



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

**“ EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE UN FRAGMENTO DE
ANTICUERPO scFv anti-MICA CANDIDATO PARA EL DESARROLLO DE UN
BIOFÁRMACO Y SU POSIBLE APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL
CÁNCER GÁSTRICO”**

*“Memoria conducente a la obtención del Título Profesional de Químico
Farmacéutico”*

Profesora Guía
Dra. María Carmen Molina Sampayo
Programa Disciplinario de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Profesora Patrocinante
Dra. Soledad Bollo Dragnic
Departamento de Química Farmacológica y
Toxicológica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

DANIEL ALBERTO CONTRERAS REYES

Santiago-Chile 2014

DEDICATORIA

*A mi padre Daniel Albero Contreras Menares, a mi hermana Romina
Nicole Contreras Reyes, pero en especial a
Mi madre Elizabeth del Carmen Reyes Benavides.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia que la compone mi Padre Daniel Contreras Menares, mi Hermana Romina Contreras Reyes y en especial a mi Madre Elizabeth Reyes, que sin ella no pude haber cumplido uno de mis grandes sueños, estudiar en la Universidad de Chile. Debo reconocer que ella ha sido mi pilar fundamental y que me ha apoyado siempre, puesto que es el segundo título profesional que me ayuda a conseguir, sin cuestionarme nada en absoluto, en lo contrario siempre animándome a seguir mis sueños. Mi Padre también lo ha hecho, pero como el no más sabe expresarlo.

En segundo lugar quiero agradecer a la Dra. María Carmen Molina, puesto que me brindó la oportunidad de poder estudiar uno de los temas que más gusta, la investigación y más aún, el campo de la Inmunología, teniendo en cuenta que llegué con cero conocimientos en el área, es por esto que fue una fuente motivadora en aprender cada día más en su área de investigación. No tan solo me ayudó en el área académica, sino que también fue muy comprensiva en los momentos que los necesitaba.

Junto a lo anterior quisiera agradecer a los miembros de los laboratorios Inmunovigilancia y Evasión Inmune (MCM): Karina, Macarena, Carolina H., Carolina R., Valentina, Felipe, Agnes y Marcela; como también a los integrantes del Centro de InmunoBiotecnología: Roberto, Matías, Norberto y en especial a Lorenzo por siempre brindar su ayuda y conocimiento.

En esta segunda época universitaria, conocí personas que siempre los llevaré conmigo, y que seremos además de colegas, amigos, entre ellos están: Lorena, Roxana, Nazaret, Natalia, Álvaro, Mitzi y Rayen; además de todas las persona que compartimos tantas alegrías y tristezas, que yo sé que siempre me apoyarán en las decisiones que tomaré en mi futuro.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Figuras.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	iv
Summary.....	vi
Resumen.....	vii
1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades del Cáncer.....	1
1.2 Cáncer Gástrico.....	3
1.3 Tratamiento del Cáncer Gástrico.....	5
1.4 Anticuerpos Terapéuticos.....	8
1.5 Inmunidad Antitumoral.....	10
1.6 Células NK.....	12
1.6.a Receptores de Células NK.....	13
1.6.b NKG2D (Natural Killer Group 2, type D).....	15
1.7 Ligandos de NKG2D.....	16
1.8 Expresión de los Ligandos de NKG2D.....	17
1.9 Mecanismos de Escape que Involucran al Sistema NKG2D-NKG2DL.....	18
1.10 Anticuerpos Monoclonales como Productos Biofarmacéuticos...	20
2. Hipótesis.....	23
3. Objetivo General.....	24
3. Objetivos Específicos.....	24
4. Metodología.....	25
4.1 O.E.1 Generar MICA recombinante en un sistema de expresión transiente.....	25
1. Materiales.....	25
2. Transfección en células HEK293T.....	25
3. Detección de proteína MICA recombinante en pellet de células HEK293T.....	26
4. Cuantificación de la proteína MICA recombinante en sobrenadante de células HEK293T.....	28
4.2 O.E.2. Expresar el fragmento scFv anti-MICA (scFv-MICA) a partir de una biblioteca de presentación de fagos establecida previamente y disponible en el laboratorio.....	28
1. Materiales.....	29
2. Expresión del scFv anti-MICA (scFv-MICA).....	29
3. Detección de scFv anti-MICA en bacterias <i>E. coli</i> cepas HB2151.....	30
4. Purificación y concentración del segmento scFv anti-MICA por FPLC (<i>Fast protein liquid chromatography</i>).....	31
5. Cuantificación de proteínas totales.....	32

4.3 O.E.3. Caracterizar la capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA recombinante por ELISA, y a MICA nativa mediante FACS.....	33
1. Materiales.....	33
2. ELISA.....	33
3. FACS.....	34
4.4 O.E.4. Analizar la capacidad de expresión del receptor de activación NKG2D en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en presencia de moléculas de scFv anti-MICA mediante citometría de flujo.....	34
1. Sangre Periférica.....	34
2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	35
3. Enriquecimiento de las células NK con interleuquina (IL)-2..	35
4. Análisis de la expresión del receptor de NKG2D en células NK y Linfocitos T CD8 ⁺ de sangre periférica por FACS.....	35
5. Estudio de Viabilidad.....	36
4.5 Expresión de resultados y Análisis estadístico.....	36
5. Resultados	37
5.1 Generar MICA recombinante en un sistema de expresión eucarionte.....	37
5.2 Expresar el fragmento scFv anti-MICA (scFv-MICA) a partir de una biblioteca de presentación de fagos establecida previamente y disponible en el laboratorio.....	42
5.3 Caracterizar la capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA recombinante por ELISA, y a MICA nativa mediante FACS.....	47
5.4 Analizar la capacidad de expresión del receptor de activación NKG2D en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en presencia de moléculas de scFv anti-MICA mediante <i>Cell sorting</i> por FACS.....	52
6. Discusión de Resultados	58
6.1 Expresión de la proteína MICA recombinante.....	58
6.2 Expresión del fragmento scFv anti-MICA.....	63
6.3 Caracterización biológica del fragmento scFv anti-MICA.....	66
7. Conclusiones	72
8. Referencias	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Marcadores fisiológicos del cáncer y sus blancos terapéuticos..	2
Figura 2.	Esquema sobre las tres etapas de la inmunología antitumoral: eliminación, equilibrio y escape.....	12
Figura 3.	Receptor de activación (A) con un motivo ITAM es inhibido en <i>trans</i> por un receptor inhibidor (B) con un motivo ITIM.....	14
Figura 4.	Diversidad de los ligandos del receptor NKG2D y las vías de señalización implicadas en la regulación de las células NK.....	16
Figura 5.	Distintos mecanismos de evasión inmune por el ataque a las células NK.....	20
Figura 6.	Vector pUCH que se utilizó para expresar el scFv-MICA en bacterias <i>E. coli</i> cepas HB2151.....	29
Figura 7.	MICA soluble se expresa en sobrenadante de células HEK293T transfectadas y en sus pellets con el vector pHLSEC-Avitag que porta el gen de MICA.....	38
Figura 8.	MICA soluble se expresa en sobrenadante de células HEK293T transfectadas y no así en sus pellet con el vector pHLSEC-Avitag que porta el gen de MICA, PEI y XBP1s.....	40
Figura 9.	ScFv anti-MICA se expresa mayoritariamente en el pellet de bacterias <i>E. coli</i> con plasmidio portador del gen del scFv.....	42
Figura 10.	ScFv anti-MICA se expresa mayoritariamente en la fracción insoluble del lisado bacteriano.....	43
Figura 11.	Cromatograma de la fracción periplasma del scFv anti-MICA...	44
Figura 12.	Cromatograma de la fracción soluble del scFv anti-MICA.....	44
Figura 13.	Cromatograma de la fracción insoluble del scFv anti-MICA.....	45
Figura 14.	Estimación de la concentración de proteína total en fracciones soluble, insoluble y periplasma purificadas provenientes de bacteria <i>E. coli</i> cepas HB2151.....	46
Figura 15.	Capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA recombinante.	47
Figura 16.	Capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA nativa en la línea celular de Cáncer Gástrico AGS.....	49
Figura 17.	Capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA nativa en la línea celular de Cáncer Gástrico MKN-45.....	50
Figura 18.	Detección de MICA nativa mediante scFv-Fagos anti-MICA en línea celular MKN-45.....	52
Figura 19.	Análisis de la expresión del receptor de activación NKG2D en células NK.....	54
Figura 20.	Análisis de la expresión del receptor de activación NKG2D en Linfocitos T CD8 ⁺	55
Figura 21.	Efecto del Imidazol en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo:	Anticuerpo Monoclonal
AcPo:	Anticuerpo Policlonal
ACK:	Erythrocytes Lysing Buffer
APC:	Aloficocianina
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
Akt:	Proteína Quinasa B
BSA:	Albúmina Sérica Bovina
BCR:	Receptor de Células B
CG:	Cáncer Gástrico
CHO:	Chinese Hamster Ovary
DAP10:	Proteína de activación de DNAX de 10 kDa
DAP12:	Proteína de activación de DNAX de 12 kDa
DMEM/F12:	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetracético
EGFR:	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ELISA:	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
FACS:	Fluorescence-activated cell sorting
FITC:	Isocianato de Fluoresceína
FPLC:	Fast Protein Liquid Chromatography
GM-CSF:	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Macrófagos
GPI:	Glicosil fosfatidil inositol
Grb2:	Proteína 2 de Unión al Receptor del Factor de Crecimiento
<i>H. pylori:</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HA:	Hemaglutinina
HEK293T:	Human Embryonic Kidney 293 with the SV40 large T antigen
HER:	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal Humano
HRP:	Enzima Peroxidasa de Rábano
IFN- γ :	Interferón Gamma
IgG:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
IPTG:	Isopropil tio- β -galactosido
ITAM:	Motivos de Activación en Inmuno-Receptores Basados en Tirosina
ITIM:	Motivos de Inhibición en Inmuno-Receptores Basados en Tirosina
kDa:	Kilodalton
LB:	Medio de Cultivo Luria Bertani (Caldo de Lisogenia)
Ld:	Ladder
MHC-I:	Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase I

MICA/B:	Proteína Relacionada con la Cadena A/B de la Molécula de Clase I del MHC
MFI:	Mediana de la Intensidad de Fluorescencia
min:	Minuto
mL:	Mililitro
mM:	Milimolar
mRNA:	RNA mensajero
NaCl:	Cloruro de Sodio
NK:	Natural Killer
NKG2D:	Receptor de Activación de Células NK, Grupo 2, Miembro D
NKG2DL:	Ligando de NKG2D
sNKG2DL:	Ligando Soluble de NKG2D
NKT:	Natural Killer T
p85:	Subunidad Regulatoria p85 de la PI3K
PBMC:	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBS:	Phosphate buffered Saline
PE:	Ficoeritrina
PeCy7:	Ficoeritrina-Cianina 7
PEI:	Polietilenimina
PI3K:	Fosfoinositol 3-quinasa
RAET1:	Primeros Transcritores del Ácido Retinoico 1
rMICA:	MICA Recombinante
RPMI:	Medio Roswell Park Memorial Institute
scFv:	Single-Chain Variable Fragment
SDS:	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS
SFB:	Suero Fetal Bovino
SPR:	Surface Plasmon Resonance
sMICA:	MICA soluble
TBS:	Tris-buffered Saline
TCA:	Ácido Tricloroacético
TCR:	Receptor de Células T
TGF- β :	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TLR:	Receptor Tipo Toll
TNF- α :	Factor de Necrosis Tumoral Alpha
Tris:	Tris-(hidroximetil)-aminometano
ULBP:	Proteína de Unión a UL16
UPR:	Unfolded Protein Response
VEGF:	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
WB:	Western Blot
XBP1:	X-box binding protein 1

SUMMARY

“Expression and biological characterization of a fragment of antibody anti-MICA scFv for development of a biopharmaceutical and its possible application in the treatment of gastric cancer”

Gastric Cancer is the second most common cause of cancer death worldwide. Cytolytic cells, such as natural killer (NK) cells and T lymphocytes, play an important role in the immune defense of the host against transformed cells. These cells express the activating receptor NKG2D, whose ligands, expressed on the cell surface of transformed cells, belong to the MIC (MICA and MICB) and ULBP/RAET (ULBP1-6) families. Although it is well established that these ligands are generally overexpressed in tumor cells, tumors can grow in immunocompetent hosts due to mechanisms of tumor escape from NKG2D-mediated immunosurveillance. One of these immune evasion strategies is the proteolytic shedding of MICA from the surface of cancer cells; as a consequence, the increase in the serum levels of soluble MICA would compromise the anti-tumor reactivity mediated by NKG2D-bearing cytotoxic lymphocytes. The aim of this work was part of a R&D of a new and completely human antibody against MICA with therapeutic purposes and consisted in the expression and biological characterization of a fragment of this antibody (scFv-MICA). In addition, we also expressed MICA in HEK293T cells.

The expression of MICA was performed by transfection between the vector carrying the gene of the protein and Poly(ethylenimine). Levels of concentration of MICA in the culture supernatant were measured by ELISA. Was also performed a co-transfection with XBP1s, and observed 4 times higher performance compared to a simple transfection. The expression of the anti-MICA scFv was carried out in *E. coli* (strain HB2151). ScFv-MICA was found mainly in the insoluble fraction of the lysate, and its subsequent purification was performed by FPLC.

The biological characterization of anti-MICA scFv was demonstrated by ELISA, as it bound specifically to recombinant MICA. Binding of the antibody was also observed, by flow cytometry, to native MICA present in two human gastric adenocarcinoma cell lines (AGS and MKN-45). However, it was not possible to reverse the expression levels of NKG2D receptor on cytolytic cells (present in PBMC) treated with 400 ng/mL of recombinant MICA in the presence of the antibody. These latter results may have possibly been caused by the action of imidazole, which generated more than 50% cell death. Nevertheless, based on all the results presented herein, it is possible to visualize new insights into the development of better strategies to express and purify anti-MICA scFv for future functional assays.

Funding by IDeA FONDEF CA12I10023 y FONDECYT 1130330

RESUMEN

El Cáncer Gástrico es la segunda causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo. Las células citolíticas, como las células *natural killer* (NK) y linfocitos T, desempeñan un papel importante en la defensa inmune del huésped contra las células transformadas. Estas células expresan el receptor de activación NKG2D, cuyos ligandos, expresados en la superficie celular, pertenecen a las familias MIC (MICA y MICB) y ULBP/RAET (ULBP-1-6). Aunque está bien establecido que estos ligandos son generalmente sobreexpresados en las células tumorales, los tumores son capaces de crecer en huéspedes inmunocompetentes debido a mecanismos de escape del tumor a la inmunovigilancia mediada por el receptor NKG2D. Una de estas estrategias de inmunoevasión es el corte proteolítico de MICA desde la superficie de células tumorales; como consecuencia, el aumento en los niveles séricos de MICA soluble disminuiría la reactividad antitumoral de los linfocitos citotóxicos que expresan el receptor NKG2D. El objetivo de este trabajo se enmarca en I&D de un nuevo anticuerpo completamente humano anti-MICA con fines terapéuticos y consistió en la expresión y caracterización biológica de un fragmento de este anticuerpo (scFv-MICA), además de la expresión del antígeno (MICA) en células HEK293T.

La expresión de MICA se realizó a través de un proceso de transfección, entre el vector que porta el gen de la proteína y Polietilenimina. Los niveles de concentración de MICA, en el sobrenadante de cultivo celular, fueron medidos por ELISA. Se realizó, además, una co-transfección con XBP1s, observándose un rendimiento 4 veces superior en comparación a una transfección simple. La expresión del scFv anti-MICA se realizó en bacterias *E. coli* (cepa HB2151), encontrándose principalmente en la fracción insoluble del lisado, con su consecuente purificación mediante la técnica de FPLC.

