada conejo para producir sueros con buena capacidad neutralizante. La producción de antivenenos a nivel industrial basado por ejemplo en la obtención de suero usando caballos, existe la opción de seleccionar a los mejores ejemplares respondedores, y a pesar de tal variabilidad en las respuestas, con el uso de las toxinas recombinantes, motivo de esta invención, la conclusión es clara: se recomienda su uso para potenciar la respuesta inmune y representan una ventaja para la producción de antivenenos de alta calidad, como ya se ha argumentado a lo largo de la descripción.

Habiendo descrito la invención son modalidades de la misma las siguientes:

Una vez probada la eficacia de las toxinas recombinantes para generar anticuerpos neutralizantes contra toxinas y/o venenos de alacranes de diferentes géneros aplicando esquemas de inmunización en especies de mamíferos, es el objeto principal de la invención proveer de composiciones inmunogénicas con los antígenos descritos ya probados y en diferentes combinaciones o mezclas, las que resulten convenientes para la zona geográfica y más aún las que resulten sinérgicas o que muestren una protección cruzada.

Es modalidad de la invención la posibilidad de obtener un antiveneno utilizando los antígenos recombinantes de manera separada o preparando mezclas con al menos dos de las mismas:

- AaHI del alacrán *Androctonus australis* (Norte de África, de Argelia a Egipto), SEQ ID No:1 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHI-6His SEQ ID No:11
- AaHII del alacrán *Androctonus australis* (Norte de África, de Argelia a Egipto), SEQ ID No:2, y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHII-6His SEQ ID No:12
- AmmV del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Norte de África, Marruecos), SEQ ID No:3 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmV-6His SEQ ID No:13
- AmmVIII del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Norte de África, Marruecos), SEQ ID No:4 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmVIII-6His SEQ ID No:14
- Bot I del alacrán *Buthus occitanus tunetanus* (Norte de África, Este de la cuenca mediterránea y el Sahel Africano), SEQ ID No:5 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-BotI-6His, SEQ ID No:15

- LqhII del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (África y Medio Oriente), SEQ ID No:6 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqHII-6His, SEQ ID No:16
- LqhIV del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (África y Medio Oriente), SEQ ID No:7 la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhIV-6His, SEQ ID No:17
- Pg8 del alacrán *Parabuthus granulatus* (Sur de África), SEQ ID No:8 la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Pg8-6His, SEQ ID No:18
- Acra4 del alacrán *Androctonus crassicauda* (Norte de África a Arabia Saudita y Turquía), SEQ ID No:9 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Acra4-6His, SEQ ID No:19
- Bu1 del alacrán *Buthacus macrocentrus* (Norte de África a Arabia Saudita y Turquía), SEQ ID No:10 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Bu1-6His, SEQ ID No:20

Es modalidad de la invención la posibilidad de obtener un antiveneno utilizando los siguientes antígenos recombinantes de especies de México de manera separada o aplicando mezclas con al menos dos de las mismas, (híbrido es la proteína de fusión):

- Cn2 del alacrán *Centruroides noxius* (México), SEQ ID No: 21 híbrido Tiorredoxina-EK-Cn2-6His SEQ ID No:25
- CII1del alacrán *Centruroides limpidus* (México), SEQ ID No: 22 híbrido Tiorredoxina-EK-CII1-6His SEQ ID No:26
- CII2 del alacrán *Centruroides limpidus* (México), SEQ ID No: 23 híbrido Tiorredoxina-EK-CII2-6His SEQ ID No:27
- CssII del alacrán *Centruroides suffusus* (México), SEQ ID No: 24 híbrido Tiorredoxina-EK-CssII-6His SEQ ID No:28
- Péptido híbrido His-Fxa-CssII SEQ ID No:29

Es modalidad de la invención la posibilidad de obtener un antiveneno en un procedimiento que implica el uso de los siguientes antígenos recombinantes de la especie *Tityus serrulatus* de Sudamérica, de manera separada o aplicando mezclas con al menos dos de las mismas:

- Ts1 SEQ ID No:30
- Ts3 SEQ ID No:31
- TsNTXp SEQ ID No:32
- Híbrida de Ts1 Tiorredoxina-EK-Ts1-6His SEQ ID No:33
- Híbrida de Ts3 Tiorredoxina-EK-Ts3-6His SEQ ID No:34
- Híbrida de TsNTXp Tiorredoxina-EK-TsNTXp-6His SEQ ID No:35
- Híbrida de Ts1 M-6His-FXa-Ts1 SEQ ID No:36
- Híbrida de Ts3 M-6His-EK- Ts3 SEQ ID No:37
- Híbrida de TsNTXp M-6His-Ek-TsNTXp SEQ ID No:38

Dicha mezcla o combinación puede acompañarse de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para conformar una composición farmacéutica utilizable como mezcla inmunogénica, para obtener antivenenos de diversas especies de alacrán. Es modalidad de la invención que estos antivenenos sean fragmentos F(ab) o bien $F(ab')_2$ de los anticuerpos policlonales obtenidos de plasma hiperinmune de mamíferos, incluyendo caballos.

Con las estrategias descritas de mezclas de antígenos recombinantes con o sin fusión, con el empleo de esquemas de inmunizacion adecuados diseñados por expertos en el campo de la invención, aunado a la capacidad inmunogenica que tienen los híbridos de todas las toxinas recombinantes propuestas en la presente, se tiene la posibilidad de seleccionar combinaciones de inmunógenos recombinantes que producen sueros neutralizantes de venenos de diversas especies de alacrán.

Dichas combinaciones pueden acompañarse de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para conformar una composición farmacéutica utilizable como inmunógenos para obtener antivenenos de diversas especies de alacrán.

Es modalidad de la invención la preparación de composiciones farmacéuticas que comprendan a las proteínas de la invención, solas ó bien en las posibles combinaciones de las mismas, como el componente activo, pueden venir en estado liofilizado y antes de su inoculación, deberán ser reconstituidas en un disolvente que es un vehículo farmacéuticamente aceptable, quedando éste último como el componente inactivo y/o como un segundo componente adyuvante de la respuesta inmune de la composición farmacéutica.

Para formulaciones liofilizadas de los antígenos pueden contener: al menos un protector de la liofilización tales como: sucrosa, Ficoll 70, polivinilpirrolidona; al menos un agente para ganar volumen, por ejemplo manitol.

En las vacunas de antígenos que se presenten liofilizados habrá que mezclar el principio activo (liofilizado) con el disolvente,y homogenizar perfectamente antes de su inoculación, el disolvente puede ser por ejemplo solución salina (como puede ser de NaCl) isotónica.

Para el uso de las composiciones inmunogénicas para la obtención de sueros antitóxicos, se puede manejar un plan de inmunización de equinos adecuado para obtener un suero con alto título de anticuerpos (hiperinmune), los equinos deberán ser adultos jóvenes mestizos, estar en buen estado de salud y recibir una dieta balanceada y con refuerzos de vitaminas y minerales, negativos para anemia infecciosa equina y piroplasmosis y desparasitados con albendazol–praziquantel. Deben ser mantenidos de acuerdo a condiciones éticas estrictas de acuerdo con la "International Animal Welfare Recommendations" y por el "Committee Members, International Society on Toxinology".

Los equinos pueden ser inoculados con la composición antigénica de la invención, siguiendo un esquema de inmunización definido por personal experto en el área técnica, utilizando o no adyuvantes que confirmen la presentación de los antígenos, por ejemplo: adyuvante de Freund Completo o Adyuvante de Freund Incompleto, opcionalmente se puede manejar como adyuvante fosfato de aluminio u otras sales de aluminio. También es modalidad de la invención el uso de vehículos de liberación de los antígenos de la invención, que sean conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo: micelas anfifílicas, nanotubos de carbón, nanopartículas o microesferas de polímeros como poli (D,L-Lactida-co-glicolido) (PLG) y poli lactida (PLA), entre otros.

REFERENCIAS

Alami, M., Vacher, H., Bosmans, F., Devaux, C., Rosso, J.P., Bougis, P.E., Tytgat, J., Darbon, H., Martin-Eauclaire, M.F. 2003. Characterization of Amm VIII from *Androctonus mauretanicus mauretanicus*: a new scorpion toxin that discriminates between neuronal and skeletal sodium channels. Biochem J. 375: 551-60.

Becerril, B., Marangoni, S. and Possani, L.D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus Tityus: a review. Toxicon 35:821-835 (1997).

Borneman, J., Hahin, R. 1993. Purification of protein toxins from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* that modify Na channels. Toxicon. 31(8): 1019-38.

Bucaretchi, F., Baracat, E.C., Nogueira, R.J., Chaves, A., Zambrone, F.A., Fonseca, M.R., Tourinho, F.S. 1995. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by Tityus bahiensis and Tityus serrulatus. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 37 (4): 331–336.

Calderon-Aranda, E.S., Hozbor D., Possani L.D. 1993. Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venom. Toxicon. 31(3): 327-37.

Caliskan, F., Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Batista, C.V.F., Zamudio, F.Z., Coronas, F.I. and Possani L.D. 2012. Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: general characterization of the venom and description of Bu1, a potent mammalian Na+-channel alpha-toxin. Toxicon, 59: 408–415

Caliskan, F., Quintero-Hernandez,V., Restano-Cassulini, R., Coronas-Valderrama, F.I., Corzo, G., Possani, L.D. 2013. Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na+-channel alpha-type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion. Biochimie, 95, 1216-1222.

Chippaux, J.P., Goyffon, M. 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. Acta Trop. 107(2): 71-9.

Corona, M., García, M. C., Valdez, N. A., Gurrola, G., Becerril, B. y Possani, L.D. 2008. Recombinant Immunogens for the Generation of Antivenoms to the Venom of Scorpions of the Genus Centruroides. Patente US7335759 concedida en Estados Unidos el 26 de febrero del 2008.

Corzo, G., Villegas, E., Nakajima, T. 2001. Isolation and structural characterization of a peptide from the venom of scorpion with toxicity towards invertebrates and vertebrates. protein and peptide letters. 8: 385–393.

Corzo-Burguete, G.A., Estrada-Tapia, G., Hernández-Salgado, K., García-Gómez B. I. Y Possani, L. D. 2008. Inmunógenos recombinantes para la producción de antivenenos contra el veneno de alacranes del género Centruroides. Patente MX290803 concedida en México el 29 de septiembre del 2011.

Dehesa-Davila, M., Ramirez, A.N., Zamudio, F.Z., Gurrola-Briones, G., Lievano, A., Darszon, A., Possani,L.D.1996. Structural and functional comparison of toxins from the venom of the scorpions Centruroides infamatus infamatus, Centruroides limpidus limpidus and Centruroides noxius. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 113(2): 331-339.

Delori, P., Rietschoten, J., Rochat, H. 1981. Scorpion venoms and neurotoxins: an immunological study. Toxicon. 19(3): 393-407.

Duarte, C.G., Alvarenga, L.M., Dias-Lopes, C., Machado-de-Avila, R.A., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C., Chávez-Olórtegui, C. 2010. In vivo protection against Tityus serrulatus scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. Vaccine. 28(5): 1168-76.

Eickstedt, V.R.D., Ribeiro, L.A., Candido, D.M., Albuquerque, M.J., Jorge, M.T. 1996. Evolution of scorpionism by Tityus bahiensis (PERTY) and Tityus serrulatus Lutz and Mello and geographical distribution of the two species in the state of São Paulo – Brazil J. Venom. Anim. Toxin. 2(2): 92–105.

El Ayeb, M. y Pierre Delori P. 1984. capítulo 18, páginas 607 a 638, del libro: Handbook of Natural Toxins, vol. 2 (editor Anthony T. Tu), editorial Marcel Dekker, Inc. New York.

Espino-Solis, G.P., Calderon-Amador, J., Calderon-Aranda, E.S., Licea, A.F., Donis-Maturano, L., Flores-Romo, L., Possani, L.D. 2009. Rational design of synthetic peptides to generate antibodies that recognize in situ CD11c(+) putative dendritic cells in horse lymph nodes. Vet Immunol Immunopathol. 132(2-4): 181-90.

Estrada, G., Garcia, B.I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., Possani, L.D., Corzo, G. 2007. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CssII: Heterologous expression and proper folding in vitro. Biochimica et Biophysica Acta. 1770: 1161–1168.

García-Gómez, B. I., Olamendi-Gómez T. C. y Possani, L. D. 2008 Inmunógenos recombinantes para la producción de antivenenos contra el veneno de alacranes del género Parabuthus. Patente MX2008011306A concedida en México el 4 de septiembre del 2008.

García-Gómez, B. I., Olamendi-Gómez T. C. y Possani, L. D. 2008 Inmunógenos recombinantes para la producción de antivenenos contra el veneno de alacranes del género Parabuthus. Patente MX2008011306A concedida en México el 4 de septiembre del 2008.

García-Gómez, B.I., Olamendi-Portugal, T.C., Paniagua, J., van der Walt, J., Dyason, K., Possani, L.D. 2009. Heterologous expression of a gene that codes for Pg8, a scorpion toxin of *Parabuthus granulatus*, capable of generating protecting antibodies in mice. Toxicon. 53(7-8): 770-8.

Gregoire, J., Rochat, H. 1983. Covalent structure of toxins I and II from the scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. Toxicon. 21(1): 153-62.

Guatimosim, S.C., Kalapothakis, E., Diniz, C.R., Chávez-Olórtegui, C. 2000. Induction of neutralizing antibodies against Tityus serrulatus toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. Toxicon. 38(1): 113-21.

Guatimosim, S.C., Prado,V.F., Diniz, C.R., Chavez-Olortegui, C., Kalapothakis, E. 1999. Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxp: an immunogenic protein from Tityus serrulatus scorpion venom. Toxicon. 37(3): 507-517.

Hernández-Salgado, K., Estrada, G., Olvera, A., Coronas, F.I., Possani, L.D., Corzo, G. 2009. Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CssII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. Immunol Lett. 125(2): 93-9.

Ismail, M. 2003. Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy. Int J Antimicrob Agents. 21(2): 170-4.

Licea, A.F., Becerril, B., Possani, L.D. 1996. Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. Toxicon. 34(8): 843-7.

Martin-Eauclaire , M.F., Alami, M., Giamarchi, A., Missimilli, V., Rosso, J.P., Bougis, P.E. 2006. A natural anatoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins. Vaccine. 24(12): 1990-6.

Martin-Eauclaire, M.F., Ceard, B., Ribeiro, A.M., Diniz, C.R., Rochat, H., Bougis, P.E. 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion Tityus serrulatus. FEBS Lett. 302 (3): 220-222.

Martin-Eauclaire, M.F., Céard, B., Ribeiro, A.M., Diniz, C.R., Rochat, H., Bougis, P.E. 1994. Biochemical, pharmacological and genomic characterisation of Ts IV, an alpha-toxin from the venom of the South American scorpion Tityus serrulatus. FEBS Lett. 342(2): 181-4.

Mendes, T.M., Dias, F., Horta, C.C., Pena, I.F., Arantes, E.C., Kalapothakis, E. 2008. Effective Tityus serrulatus anti-venom produced using the Ts1 component. Toxicon. 52(7): 787-93.

Ministério da Saúde. 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, Fundação Nacional de Saúde/Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. CENEPI, Brasília.

Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Estévez, J., Clement, H., de Roodt, A., Paniagua-Solís, J., Vázquez, H., Zavaleta, A., Arruz, M.S., Stock, R.P., Alagón, A. 2006. North and South American Loxosceles spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. Toxicon. 48(1): 64-74.

Pedroso De Lima Maria C. y Düzgünes Nejat Eds. Trafficking of Intracellular Membranes:: From Molecular Sorting to Membrane Fusion (Nato ASI Subseries H:)Jan 1, 1995

Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na^+-channels. Eur. J. Biochem. 264: 287–300.

Ramirez, A.N., Martin, B.M., Gurrola, G.B., Possani,L.D. 1994. Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion Centruroides limpidus limpidus Karsch. Toxicon. 32(4): 479-490.

Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzky, S., Edman, P. 1970. The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis hector*. Eur J Biochem. 17(2): 262-6.

Rochat, H., Rochat, C., Sampieri. F., Miranda, F. & Lissitzky, S. 1972. The amino acid sequence of neurotoxin II of *Androctonus australis Hector*. Eur J. Biochem. 28, 381-388.

Rosso, J.P., Rochat, H. 1985. Characterization of ten proteins from the venom of the scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, six of which are toxic to the mouse. Toxicon, 23: 113–125

Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B.M, Gurrola-Briones, G., Hérion, P., Possani, L.D. 1992. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. Eur J Biochem. 204(1): 281-92.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica, caracterizada porque comprende al menos una de las proteínas recombinantes del veneno de alacranes de especies del Norte de África, Este de la cuenca mediterránea, el Sahel Africano y Arabia Saudita, seleccionada del grupo que consiste de:

a) AaH I del alacrán *Androctonus australis*, SEQ ID No:1 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHI-6His SEQ ID No:11

b) AaH II del alacrán *Androctonus australis* (SEQ ID No:2, y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHII-6His, SEQ ID No:12

c) Amm V del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Norte de África, Marruecos), SEQ ID No:3 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmV-6His, SEQ ID No:13

d) Amm VIII del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Norte de África, Marruecos), SEQ ID No:4 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmVIII-6His, SEQ ID No:14

e) Bot I del alacrán *Buthus occitanus tunetanus* (Norte de África,), SEQ ID No:5 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-BotI-6His, SEQ ID No:15

f) LqhII del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (África y Medio Oriente), SEQ ID No:6 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqHII-6His, SEQ ID No:16

g) LqhIV del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (África y Medio Oriente), SEQ ID No:7 la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhIV-6His, SEQ ID No:17

h) Acra4 del alacrán *Androctonus crassicauda*,(SEQ ID No:9 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Acra4-6His, SEQ ID No:19

i) Bu1 del alacrán *Buthacus macrocentrus*, SEQ ID No:10 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Bu1-6His, SEQ ID No:20

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, caracterizada porque además comprende a la proteína recombinante de la especie del sur de África Pg8 del alacrán *Parabuthus granulatus*, SEQ ID No:8 y/o a la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Pg8-6His, SEQ ID No:18.

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 caracterizada porque comprenden la mezcla de al menos dos de las proteínas recombinantes de venenos de

alacrán de especies del Norte de África, Este de la cuenca mediterránea, el Sahel Africano y Arabia Saudita, seleccionada del grupo que consiste de:

j) AaH I del alacrán *Androctonus australis*, SEQ ID No:1 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHI-6His SEQ ID No:11

k) AaH II del alacrán *Androctonus australis* (SEQ ID No:2, y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHII-6His, SEQ ID No:12

l) Amm V del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Norte de África, Marruecos), SEQ ID No:3 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmV-6His, SEQ ID No:13

m) Amm VIII del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Norte de África, Marruecos), SEQ ID No:4 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmVIII-6His, SEQ ID No:14

n) Bot I del alacrán *Buthus occitanus tunetanus* (Norte de África,), SEQ ID No:5 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-BotI-6His, SEQ ID No:15

o) LqhII del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (África y Medio Oriente), SEQ ID No:6 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqHII-6His, SEQ ID No:16

p) LqhIV del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (África y Medio Oriente), SEQ ID No:7 la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-LqhIV-6His, SEQ ID No:17

q) Bu1 del alacrán *Buthacus macrocentrus*, SEQ ID No:10 y la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Bu1-6His, SEQ ID No:20

4. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, caracterizada porque comprende la mezcla de las proteínas recombinantes de las especies *Androctonus crassicauda* y *Buthacus macrocentrus* de Turquía:

a) Acra4, SEQ ID No:9 y/o la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Acra4-6His, SEQ ID No:19

b) Bu1, SEQ ID No:10 y/o la proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Bu1-6His, SEQ ID No:20

5. La mezcla de proteínas recombinantes de venenos de alacrán, de la reivindicación 3, caracterizada porque comprende la mezcla de al menos dos de las proteínas recombinantes de venenos de alacrán de especies del Norte de África *Androctonus australis* y *Androctonus mauretanicus mauretanicus* seleccionadas del grupo que consiste de:

a) AaH II del alacrán *Androctonus australis*, SEQ ID No:2,
b) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AaHII-6His, SEQ ID No:12

c) Amm V del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, SEQ ID No:3,

d) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmV-6His, SEQ ID No:13

e) Amm VIII del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, SEQ ID No:4,
f) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-AmmVIII-6His, SEQ ID No:14

y caracterizada porque induce anticuerpos neutralizantes de veneno nativo de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, *Androctonus australis* con capacidad neutralizante potenciada por la presencia de ambos antígenos y para ambas especies debido a cruce antigénico.

6. Una composición inmunogénica, caracterizada porque comprende al menos una de las proteínas recombinantes de venenos de alacrán del género Centruroides seleccionada del grupo que consiste de:

a) Cn2 del alacrán *Centruroides noxius*, SEQ ID No:21
b) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Cn2-6His SEQ ID No:25
c) CII1del alacrán *Centruroides limpidus*, SEQ ID No: 22
d) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-CII1-6His SEQ ID No:26
e) CII2 del alacrán *Centruroides limpidus*, SEQ ID No:23
f) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-CII2-6His SEQ ID No:27
g) CssII del alacrán *Centruroides suffusus*, SEQ ID No: 24
h) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-CssII-6His SEQ ID No:28
i) La proteína de fusión His-Fxa-CssII SEQ ID No: 29

7. Una composición inmunogénica, caracterizada porque comprende al menos una de las proteínas recombinantes de venenos de alacrán de la especie *Tityus serrulatus* seleccionada del grupo que consiste de:

a) Ts1 SEQ ID No:30
b) Ts3 SEQ ID No:31
c) TsNTXp SEQ ID No:32
d) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Ts1-6His SEQ ID No:33
e) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-Ts3-6His SEQ ID No:34
f) La proteína de fusión Tiorredoxina-EK-TsNTXp-6His SEQ ID No:35
g) La proteína de fusión M-6His-FXa-Ts1 SEQ ID No:36
h) La proteína de fusión M-6His-EK-Ts3 SEQ ID No:37
i) La proteína de fusión M-6His-Ek-TsNTXp SEQ ID No:38

8. Uso de la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para preparar un antiveneno en donde el principio activo son anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, incluyendo fragmentos $F(ab')_2$.

9. Un procedimiento para obtener antivenenos de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos incluyendo fragmentos $F(ab)'_2$, caracterizado porque comprende un paso de inmunización de mamíferos con cualquiera de las composiciones inmunogénicas de las reivindicaciones 1 a 7, y obtener de plasma del mamífero.

FIGURA 1A

1. TOXINA AaHI

Oligos Internos:

Rev1-AaHI 51 pb
5′ GCA CGG CGG CAC GCA GTG ATA CAC GCA GTT GTT CGG GTA CAC GAT ATA GCC 3′

Dir2-AaHI 51 pb
5′ TGC GTG CCG CCG TGC GAT GGC CTG TGC AAA AAA AAC GGC GGC AGC AGC GGC 3′

Rev2-AaHI 51 pb
5′ ACA CGC CAG GCC GCT CGG CAC CAG GAA GCT GCA GCT GCC GCT GCT GCC GCC 3′

Dir3-AaHI 51 pb
5′ AGC GGC CTG GCG TGT TGG TGC AAA GAT CTG CCG GAT AAC GTG CCG ATC AAA 3′

Oligos externos:

Dir1-BEK-AaHI 51 pb
5′ TCT **GGA TCC** GGT *GAT GAC GAT GAC AAG* AAA CGT GAT GGC TAT ATC GTG TAC 3′

Rev3-XhoI-AaHI 46 pb
5′ TAT **ACT CGA G** GG TAC ATT TAC GGC TGG TAT CTT TGA TCG GCA CGT T 3′

FIGURA 1B

2. **TOXINA AaHII**

Oligos internos:

h2.Up1: 44 pb
5′ AAAGATGGCTATATTGTGGATGATGTGAACTGCACCTATTTTTG 3′

h2.Lw2: 49 pb
5′ ATTCTTCGTTGCAATACGCGTTGCGGCCGCAAAAATAGGTGCAGTTCAC 3′

h2.Up3: 48 pb
5′ CGCGTATTGCAACGAAGAATGCACCAAACTGAAAGGCGAAAGCGGCTA 3′

h2.Lw4: 52 pb
5′ GCACGCGTTGCCATACGGGCTCGCCCACTGGCAATAGCCGCTTTCGCCTTTC 3′

h2.Up5: 47 pb
5′ CCGTATGGCAACGCGTGCTATTGCTATAAACTGCCGGATCATGTGCG 3′

h2.Lw6: 41 pb
5′ GGCAGCGGCCCGGGCCTTTGGTGCGCACATGATCCGGCAGT 3′

Oligos Externos:

Aa2_4TRXUp 48 pb
5′ GA GGATCC GGT GATGACGATGACAAG GTGAAAGATGGCTATATTGTGG 3′

***Aa2_4TRXLw** 22 pb*
5′ GA CTCGAG ATGGCAGCGGCCCG 3′

FIGURA 1C

3. **TOXINA AmmV**

Oligos internos:

Amm5_Lw2: 5'-TCA CAG TAT GCA TTG CGA CCG CAA AAG AAG GTA CAG TTC AGA TCG TCA ATG ATA TAG CCA-3'

Amm5_Up3: 5'-GGT CGC AAT GCA TAC TGT GAC GAT GAA TGC AAA AAG AAA GGC GGT GAA AGC GGT TAT TG-3'

Amm5_Lw4: 5'-ACA CGC ATT GCC ATA CGG AGA TGC CCA CTG ACA ATA ACC GCT TTC ACC GC-3'

Amm5_Up5: 5'-TCC GTA TGG CAA TGC GTG TTG GTG CTA CAA ACT GCC GGA TCG TGT TAG CAT TA-3'

Oligos Externos:

Amm5_Up1:5'- GAG GAT CCG GTG ATG ACG ATG ACA AGC TGA AAG ATG GCT ATA TCA TTG ACG-3'

Amm5_Lw6: 5'- GAC TCG AGA TTG CAA CGA CCT TTC TCC TTA A -3'

FIGURA 1D

4. TOXINA AmmVIII

Oligos Internos:

Amm8_Lw2: 5'-TTC GTT ACA ATA GGC ATT ACG ACC GCA AAA GTA GGT ACA GTT GAT GTC ATT CAC A-3'

Amm8_Up3: 5'-CGT AAT GCC TAT TGT AAC GAA CTG TGC ATC AAG CTG AAA GGT GAA TCT GGC TAT TGT CAG-3'

Amm8_Lw4: 5'-ATA GCA GCT GTT GCC ATA CGG GCT TGC CCA CTG ACA ATA GCC AGA TTC ACC-3'

Amm8_Up5: 5'-CGT ATG GCA ACA GCT GCT ATT GTT ACA AAC TGC CTG ATC ATG TTC GCA CCA AAG-3'

Oligos Externos:

Amm8_Up1: 5'- GAG GAT CCG GTG ATG ACG ATG ACA AGC TGA AAG ATG GCT ATA TTG TGA ATG A-3'

Amm8_Lw6: 5'- GAC TCG AGA TCG TTG CAA CGA CCC GGA C -3'

FIGURA 1E

5. TOXINA BotI

Oligos Internos:

Rev1-BotI 51 pb
5′ GCT GTT CTG CGC GCA TTC GTA CAC GCA GTT TTC CGG CTG CGC GAT ATA CGC 3′

Dir2-BotI 51 pb
5′ TGC GCG CAG AAC AGC TAC TGC AAC GAT CTG TGC ACC AAA AAC GGC GCG ACC 3′

Rev2-BotI 51 pb
5′ GTT GCC GTA TTT GCC CAG CCA CTG GCA GTA GCC GCT GGT CGC GCC GTT TTT 3′

Dir3-BotI 51 pb
5′ GGC AAA TAC GGC AAC GCG TGC TGG TGC AAA GAT CTG CCG GAT AAC GTG CCG 3′

Oligos externos:

Dir1-BEK-BotI 51 pb
5′ TCT GGA TCC GGT *GAT GAC GAT GAC AAG* GGC CGT GAT GCG TAT ATC GCG CAG 3′

Rev3-XhoI-BotI 52 pb
5′ TAT ACT CGA G GAA ATG GCA TTT GCC CGG GAT ACG GAT CGG CAC GTT ATC CGG 3′

FIGURA 1F

6. TOXINA LqHII

Oligos internos:

h2.Up1: 44 pb
5′ AAAGATGGCTATATTGTGGATGATGTGAACTGCACCTATTTTTG 3′

h2.Lw2: 49 pb
5′ ATTCTTCGTTGCAATACGCGTTGCGGCCGCAAAAATAGGTGCAGTTCAC 3′

h2.Up3: 48 pb
5′ CGCGTATTGCAACGAAGAATGCACCAAACTGAAAGGCGAAAGCGGCTA 3′

h2.Lw4: 52 pb
5′ GCACGCGTTGCCATACGGGCTCGCCCACTGGCAATAGCCGCTTTCGCCTTTC 3′

h2.Up5: 47 pb
5′ CCGTATGGCAACGCGTGCTATTGCTATAAACTGCCGGATCATGTGCG 3′

h2.Lw6: 41 pb
5′ GGCAGCGGCCCGGGCCTTTGGTGCGCACATGATCCGGCAGT 3′

Oligos externos:

Lq2_4TRXUp 50 pb
5′ GA GGATCC GGT GATGACGATGACAAG ATTAAAGATGGCTATATTGTGGAT 3′

Lq2_4TRXLw 21 pb
5′ GA CTCGAG GCGGCAGCGGCCC 3′

FIGURA 1G

7. TOXINA LqHIV

Oligos Internos:

REV1-LqHIV 51 pb
5′ GTT CGC GCC GCA GGT ATA CAC GCA GTT TTT ATC ATC CGC GAT ATA CGC ATC 3′

Dir2-LqHIV 51 pb
5′ ACC TGC GGC GCG AAC AGC TAT TGC AAC ACC GAA TGC ACC AAA AAC GGC GCG 3′

Rev2-LqHIV 51 pb
5′ GCC ATA TTT GCC GAA CCA CTG GCA ATA GCC GCT TTC CGC GCC GTT TTT GGT 3′

Dir3-LqHIV 51 pb
5′ TTC GGC AAA TAT GGC AAC GCG TGC TGG TGC ATC AAA CTG CCG GAT AAA GTG 3′

Oligos externos:

Dir1-BEK-LqHIV 51 pb
5′ TCT GGA TCC GGT GAT GAC GAT GAC AAG GGC GTG CGT GAT GCG TAT ATC GCG 3′

Rev3-XhoI-LqhIV 52 pb
5′ TAT ACT CGA GAC GGC ATT TGC CCG GGA TAC GGA TCG GCA CTT TAT CCG GCA G 3′

FIGURA 1H

8. TOXINA Pg8

Pg8_4TRXUp
5´GA **GGATCC** GGT GAT GAC GAT GAC AAG AAA AAG GAT GGC TAT CCG GT 3´

Pg8_4TRXLw (introduce el sitio de restricción XhoI, en negritas)
GA **CTCGAG** CGG GCG GCA GCG G

FIGURA 1I

9. TOXINA Acra4

Oligos internos:

Rev1-Acra4 51 pb
5′ GCA TGG CGG AAT ACA ATG ATA AAC ACA GTT TTT GTC ATC AAC AAT ATA ACC 3′

Dir2-Acra4 51 pb
5′ TGT ATT CCG CCA TGC GAC GGT CTG TGT AAG AAA AAC GGT GGT AAA AGC GGC 3′

Rev2-Acra4 51 pb
5′ GCA CGC CAG ACC AGA CGG AAC CAG AAA AGA GCA AGA GCC GCT TTT ACC ACC 3′

Dir3-Acra4 52 pb
5′ TCT GGT CTG GCG TGC TGG TGC AAA GCG CTG CCG GAT AAC GTG CCG ATT AAA G 3′

Oligos Externos:

Dir1-BEK-Acra4 52 pb
5′ TCT GGA TCC GGT *GAT GAC GAT GAC AAG* GTT CGT GAT GGT TAT ATT GTT GAT G **3′**

Rev3-XhoI-Acra4 52 pb
5′ TAT ACT CGA G CT TAT GGC ATT TAT AGC TCG GAT CTT TAA TCG GCA CGT TAT C

FIGURA 1J

10. **TOXINA Bu1**

Oligos Internos:

REV1-Bu1 51 pb
5′ GTT TTT AGC ACA AGT ATA AAC GCA GTT TTT ATC GTC CGC AAT ATA CGC ATC 3′

Dir2-Bu1 51 pb
5′ ACT TGT GCT AAA AAC AGC TAT TGC AAC ACT GAA TGT ACC AAA AAC GGT GCG 3′

Rev2-Bu1 53 pb
5′ ACC GTA TTT ACC CAG CCA CTG GCA ATA GCC GCT TTC CGC ACC GTT TTT GGT AC 3′

Dir3-Bu1 52 pb
5′ CTG GGT AAA TAC GGT AAC GGC TGC TGG TGC ATC AAA CTG CCG GAT AAA GTT C 3′

Oligos Externos:

Dir1-BEK-Bu1 51 pb
5′ TCT GGA TCC GGT *GAT GAC GAT GAC AAG* **GGT GTG CGT GAT GCG TAT ATT GCG** 3′

Rev3-XhoI-Bu1 52 pb
5′ TAT ACT CGA G AC GGC AGC GAC CCG GAA TAC GAA TCG GAA CTT TAT CCG GCA G 3′

FIGURA 2

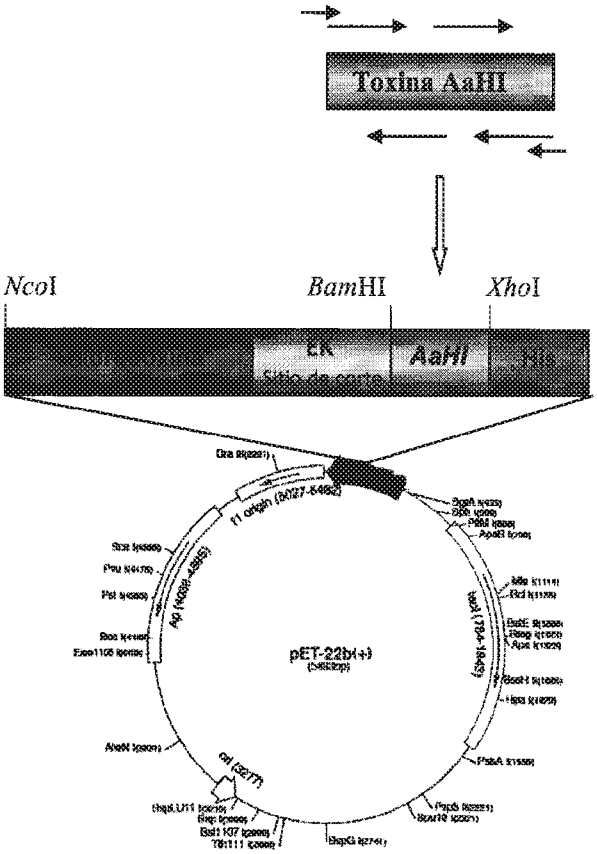


FIGURA 3

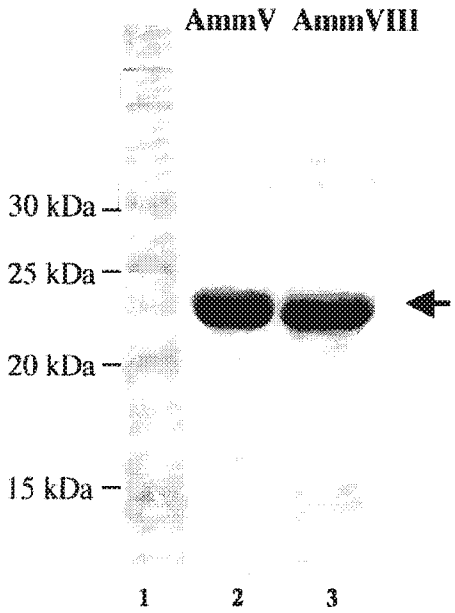


FIGURA 4A

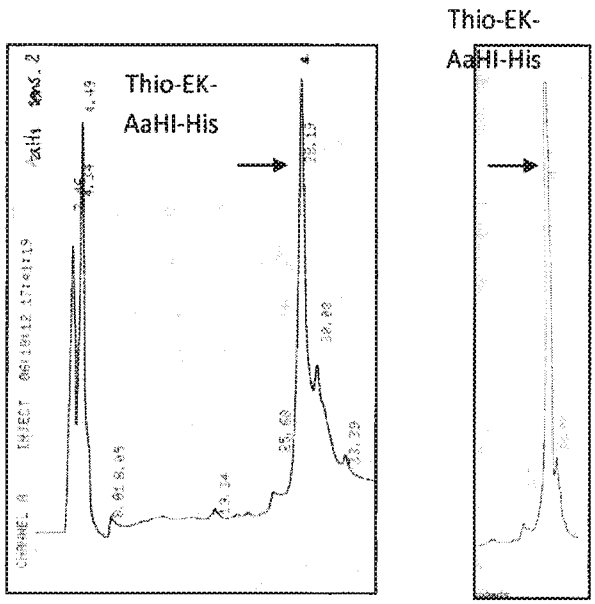


FIGURA 4B

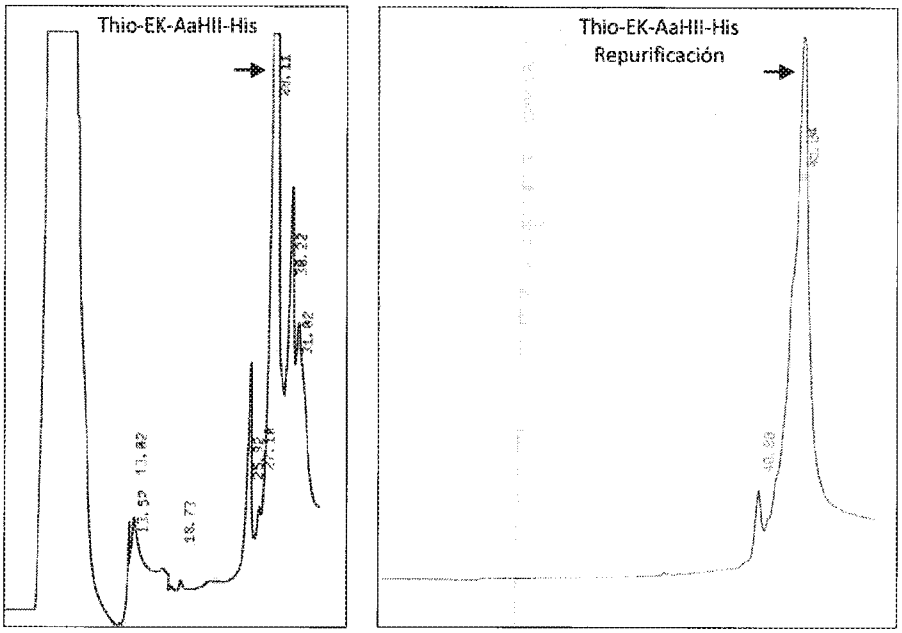


FIGURA 4C

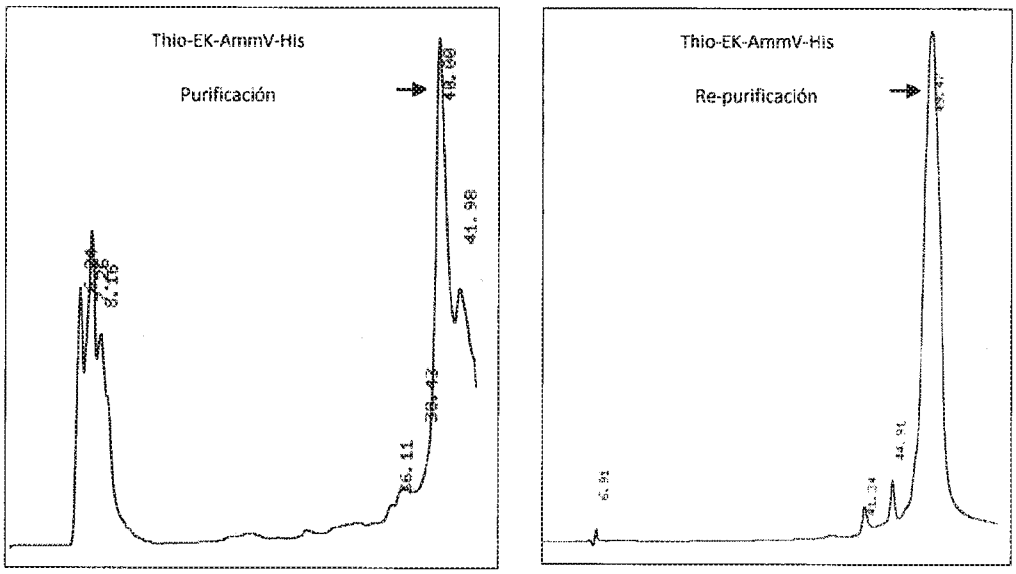


FIGURA 4D

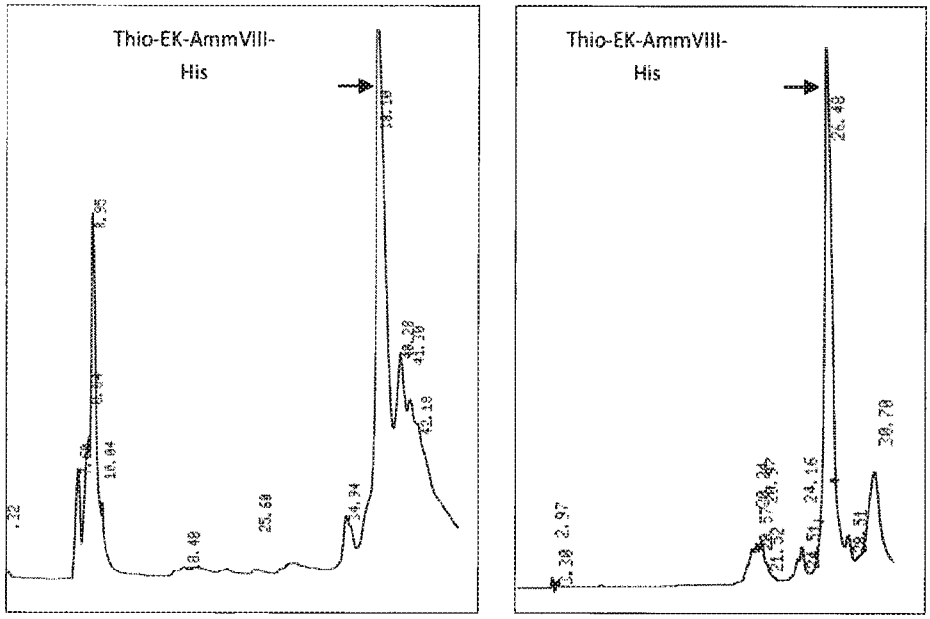


FIGURA 4E

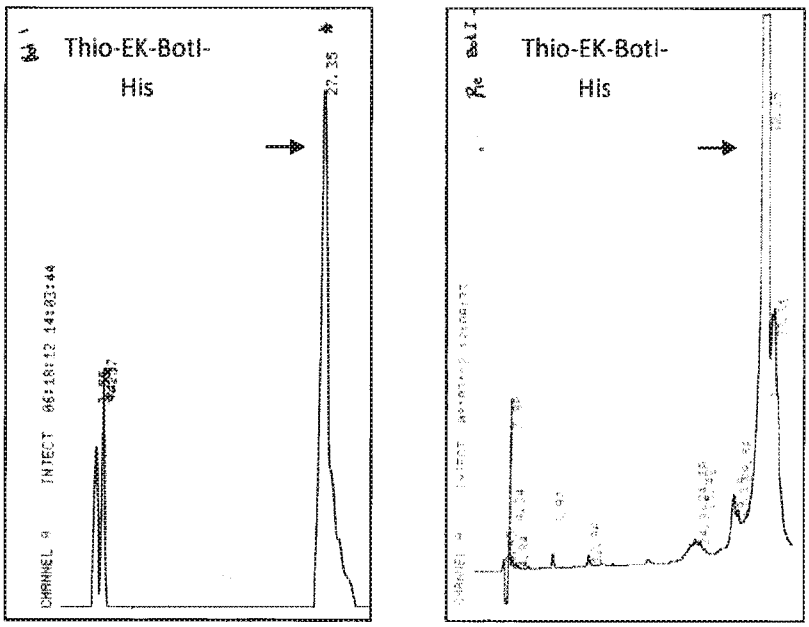


FIGURA 4F

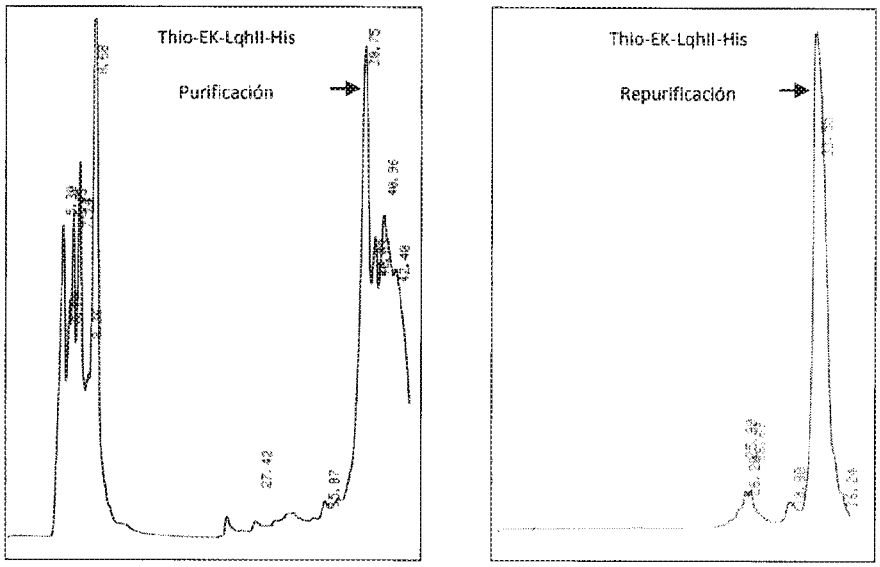


FIGURA 4G

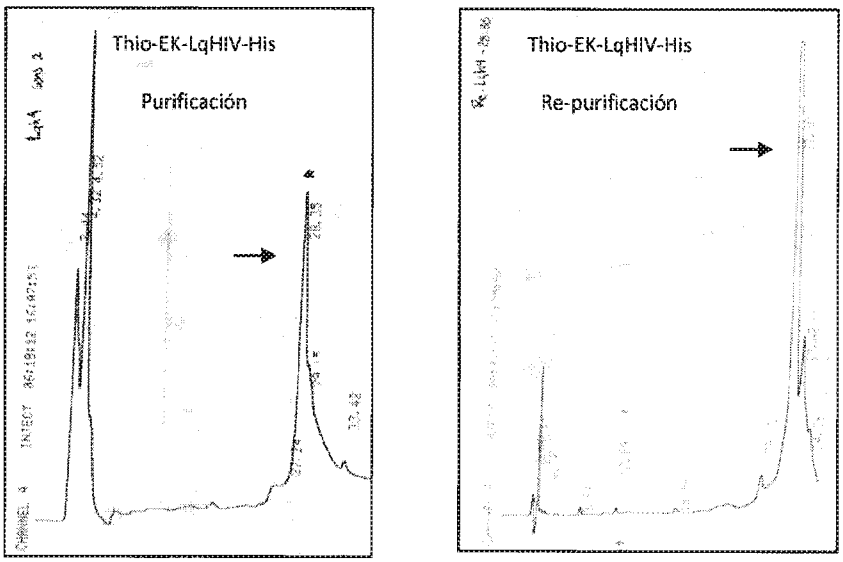


FIGURA 4H

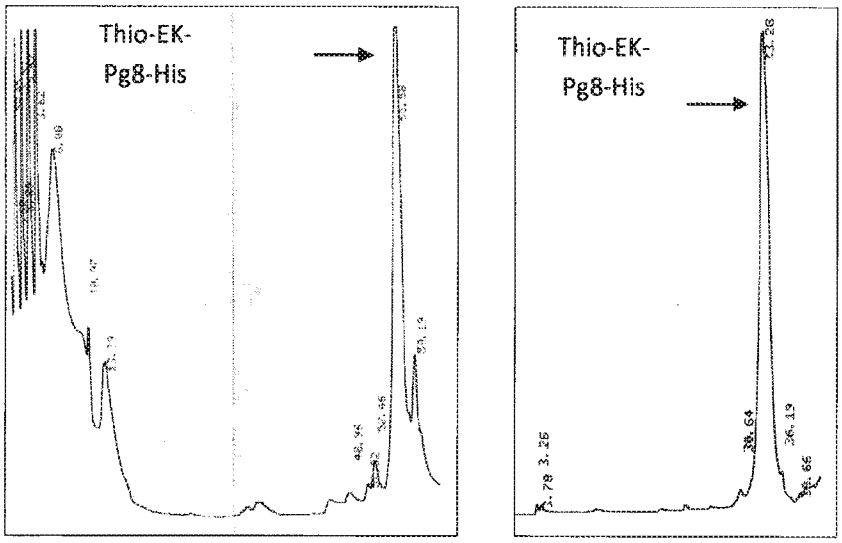


FIGURA 4I

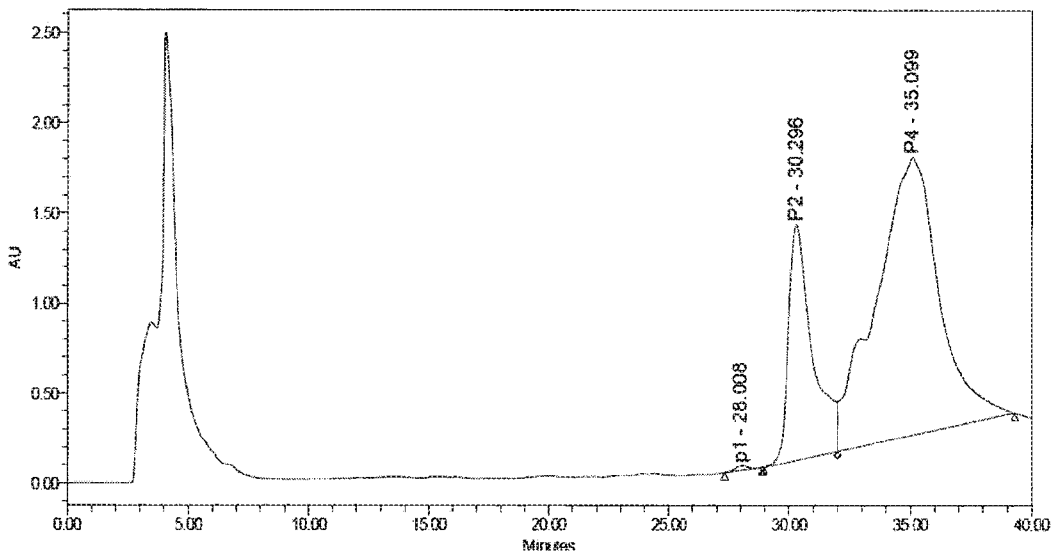


FIGURA 4J

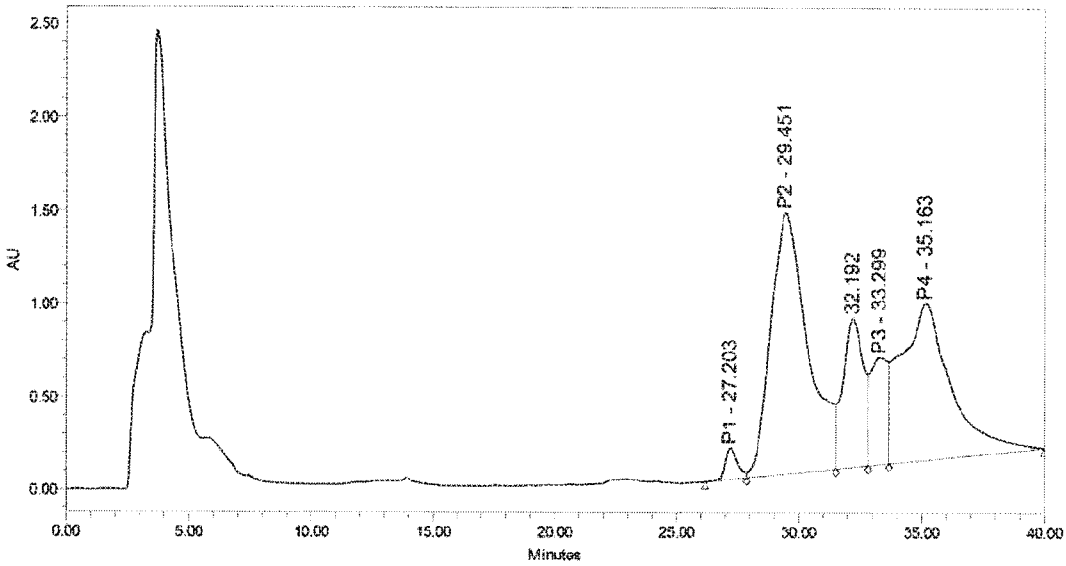


FIGURA 5

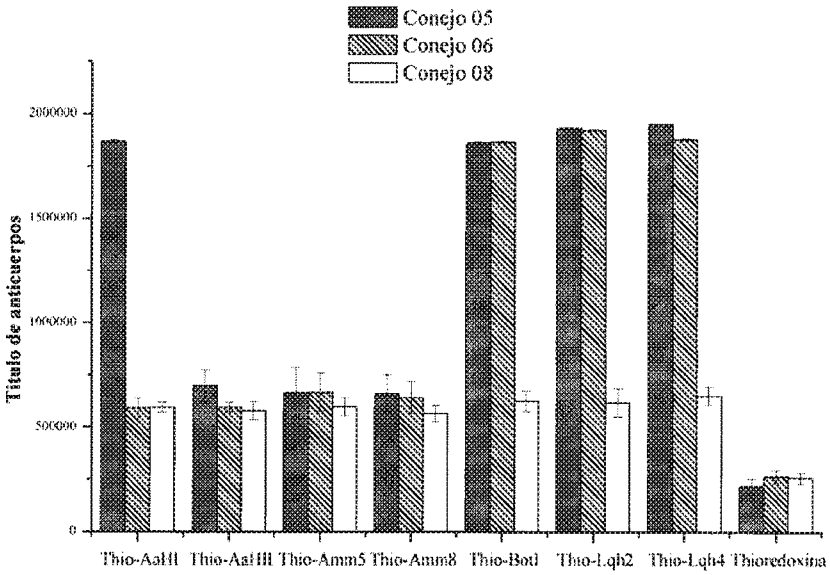


FIGURA 6

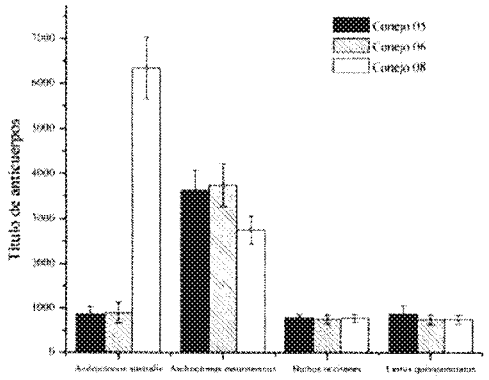


FIGURA 7

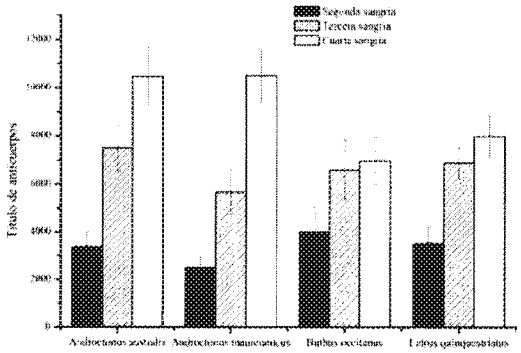


FIGURA 8

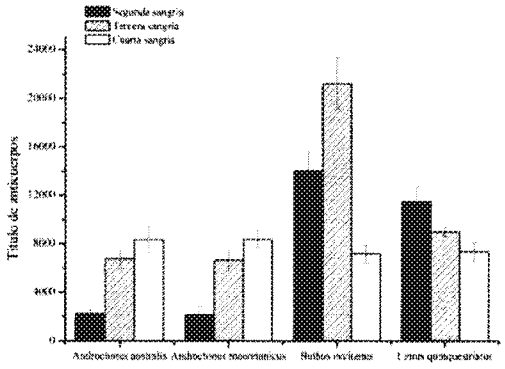


FIGURA 9

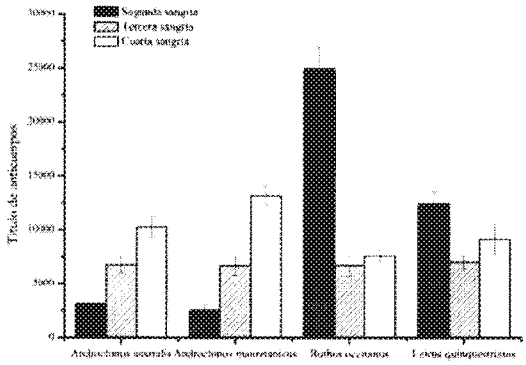


FIGURA 10

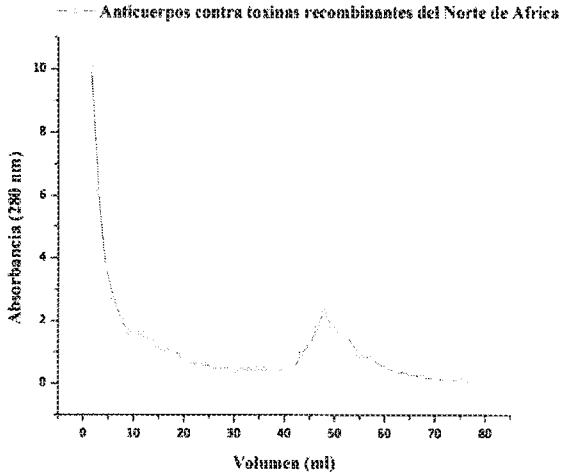
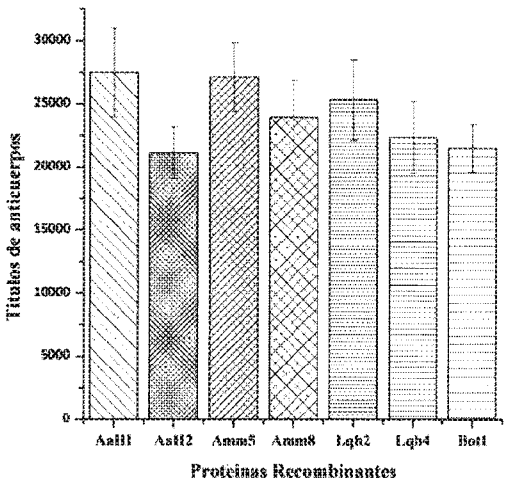


FIGURA 11



Titulos de Anticuerpos	
Toxina recombinante	Media± SD
AaHI	27,479±3,511
AaHII	21,142±2,036
AmmV	27,159±2,731
AmmVIII	23,996±2,918
LqhII	25,352±3,198
LqhIV	22,400±2,868
BotI	21,518±1,895