La caracterización biológica del scFv anti-MICA consistió en demostrar, por ELISA, su unión específica a MICA recombinante, además de su unión, por citometría de flujo, a MICA nativa presente en dos líneas celulares de Cáncer Gástrico (AGS y MKN-45). Sin embargo, no se pudo revertir los niveles de expresión del receptor NKG2D en células citolíticas (provenientes de PBMC) tratadas con 400 ng/mL de MICA recombinante en presencia del anticuerpo. Estos últimos resultados fueron probablemente provocados por acción del Imidazol, el cual generó más de un 50% de muerte celular. Sin embargo, consideramos que, en base a los resultados obtenidos durante este estudio, se podrían visualizar nuevas perspectivas en la metodología tanto de la expresión como purificación de scFv-MICA para futuros ensayos funcionales.

Financiamiento: FONDEF IDeA CA12110023 y FONDECYT 1130330.

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del Cáncer

Diversas evidencias indican que la carcinogénesis es un proceso que involucra múltiples pasos. Cada uno de estos se produce por un cambio genético que conduce a la transformación progresiva de una célula normal en una célula neoplásica. Durante este proceso Darwiniano, cada cambio genético sucesivo confiere algún tipo de ventaja adicional para el crecimiento del tumor y eventualmente el establecimiento de la metástasis ^[1].

Se ha sugerido que existen alteraciones esenciales en la fisiología de las células, las cuales se pueden apreciar en la **figura 1** con sus respectivos blancos terapéuticos, que colectivamente permiten la transformación tumoral. Estas alteraciones provocan ^[1]: autosuficiencia en la producción de factores de crecimiento, pérdida de respuesta a señales inhibitorias del crecimiento celular, evasión de o resistencia a la apoptosis, adquisición de potencial replicativo ilimitado, promoción de angiogénesis sostenida e invasión de tejido (capacidad metastásica).

En los últimos años se han ido incorporando otras alteraciones fisiopatológicas de las células cancerígenas, una de ellas es la reprogramación del metabolismo energético que estas mismas necesitan para continuos procesos de crecimiento y proliferación, principalmente a través de reacciones glicolíticas ^[2]. La otra alteración que ha tomado una importante área de investigación es la que relaciona al sistema inmunológico con la progresión del cáncer, la cual a través de la teoría de la inmunovigilancia, propone que las células y los tejidos están en un constante monitoreo por una parte siempre latente del sistema inmune, y esta es la responsable del reconocimiento y eliminación de la gran mayoría de incipientes células carcinogénicas ^[1].

Un incremento de la evidencia, desde el punto de vista de la ingeniería genética y de la epidemiología clínica, ha demostrado que el sistema inmune opera como una barrera significativa para la formación y progresión de los tumores. Tal comportamiento ha sido demostrado a través de que células

cancerígenas, altamente inmunogénicas son rápidamente eliminadas en huéspedes inmunocompetentes, fenómeno llamado inmunoedición.

Como resultado de esto quedarían clones débilmente inmunogénicos, los cuales posteriormente crecerán y generarán tumores sólidos; estos mismos clones en un futuro podrán colonizar tanto a huéspedes inmunodeficientes como huéspedes inmunocompetentes, para así generar un súbito crecimiento y diseminación del cáncer [3].

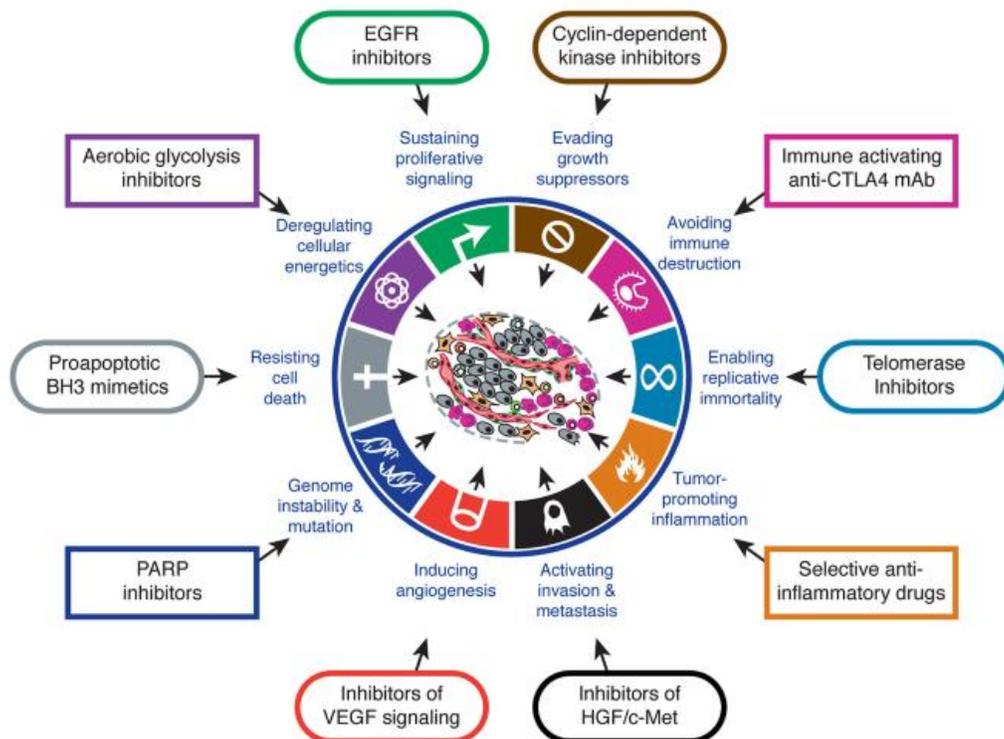


Figura 1: Marcadores fisiológicos del cáncer y sus blancos terapéuticos. Drogas que interfieren con cada una de las capacidades que adquieren las células cancerígenas para su crecimiento y progresión, que han sido desarrolladas y actualmente están en ensayos clínicos o en algunos casos su uso clínico ha sido aprobado en algunos tipos de cánceres [1].

La patología del cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En 2012 hubo 14,1 millones de casos y 8,2 millones de muerte por cáncer (GLOBOCAN: Agencia Internacional para Investigación del Cáncer de la OMS); 57% de los casos y 48% de las muertes ocurrieron en países en vías de desarrollo. En los países desarrollados, el cáncer de pulmón, mama, colorectal y próstata representan el 46% del total de los cánceres; mientras que en los países

en vías de desarrollo: sarcoma de Kaposi, cáncer cérvicouterino, cáncer hepático, cáncer gástrico y de esófago representan el 43% de la carga de enfermedad por cáncer. En Chile, el cáncer de estómago es el que presenta mayor porcentaje de la carga por cáncer, seguido de vesícula biliar, pulmón y mama ^[4].

1.2 Cáncer gástrico

El cáncer gástrico (CG) es un crecimiento tisular maligno, por proliferación contigua de células anormales de los tejidos que revisten el estómago, con capacidad de invasión y destrucción de los otros tejidos y órganos, principalmente el esófago e intestino delgado ^[5].

La etiología específica del cáncer gástrico se desconoce, pero hay gran cantidad de agentes ambientales que son sospechosos de intervenir en ella. Se le relaciona con dietas elevadas en concentración de nitratos, alimentos secos y salados, ahumados y mal refrigerados o almacenados ^[6], así como con bajo contenido de fibras y vitaminas ^[7], antecedentes familiares con cáncer, edad mayor a 60 años, nivel socioeconómico bajo ^[8], tabaquismo, alcoholismo y con grupo sanguíneo A positivo. También se ha sugerido que patologías como gastritis atrófica, úlcera gástrica e infección por *Helicobacter pylori* aumentan el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer ^[9].

La incidencia del cáncer gástrico ha disminuido en la mayoría de los países, probablemente como resultado de una reducción significativa de los factores de riesgo, incluyendo cambios en la preservación de los alimentos y una disminución en la prevalencia de infección por *H. pylori* ^[10].

En Chile, esta enfermedad corresponde a la segunda causa principal de muerte según el MINSAL (Minsal, 2010). El cáncer gástrico es el cuarto cáncer más común en el mundo y la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer, con 989.600 casos nuevos y 738.000 muertes por año, abarcando cerca de un 8% de todos los nuevos casos de cáncer y un 10% del total de las muertes debido a esta enfermedad ^[11]. Su incidencia varía de un país a otro, y Chile está dentro de los países con las tasas más altas, junto a Japón, Costa Rica y Singapur ^[12]. En Chile, el CG representa la primera causa de muerte por tumores malignos para

ambos sexos, y fallecen al año por esta causa alrededor de 3.000 personas (Minsal, 2010). La probabilidad media de que un chileno muera por cáncer gástrico es cerca de un 3% [13].

El cuadro clínico del cáncer gástrico es inespecífico; muchos pacientes no presentan síntomas o signos iniciales que faciliten el diagnóstico. La sintomatología es vaga: dolor o "pesadez" en el abdomen, que aumenta después de comer, además se presentan náuseas y vómitos. En etapas más avanzadas, se presenta fatiga, pérdida de peso, falta de apetito y dificultad para tragar [14].

El 95% de todas las neoplasias gástricas malignas son adenocarcinomas, lo que significa que se originan en cualquiera de las tres capas germinales de las células epiteliales, con un patrón microscópico de crecimiento glandular. El adenocarcinoma gástrico avanzado se describe morfológicamente de acuerdo con la clasificación de Bormann que los divide en cinco tipos: tipo I polipoide o exofítico; tipo II ulcerado o de bordes elevados; tipo III ulcerado infiltrante; tipo IV infiltrante difuso y tipo V no clasificado [15].

Esta clasificación guarda relación con el pronóstico, ya que en su mayoría las lesiones de tipo I están bien diferenciadas, entendiendo diferenciación como el grado en que las células neoplásicas se asemejan a las células normales equivalentes, tanto morfológica como funcionalmente. Mientras que de los tipos III en adelante pueden comprender neoplasias indiferenciadas, las cuales, por lo general, tienen un peor pronóstico [15].

Las opciones de tratamiento para el CG incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación de ellas, alternativamente anticuerpos monoclonales [1, 2, 16, 17]. La cirugía es el único tratamiento potencialmente curativo, lo cual involucra la resección quirúrgica, más comúnmente una gastrectomía total o subtotal, acompañada de una linfadenectomía. En Chile, se estima que cerca del 50% de los pacientes ya tienen metástasis ganglionares o compromiso de órganos vecinos al momento del diagnóstico, y aún la mayoría de los enfermos que pueden ser resecados se presentan en etapas avanzadas de la enfermedad. Este problema se complica aún más debido a que entre el 40% a 65% de los pacientes resecados, con intento curativo, presentará recurrencia. Por esto, la tasa de

sobrevida a 5 años en pacientes con cáncer gástrico resecable varía entre el 10% al 30%, con un tiempo de sobrevida promedio cercano a los 24 meses ^[18]. Debido a estos antecedentes, la morbilidad del CG es debida, en gran parte, a las metástasis, y la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico avanzado mueren a causa de las complicaciones por las metástasis, no por el tumor primario. Por lo tanto, una forma de aminorar la carga de enfermedad por el cáncer sería por medio de intervenciones de prevención primaria o detecciones tempranas efectivas.

1.3 Tratamiento de cáncer gástrico

La adición de anticuerpos monoclonales a los tratamientos convencionales con antineoplásicos, ha sido una excelente estrategia que ha demostrado una mejoría en pacientes con cáncer gástrico. Un estudio internacional, randomizado, doble ciego, con control de placebo y en fase III (REGARD) ^[19] fue llevado a cabo con la utilización de ramucirumab (anti-VEGFR-2, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), para ver su eficacia frente al aumento de sobrevida de pacientes con CG. Pacientes con estados avanzados de adenocarcinomas, tanto gástrico como gastroesofágico y con progresión de la enfermedad (n = 355), luego de una quimioterapia con compuestos de platino y compuestos de fluoropirimidina, fueron asignados con una terapia intravenosa de ramucirumab (8 mg/kg) (n = 238) o estar en el grupo control con placebo (n = 117). La supervivencia en término general en el primer grupo fue de 5,2 meses y en el grupo control fue de 3,8 meses, datos demuestran también que el grupo de ramucirumab presentó un mayor grado de hipertensión (16%), en comparación con el grupo control (8%) ^[19].

El estudio clínico RAINBOW fase III ^[20], tomó como tratamiento de segunda línea al ramucirumab más paclitaxel, comparándolo sólo con paclitaxel, el primer grupo demostró mejoría en la supervivencia en término general y en la supervivencia libre de progresión, en pacientes con adenocarcinoma gástrico metastásico y con adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, que habían experimentado un régimen de tratamiento con cisplatino y 5-fluorouracilo. Los

Pacientes (n = 655) fueron asignados aleatoriamente para recibir sólo el paclitaxel (80 mg/m² en los días 1, 8 y 15) o con ramucirumab (8 mg/kg por vía endovenosa, cada 2 semanas) en ciclos indefinidos de 4 semanas. La supervivencia en término general para pacientes con ramucirumab y paclitaxel fue de 9,6 meses, comparado con los 7,4 meses que tuvieron los pacientes que solamente recibieron paclitaxel, lo que representó una disminución del riesgo de un 19%. La supervivencia libre de progresión media fue de 4,4 meses y 2,9 meses, respectivamente, con un 27% en la disminución del riesgo. Los principales efectos adversos que se presentaron en el grupo con ramucirumab más paclitaxel fueron neutropenia, leucopenia, hipertensión, anemia, fatiga, dolor abdominal y astenia [20].

Otro estudio en fase II, multicéntrico, randomizado y doble ciego quiso ver la eficacia del anticuerpo monoclonal nimotuzumab (anti-EGFR, Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal) cuando era administrado junto a irinotecán, en comparación a la monoterapia de irinotecán en pacientes con CG avanzado tras haber estado con terapia de 5-fluorouracilo [21]. Los regímenes de administración para el primer grupo fueron de nimotuzumab 400 mg semanalmente más Irinotecán 150 mg/m² por cada dos semanas y para el grupo de monoterapia fue de Irinotecán 150 mg/m², hasta la progresión de la enfermedad. El "endpoint" primario fue supervivencia libre de progresión y el "endpoint" secundario fue la supervivencia en términos generales, seguridad, tolerabilidad y la correlación entre la eficacia y la expresión del EGFR. De los 83 pacientes en dicho estudio, 40 y 43 pacientes fueron aleatoriamente asignados al grupo de la biterapia y monoterapia, respectivamente. La supervivencia libre de progresión media para el primer grupo fue 73 días, en comparación con los 85 días del grupo que tenía solamente al irinotecán como terapia. La supervivencia en términos generales en el grupo de nimotuzumab más irinotecán fue de 18 meses y para el segundo grupo de pacientes fue de 18,4 meses. La conclusión de este estudio fue que no hubo superioridad en la eficacia, cuando se incorporó el anticuerpo monoclonal a los pacientes con una terapia refractaria con 5-fluorouracilo. Sin embargo,

nimotuzumab más irinotecán mostró una importante mejoría en la disminución en la expresión de los niveles de EGFR [21].

El estudio ToGA, de fase III y randomizado quiso evaluar la efectividad de trastuzumab (anti-HER2) en pacientes con CG avanzado. Pacientes con cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica fueron randomizados en dos grupos 1:1, el primer grupo consistía en la quimioterapia de capecitabina más cisplatino o 5-fluorouracilo más cisplatino administrado cada 3 semanas por 6 ciclos y el otro grupo con la misma quimioterapia antes señalada, más el anticuerpo trastuzumab por vía endovenosa (8 mg/kg) [17]. En total fueron 584 pacientes, de los cuales 290 fueron asignados al primer grupo, y 294 al segundo grupo con el anticuerpo monoclonal. El tiempo de supervivencia en términos generales fue de 17,1 y 18,6 meses, respectivamente. Las principales reacciones adversas (en ambos grupos) fueron de náuseas, vómitos y neutropenia, aunque se llegó a la conclusión que todas ellas fueron debido más a la quimioterapia convencional que al trastuzumab. Cabe mencionar que los pacientes, en general, que tuvieron una mejor respuesta a trastuzumab, fueron aquellos que tenían altos niveles de expresión de la proteína HER2 [17].