FIGURA 12

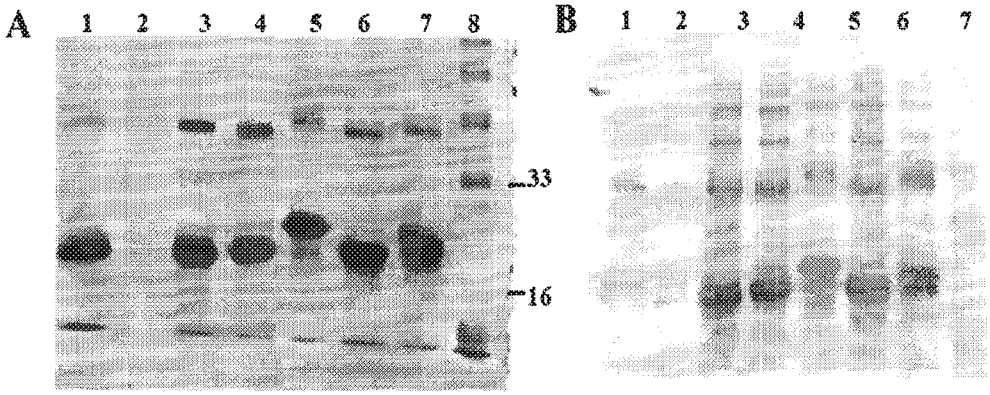


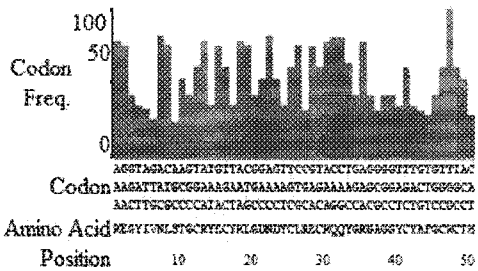
FIGURA 13

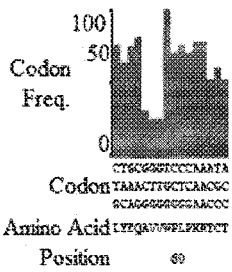
***E. coli* Codon Usage Analysis 2.0** by Morris Maduro

Date: Mon 24 Sep 112 - 6:04 pm **Sequence**: Cn2 Toxin

Sequence entered (198 bases):

```
5'-AAAGAAGGCT ATATTGTGAA CCTGAGCACC GGCTGCAAAA ATGAATGCTA TAAACTGGGC GACAACGACT ATTGCCTGCG
   CGAATGCAAA CAGCAGTACG GCAAAGGCGC GGGCGGCTAT TGCTACGCGT TTGGCTGCTG GTGCACCCAT CTGTACGAAC
   AGGCGGTGGT GTGGCCGCTG CCGAAAAAAA CCTGCACC-3'
```





Colors: ▩ = less than 10% of codons for same amino acid; ▩ = at least 10%

Fraction of sense codons below threshold (=10.00): **0/66 (0%)**

FIGURA 14A

Toxina Cn2 de *Centruroides noxius*

a. Oligos internos:

Cn2UpA 64 pares de bases (pb)
5' AT CTG GTG GAC AAA AAC ACC GGC TGC AAA TAT GAA TGC CTG AAA CTG GGC GAC AAC GAC TAT TG 3'
Cn2LwB 63 pb
5' GCC GCC CGC GCC TTT GCC GTA CTG CTG TTT GCA TTC GCG CAG GCA ATA GTC GTT GTC GCC CAG 3'
Cn2UpC 61 pb
5' GGC AAA GGC GCG GGC GGC TAT TGC TAC GCG TTT GCG TGC TGG TGC ACC CAC CTG TAC GAA C 3'
Cn2LwD 56 pb
5' GCT GCA GCG TTT GTT CGG CAG CGG CCA CAC AAT CGC CTG TTC GTA CAG GTG GGT GC 3'

b. Oligos externos:

B-EK-Cn2 58 pb
5' **TCT GGA TCC GGT GAT GAC GAT GAC AAG** AAA GAA GGC TAT CTG GTG GAC AAA AAC ACC G 3'
XhoI-Cn2 31 pb
5' **TAT ACT CGA G** GCT GCA GCG TTT GTT CGG CAG 3'

c. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos:

K	E	G	Y	L	V	D	K	N	T	G	C	K	Y	E
AAA	GAA	GGC	TAT	CTG	GTG	GAC	AAA	AAC	ACC	GGC	TGC	AAA	TAT	GAA
TTT	*CTT*	*CCG*	*ATA*	*GAC*	*CAC*	*CTG*	*TTT*	*TTG*	*TGG*	*CCG*	*ACG*	*TTT*	*ATA*	*CTT*
C	L	K	L	G	D	N	D	Y	C	L	R	E	C	K
TGC	CTG	AAA	CTG	GGC	GAC	AAC	GAC	TAT	TGC	CTG	CGC	GAA	TGC	AAA
ACG	*GAC*	*TTT*	*GAC*	*CCG*	*CTG*	*TTG*	*CTG*	*ATA*	*ACG*	*GAC*	*GCG*	*CTT*	*ACG*	*TTT*
Q	Q	Y	G	K	G	A	G	G	Y	C	Y	A	F	A
CAG	CAG	TAC	GGC	AAA	GGC	GCG	GGC	GGC	TAT	TGC	TAC	GCG	TTT	GCG
GTC	*GTC*	*ATG*	*CCG*	*TTT*	*CCG*	*CGC*	*CCG*	*CCG*	*ATA*	*ACG*	*ATG*	*CGC*	*AAA*	*CGC*
C	W	C	T	H	L	Y	E	Q	A	I	V	W	P	L
TGC	TGG	TGC	ACC	CAC	CTG	TAC	GAA	CAG	GCG	ATT	GTG	TGG	CCG	CTG
ACG	*ACC*	*ACG*	*TGG*	*GTG*	*GAC*	*ATG*	*CTT*	*GTC*	*CGC*	*TAA*	*CAC*	*ACC*	*GGC*	*GAC*
P	N	K	R	C	S									
CCG	AAC	AAA	CGC	TGC	AGC									
GGC	*TTG*	*TTT*	*GCG*	*ACG*	*TCG*									

FIGURA 14B

Toxina Cll1 de *Centruroides limpidus limpidus*

a. Oligos internos:

Cll1upA 64 pb
5' AT ATT GTG AAC CTG AGC ACC GGC TGC AAA TAT GAA TGC TAT AAA CTG GGC GAC AAC GAC TAT TG 3'
Cll1LwB 63 pb
5' GCC GCC CGC GCC TTT GCC GTA CTG CTG TTT GCA TTC GCG CAG GCA ATA GTC GTT GTC GCC CAG 3'
Cll1upC 61 pb
5'GGC AAA GGC GCG GGC GGC TAT TGC TAT GCG TTT GGC TGC TGG TGC ACC CAT CTG TAC GAA C 3'
Cll1LwD 56 pb
5'GGT GCA GGT TTT TTT CGG CAG CGG CCA CAC CAC CGC CTG TTC GTA CAG ATG GGT GC 3'

b. Oligos externos:

B-EK-Cll1corr. 58 pb
5'TCT **GGA TCC** GGT **GAT GAC GAT GAC AAG** AAA GAA GGC TAT ATT GTG AAC CTG AGC ACC G 3'
Rev-XhoI-cll1 28 pb
5' TATA **CTC GAG** GGT GCA GGT TTT TTT CGG

c. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos:

K	E	G	YI		V	N	L	S	T	G	C	K	Y
AAA	GAA	GGC	TAT	ATT	GTG	AAC	CTG	AGC	ACC	GGC	TGC	AAA	TAT
TTT	*CTT*	*CCG*	*ATA*	*TAA*	*CAC*	*TTG*	*GAC*	*TCG*	*TGG*	*CCG*	*ACG*	*TTT*	*ATA*
E	C	Y	K	L	G	D	N	D	Y	C	L	R	E
GAA	TGC	TAT	AAA	CTG	GGC	GAC	AAC	GAC	TAT	TGC	CTG	CGC	GAA
CTT	*ACG*	*ATA*	*TTT*	*GAC*	*CCG*	*CTG*	*TTG*	*CTG*	*ATA*	*ACG*	*GAC*	*GCG*	*CTT*
C	K	Q	Q	Y	G	K	G	A	G	G	Y	C	Y
TGC	AAA	CAG	CAG	TAC	GGC	AAA	GGC	GCG	GGC	GGC	TAT	TGC	TAT
ACG	*TTT*	*GTC*	*GTC*	*ATG*	*CCG*	*TTT*	*CCG*	*CGC*	*CCG*	*CCG*	*ATA*	*ACG*	*ATA*
A	F	G	C	W	C	T	H	L	Y	E	Q	A	V
GCG	TTT	GGC	TGC	TGG	TGC	ACC	CAT	CTG	TAC	GAA	CAG	GCG	GTG
CGC	*AAA*	*CCG*	*ACG*	*ACC*	*ACG*	*TGG*	*GTA*	*GAC*	*ATG*	*CTT*	*GTC*	*CGC*	*CAC*
V	W	P	L	P	K	K	T	C	T				
GTG	TGG	CCG	CTG	CCG	AAA	AAA	ACC	TGC	ACC				
CAC	*ACC*	*GGC*	*GAC*	*GGC*	*TTT*	*TTT*	*TGG*	*ACG*	*TGG*				

FIGURA 14C

Toxina C1l2 de *Centruroides limpidus limpidus*

a. Oligos internos:

UpC1l2A 64 pb
5' AT CTG GTG AAC CAC AGC ACC GGC TGC AAA TAT GAA TGC TTC AAA CTG GGC GAC AAC GAC TAT TG 3'
C1l1LwB 63 pb
5' GCC GCC CGC GCC TTT GCC GTA CTG CTG TTT GCA TTC GCG CAG GCA ATA GTC GTT GTC GCC CAG 3' (Este Oligonucleotido se uso tanto para C1l1 como para C1l12, debido a su secuencia en comun)
UpC1l2C 61 pb
5'GGC AAA GGC GCG GGC GGC TAT TGC TAT GCG TTT GGC TGC TGG TGC AAC CAT CTG TAC GAA C 3'
C1l2LwD 56 pb
5'GTT GCA GGT TTT TTT CGG CAG CGG CCA CAC CAC CGC CTG TTC GTA CAG ATG GTT GC 3'

b. Oligos externos:

B-EK-C1l2 48 pb
5' TCT **GGA TCC** GGT **GAT GAC GAT GAC AAG** AAA GAA GGC TAT CTG GTG AAC 3'
XhoI-c1l2 28 pb
5' TAT **ACT CGA G** GTT GCA GGT TTT TTT CGG 3'

c. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos:

```
K   E   G     Y   L   V   N   H   S   T   G   C   K   Y
AAA GAA GGC TAT CTG GTG AAC CAC AGC ACC GGC TGC AAA TAT
TTT CTT CCG ATA GAC CAC TTG GTG TCG TGG CCG ACG TTT ATA
E   C   F   K   L   G   D   N   D   Y   C   L   R   E
GAA TGC TTC AAA CTG GGC GAC AAC GAC TAT TGC CTG CGC GAA
CTT ACG AAG TTT GAC CCG CTG TTG CTG ATA ACG GAC GCG CTT
C   K   Q   Q   Y   G   K   G   A   G   G   Y   C   Y
TGC AAA CAG CAG TAC GGC AAA GGC GCG GGC GGC TAT TGC TAT
ACG TTT GTC GTC ATG CCG TTT CCG CGC CCG CCG ATA ACG ATA
A   F   G   C   W   C   N   H   L   Y   E   Q   A   V
GCG TTT GGC TGC TGG TGC AAC CAT CTG TAC GAA CAG GCG GTG
CGC AAA CCG ACG ACC ACG TTG GTA GAC ATG CTT GTC CGC CAC
V   W   P   L   P   K   K   T   C   N
GTG TGG CCG CTG CCG AAA AAA ACC TGC AAC
CAC ACC GGC GAC GGC TTT TTT TGG ACG TTG
```

FIGURA 14D

Toxina Css2 de *Centruroides suffusus suffusus*

a. Oligos

Oligo Directo:
Cs2_4TRXUp 47 pb
5´GA **GGA TCC** GGT GAT GAC GAT GAC AAG AAA GAG GGC TAT CTG GTA AGC 3

Oligo Reverso
Cs2_4TRXLw 31 pb
5´GA **CTC GAG** GTT GCA TGT TTT ATT AGG AAG GG 3´

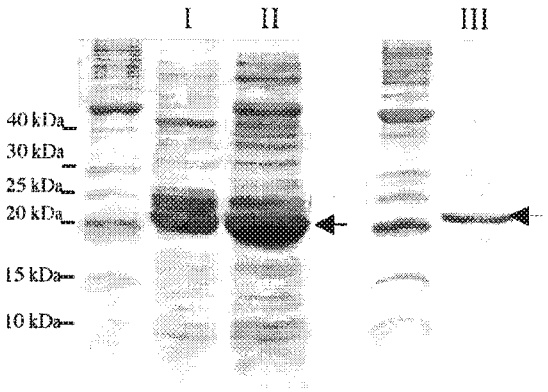
b. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos:

aaagagggctatctggtaagcaagagcacaggctgcaaatacgaatgccttaaattggga

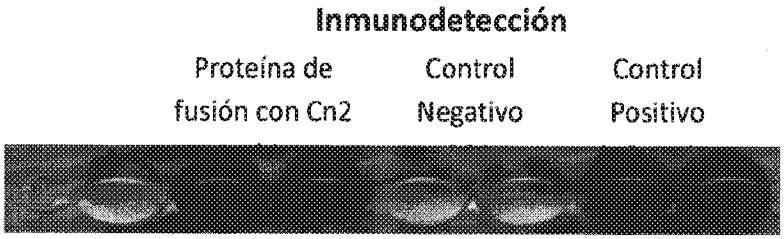
K E G Y L V S K S T G C K Y E C L K L G
gataacgattattgcctgcgcgaatgcaaacagcagtacggaaaaagcagtggcggctat
D N D Y C L R E C K Q Q Y G K S S G G Y
tgctacgcttttgcgtgctggtgcacacacttgtacgaacaagcagtggtctggcccctt
C Y A F A C W C T H L Y E Q A V V W P L
cctaataaaacatgcaac
P N K T C N

FIGURA 15

A)



B)



C)

Secuenciación del amino terminal de la proteína de fusión :
MAMSDKIIHL

FIGURA 16

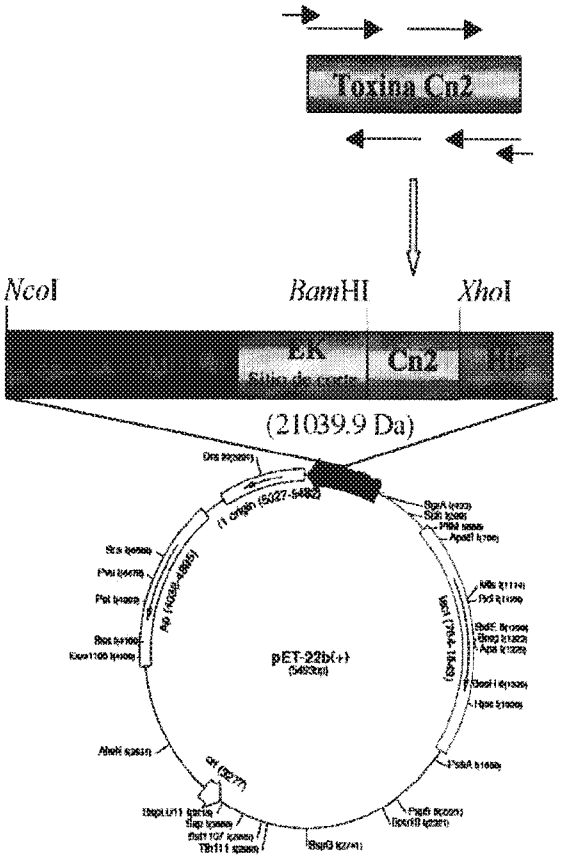


FIGURA 17A

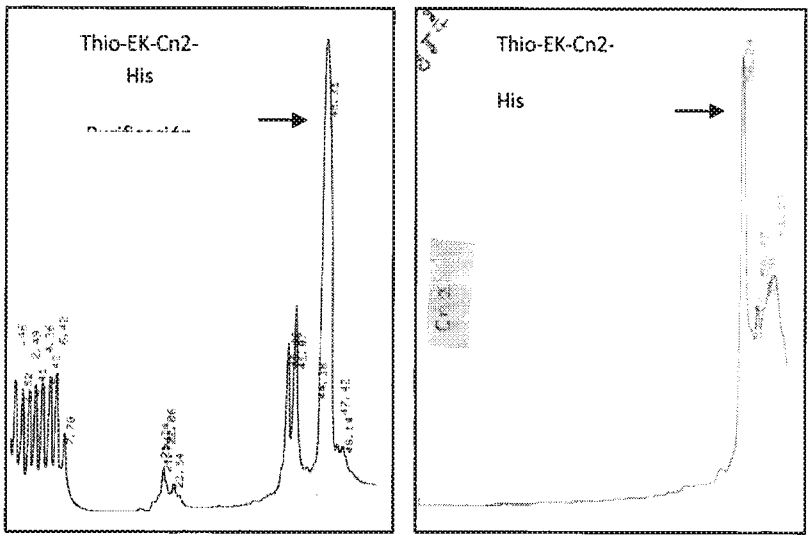


FIGURA 17B

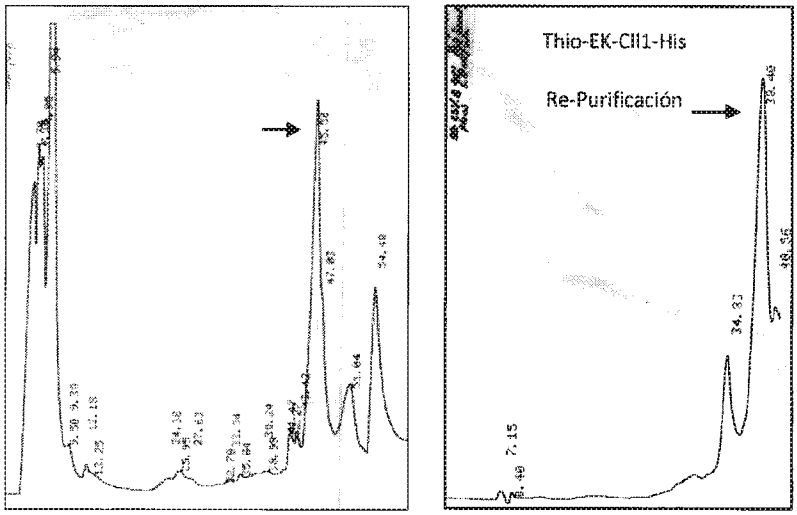


FIGURA 17C

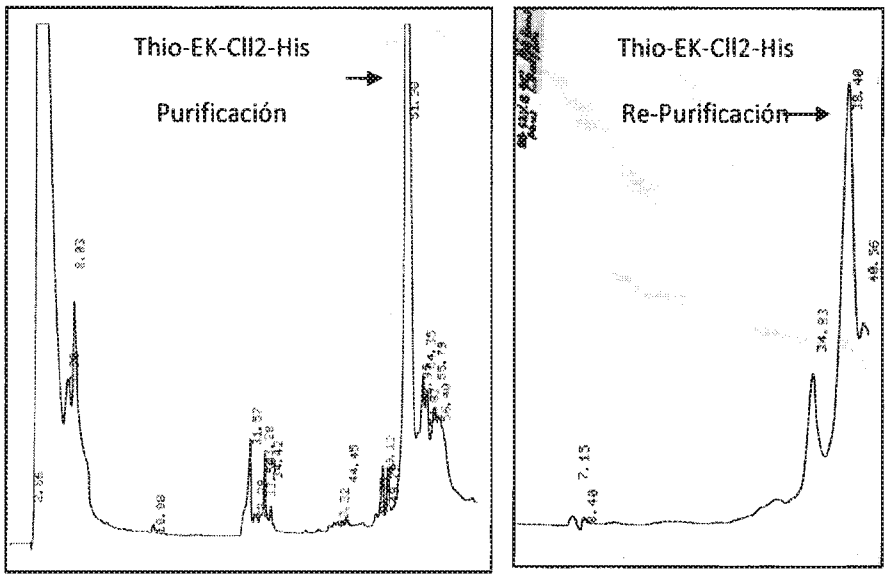


FIGURA 17D

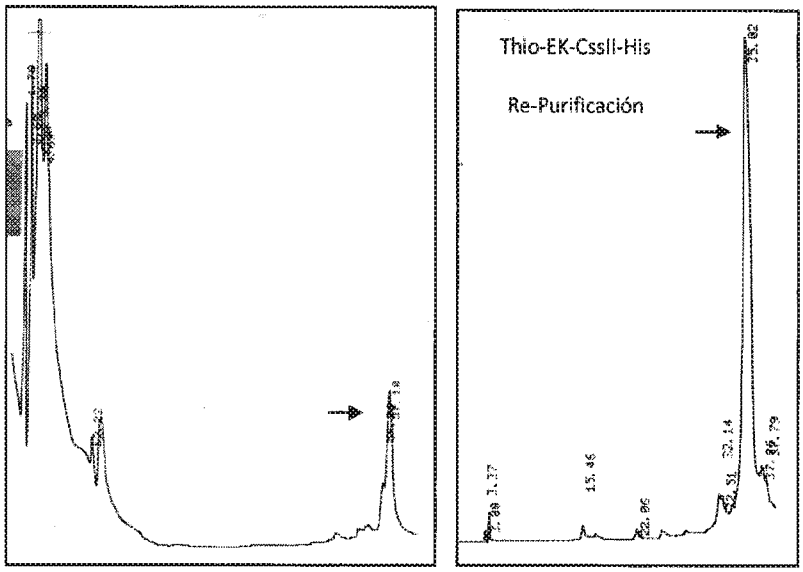


FIGURA 18

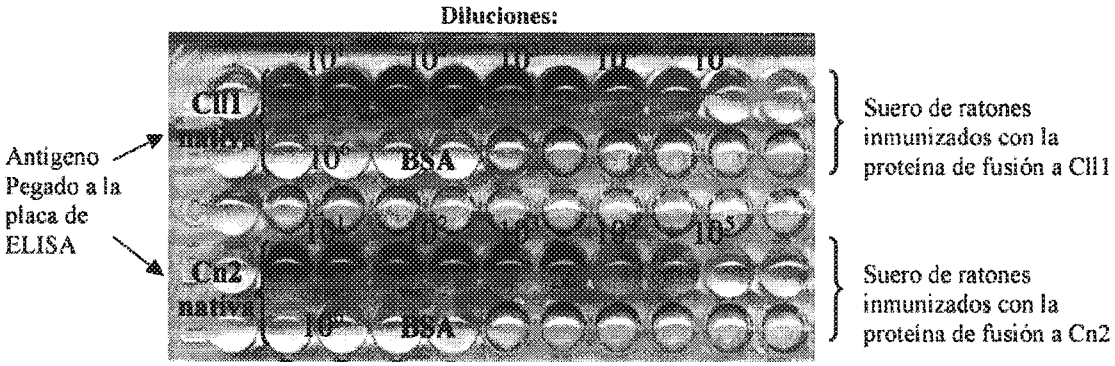
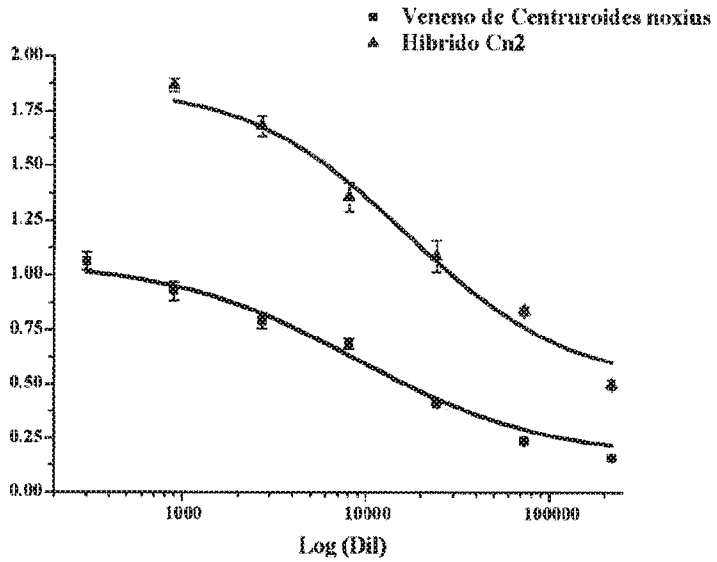


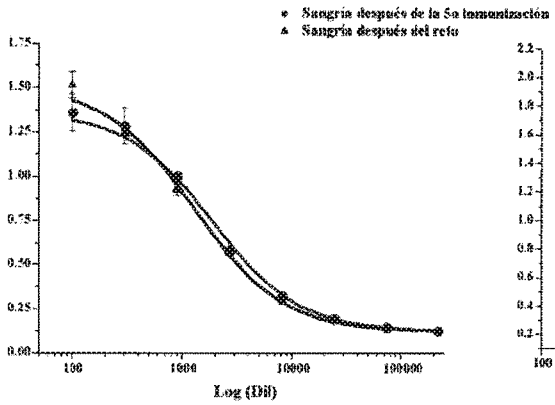
FIGURA 19



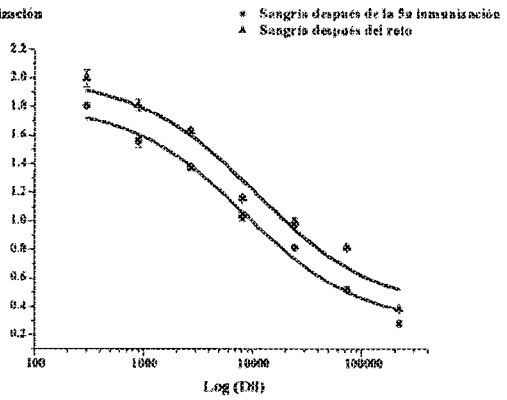
Antígeno	Títulos del suero
Veneno *C. noxius*	9165
Híbrido Cn2	16997

FIGURA 20

Veneno de *Centruroides suffusus suffusus*



Inmunógeno Híbrido Css2



Antígeno	Títulos del suero después de la quinta inmunización	Títulos del suero final
Veneno Css	1319	1890
Híbrido CssII	8670	11011

FIGURA 21

Seqnence entered (189 bases):

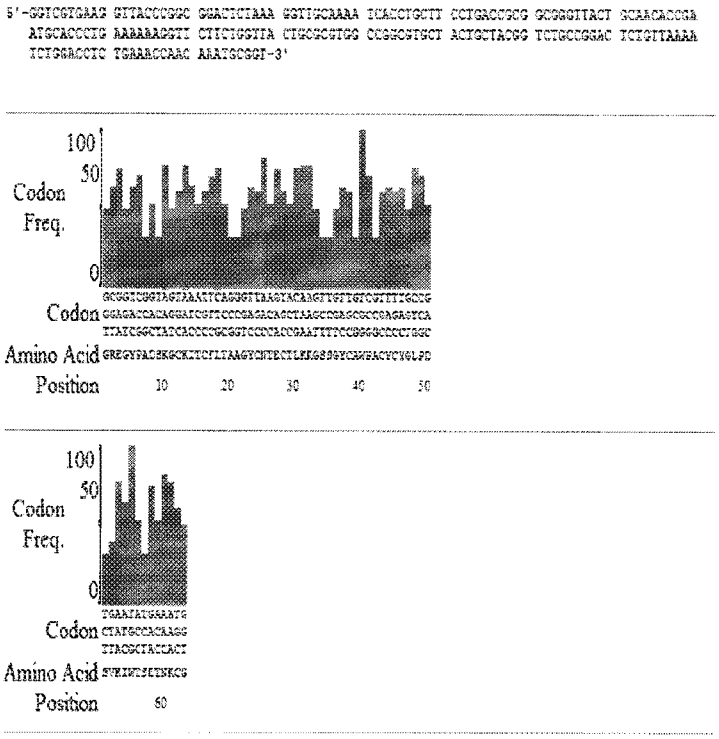
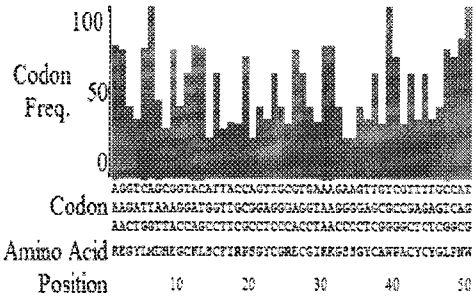


FIGURA 22

Sequence entered (183 bases):

```
5'-AAAGAAGGCT ATCTGATGGA TCATGAAGGC TGCAAACTGA GCTGCTTTAT TCGCCCGAGC GGCTATTGCG GCCGCGAATG
   CGGCATTAAA AAAGGCAGCA GCGGCTATTG CGCGTGGCCG ACGTGCTATT GCTATGGCCT GCCGAACTGC GTGAAAGTGT
   GCGATCGCGC GACCGACAAA TGC-3'
```



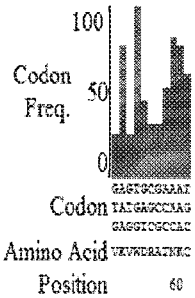


FIGURA 23A

1. Toxina Ts1

A. Oligos para su ensamble con uso preferencial de codones de *E. coli*: Ts1

Oligos Internos:

GamTserUp1 58 pb
5´ AAA GAA GGC TAT CTG ATG GAT CAT GAA GGC TGC AAA CTG AGC TGC TTT ATT CGC CCG A 3´

GamTserLw2 57 pb
5´ CTG CTG CCT TTT TTA ATG CCG CAT TCG CGG CCG CAA TAG CCG CTC GGG CGA ATA AAG3´

GamTserUp3 57 pb
5´ TTA AAA AAG GCA GCA GCG GCT ATT GCG CGT GGC CGG CGT GCT ATT GCT ATG GCC TGC3´

GamTserLw4 57 pb
5´ GCA TTT GTT GGT CGC GCG ATC CCA CAC TTT CAC CCA GTT CGG CAG GCC ATA GCA ATA 3´

Oligos externos:

Ts1_4TRXUp 48 pb
5´ GA **GGATCC** GGT **GATGACGATGACAAG** AAAGAAGGCTATCTGATGGATC 3´

Ts1_4TRXLw 24 pb
5´ GA **CTCGAG** GCATTTGTTGGTCGCG 3´

B. Ensamble del gen de Ts1

AAA GAA GGC TAT CTG ATG GAT CAT GAA GGC TGC AAA CTG AGC TGC TTT ATT CGC CCG A
AAA GAA GGC TAT CTG ATG GAT CAT GAA GGC TGC AAA CTG AGC TGC TTT ATT CGC CCG AGC
TTT CTT CCG ATA GAC TAC CTA GTA CTT CCG ACG TTT GAC TCG ACG AAA TAA GCG GGC TCG
G AAA TAA GCG GGC TCG

TT AAA AAA GGC AGC AGC GGC TAT TGC GCG TGG CCG
GGC TAT TGC GGC CGC GAA TGC GGC ATT AAA AAA GGC AGC AGC GGC TAT TGC GCG TGG CCG
CCG ATA ACG CCG GCG CTT ACG CCG TAA TTT TTT CCG TCG TCG CCG ATA ACG CGC ACC GGC
CCG ATA ACG CCG GCG CTT ACG CCG TAA TTT TTT CCG TCG TC

GCG TGC TAT TGC TAT GGC CTG C
GCG TGC TAT TGC TAT GGC CTG CCG AAC TGG GTG AAA GTG TGG GAT CGC GCG ACC AAC AAA
CGC ACG ATA ACG ATA CCG GAC GGC TTG ACC CAC TTT CAC ACC CTA GCG CGC TGG TTG TTT
ATA ACG ATA CCG GAC GGC TTG ACC CAC TTT CAC ACC CTA GCG CGC TGG TTG TTT

TGC
ACG

FIGURA 23B

1. Toxina TsNTxP

A. Oligos para su ensamble con uso preferencial de codones de E. coli: TsNTxP

Oligos Internos:

Rev1-TsNTxP 48 pb

5′-cgc ggt cag gaa gca ggt gat ttt gca acc ttt aga gtc cgc cgg gta-3′

Dir2-TsNTxP 51 pb

5′-ttc ctg acc gcg gcg ggt tac tgc aac acc gaa tgc cct gaa aaa aaa-3′

Rev2-TsNTxP 48 pb

5′-gta gca cgc cgg cca cgc gca gta acc aga aga acc ttt ttt cag ggt-3′

Dir3-TsNTxP 48 pb

5′-ccg gcg tgc tac tgc tac ggt ctg ccg gac tct gtt aaa atc tgg acc-3′

Oligos Externos:

Dir1-BEK-TsNTxP 50 pb

5′-CT **GGA TCC** GGT *GAT GAC GAT GAC AAA* ggt cgt gaa ggt tac ccg gcg gac-3′

Rev3-XhoI-TsNTxP 48 pb

5′-GTG **GTG CTC** GAG acc gca ttt gtt ggt ttc aga ggt cca gat ttt aac-3′

B. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos:

```
 G   R   E   G   Y   P   A   D   S   K   G   C   K   I   T   C   F
ggt cgt gaa ggt tac ccg gcg gac tct aaa ggt tgc aaa atc acc tgc ttc
cca gca ctt cca atg ggc cgc ctg aga ttt cca acg ttt tag tgg acg aag

 L   T   A   A   G   Y   C   N   T   E   C   T   L   K   K   G   S
ctg acc gcg gcg ggt tac tgc aac acc gaa tgc acc ctg aaa aaa ggt tct
gac tgg cgc cgc cca atg acg ttg tgg ctt acg tgg gac ttt ttt cca aga
 S   G   Y   C   A   W   P   A   C   Y   C   Y   G   L   P   D   S
tct ggt tac tgc gcg tgg ccg gcg tgc tac tgc tac ggt ctg ccg gac tct
aga cca atg acg cgc acc ggc cgc acg atg acg atg cca gac ggc ctg aga

 V   K   I   W   T   S   E   T   N   K   C   G
gtt aaa atc tgg acc tct gaa acc aac aaa tgc ggt

caa ttt tcg acc tcc aga ctt tgg ttg ttl acg cca
```

FIGURA 23C

2. Toxina Ts3

A. Oligos para su ensamble con uso preferencial de codones de *E. coli*: Ts3.

Oligos internos:
Rev1-Ts3 48 pb
5´-gtc gta gtt cca gca gat gta cgc gca gtt gtc gta ttc aac cgg gta-3'
Dir2-Ts3 48 pb
5´-tgg aac tac gac aac gcg tac tgc gac aaa ctg tgc aaa gac aaa aaa-3'
Rev2-Ts3 51 pb
5´-gca cag gat gtg aac cca gta gca gta gcc aga gtc cgc ttt ttt gtc ttt-3'
Dir3-Ts3 48 pb
5´-atc ctg tgc tac tgc tac ggt ctg ccg gac tct gaa ccg acc aaa acc-3'

Oligos Externos:
Dir1-BEK-Ts3 47 pb
5´-CT **GGA TCC** GGT *GAT GAC GAT* GAC aaa aaa aaa gac ggt tac ccg gtt-3'
Rev3-XhoI-Ts3 45 pb
5´-GTG **GTG CTC** GAG aga ttt gca ttt acc gtt ggt ttt ggt cgg ttc-3'

B. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos:

```
 K   K   D   G   Y   P   V   E   Y   D   N   C   A   Y   I   C   W
aaa aaa gac ggt tac ccg gtt gaa tac gac aac tgc gcg tac atc tgc tgg
ttt ttt ctg cca atg ggc cgg ctt atg ctg ttg acg cgc atg tag acg acc

 N   Y   D   N   A   Y   C   D   K   L   C   K   D   K   K   A   D
aac tac gac aac gcg tac tgc gac aaa ctg tgc aaa gac aaa aaa gcg gac
ttg atg ctg ttg cgc atg acg ctg ttt gac acg ttt ctg ttt ttt cgc ctg

 S   G   Y   C   Y   W   V   H   I   L   C   Y   C   Y   G   L   P
tct ggc tac tgc tac tgg gtt cac atc ctg tgc tac tgc tac ggt ctg ccg
aga ccg atg acg atg acc caa gtg tag gac acg atg acg atg cca gac ggc

 D   S   E   P   T   K   T   N   G   K   C   K   S
gac tct gaa ccg acc aaa acc aac ggt aaa tgc aaa tct
ctg aga ctt ggc tgg ttt tgg ttg cca ttt acg ttt aga
```

FIGURA 24

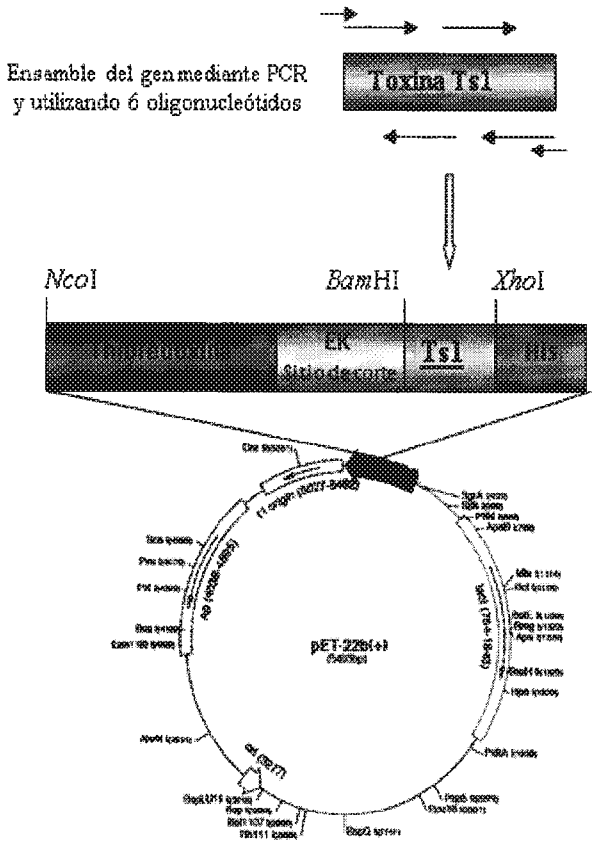

Ensamble del gen mediante PCR
y utilizando 6 oligonucleótidos
Toxina Tsi
NcoI
BamHI
XhoI
EK
Tsi
pET-22b(+)