Existen otros estudios en los cuales su fin es ver diferencia significativa de eficacia, frente a dos vías de administración con regímenes de antineoplásicos distintos, uno de ellos es donde el objetivo principal del estudio clínico es comparar la eficacia de dos quimioterapias coadyuvantes, FLEEOX y XELOX, con diferentes vías de administración en pacientes con CG no resecable [22]. Con un número de pacientes de 85, 48 de ellos recibieron el régimen FLEEOX (5-fluorouracilo, leucovorina, epuribicina, etopósido y oxiplatino), los cuales fueron administrados por vía arterial y venosa de manera combinada, por 1 ó 2 ciclos, mientras que para el régimen XELOX (capecitabina más oxiplatino) 37 pacientes fueron administrados por vía venosa por 2 ó 4 ciclos. El "endpoint" a comparar fue la respuesta clínica. En el grupo FLEEOX, la respuesta clínica de la quimioterapia fue de 85,4% y la supervivencia en término general fue de 25 meses. En el grupo con la quimioterapia neoadyuvante XELOX la respuesta clínica fue de un 59,5%, con una supervivencia en término general de 9 meses. También se comprobó que

entre los dos grupos no hubo diferencias significativas entre las reacciones adversas, tóxicas ni en las complicaciones post-operatorias. Por tanto se concluyó que la administración por vía arterial y venosa es útil para mejorar la eficacia de quimioterapia neoadyuvante para pacientes con CG.

De esta forma se están realizando diversos estudios clínicos, no tan sólo para el CG, sino que para múltiples cánceres, combinando otras terapias como son radioterapia, cirugía de linfonodos cercanos al estómago, cirugía total o parcial y los tratamientos que utilizan distintos tipos de células y mediadores celulares.

1.4 Anticuerpos terapéuticos

Desde su aparición en la clínica a mediados de los años 80, los anticuerpos terapéuticos han tenido un gran éxito en el tratamiento de diversas enfermedades, especialmente del cáncer y patologías autoinmunes, entre otras. Su eficacia y sus efectos adversos relativamente leves, han permitido llegar a estar dentro de los medicamentos más vendidos en el mundo. Así, estos fármacos se están volviendo cada vez más importantes en la práctica clínica ^[23].

Los anticuerpos monoclonales recombinantes son anticuerpos monoclonales cuya generación se basa en la incorporación, mediante ingeniería genética, de una mayor proporción de proteína humana en la estructura de los anticuerpos monoclonales murinos, evitando de esta manera el rechazo del sistema inmune al ser introducidos en el organismo. De este modo, hoy se dispone de anticuerpos monoclonales recombinantes quiméricos y humanizados y, más recientemente, de los anticuerpos monoclonales recombinantes completamente humanos o anticuerpos humanos. Con el fin de ordenar la nomenclatura de los anticuerpos monoclonales, cómo fármacos, se utiliza el sufijo “-omab”, “-ximab”, “-zumab” y “-umab” para nombrar los anticuerpos de origen murino, quimérico, humanizado y completamente humano, respectivamente ^[24].

En los anticuerpos quiméricos, ambos dominios variables, tanto de las cadenas livianas como de las cadenas pesadas, son codificados por genes de origen murino. La parte murina o variable (un 34%) es indispensable para que el anticuerpo reconozca al antígeno; en tanto, la parte humana (un 66%) es

responsable de la acción efectora del anticuerpo, y en la que el sistema inmunológico del paciente receptor, mediante otras moléculas y células inmune, contribuirá a añadir efectividad a esta acción. De este modo, es posible modificar los anticuerpos monoclonales recombinantes casi de manera infinita, para dotarlos de propiedades efectoras y de reconocimiento diferente a los originales, además de minimizar la posibilidad de generar respuesta inmune al propio anticuerpo terapéutico [24].

Por su parte los anticuerpos humanizados, con un 90% de contenido proteico humano, han demostrado reducir significativamente su inmunogenicidad, es decir, el rechazo del sistema inmunológico. La humanización es una técnica que se basa en modificar la estructura terciaria del sitio de combinación del anticuerpo (paratopo) con el antígeno. En el paratopo, existen regiones responsables de la unión directa al antígeno denominadas CDR, mientras que otras zonas sólo sirven de soporte estructural, conocidas como FR. En los anticuerpos monoclonales, sólo las regiones CDRs son codificadas por genes murinos, mientras que el resto de la molécula es de origen humano. Por lo tanto, las regiones estructurales se obtienen de un anticuerpo humano, mientras que las regiones hipervariables CDRs proceden del anticuerpo monoclonal murino [24].

Los anticuerpos completamente humanos pueden ser obtenidos a partir de ratones transgénicos o utilizando genotecas en fagos filamentosos de genes que codifican scFv (Single-Chain Variable Fragment), fusionada a una proteína de un fago filamentosos. Los scFv, también denominados anticuerpos monocatenarios, son la fusión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas, unidas mediante un péptido conector (linker), que principalmente consta de residuos de glicina (para aportarle flexibilidad) y de serina o treonina para darle solubilidad [24].

Sin duda, los anticuerpos terapéuticos más exitosos hasta ahora han sido aquellos desarrollados para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, la principal causa de muerte en esta enfermedad deriva de complicaciones por metástasis, no por tumores primarios, por lo que la mayoría de estos anticuerpos están diseñados contra moléculas involucradas en los múltiples eventos secuenciales y selectivos

que ocurren en esta etapa, como desprendimiento de células tumorales, invasión local, motilidad, angiogénesis, invasión de vasos, supervivencia en la circulación, adhesión a células endoteliales, extravasación y recrecimiento en diferentes órganos. Así estos nuevos fármacos, dentro de los cuales los anticuerpos terapéuticos cumplen un rol central, se podrían agrupar en agentes que:

- a) Interfieren directamente con las señales de crecimiento, tales como aquellos que inhiben al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) (cetuximab) ^[25] o al Receptor de Tirosina Quinasa ErbB2, miembro de la familia de moléculas HER (trastuzumab) ^[26].
- b) Inhiben la formación de nuevos vasos o al proceso de angiogénesis, como aquellos que inhiben el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) (bevacizumab) ^[27].
- c) Interfieren con el potencial que presentan las células de replicarse ilimitadamente, como los inhibidores del ciclo celular (flavopiridol) ^[28].
- d) Promueven la apoptosis, como los inhibidores del proteosoma (bortezomib) ^[29].
- e) Inhiben la invasión del tejido y el proceso de la metástasis, como los inhibidores de las metaloproteasas de la matriz (marimastat) ^[30].
- f) Revierten la inhibición o regulación de las funciones efectoras del sistema inmune (ipilimumab) ^[31].

Para el desarrollo de un potencial blanco terapéutico es importante o necesario conocer los mecanismos por el cual los tumores deberían ser eliminados naturalmente y como estos evaden al sistema inmune.

1.5 Inmunidad antitumoral

La inmunidad antitumoral, al parecer, no sólo desempeña un papel importante en la prevención y eliminación del tumor, sino que también en la conformación de la enfermedad neoplásica. Así, en la interacción entre el huésped y las células tumorales, se han propuesto tres fases esenciales: eliminación, equilibrio y escape (**Figura 2**) ^[32]. La fase de eliminación corresponde a la hipótesis original de la inmunovigilancia antitumoral de Burnet y Thomas, mediante

el cual el sistema inmunitario reconoce y destruye las células tumorales que se han desarrollado, como resultado del fallo de la vigilancia no inmunológica intrínseca (por ejemplo, la reparación del ADN y el control de la apoptosis). Como consecuencia de la fase de eliminación todas las células tumorales pueden ser destruidas o parcialmente erradicadas. En este último caso, se establece la segunda fase, donde se observa un equilibrio entre el crecimiento o desarrollo del tumor y el sistema inmunológico, que puede llegar a durar varios años. Durante este período, el desarrollo del tumor puede permanecer latente o seguir evolucionando y se acumulan más cambios (por ejemplo, modificaciones epigenéticas, mutaciones en el ADN, cambios relacionados en la expresión génica, entre otros). Estos cambios pueden modular la expresión de los antígenos específicos del tumor y el estrés inducido por las células tumorales, lo que hace que sean sensibles o resistentes a la eliminación por el sistema inmune del huésped. Durante la fase de escape, el sistema inmune no restringe el crecimiento del tumor, lo que resulta en un tumor de crecimiento progresivo. Las células, con inmunogenicidad reducida, son ahora más capaces de sobrevivir y crecer en un huésped inmunocompetente, lo que explica la aparente paradoja de la formación de tumores en individuos inmunológicamente intactos [32].

En el proceso de eliminación se combinan los efectores de la inmunidad innata y adaptativa para destruir las células transformadas [33]. El éxito de esta fase depende de moléculas tales como receptores de tipo Toll (TLR), citoquinas, otras diversas moléculas y células. Las principales células de la inmunidad adaptativa e innata, primera barrera inmunológica, son los linfocitos citotóxicos T $\gamma\delta$, linfocitos T citotóxico CD8⁺ y células *natural killer*. La actividad de estos linfocitos infiltrados en el tumor se asocia con el perfil de citoquinas locales T "Helper" 1 (Th1) y la producción de interferón (IFN- γ) [34].

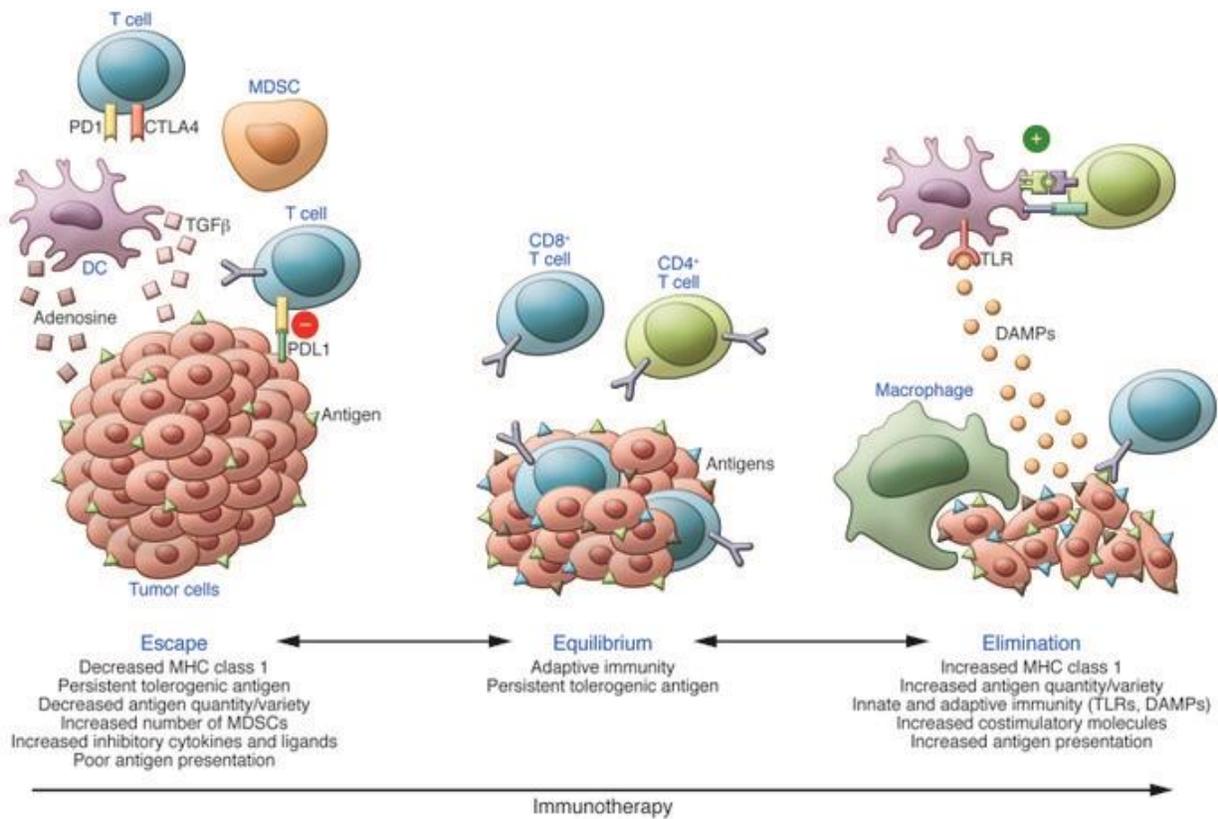


Figura 2: Esquema sobre las tres etapas de la inmunología antitumoral: eliminación, equilibrio y escape. En la hipótesis de la inmunoedición, el sistema inmune tiene un balance con respecto a los cambios del tumor entre el escape de este mismo (mutaciones de antígenos específicos), equilibrio y eliminación, de las cuales son las responsables de generar tumores en pacientes inmunocompetentes [35].

1.6 Células NK

Las *células NK* comprenden aproximadamente de un 5 a un 15% de las células linfoides circulantes en sangre periférica. Derivan de un precursor CD34⁺ y completan su desarrollo en la médula ósea. De acuerdo a sus marcadores de superficie celular, normalmente están definidas como CD3⁻CD56⁺ y se pueden dividir en dos sub-poblaciones principales: CD56^{dim}CD16⁺ y CD56^{bright}CD16⁻. La población CD56^{dim} predomina en sangre periférica (aproximadamente 95% de las *células NK*) y en los sitios de inflamación, y presenta un alto potencial citotóxico que las hace capaces de lisar células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Al contrario, las células de la población CD56^{bright} predominan en los linfonodos (aproximadamente 75% de las *células NK*) y una vez activadas estas últimas, producen principalmente citoquinas inmunorreguladoras (IFN-γ, TNF-α, TNF-β, IL-10, IL-13,

GM-CSF) que juegan un papel muy importante durante el desarrollo de la respuesta inmune innata y el disparo de la respuesta inmune adaptativa [36].

Las *células NK* fueron descritas hace más de 30 años por su capacidad de lisar células tumorales o células infectadas con virus, que no expresaban moléculas de clase I del complejo de mayor histocompatibilidad (MHC). Este complejo dio origen a la hipótesis del *missing self*, en la que se proponía que las *células NK* monitoreaban los niveles de expresión de moléculas de clase I del MHC sobre la célula y destruían a aquéllas células que por diversos mecanismos habían dejado de expresar niveles normales de estas moléculas [37], generalmente células tumorales o infectadas con virus. Aunque se las asoció inmediatamente con el fenómeno de vigilancia inmunológica, el reconocimiento de células con niveles bajos o nulos de moléculas MHC de clase I, implicaba necesariamente la existencia de receptores activadores de citotoxicidad que dispararán la actividad biológica de las células citotóxicas, ya que los glóbulos rojos, células sin MHC, no eran lisados por las *células NK*. Así, también las *células NK* lisan células infectadas que aumentan la expresión de receptores de activación, sin variar la expresión de MHC de clase I [38].

La unión de receptores activadores a moléculas de membrana de células blanco no sólo desencadena la citotoxicidad sino que también promueve la producción de citoquinas, la migración de las *células NK*, su activación y su proliferación [39]. Cada *célula NK* parece expresar su propio repertorio de receptores activadores e inhibidores (usualmente entre 3 y 4 de cada tipo) de manera que la citotoxicidad se encuentra finalmente regulada por un balance de señales provenientes de receptores inhibidores, que interactúan con las moléculas del MHC clase I y de receptores activadores que reconocen moléculas relacionadas con el MHC de clase I en las células blanco [40].

1.6a Receptores de células NK

A diferencia de lo que ocurre con los linfocitos T y B, las *células NK* no emplean un único receptor para el reconocimiento de las células blanco. Por el contrario expresan un conjunto de receptores asociados a cascadas de

señalización intracelular específicas. Durante los últimos años se han caracterizado un número importante de estos receptores, todos los cuales son proteínas integrales de membrana asociados a subunidades transductoras de señales específicas.