FIGURA 25

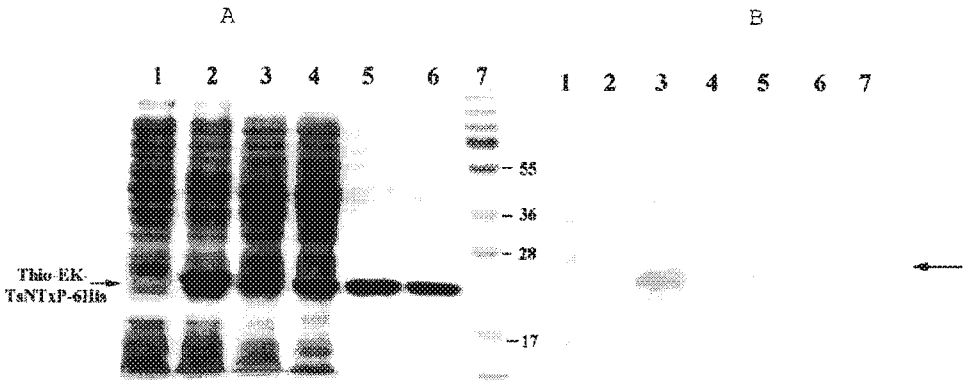


FIGURA 26A

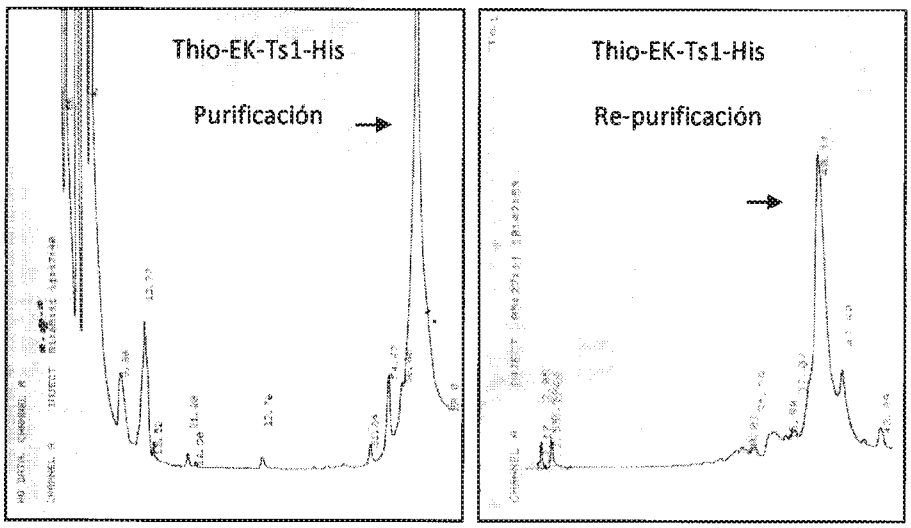


FIGURA 26B

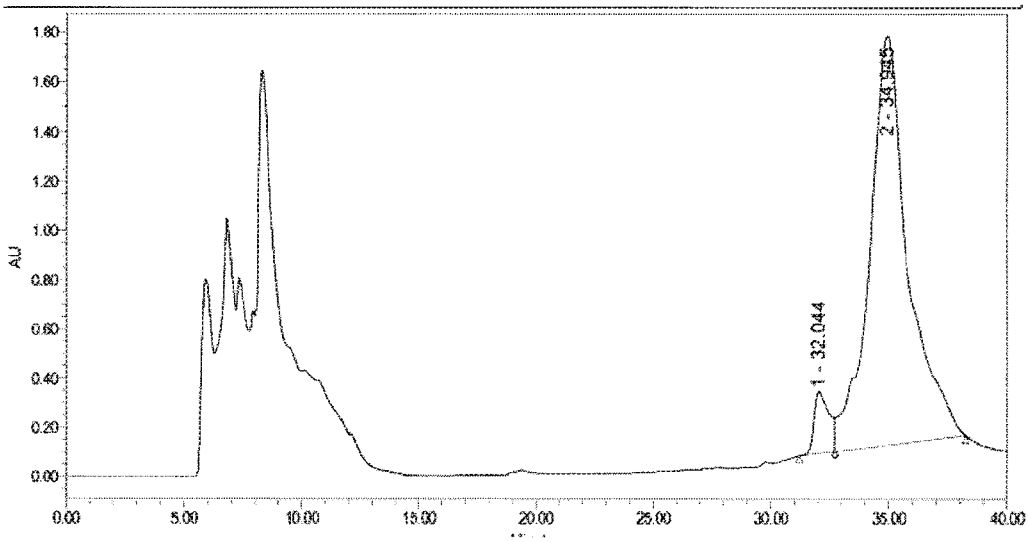


FIGURA 26C

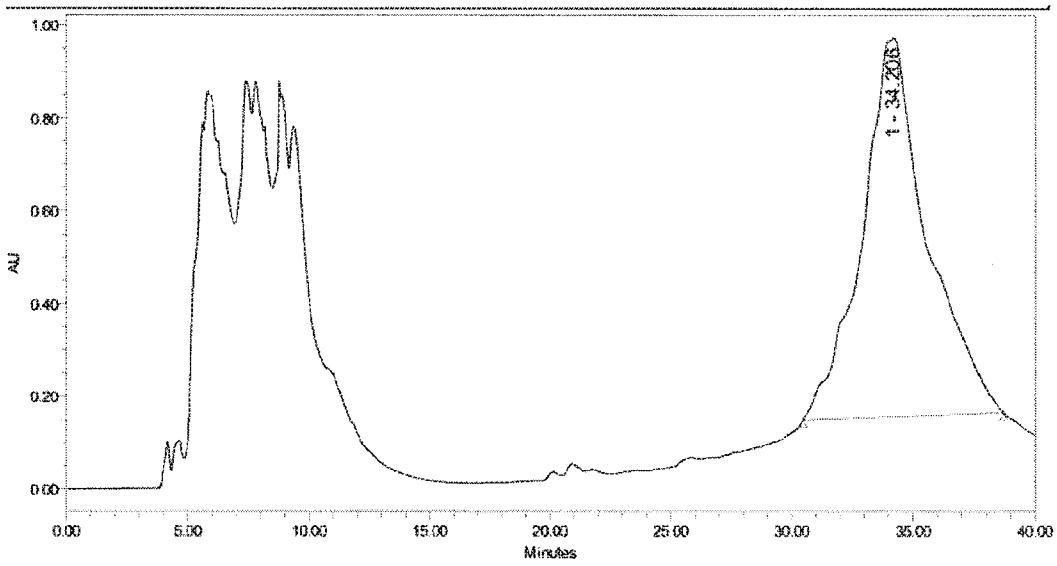


FIGURA 27

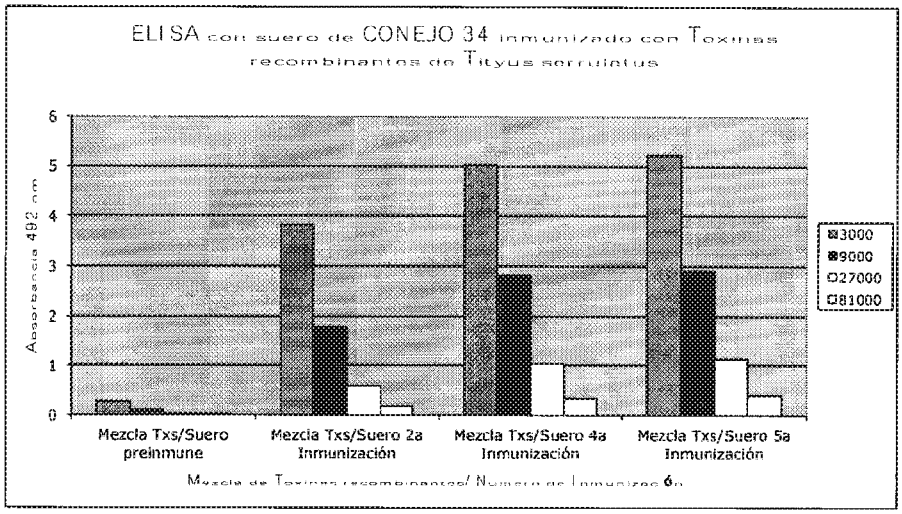


FIGURA 28

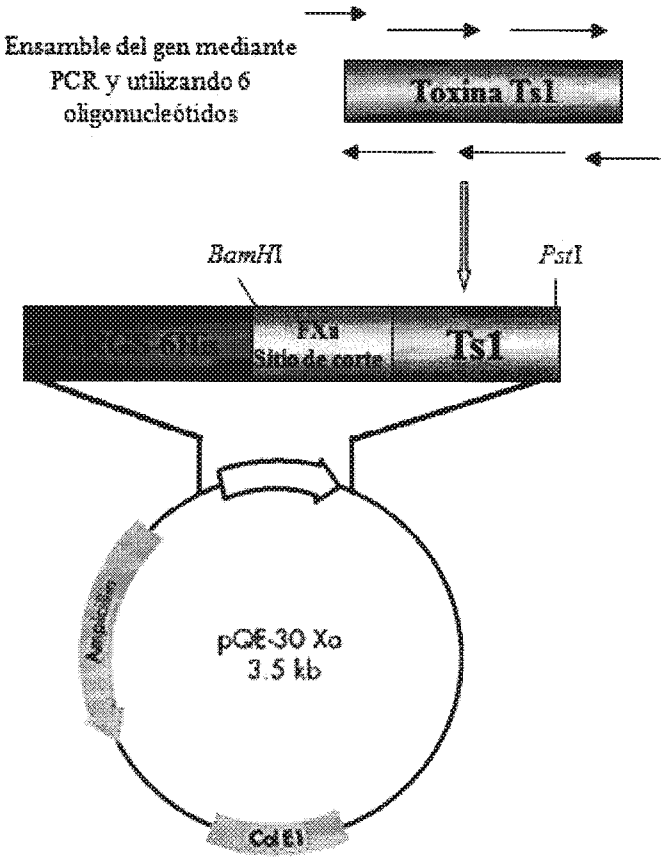


FIGURA 29

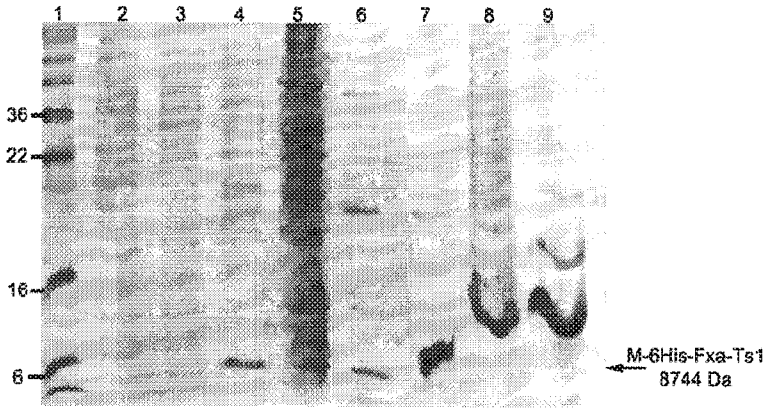


FIGURA 30

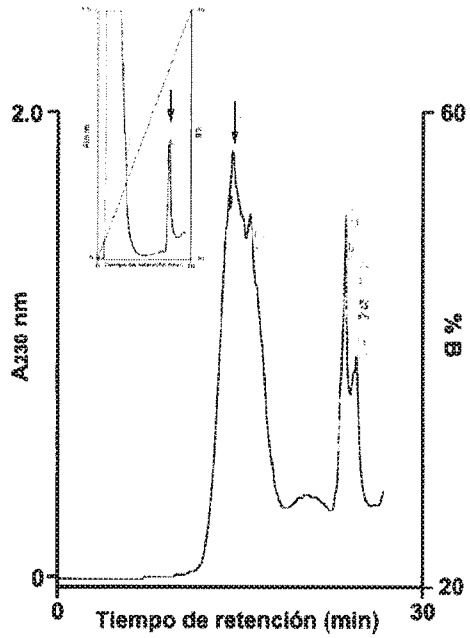


FIGURA 31

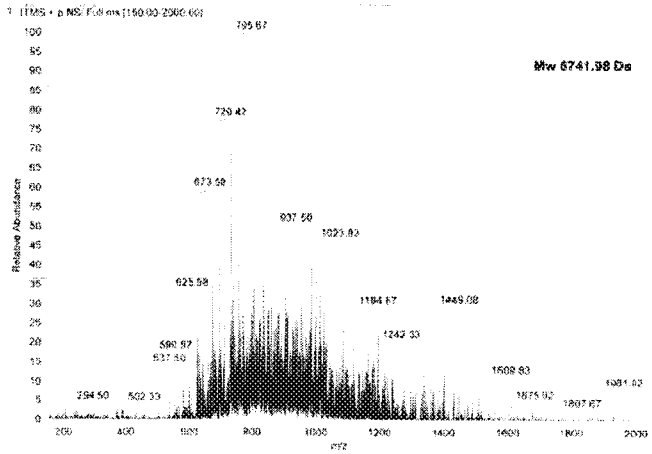


FIGURA 32

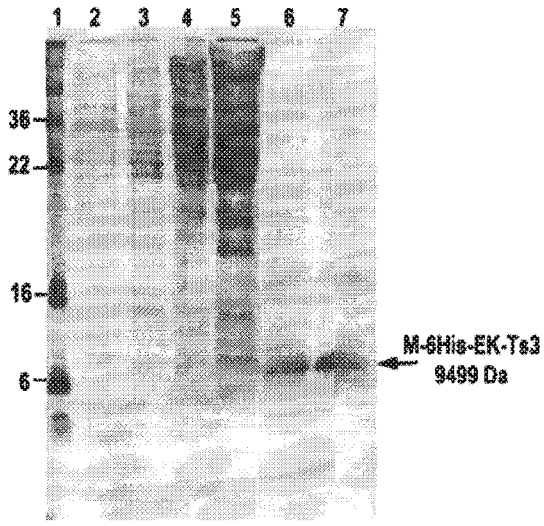


FIGURA 33

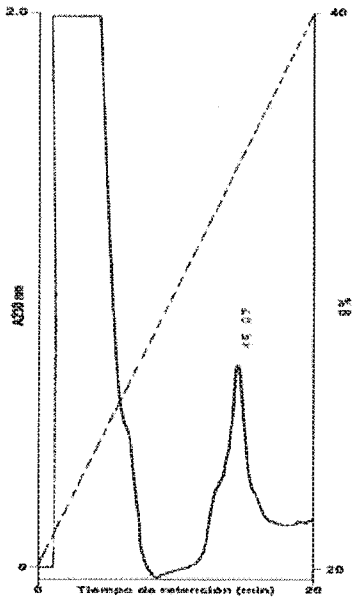


FIGURA 34

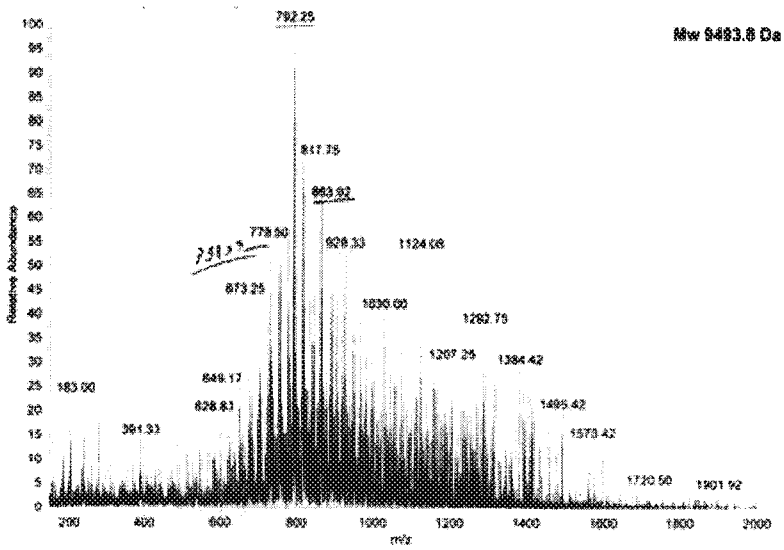


FIGURA 35

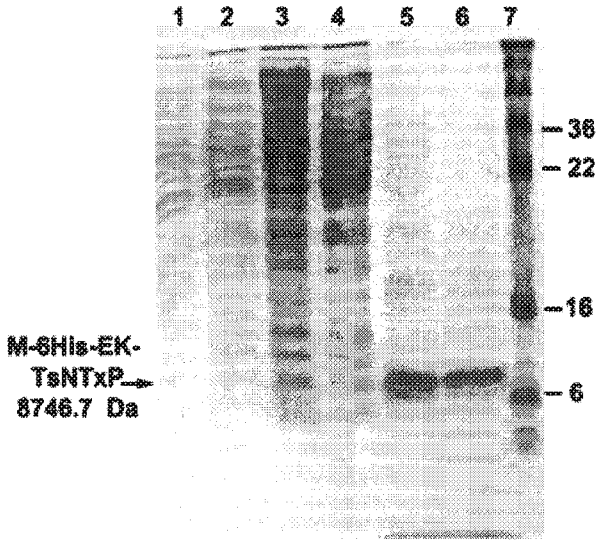


FIGURA 36

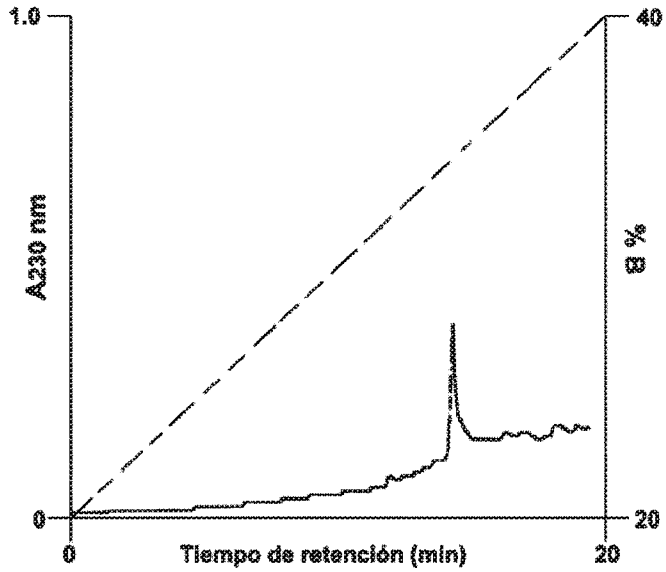


FIGURA 37

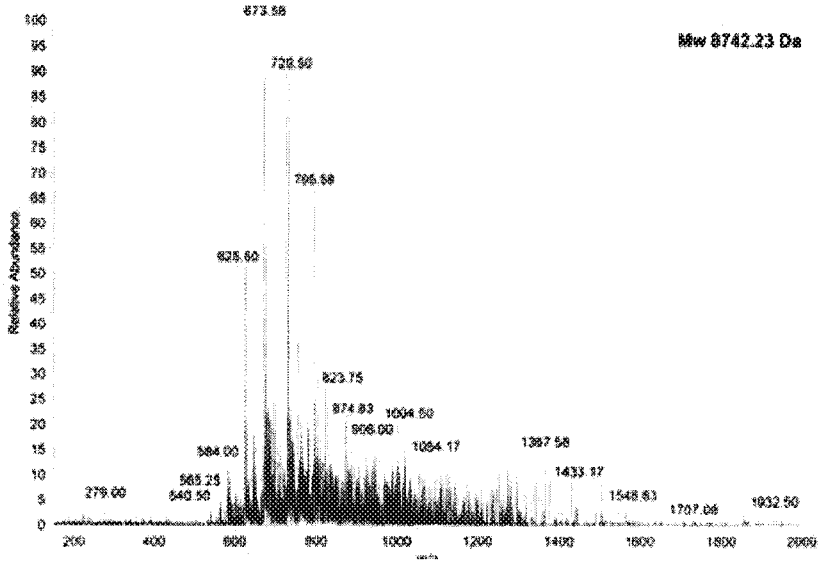

Mw 8742.23 Da
Relative Abundance
673.58
726.50
796.58
625.60
823.75
874.83
1004.50
906.00
1054.17
1387.58
1433.17
584.00
585.25
540.50
279.00
1548.83
1707.08
1932.50
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000

FIGURA 38

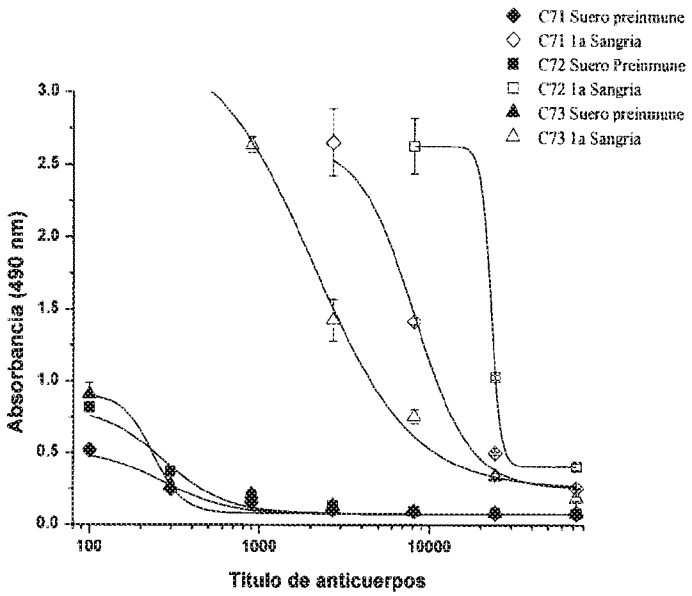


FIGURA 39