Funcionalmente, los receptores de *células NK* se dividen en inhibidores y activadores de citotoxicidad (**Figura 3**). Los receptores inhibidores poseen en su cola citoplasmática un dominio ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina), que luego de fosforilarse recluta fosfatasa de la familia SHP-1 que previenen las funciones efectoras de las *células NK* ^[41]. Por el contrario, los receptores activadores de citotoxicidad poseen una cola citoplasmática corta que carece del dominio ITIM. Para llevar a cabo la señalización se asocian con diferentes moléculas adaptadores, tales como CD3 ζ , Fc ϵ R1 γ y DAP12, que poseen motivos ITAM o DAP10, que contiene un motivo YxxM. La unión de estos receptores a sus ligandos resulta en la activación de una cascada de fosforilación, mediada por tirosin-quinasas intracelulares, que en última instancia llevan a la producción de citoquinas y movilización de gránulos secretorios que contienen perforina y granzimas ^[42].

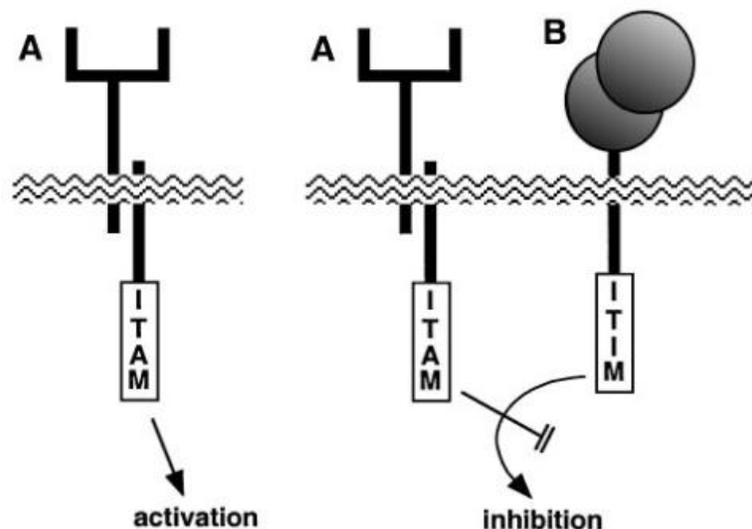


Figura 3: Receptor de activación (A) con un motivo ITAM es inhibido en *trans* por un receptor inhibidor (B) con un motivo ITIM. Una secuencia aminoacídica conservada localizada en los dominios citoplasmáticos de una familia de proteínas de transmembrana que pueden regular negativamente (ITIM) o positivamente (ITAM) las funciones efectoras de las células NK ^[40].

1.6b NKG2D (Natural Killer Group 2, type D)

Dentro de los receptores activadores de las *células NK*, el receptor NKG2D es uno de los que ha sido mejor caracterizado y a la vez más investigado. Este receptor es una proteína de transmembrana de tipo II que pertenece a la familia de lectinas de tipo C ^[43], y se expresa en linfocitos NK, NKT y T $\gamma\delta$ de la inmunidad innata y algunos linfocitos T CD8⁺ citotóxicos de la inmunidad adquirida. El receptor NKG2D consiste en dos proteínas de transmembrana de tipo II unidas por un puente de disulfuro. El dominio de transmembrana posee aminoácidos cargados positivamente; el dominio intracelular es muy corto y no tiene propiedad de señalización, por lo que, para la transducción de señales, NKG2D se asocia, como muchos otros receptores activadores, con proteínas adaptadoras por medio de los residuos ITAMs cargados en su dominio de transmembrana. En humanos, el receptor NKG2D forma un complejo con la molécula adaptadora DAP10 (proteína activadora DNAX de 10 kDa), la cual se asocia con el receptor NKG2D como homodímeros ^[44]. El complejo de señalización NKG2D forma una estructura hexamérica debido a que cada homodímero de NKG2D se une a dos homodímeros de moléculas adaptadoras ^[45]. DAP10 tiene en su cola citoplasmática un motivo Tyr-Ile-Asn-Met (YINM), que, al ser fosforilado, recluta la subunidad p85 de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y a la proteína adaptadora Grb2 (proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento), la cual interacciona con Vav1. Esta señal estimula la proliferación y citotoxicidad de las *células NK*, y provee de co-estimulación a los linfocitos T activados ^[46].

El grado de respuesta del receptor de NKG2D no sólo depende de la unión con sus respectivos ligandos, sino que también de otros estímulos que pueden influenciar el estado de activación de la vía NKG2D-DAP10, tales como la presencia de IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, entre otras citoquinas ^[47-49].

1.7 Ligandos de NKG2D (NKG2DL)

Una característica del sistema NKG2D es que existen múltiples ligandos para este receptor (**Figura 4**), que comparten una lejana homología con la proteína del MHC de clase I. Los primeros ligandos identificados fueron los MHC *class I chain related proteins* (MIC) A y B, que se encuentran codificados en el MHC humano (6p21.3) [50]. Su secuencia se asemeja a la de las proteínas clase I del MHC en sólo 27%, y aunque presenta tres dominios: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, éstos no se asocian con β -2-microglobulina ni al péptido [50, 51]. Una segunda familia de ligandos de NKG2D, la *UL16 binding proteins* (ULBP), se codifica fuera de la región del MHC (6q24.4-q25.3) [52].

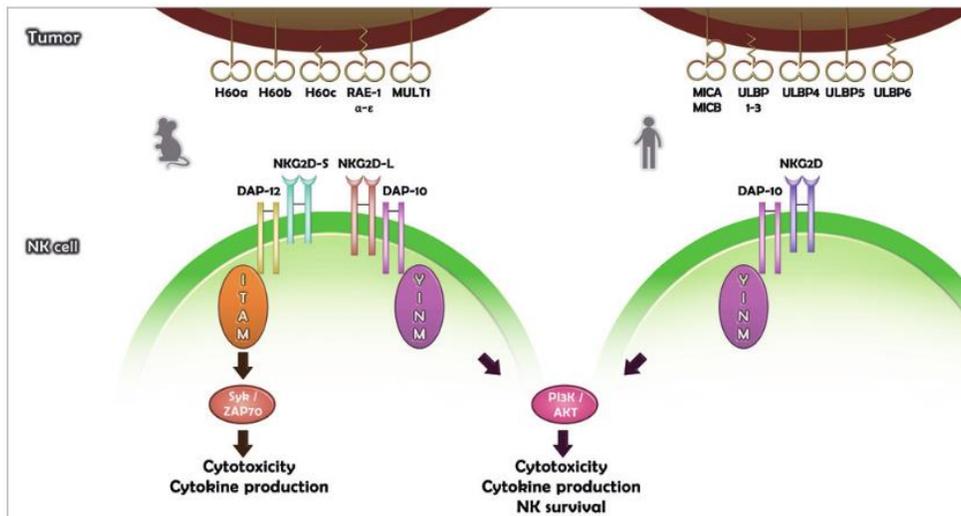


Figura 4: Diversidad de los ligandos del receptor NKG2D y las vías de señalización implicadas en la regulación de las células NK. La activación de NKG2D promueve la función citotóxica de las células NK, como también su capacidad para secretar citoquinas inmunomoduladoras. Una vez activado NKG2D (de ratón), SYK o ZAP70 son reclutadas a través de los motivos ITAM conjunto al adaptador DAP12. En humanos, NKG2D una vez activado promueve el reclutamiento de las proteínas DAP10, PI3K y Grb2/Vav1 [53].

Los ULBPs también son conocidos como la familia de primeros transcritores del ácido retinoico 1 (RAET1), ya que muestran homología con la secuencia de las proteínas tempranas del ácido retinoico 1 de ratón (Rae1-e). Existen en total diez miembros de la familia de genes *RAET1* en humanos, de los cuáles únicamente cinco se expresan y codifican proteínas funcionales que son capaces de ligar NKG2D [54].

1.8 Expresión de los ligandos de NKG2D

Aunque el mRNA de MICA/B y ULBPs puede ser encontrado en algunas células normales ^[55], los niveles de expresión de NKG2DL en la superficie celular de la gran mayoría de células sanas son nulos o bajos, y claramente por debajo de lo necesario para activar las células inmunes que expresan receptores NKG2D. En cambio, la expresión en superficie de estas moléculas aumenta en diversos tipos celulares bajo condiciones de estrés (como el *shock térmico*), infección y frecuentemente durante la carcinogénesis ^[56].

Se ha visto que los NKG2DL se expresan constitutivamente en una gran variedad de tumores primarios y líneas celulares derivadas de tumores ^[57]. Por ejemplo, los ULBPs se expresan en una variedad de tumores, incluyendo neuroblastomas, gliomas malignos, leucemias y carcinomas ováricos ^[54]. MICA/B se expresan en melanomas, neuroblastomas, carcinomas (mama, pulmón, próstata, colon, recto, ovárico) y distintos tipos de neoplasias hematopoyéticas ^[58].

Debido a que los tumores se desarrollan a partir de células propias, son generalmente poco inmunogénicos y muchas veces no son reconocidos eficientemente por el sistema inmune. Por lo tanto, estos ligandos, presentes en la superficie de células tumorales, actuarían como una señal de peligro para su detección.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las *células NK* pueden eliminar células tumorales ^[59]. Además, la expresión de NKG2DL en tumores los hace susceptibles a su eliminación por las *células NK in vitro* ^[60], y la formación de tumores puede ser prevenida a través de la vía de señalización del receptor NKG2D. Estudios *in vivo* han demostrado que la expresión de NKG2DL en las células tumorales luego de ser transplantadas en ratón, resulta en la eliminación del tumor mediada por NKG2D ^[61]. Además, se ha demostrado que la regulación negativa o el *knockout* del receptor NKG2D en ratones resulta en una respuesta inmune comprometida contra células tumorales, un mayor nivel de expresión de los ligandos de NKG2D y una elevada incidencia de ciertos tumores ^[62].

Por lo tanto, el sistema receptor NKG2D/NKG2DL es importante en la inmunidad antitumoral, tanto para prevenir el desarrollo del tumor como también su progresión.

1.9 Mecanismos de escape que involucran al sistema NKG2D-NKG2DL

Aunque los tumores expresen NKG2DL, estos son capaces de crecer progresivamente debido a múltiples mecanismos de evasión de la respuesta inmune (**Figura 5**). Las células tumorales utilizan diversas estrategias para prevenir su eliminación mediada por el receptor NKG2D. Una de estas corresponde a la regulación negativa de los NKG2DL. Se ha demostrado que muchos tumores inhiben activamente la expresión de los NKG2DL ^[63]. Un mecanismo importante para la regulación negativa de los NKG2DL sería la producción de citoquinas inmunomoduladoras, como el TGF- β , el cual puede ser secretado directamente por las propias células tumorales o por células inmunoreguladoras que se expanden durante la progresión del tumor ^[64]. En nuestro laboratorio se demostró que IL-10, una citoquina inmunosupresora, también reduce la expresión de los NKG2DL en la superficie de células de melanoma, afectando la citotoxicidad mediada por las *células NK* ^[65].

En células tumorales, la expresión en superficie de NKG2DL también puede disminuir por la acción de enzimas metaloproteasas, que son secretadas por las células cancerígenas. Estas enzimas son capaces de proteolizar los ligandos de NKG2D expresados en la superficie celular, resultando en la liberación de formas solubles de los ectodominios de estos ligandos ^[66]. De hecho, se han encontrado ligandos de NKG2D solubles (sNKG2DL), como el MICA soluble (sMICA), en el sobrenadante de líneas celulares tumorales positivas para NKG2DL y en el suero de pacientes con diferentes tipos de tumores malignos. Por ejemplo, se ha detectado sMICA en el suero de pacientes con cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de páncreas, neuroblastoma, osteosarcoma y tumores hematopoyéticos severos ^[50].

Debido al hecho de que altos niveles de sMICA en el suero de pacientes con algunos tipos de cáncer, se correlacionan significativamente con el estadio del

cáncer, diferenciación y metástasis, este ligando soluble podría ser usado como marcador para la progresión del tumor y como posible blanco terapéutico [67].

Por otro lado, se ha descrito que sMICA facilita la internalización y consecuente degradación lisosomal del receptor NKG2D, disminuyendo así sus niveles de expresión en superficie en *células NK* y linfocitos T CD8⁺ [68]. Como resultado, la capacidad de las células efectoras en reconocer y, consecuentemente, lisar la célula tumoral se ve afectada, lo que favorecería la evasión inmune por el tumor.

Otros tumores utilizan una estrategia opuesta para manipular la señalización mediada por el receptor NKG2D, al presentar mayor expresión de los NKG2DL en su superficie. La expresión sostenida de los NKG2DL en los tumores puede también promover la disminución de la expresión del receptor de NKG2D de las células efectoras, comprometiendo así su citotoxicidad. Por lo tanto, una exposición crónica de las *células NK* a los NKG2DL de superficie o solubles, llevan a la modulación del receptor NKG2D, lo que afectaría la activación celular dependiente de este receptor [69].

En pacientes con cáncer gástrico, se ha observado que existen defectos inmunes sistémicos y locales, los cuales se correlacionan con la progresión de la enfermedad y el mal pronóstico. Por ejemplo, se ha demostrado que, en estos pacientes, las *células NK*, linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T $\gamma\delta$, tanto en sangre periférica como aquellos infiltrados en tumores, expresan bajos niveles del receptor de NKG2D, lo que compromete la función efectora de estas células citotóxicas, contribuyendo a la severidad de la patología [70].

Debido a que se ha asociado una disminución del receptor NKG2D con la presencia de sMICA, en suero de pacientes con diferentes tumores malignos [50, 67, 68], es posible que esto también esté pasando en los pacientes con cáncer gástrico. Por ello, MICA podría ser un blanco terapéutico a ser investigado, tanto para entender la fisiopatología del CG, como para generar una terapia dirigida para el tratamiento de esta patología.

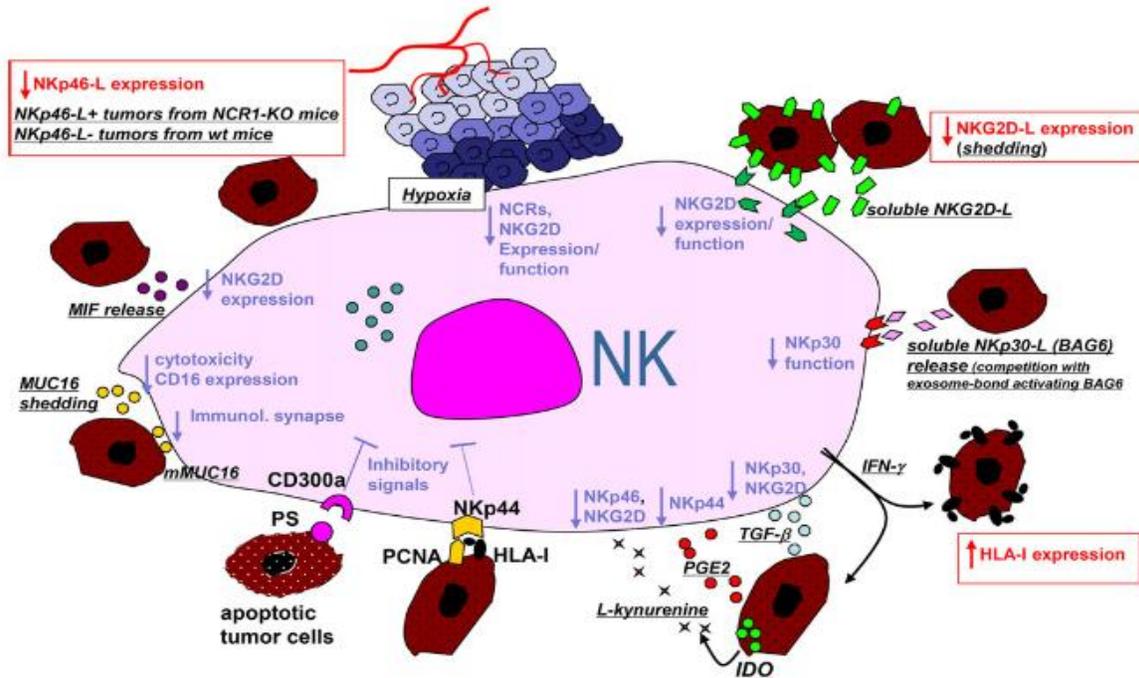


Figura 5: Distintos mecanismos de evasión inmune por el ataque a las células NK⁷⁰. El microambiente del tumor puede suprimir a las células NK en diferentes vías (indicadas en líneas azules). Las células cancerígenas (de color café) pueden producir "down-regulation" de diferentes tipos de receptores de activación de las células NK por diferentes mecanismos: liberación del factor de migración inhibitorio del macrófago, TGF- β , la exposición crónica de los ligandos de NKG2D a su receptor, etc^[71].

1.10 Anticuerpos monoclonales como productos biofarmacéuticos

La investigación que se está realizando en el Laboratorio de la Dra. María Carmen Molina y Dr. Juan Carlos Aguillón se focaliza en generar un anticuerpo recombinante anti-MICA, el cual se clasificaría, según los mecanismos de los anticuerpos terapéuticos en aquellos que revierten la inhibición o la regulación de las funciones efectoras inmune, ya que su función principal sería revertir la tolerancia de estos linfocitos, inducida por la expresión sostenida de esta molécula, y así mejorando la inmunidad antitumoral.

Otro elemento importante a tener en cuenta y que explican la existencia de una oportunidad es el hecho que, en este laboratorio, en el contexto del Proyecto FONDEF D0611005, se generó una genoteca de fragmentos de DNA que codifican las regiones variables de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas en una sola cadena (scFv), las que se expresan en fagos filamentosos y son base para la

generación de anticuerpos humanizados ^[72]. Utilizando esta librería se seleccionaron los fagos cuyos scFv reconocen MICA, proteína recombinante. También, se dispone de un vector de expresión de células eucariontes que porta la porción del gen que codifica para la cadena pesada $\gamma 1$ de la inmunoglobulina humana, construida durante la quimerización de un anticuerpo monoclonal anti-TNF (FONDEF D03I1055). Además, recientemente en el laboratorio se ha observado que pacientes con adenocarcinoma gástrico con tamaño tumoral aumentado presentan, en las células tumorales, mayor expresión de MICA y ULBP-2 (Ribeiro et al, 2013, enviado a publicación), además de expresarse simultáneamente otros 4 ligandos de NKG2D, lo que ayudaría a la regulación de las células NK, y explicaría el crecimiento tumoral (FONDECYT N° 11060452 y N° 310-0151).

Los medicamentos biofarmacéuticos están definidos como productos farmacéuticos que consisten en productos glicoproteicos, tales como enzimas, anticuerpos monoclonales, citoquinas y/o ácidos nucleicos. Estos son desarrollados por algún medio o por alguna combinación de metodologías que involucran una práctica biotecnológica que compromete a técnicas del DNA recombinante, control de la expresión de genes o utilización de técnicas inmunológicas. Desde esa perspectiva, se ha postulado que la elaboración de las sustancias activas de los biofarmacéuticos provienen de organismos vivientes como medios de expresión, tales son bacterias (*E. coli*, productos no glicosilados), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), células mamíferas (células CHO, productos glicosilados), células humanas, animales transgénicos (cabras) y/o plantas transgénica (tabaco) ^[73].

Para tener un mayor conocimiento sobre los productos biofarmacéuticos, estos presentan las siguientes características en común ^[74]: alto peso molecular, estructura tridimensional compleja, producción en organismos vivos, capacidad de generar una respuesta inmunitaria, la actividad biológica depende de la reproducibilidad del proceso de elaboración y dificultad de caracterizar completamente la molécula por análisis fisicoquímicos y/o por métodos de bioensayos.

Con respecto al proceso de manufactura de los productos biofarmacéuticos, la European Pharmacopoeia en el año 2008 ha esquematizado sobre las distintas fases que se necesitan para la elaboración de un biofármaco como tal, estas se pueden dividir en ^[73, 74]: desarrollo de la célula huésped, establecer el blanco farmacoterapéutico, producción de la proteína (producto biofarmacéutico), purificación para la eliminación de proteínas indeseables e impurezas (tales como, priones, virus, endotoxinas, iones metálicos, antibióticos, azúcares, ácidos grasos y factores de crecimiento), análisis fisicoquímico y biológico (algunos que se deben tener en cuenta son la determinación de la secuencia aminoacídica de la estructura terciaria y cuaternaria, patrones de glicosilación, nivel de agregación, perfil de la isoforma, heterogeneidad y potencia biológica) y por último el proceso de fabricación de la droga.

La formulación ya finalizada consiste principalmente en proteínas, estabilizadores y otros excipientes, los estabilizadores que se utilizan son los aminoácidos, azúcares, metales y surfactantes. Los productos biofarmacéuticos son muy sensibles a los cambios del medio ambiente, los cuales los puede dejar sujeto a una degradación química y/o física ^[73].

HIPÓTESIS

Como se ha descrito anteriormente MICA, ligando de NKG2D, se expresa tanto en la membrana de diversas células tumorales como en sobrenadante de cultivos de células provenientes de tumores gástricos (resultados previos de laboratorio) y de otras líneas celulares. Ambas situaciones dan cuenta de mecanismos de evasión de la inmunidad antitumoral, como por ejemplo promover la endocitosis del receptor de activación NKG2D de células citolíticas. Por ello MICA podría ser un blanco terapéutico selectivo en el desarrollo de anticuerpos recombinantes completamente humanos, para el tratamiento de diversos cánceres con células tumorales que sobre expresen la proteína MICA.

Los anticuerpos completamente humanos pueden construirse con dos cadenas glicoproteicas idénticas, unidas por enlace disulfuro, y formadas por la fusión de una cadena simple de regiones variables (scFv) y una cadena constante pesada de inmunoglobulina.

En base a esta información se plantea la siguiente hipótesis:

“Fragmentos de anticuerpos scFv anti-MICA que se unen selectivamente a MICA recombinante y a MICA de superficie celular de líneas celulares de cáncer gástrico, provocan una reversión en la expresión de los niveles del receptor de activación NKG2D en la superficie de células citolíticas”

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Investigación y desarrollo de un anticuerpo recombinante de origen humano anti-MICA para la generación de un biofármaco contra el cáncer gástrico.

3.2 Objetivos Específicos:

O.E.1. Generar MICA recombinante en un sistema de expresión transiente.

O.E.2. Expresar el fragmento scFv anti-MICA (scFv-MICA) a partir de una biblioteca de presentación de fagos establecida previamente y disponible en el laboratorio.

O.E.3. Caracterizar la capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA recombinante por ELISA, y a MICA nativa mediante FACS.

O.E.4. Analizar la capacidad de expresión del receptor de activación NKG2D en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en presencia de moléculas de scFv anti-MICA mediante citometría de flujo.

METODOLOGÍA

4.1 O.E.1. Generar MICA recombinante en un sistema de expresión transiente

1. Materiales

Para la realización de este objetivo específico se utilizó la línea celular HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293 with the SV40 large T antigen*, ATCC, EE.UU.), la cual se mantuvo en medio de cultivo DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*, Invitrogen®, EE.UU.), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone®, EE.UU.), penicilina/estreptomicina (HyClone®, EE.UU.) al 1% y L-glutamina (HyClone®, EE.UU.) al 1% en ambiente de 5% de CO₂ y a 37°C.

Como vector para la expresión de MICA recombinante, se empleó el plasmidio pHLSEC-Avitag, previamente diseñado en el laboratorio, el cual en su sitio de clonamiento contiene una secuencia señal para la expresión extracelular de la proteína MICA recombinante (rMICA) en su forma soluble para células mamíferas y una secuencia *His-Tag* para la identificación y purificación de los transfectos. Como agente transfectante se utilizó Polietilenimina de peso molecular 25 kDa (PEI) 1,0 µg/mL (Sigma-Aldrich®, EE.UU.) [75] en su forma ramificada.

2. Transfección en células HEK293T

Previo al proceso de transfección se realizó un estudio de viabilidad con Azul de Tripán y se contaron las células vivas después de haber estado expuestas al agente transfectante. Debido a que se debe tener en consideración la citotoxicidad del PEI [75], se utilizaron distintas cantidades de PEI, las cuales fueron 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0 y 14,0 µg. La condición con menor citotoxicidad fue la de 4,0 µg de PEI y 2,0 µg de pHLSEC-Avitag, estudios previos han demostrado que la condición óptima entre PEI:DNA 2:1 presenta mejores resultados en expresión de proteínas [76].

Debido a su buena susceptibilidad de transfección se utilizaron las células HEK293T, hasta una confluencia óptima de 90% [76]. Para una placa de cultivo de 6 pocillos (Becton Dickinson Labware®, EE.UU.) se comenzó con una densidad celular de 300.000 células/mL en DMEM/F-12 al 10% de SFB, se esperó a confluencia de 90% y se agregó la mezcla de pHLSEC-Avitag y PEI disuelto en 500 µL de DMEM/F-12 sin SFB. Luego se dejaron las células en 2 mL de DMEM/F-12 al 2% de SFB por 4 días post-transfección. Al finalizar la incubación se guardó tanto el pellet, como también el sobrenadante para posteriormente ser analizados. Alternativamente se realizó una co-transfección con pHLSEC-Avitag, XBP1 [77] (*X-box binding protein 1*) (previamente diseñado en el laboratorio) y PEI para potenciar la expresión de la proteína MICA recombinante hacia el medio extracelular.

3. Detección de proteína MICA recombinante en pellet de células HEK293T

3.a SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó según el procedimiento descrito por Laemmli [78], en un sistema minigel vertical Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad®, EE.UU.). Se preparó un gel de poliacrilamida discontinuo, con un gel de separación de poliacrilamida al 15% y un gel de concentración de la muestra de poliacrilamida al 5%. Las muestras de pellets a analizar fueron mezcladas con el tampón de carga de proteína 5X (Tris 0,125 M, glicerol 20%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,02%, pH 6,8) y se llevó a 95°C durante 15 min. Se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular en el gel, seguido de la corrida electroforética, la cual se llevó a cabo en buffer de corrida (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8,3) durante 30 min a 50 mV y luego por 150 min a 100 mV. Se utilizó el marcador de peso molecular de proteínas preteñido (10 a 170 kDa) (Thermo Scientific®, EE.UU.).

3.b Western Blot

Ya corrido el gel de poliacrilamida, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare[®], Suecia) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, metanol 20%) a 400 mA durante 90 minutos a 4°C para análisis por Western Blot. Luego, se bloqueó la membrana usando una solución de leche descremada al 3% en TBS-Tween 0,1 % (Tris-buffered Saline) (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, Tween-20 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para detectar rMICA se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal (AcPo) de conejo anti-MICA (clon ab63709, AbcamBiochemicals[®], EE.UU.) diluido 1:3000 en TBST-Leche 3%. La membrana posteriormente se lavó 3 veces con TBST 0,1%, cada lavado se mantuvo con solución de lavado por 5 minutos, y luego se agregó un anticuerpo (IgG) de cabra anti-conejo conjugado a HRP (Sigma-Aldrich[®], EE.UU.) diluido 1:6000 en TBST-Leche 3%. La membrana se lavó 5 veces con TBST 0,1%, cada lavado se realizó por 5 minutos. Finalmente, se procedió a la detección usando el reactivo ECL (Thermo Scientific[®], EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

Con el fin de optimizar la metodología, se realizó un control de carga para β -actina. La membrana de nitrocelulosa post WB para rMICA, se incubó por 1 hora con solución de stripping (glicina 0,1 M; SDS 0,1%; pH 2,0) a temperatura ambiente y con agitación constante. La membrana se lavó 3 veces con TBST 0,1% y luego se bloqueó con TBST-Leche 3% por 1 hora, también a temperatura ambiente. Para detectar β -actina se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal (AcMo) de conejo anti- β -actina (clon A2066, Sigma-Aldrich[®], EE.UU.) diluido 1:4000 en TBST-Leche 3%. La membrana se lavó 3 veces con TBST 0,1%, cada lavado se agitó por 5 minutos, y luego se agregó un anticuerpo (IgG) de cabra anti-conejo conjugado a HRP (Sigma-Aldrich[®], EE.UU.) diluido 1:6000 en TBST-Leche 3%. La membrana fue lavada 5 veces con TBST 0,1%, cada 5 minutos. Finalmente, se procedió a la detección usando el reactivo ECL (Thermo Scientific[®], EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

4. Cuantificación de la proteína MICA recombinante en sobrenadante de células HEK293T

Se sensibilizó la placa de 96 pocillos (NUNC Maxisorp[®], EE.UU.) con el anticuerpo monoclonal (AcMo) de captura anti-MICA (clon AMO1 159227, R&D Systems[®], EE.UU.) a una concentración final de 3 µg/mL en PBS 1x (phosphate buffered saline) durante toda la noche a 4°C. Luego la placa se bloqueó con PBS-BSA 1% y se incubó durante 1 hora a 37°C, se lavó la placa 4 veces con PBST 0,05% y esta misma se incubó con los sobrenadantes de cultivo de las células HEK293T transfectadas y co-transfectadas diluidos, hasta obtener valores dentro de la curva de calibración y luego multiplicarlos por el factor de dilución a 4°C durante toda la noche. Se prepararon diluciones seriadas del estándar de rMICA, para la curva de calibración, en medio DMEM/F-12 al igual que los sobrenadantes y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se lavó la placa 4 veces al día siguiente con PBST 0,05% y se incubó con el anticuerpo monoclonal (AcMo) de detección IgG de cabra anti-MICA biotinilado (clon JOH0614031, R&D System[®], EE.UU.) a una concentración de 0,4 ng/mL en PBS-BSA 1% por dos horas a temperatura ambiente. Después de 4 lavados con PBST 0,05%, se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (1:2000) (clon 55512, Sigma-Aldrich[®], EE.UU.) diluida en PBS-BSA 1% a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, se realizó 1 lavado con PBST 0,05%, se agregó el sustrato TMB Ultra (3,3',5,5'-tetrametil-bencidina, Thermo Scientific[®], EE.UU.) y se incubó por 30 minutos, leyendo la densidad óptica a 650 nm en un lector de ELISA (TECAN[®], Suiza). La reacción se detuvo agregando H₃PO₄ 1 M y se leyó la densidad óptica a 450 nm en un lector de ELISA (TECAN[®], Suiza). Los datos fueron adquiridos por el programa Magellan[®].

4.2 O.E.2. Expresar el fragmento scFv anti-MICA (scFv-MICA) a partir de una biblioteca de presentación de fagos establecida previamente y disponible en el laboratorio

1. Materiales

Los fragmentos de anticuerpos (scFv) se encuentran en el vector pUCH (Figura 6), el cual fue generado previamente en el laboratorio, se diseñó de tal manera que permita la expresión y secreción del scFv hacia el periplasma de *E. coli*. Además en la construcción se incorporó un codón ámbar entre la región codificante del scFv y la proteína III del fago. En cepas supresoras, como la ER2738, el codón ámbar es reconocido como codón de glutamina, mientras que en cepas no supresoras, como la HB2151, es reconocido como codón de término, por lo que en esta cepa se produjo el scFv-MICA libre de la proteína pIII del fago. Adicionalmente, rio arriba del codón ámbar se incorporaron secuencias codificantes para 6 histidinas, con el propósito de facilitar la purificación del fragmento de anticuerpo y un epítipo de hemaglutinina para su detección.

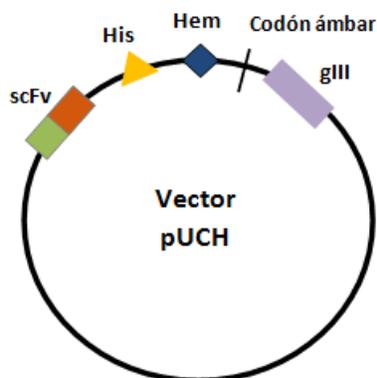


Figura 6: Vector pUCH que se utilizó para expresar el scFv-MICA en bacterias *E. coli* cepas HB2151. El fragmento de anticuerpo scFv anti-MICA se encuentra en el vector pUCH, el cual además contiene una secuencia codificante para 6 histidinas (para su purificación) y una secuencia codificante para hemaglutinina (para su identificación).

2. Expresión del scFv anti-MICA (scFv-MICA)

Se cultivó un inóculo con bacterias *E. coli* cepas HB2151 en 10 mL de medio LB (Caldo de lisogenia), más ampicilina 100 µg/mL y el vector pUCH que contiene la secuencia para la expresión de scFv anti-MICA durante toda la noche, en agitación a 37°C. Como control negativo se cultivaron *E. coli* cepas HB2151 sin transformar y sin ampicilina, en las mismas condiciones que el inóculo anterior. Al día siguiente se cultivaron en 500 mL de medio de cultivo LB en una

concentración (1:100) con el inóculo del día anterior, más ampicilina 100 µg/mL en agitación a 37°C, lo mismo se realizó con el control negativo, pero sin el antibiótico. Se esperó hasta que llegaran ambos medios de cultivo a una densidad óptica de 0,6 de absorbancia para estimular con IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (US Biological®, EE.UU.) a una concentración final de 1 mM hasta que llegue a un crecimiento bacteriano de fase estacionaria. Se centrifugaron los medios de cultivo a 13.000 RPM por 1 minuto a 4°C y se realizaron 3 lavados consecutivos con 30 mL de NaCl 0,9%. Se resuspendieron los pellets con 10 mL de Buffer TES 1x (ice-cold) (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, EDTA 0,05 mM, sacarosa 0,5 M) con el fin de generar el shock osmótico. Posteriormente se agregó 15 mL de Buffer TES 1/5x (ice-cold) y se agitó por 1 minuto. Finalmente se incubó por 30 minutos en hielo y se centrifugó a 13.000 RPM por otros 10 minutos, teniendo como resultado el periplasma. El pellet se dejó incubando con buffer de lisis (Tris 25 mM, NaCl 250 mM, imidazol 20 mM, Tritón X-100 0,1%, pH 8,0) y se centrifugó nuevamente a 13.000 RPM por 10 minutos, obteniendo así la fracción soluble. Finalmente, para obtener la fracción insoluble del pellet, este se dejó incubando con guanidina 6 M, tampón fosfato a pH 7,8 y una pastilla de inhibidores de proteasas por toda la noche a 4°C y se centrifugó al día siguiente a 13.000 RPM por 5 minutos.

Se dejó precipitando 1 mL de periplasma en 13% TCA (ácido tricloroacético), tanto del control positivo, como del control negativo, para posterior análisis de detección por Western Blot.

3. Detección de scFv anti-MICA en bacterias *E. coli* cepas HB2151

3.a SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó según el procedimiento descrito por Laemmli ^[78], en un sistema minigel vertical Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad®, EE.UU.). Se preparó un gel de poliacrilamida discontinuo, con un gel de separación de poliacrilamida al 15% y un gel de concentración de poliacrilamida al 5%. Las muestras de periplasma previamente precipitadas con TCA y las de la fracción soluble e insoluble del pellet

fueron mezcladas con el tampón de carga de proteína 5X (Tris 0,125 M, glicerol 20%, SDS 4%, β -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,02%, pH 6,8) y se llevó a 95°C durante 15 min. Se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular en el gel, seguido de la corrida electroforética, la cual se llevó a cabo en buffer de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8.3) durante 30 min a 50 mV y luego por 150 min a 100 mV. Se utilizó el marcador de peso molecular de proteínas preteñido (10 a 170 kDa) (Thermo Scientific®, EE.UU.).

3.b Western Blot

Ya corrido el gel de poliacrilamida, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare®, Suecia) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%) a 400 mA durante 90 minutos a 4°C para análisis por Western Blot. Luego, se bloqueó la membrana usando una solución de TBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Para detectar scFv anti-MICA se incubó la membrana durante 2 horas con anticuerpo monoclonal (AcMo) de ratón anti-poli-histidina (clon H1029, Sigma-Aldrich®, EE.UU.) diluido 1:3000 en TBS-BSA 1% a temperatura ambiente. La membrana fue lavada 6 veces con TBST 0,1%, cada lavado fue por 15 minutos, y luego se agregó un anticuerpo (IgG) de cabra anti-ratón conjugado a HRP (Sigma-Aldrich®, EE.UU.) diluido 1:6000 en TBS-BSA 1% por 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó 6 veces con TBST 0,1%, cada lavado se realizó por 15 minutos. Finalmente, se procedió a la detección usando el reactivo ECL (Thermo Scientific®, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

4. Purificación y concentración del segmento scFv anti-MICA por FPLC (*Fast protein liquid chromatography*)

El análisis por FPLC fue llevado a cabo en un sistema de cromatografía ÄKTApurifier. Se utilizó una columna de volumen 1 mL *HisTrap HP* prellenada con una solución de Ni “Sephacore Performance” (GE Healthcare®, Suecia) y pre-equilibrada en el “Buffer” de unión (NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 30 mM, pH 7,4). Después del equilibrio de la columna, el periplasma, el pellet soluble e insoluble, previamente generados, fueron incorporados en la columna a un flujo de

1 mL/minuto. Para eluir el scFv anti-MICA se utilizó el “Buffer” de elución (NaPO₄ mM, NaCl 0,5 M, imidazol 300 mM, pH 7,4). La cromatografía fue monitoreada mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 280 nm y los datos fueron adquiridos por el programa UNICORN®.

5. Cuantificación de proteínas totales

Como se describió anteriormente, de la expresión de scFv anti-MICA, se obtuvieron las siguientes fracciones: periplasma, soluble e insoluble; las cuales todas se cuantificaron mediante el reactivo de Bradford [79], modificado por Spector [80]. Este método de cuantificación de proteína se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250® a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Brevemente, 10 µL de muestra se llevaron a 100 µL con PBS y se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford (1/5) (100 mg azul de Coomassie G-250 se disuelven en 50 mL etanol 95%. Luego se agregaron 100 mL ácido ortofosfórico 85% y cantidad suficiente de agua desionizada para un litro. Se almacenó a 4°C). Se mezcló suavemente y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA (TECAN®, Suiza). Los datos fueron adquiridos por el programa Magellan®. Los valores de concentración se interpolaron de una curva de calibración realizada con albúmina sérica bovina (BSA).

4.3 O.E.3. Caracterizar la capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA recombinante por ELISA, y a MICA nativa mediante FACS

1. Materiales

Para la realización de este objetivo específico se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma gástrico MKN-45 (*DSMZ: ACC 409*) y AGS (*ATCC: CRL-1739™*) de origen humano ^[65], se mantuvieron en medio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute, Life Technology®*, EE.UU.), suplementado con 3% de SFB (*HyClone®*, EE.UU.), penicilina/estreptomicina (*HyClone®*, EE.UU.) al 1% y L-glutamina (*HyClone®*, EE.UU.) al 1% en ambiente 5% de CO₂ y a 37°C.

2. ELISA

Se sensibilizó la placa de 96 pocillos (*NUNC Maxisorp®*, EE.UU.) con 100 µL de la proteína MICA recombinante, generada en el laboratorio, a una concentración final de 20 µg/mL en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Luego, la placa se bloqueó con 200 µL con TBS-BSA 1% y se incubó durante 1 hora a 37°C, se lavó la placa 2 veces con TBST 0,05% y posteriormente se incubó con la solución de scFv anti-MICA del periplasma y del control negativo en cantidades iguales, previamente expresados, por 2 horas a 37°C. Se lavó 3 veces con TBST 0,05% y se dejó incubando con el anticuerpo primario monoclonal (*AcMo*) de ratón anti-hemaglutinina (1:2000) (clon H3663, *Sigma-Aldrich®*, EE.UU.) diluido en TBS-BSA 1% a temperatura ambiente por 2 horas. Luego se lavó 3 veces nuevamente con TBST 0,05% y se incubó con el anticuerpo (IgG) de cabra anti-ratón acoplado a HRP (1:5000) (*Sigma-Aldrich®*, EE.UU.) durante 1 hora diluido en TBS-BSA 1%. Finalmente, se realizó 1 lavado con TBST 0,05%, se agregó el sustrato TMB Ultra (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, *Thermo Scientific®*, EE.UU.) y se dejó incubando por 30 min, leyendo la densidad óptica a 650 nm en un lector de ELISA (*TECAN®*, Suiza). La reacción se detuvo agregando H₃PO₄ 1 M y se leyó la densidad óptica a 450 nm en un lector de ELISA (*TECAN®*, Suiza). Los datos fueron adquiridos por el programa *Magellan®*.

3. FACS

Mediante citometría de flujo (FACS), se determinó la unión de cadenas scFv anti-MICA al dominio extracelular del ligando MICA en las dos líneas celulares anteriormente mencionadas (MKN-45 y AGS). Las células se lavaron dos veces con PBS-SFB 10% y luego se incubaron a una densidad celular inicial de 200.000 células/pocillo a una placa de 96 pocillos (NUNC[®], EE.UU.) con fondo "U". Posteriormente se lavó y se agregó el scFv anti-MICA, a una concentración de 104,3 µg/mL, dejándolas a 37°C por 2 horas. Se lavaron las células 2 veces con PBS-SFB 10% y se incubó con el anticuerpo (IgG) anti-hemaglutinina-FITC (clon H7411, Sigma-Aldrich[®], EE.UU.) a una concentración de 1,0 µg/mL por 30 minutos a temperatura ambiente, y con un control de isotipo para hemaglutinina, IgG1-FITC (clon MOPC-21, BioLegend[®], EE.UU.). Luego se lavaron nuevamente con PBS-SFB 10% y se resuspendieron en "FACS buffer" (BD Biosciences[®], EE.UU.). Como control de unión específica se utilizó el anticuerpo primario de ratón anti-MICA (1:25) (clon 159227, R&D Systems[®], EE.UU) en PBS-SFB 10%, y como anticuerpo secundario (IgG) de cabra anti-ratón-FITC (1:50) (Kirkegaard & Perry Laboratories[®], EE.UU.) en PBS-SFB 10%. Como control de unión inespecífica se utilizaron scFv-Fagos anti-MICA y un Fago irrelevante, para la cual se utilizó el anticuerpo primario de ratón anti-M13-FITC (1:100) (clon RL-ph1, Santa Cruz Biotechnology[®], EE.UU.) en PBS-BSA 10%. Las muestras fueron analizadas en el equipo FACSCalibur, BD Biosciences y los datos fueron adquiridos por el programa CellQuest Pro, BD Biosciences.

4.4 O.E.4. Analizar la capacidad de expresión del receptor de activación NKG2D en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en presencia de moléculas de scFv anti-MICA mediante citometría de flujo

1. Sangre periférica

Las muestras de sangre periférica de sujetos sanos se obtuvieron en tubos con heparina (para posterior obtención de células mononucleares de sangre

periférica (PBMC)) y en tubos sin anticoagulante (para adquisición de suero), todo en condiciones estériles.

2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

El aislamiento de PBMCs se realizó a partir de sangre periférica heparinizada, extraída en condiciones estériles de los sujetos sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Fill Paque (GE Healthcare®, Suecia). La sangre se diluyó en igual volumen de PBS 1x estéril, y se depositó cuidadosamente sobre 12 mL de Ficoll en tubos estériles de 50 mL. Los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 300 x g y a 18°C. Las células mononucleares se recogieron de la interfase, se lavaron dos veces en PBS 1x estéril y se incubaron con solución ACK (cloruro de amonio 1,5 M, hidrogenocarbonato de potasio 100 mM, Triplex111 10 mM). Las células se lavaron nuevamente con PBS 1x y el precipitado celular se resuspendió en medio de cultivo de linfocitos humanos, el que consta de RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Life Technology®, EE.UU.) suplementado con 2 mM de L-glutamina (HyClone®, EE.UU.), con penicilina/estreptomicina (HyClone®, EE.UU.) al 1% y con 10% v/v de SFB (HyClone®, EE.UU.).

3. Enriquecimiento de las células NK con interleuquina (IL)-2

Previo al ensayo de expresión de los niveles de NKG2D, las células se activaron con 160 U/mL de IL-2r (Tecnofarma, Chile) durante 24 horas en un ambiente 5% de CO₂ y a 37°C.

4. Análisis de la expresión del receptor de NKG2D en células NK y Linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica por FACS

La tinción celular se realizó utilizando anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos para seleccionar células NK y linfocitos T CD8⁺: anti-CD3-PeCy7 (clon OKT3, 1:100, BioLegend®, EE.UU.), anti-CD56-PE (clon CMSSB, 1:25, eBioscience®, EE.UU.) y anti-CD8-FITC (clon HIT8a, 1:100, BioLegend®, EE.UU.), además del anticuerpo anti-NKG2D-APC (clon 1D11, 1:10,

BD Pharmigen[®], EE.UU.) y con el anticuerpo control de isotipo para NKG2D, IgG2b-APC (clon eBMG2b, eBioscience[®], EE.UU.). Los niveles de la expresión de NKG2D se evaluaron en células previamente tratadas con MICAr a una concentración de 400 ng/mL y con scFv anti-MICA por 24 horas, en una densidad inicial de 200.000 células por pocillo, en una placa de 96 pocillos con fondo "U" (NUNC[®], EE.UU.), a través de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de las células teñidas. Luego del lavado con PBS-SFB 1%, las células se incubaron por 30 minutos con la mezcla de estos anticuerpos. Como control positivo se utilizó un anticuerpo anti-MICA (clon AMO1 159227, R&D Systems[®], EE.UU., concentración final 10 µg/mL). Luego se lavaron nuevamente con PBS-SFB 1% y se resuspendieron en "FACS buffer" (BD Biosciences, EE.UU.). Las muestras fueron analizadas en el equipo FACSCalibur, BD Biosciences y los datos fueron adquiridos por el programa CellQuest Pro, BD Biosciences.

5. Estudio de viabilidad

Para los estudios de viabilidad se utilizaron las células PBMC en presencia de distintas concentraciones de imidazol (Sigma-Aldrich[®], EE.UU.) (150 mM, 75 mM, 37,5 mM y 18,75 mM) por 24 horas en una placa de 96 pocillos con fondo "U" (NUNC[®], EE.UU.). El conteo se realizó mediante Azul de Tripán en células vivas, por triplicado, y se expresó mediante porcentaje.

4.5 Expresión de resultados y Análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm D.S. de al menos tres experimentos independientes para determinar la expresión de la proteína MICA recombinante en células HEK293T transfectadas y los datos fueron analizados por la prueba de t de student pareado. Para el caso de evaluación de la capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA recombinante se realizó un experimento independiente, de manera triplicada.

Todos los datos se analizaron con el software GraphPad Prism, versión 5.0 (EE.UU.), y los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

5.1. O.E.1. Generar MICA recombinante en un sistema de expresión transiente

Con el fin de poder expresar la proteína recombinante MICA, para posteriores ensayos, se utilizó un método de transfección químico. Polietilenimina es un polímero con una carga neta positiva que se une al DNA (pHLSEC-Avitag), para producir la condensación de este último y así poder formar un complejo de aspecto toroidal ^[75], el cual por mecanismos de endocitosis es capaz de ingresar a la célula y entregar el DNA para su uso subsiguiente en la síntesis de proteínas.

Debido a que el sitio de clonamiento de pHLSEC-Avitag posee una secuencia señal para la expresión de la proteína MICA hacia el medio extracelular en su forma soluble, los sobrenadantes celulares se analizaron luego de 4 días post-transfección mediante un ELISA tipo sándwich a través de un anticuerpo de captura AMO1 a una concentración de 3 µg/mL y un anticuerpo de detección MICA biotinilado a una concentración final de 0,4 ng/mL. En la **figura 7** se muestran las concentraciones de MICA soluble recombinante que se obtuvieron a través de una transfección simple entre PEI y pHLSEC-Avitag, además del Western Blot de los pellets de células HEK293T transfectadas respectivamente, con el fin de detectar en qué forma se presenta la proteína MICA. Para esto se utilizó un anticuerpo específico para la proteína MICA (Abcam) y como control de carga, un anticuerpo anti-β-actina.

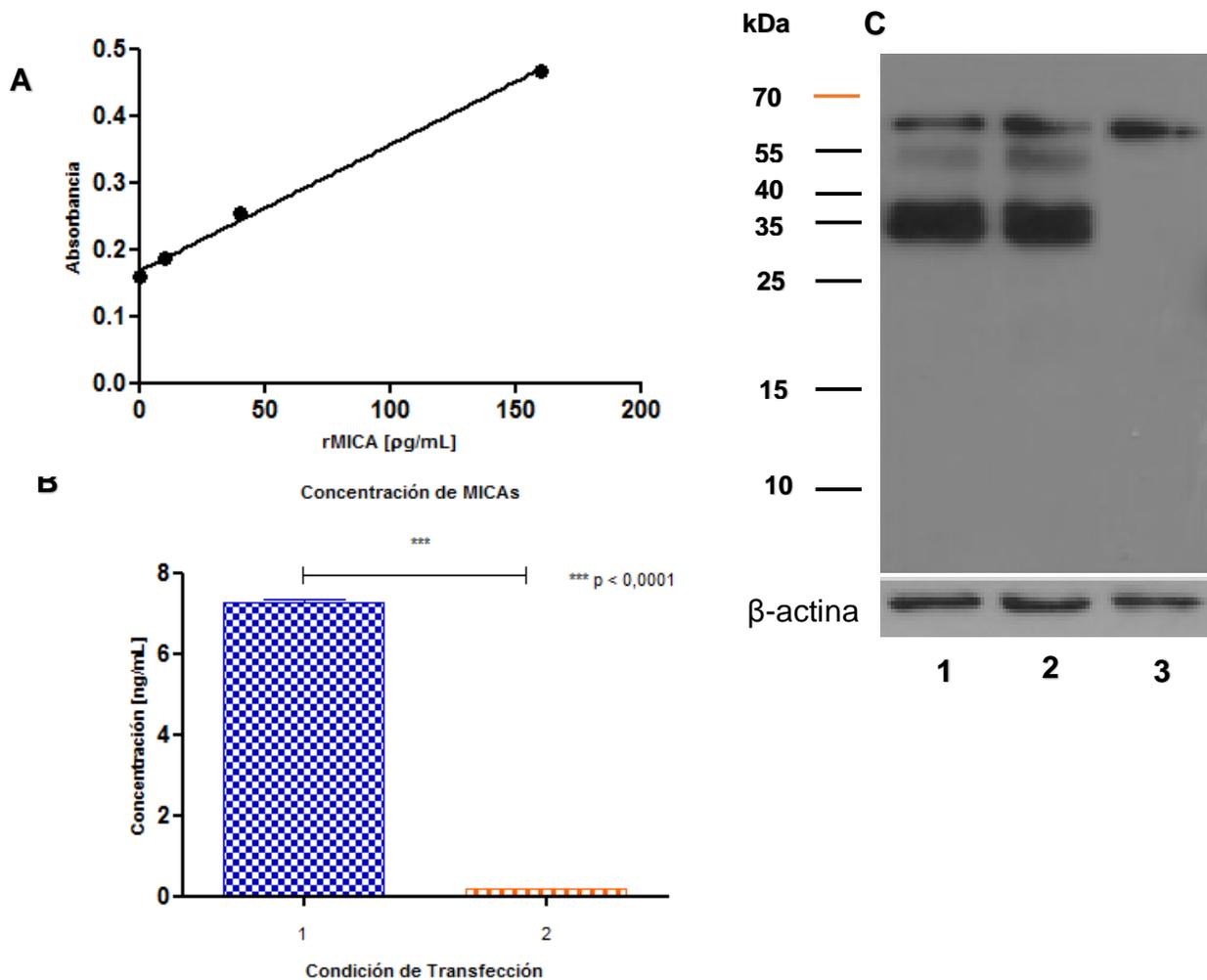


Figura 7: MICA soluble se expresa en sobrenadante de células HEK293T transfectadas y en sus pellets con el vector pHLSEC-Avitag que porta el gen de MICA. (A) Curva de calibración utilizando rMICA comercial, con una ecuación de la recta $y = 0,0019x + 0,1676$, $r^2 = 0,9968$. (B) Mediante ensayo ELISA se cuantificó MICAs en el sobrenadante de células HEK293T transfectadas con; (1) 2,0 µg de DNA + 4,0 µg de PEI, como control negativo (2) se utilizó células sin transfectar. (C) Los lisados celulares de HEK293T se analizaron por medio de la técnica de Western Blot con un anticuerpo anti-MICA y con un anticuerpo anti-β-actina como control, las condiciones a evaluar son: (1) y (2) dos clones distintos transfectados con 2,0 µg de DNA + 4,0 µg de PEI, y (3) células sin transfectar como control negativo. Además se muestra control de carga de β-actina con un peso molecular de 43 kDa. *** $p < 0,0001$ (t de student), $n = 3$. Los resultados se expresan como promedio ± DS.

Los valores exactos de concentración de MICA soluble dados por el ensayo de ELISA (**Figura 7b**), tanto para las células transfectadas, como para su control negativo son: $7,250 \pm 0,1021$ ng/mL y $0,1700 \pm 0,1528$ ng/mL, respectivamente. Demostrando diferencia estadísticamente significativa entre las células HEK293T con y sin el vector que porta el gen de MICAs. Además se quiso detectar en qué forma se presentaba la proteína MICA recombinante post-transfección, las condiciones del Western Blot (**Figura 7c**) fueron las siguientes: (1) y (2) dos clones distintos que fueron transfectados con 2,0 μ g de pHLSEC-Avitag (vector portador del gen de MICA) más 4,0 μ g de PEI (agente transfectante), y (3) células HEK293T sin el proceso de transfección.

Al analizar la **figura 7c**, se vio que donde se realizó transfección simple (condición 1 y 2), se encontraba la proteína MICA recombinante de peso molecular 35 kDa, además de esta, se vio que también se presentaban dos bandas más correspondientes a formas de MICA glicosilada, generadas por modificaciones post-traduccionales al interior de la célula [55]. En la condición 3, que son células HEK293T sin transfectar no se observó la proteína MICA de 35 kDa, que es la forma en que se transfectó, sólo se pudo detectar una banda a 65 kDa, la cual también se detectó en las otras condiciones, llegando a la conclusión que está es la forma en que se presenta la proteína MICA madura, propia de la línea celular.

XBP1, *X-box protein 1*, es un factor de transcripción que una vez activado estimula la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR en inglés, *Unfolded protein response*), el cual por diversas vías de señalización genera un incremento en la producción de chaperonas moleculares involucradas en el plegamiento de las proteínas en el retículo endoplásmico [77].

Debido a que se generó poca cantidad de la proteína MICA, se quiso potenciar su producción a través de una co-transfección con el vector que codifica a XBP1s. En la **figura 8** se muestran las concentraciones de MICA soluble recombinante que se obtuvieron a través de una co-transfección entre PEI, pHLSEC-Avitag y XBP1s, además del Western Blot de los pellets de células HEK293T transfectadas respectivamente, con el fin de detectar en qué forma se

presenta la proteína MICA. Para esto se utilizó un anticuerpo específico para la proteína MICA (Abcam) y como control de carga, un anticuerpo anti- β -actina.

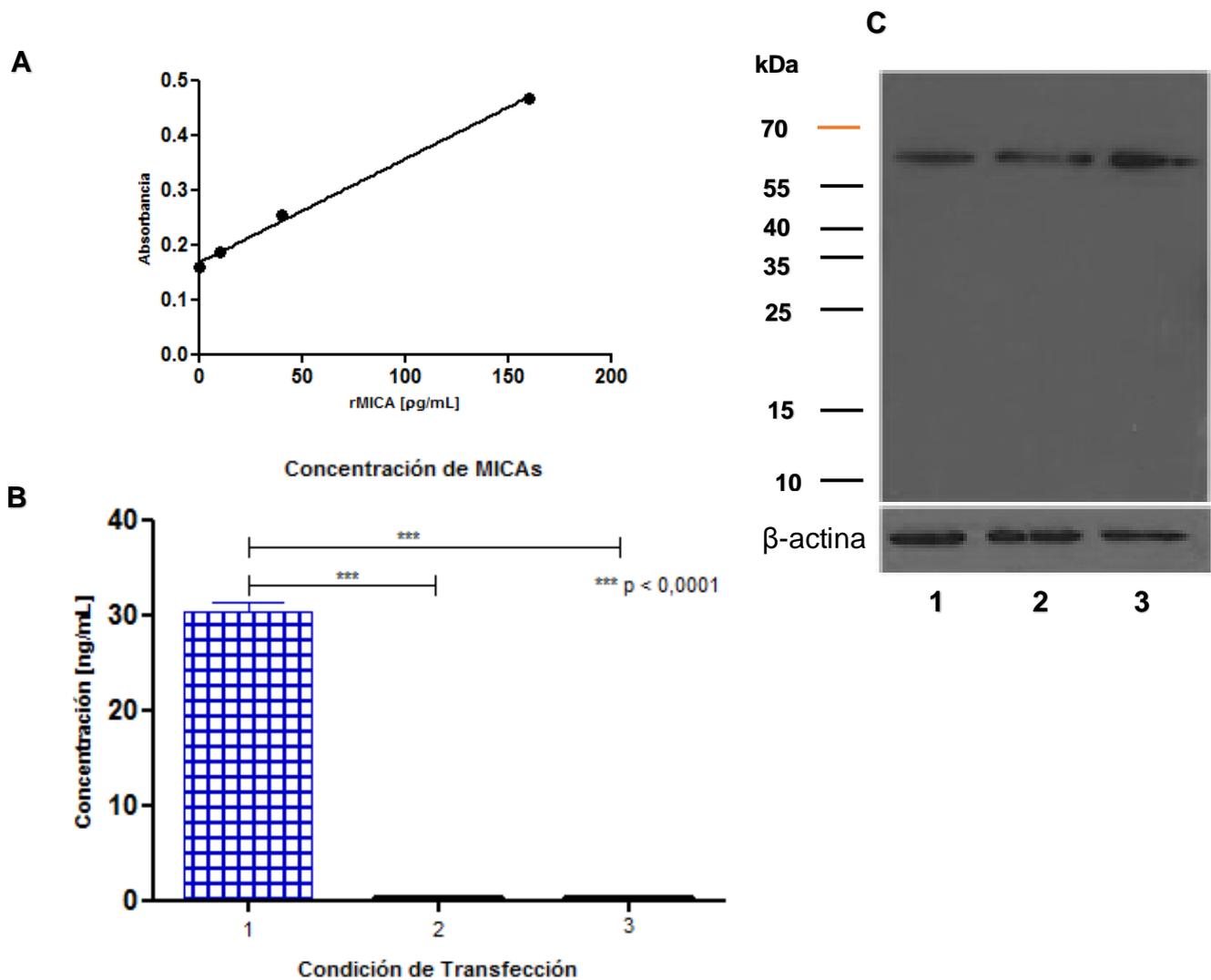


Figura 8 MICA soluble se expresa en sobrenadante de células HEK293T transfectadas y no así en sus pellets con el vector pHLSEC-Avitag que porta el gen de MICA, PEI y XBP1s. (A) Curva de calibración utilizando rMICA comercial, con una ecuación de la recta $y = 0,0019x + 0,1676$, $r^2 = 0,9968$. (B) Mediante ensayo ELISA se cuantificó MICAs en el sobrenadante de células HEK293T co-transfectadas con; (1) 2,0 μ g de DNA + 2,0 μ g de XBP1s + 8,0 μ g de PEI. Como controles negativos; (2) 2,0 μ g de DNA de un plasmidio irrelevante pGEM DA + 8,0 μ g de PEI + 2,0 μ g de XBP1 y (3) 4,0 μ g de pGEM DA + 8,0 μ g de PEI. (C) Los lisados celulares de HEK293T se analizaron por medio de la técnica de Western Blot con un anticuerpo anti-MICA y con un anticuerpo anti- β -actina como control, las condiciones a evaluar son: (1) y (2) dos clones distintos co-transfectados con 2,0 μ g de DNA + 2,0 μ g de XBP1s + 8,0 μ g de PEI, y (3) células sin transfectar como control negativo. Además se muestra control de carga de β -actina con un peso molecular de 43 kDa. *** $p < 0,0001$ (t de student), $n = 3$. Los resultados se expresan como promedio \pm DS.

Los valores exactos de concentración de MICA soluble dados por el ensayo de ELISA (**Figura 8b**), tanto para las células co-transfectadas, como para sus controles negativos son: $30,30 \pm 0,9492$ ng/mL (condición 1), $0,2767 \pm 0,0371$ ng/mL (condición 2) y $0,3033 \pm 0,0145$ ng/mL (condición 3), respectivamente. Demostrando diferencia estadísticamente significativa entre las células HEK293T co-transfectadas con los dos vectores (MICA y XBP1s) y sus correspondientes controles negativos con vectores irrelevantes. Además se quiso detectar en qué forma se presentaba la proteína MICA recombinante en células HEK293T después de haber estado expuestas a la co-transfección, las condiciones del Western Blot (**Figura 8c**) fueron las siguientes: (1) y (2) dos clones distintos que fueron co-transfectados con 2,0 μ g de pHLSEC-Avitag (vector portador del gen de MICA) más 2,0 μ g de XBP1s y 8,0 μ g de PEI (agente transfectante), y (3) células HEK293T sin haber estado transfectadas.

Al analizar la **figura 8c**, se vio que ambas condiciones (1 y 2), sólo presentan la forma de MICA glicosilada (65 kDa, forma constitutiva de la línea celular HEK293T), al igual que el control negativo (condición 3), lo que deja visto, es que al realizar la co-transfección con XBP1, toda la proteína MICA recombinante fue secretada al medio extracelular, provocando un aumento en su forma soluble hacia el medio extracelular (**Figura 8b**).

Teniendo en cuenta ambas situaciones (transfección simple y co-transfección), XBP1s potenció 4 veces la producción de MICAs hacia el medio extracelular (**Figuras 7b y 8b, respectivamente**), en un medio de expresión eucarionte, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$, t de student), los valores de concentración de MICAs son: $7,250 \pm 0,1021$ ng/mL y $30,30 \pm 0,9492$ ng/mL, respectivamente.

5.2 O.E.2. Expresar el fragmento scFv anti-MICA (scFv-MICA) a partir de una biblioteca de presentación de fagos establecida previamente y disponible en el laboratorio

Para la expresión del scFv anti-MICA se utilizó el vector pUCH, el cual en bacterias no supresoras, como *E. coli* cepa HB2151, se considera al codón ambar, como codón de término, generando así al scFv libre de la proteína pIII del fago. Para la detección del scFv anti-MICA se llevó a cabo un Western Blot (**Figura 9**) con un anticuerpo anti-poli-histidina de los periplasma de dos clones distintos de bacterias con sus respectivos controles negativos, además de sus pellets.

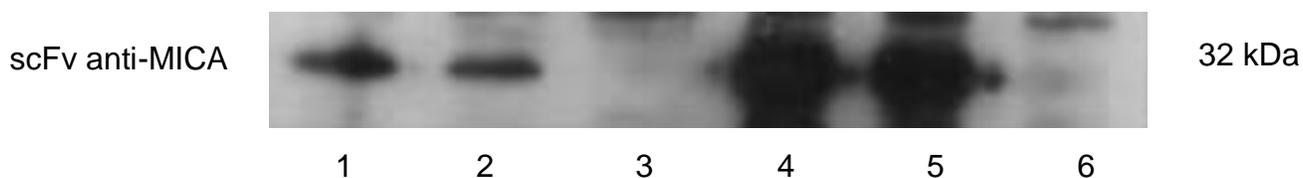


Figura 9: ScFv anti-MICA se expresa mayoritariamente en el pellet de bacterias *E. coli* con plasmidio portador del gen del scFv. Western Blot del shock osmótico con Buffer TES 1x a bacterias *E. coli* cepas HB2151 con anticuerpo anti-poli-histidina (1:3000) como anticuerpo primario, y como anticuerpo secundario un IgG acoplado a HRP (1:6000). (1) periplasma clon 6, (2) periplasma clon 9, (3) periplasma control negativo, (4) pellet clon 6, (5) pellet clon 9, (6) pellet control negativo.

Como se aprecia en la **figura 9**, las condiciones 1 y 2 corresponden a dos periplasmas de clones distintos transformados con el plasmidio pUCH y las condiciones 4 y 5 son sus pellets, respectivamente. La condición 3 es el periplasma del control negativo de bacteria *E. coli* sin transformar y la condición 6 su equivalente pellet. Debido a que se vio una gran cantidad de la proteína scFv anti-MICA en el pellet, se decidió separar a este mismo, en sus dos fracciones (soluble e insoluble), tal y como se describió previamente en la sección de metodología y analizar en cuál de éstas se detectaba con mayor intensidad (**Figura 10**).

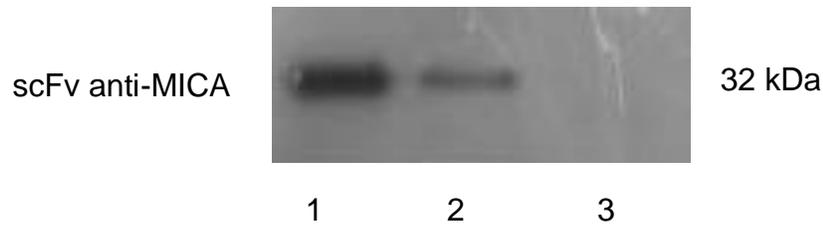


Figura 10: ScFv anti-MICA se expresa mayoritariamente en la fracción insoluble del lisado bacteriano. Western Blot del pellet de bacterias *E. coli* cepas HB2151 con un anticuerpo anti-poli-histidina (1:3000) como anticuerpo primario, y como anticuerpo secundario un IgG acoplado a HRP (1:6000). (1) fracción insoluble del lisado, (2) fracción soluble del lisado, (3) medio de cultivo LB donde se crecieron las bacterias.

En la **figura 10** se pueden ver tres condiciones a analizar. La condición 1 corresponde a la fracción insoluble del lisado bacteriano, la condición 2 a la fracción soluble de este mismo lisado, y en la condición 3, se quiso ver si se encontraba scFv anti-MICA en el sobrenadante del medio de cultivo donde creció la bacteria. Como se puede observar en esta última situación no se pudo apreciar la aparición de la proteína en dicho sobrenadante, para ello habría que realizar una inmunoprecipitación.

La purificación de la proteína, en todas sus fracciones, se realizó a través de FPLC, como se mencionó en la metodología. La particularidad que tiene este tipo de cromatografía es que a través de una columna con una solución de níquel, la poli-histidina que contiene el scFv anti-MICA se une por afinidad al metal, a través del “Buffer” de unión, el cual luego es eluido por un aumento de la concentración del Imidazol que se encuentra en el “Buffer” de elución. Esto se produce ya que el Imidazol es un intermediario en la biosíntesis de la histidina, y por un mecanismo de competencia, el scFv es liberado de la columna. Esto se midió a través de espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm, dando como resultado distintos tipos de cromatogramas (**Figuras 11, 12 y 13**). Además de la purificación de la proteína, ésta se puede concentrar en las distintas eluciones que va dando el equipo.

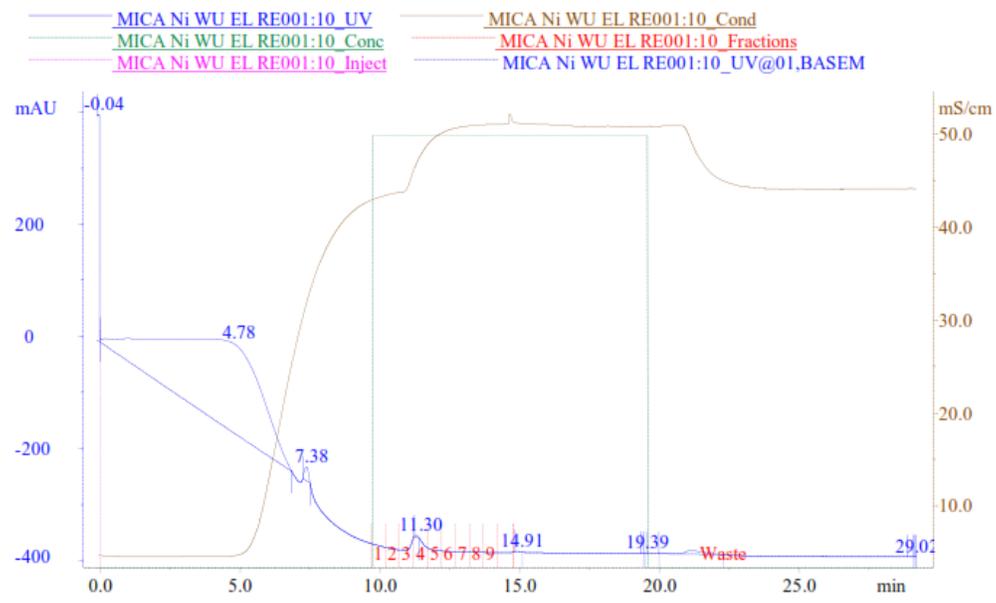


Figura 11: Cromatograma de la fracción periplasma del scFv anti-MICA. Perfil de elución de 18 mL de scFv anti-MICA del periplasma, previamente expresado y caracterizado, los cuales pasaron a través de la columna *HisTrap HP*. scFv anti-MICA se observa por cambios en la absorbancia (línea azul), cuando está presente el "Buffer" de elución (línea verde), en este caso se ve un pequeño "peak" con un área bajo la curva de 11.30 entre las eluciones 3,4 y 5.

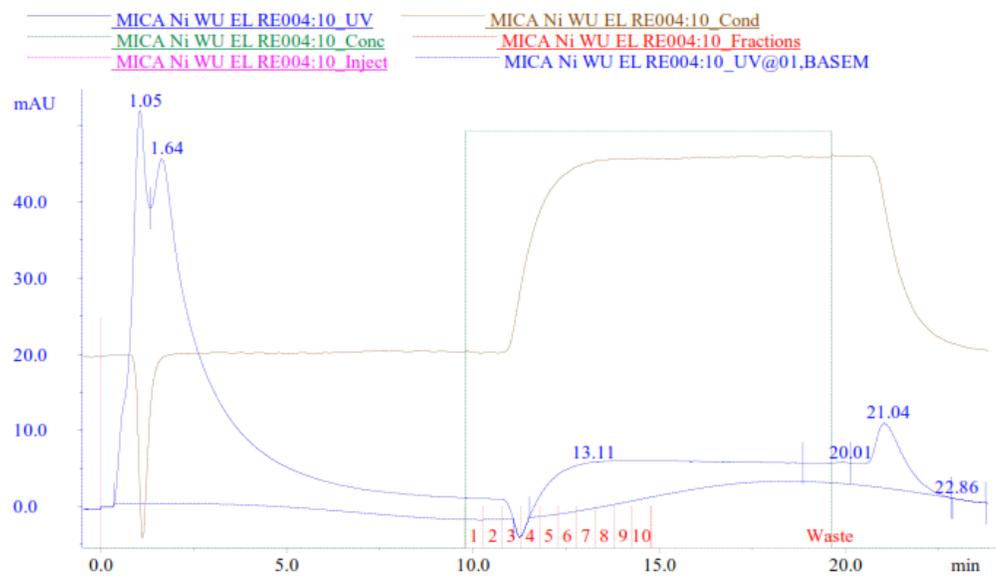


Figura 12: Cromatograma de la fracción soluble del scFv anti-MICA. Perfil de elución de 100 μ L de scFv anti-MICA de la fracción soluble, previamente expresado y caracterizado, los cuales pasaron a través de la columna *HisTrap HP*. En este caso en particular es difícil apreciar al scFv (cambios en absorbancia, línea azul), en presencia del "Buffer" de elución, principalmente por componente que se encontraban en el "Buffer" de lisis que se utilizó para el fraccionamiento de los lisados de *E. coli* cepas HB2151.

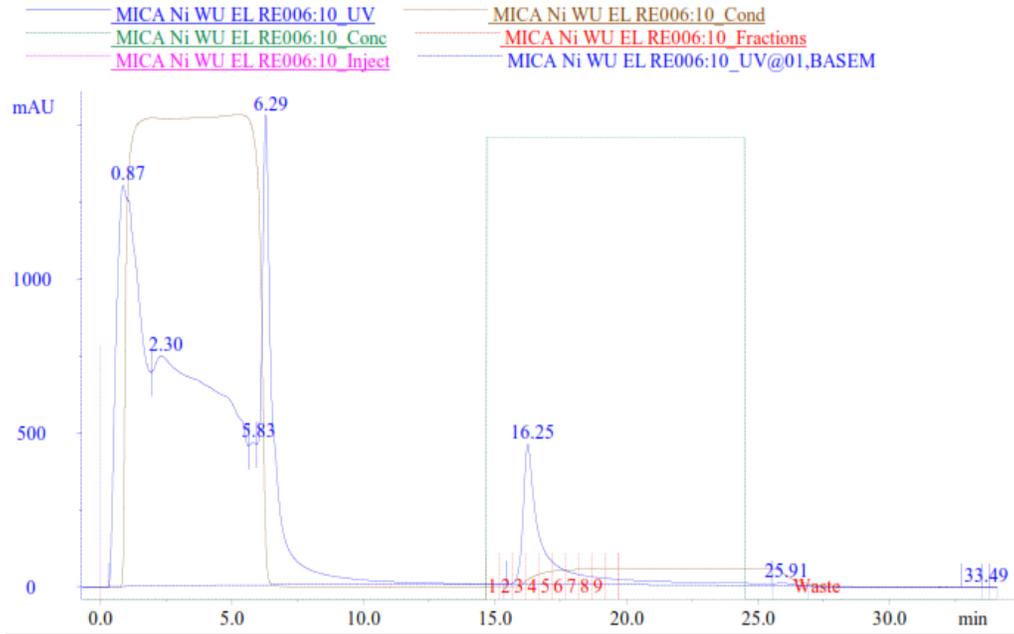


Figura 13: Cromatograma de la fracción insoluble del scFv anti-MICA. Perfil de elución de 2 mL de scFv anti-MICA de la fracción insoluble, previamente expresado y caracterizado, los cuales pasaron a través de la columna *HisTrap HP*. scFv anti-MICA se observa por cambios en la absorbancia (línea azul), cuando está presente el "Buffer" de elución (línea verde), en este caso se ve un "peak" con un área bajo la curva de 16,25 entre las eluciones 3,4 y 5.

En las **figuras 11 y 13** se puede apreciar que el scFv anti-MICA se encuentra concentrado en las eluciones 3, 4 y 5 principalmente. Esto se ve gracias a cambios que ocurren en la absorbancia (línea de color azul), provocados por la proteína, en presencia del "Buffer" de elución (línea de color verde). Teniendo en cuenta los Western Blot y la cuantificación de proteína total por Bradford, se pudo ver también que en los cromatogramas, por medio del área bajo la curva, la fracción insoluble del lisado bacteriano resultó ser donde más se encontraba el scFv anti-MICA. En la **figura 12**, se evidencia el resultado obtenido correspondiente a la fracción soluble, donde se vio un comportamiento distinto en comparación a los otros cromatogramas. Esto se pudo deber a que la fracción soluble se encuentra en "Buffer" de lisis, en donde alguno de sus componentes pudo haber generado cambios en la proteína y por tanto en la absorbancia.

Teniendo en cuenta las tres fracciones, soluble, insoluble y periplasma purificadas, se procedió a realizar una estimación de proteína total en cada una de ellas, mediante el método de Bradford, cuyos resultados obtenidos se pueden ver en la **figura 14**.

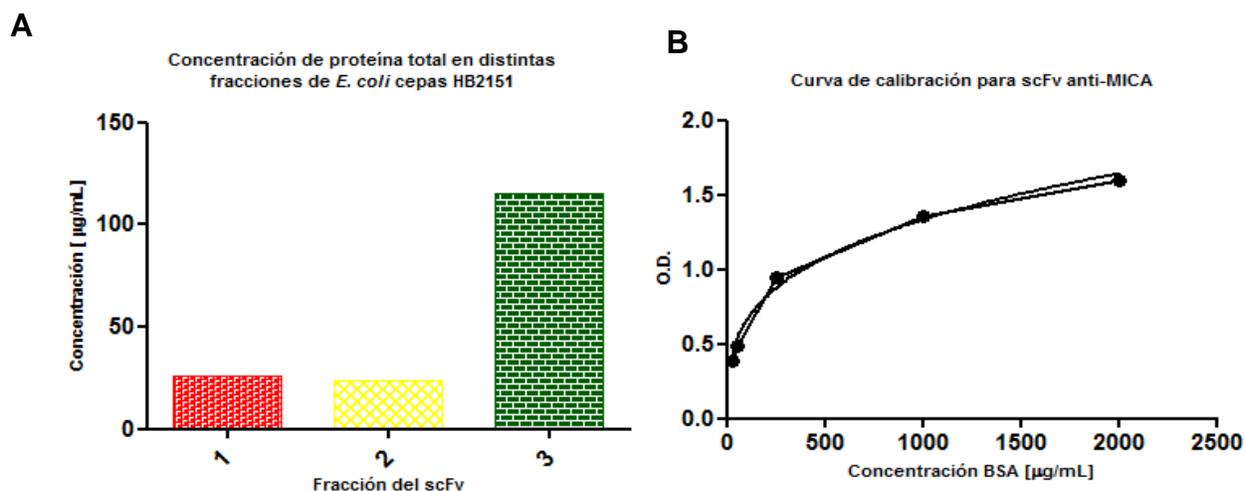


Figura 14: Estimación de la concentración de proteína total en fracciones soluble, insoluble y periplasma de bacteria *E. coli* cepas HB2151. (A) Las concentraciones de scFv de las diferentes fracciones se realizaron por el método de Bradford, utilizando la curva de calibración mostrada en B: (1) scFv anti-MICA en periplasma, (2) scFv anti-MICA fracción soluble, (3) scFv anti-MICA fracción insoluble de *E. coli* cepas HB2151, (B) Curva de calibración realizada con O.D. obtenida utilizando el método de Bradford, con diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) para la cuantificación de scFv anti-MICA en sus distintas fracciones, con una ecuación de la línea de tendencia logarítmica: $y = 0,2806\ln(x) - 0,5689$. $r^2 = 0,9931$.

Los valores de concentración de proteína total para la fracción insoluble, soluble y periplasma fueron las siguientes, 115,19 µg/mL, 24,09 µg/mL y 26,3 µg/mL, respectivamente.

5.3 O.E.3. Caracterizar la capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA recombinante por ELISA, y a MICA nativa mediante FACS

Para caracterizar biológicamente al scFv anti-MICA, se quiso determinar la unión tanto a MICA recombinante, generada en el laboratorio, como a MICA nativa de líneas celulares de cáncer gástrico (AGS y MKN-45). Para el primer caso se realizó un ELISA, en donde la placa se sensibilizó con 100 μ L de proteína MICA a una concentración de 20 μ g/mL, para luego incorporar el scFv anti-MICA a una cantidad de 2,63 μ g por pocillo. Posteriormente se agregaron los anticuerpos anti-Hemaglutinina (1:2000) y el anticuerpo (IgG) de cabra anti-ratón acoplado a HRP (1:5000). En la **figura 15** se esquematiza la capacidad de unión que posee el scFv-anti MICA a MICA recombinante a través de la O. D., además del esquema del ELISA que se utilizó para llevar a cabo este objetivo específico.

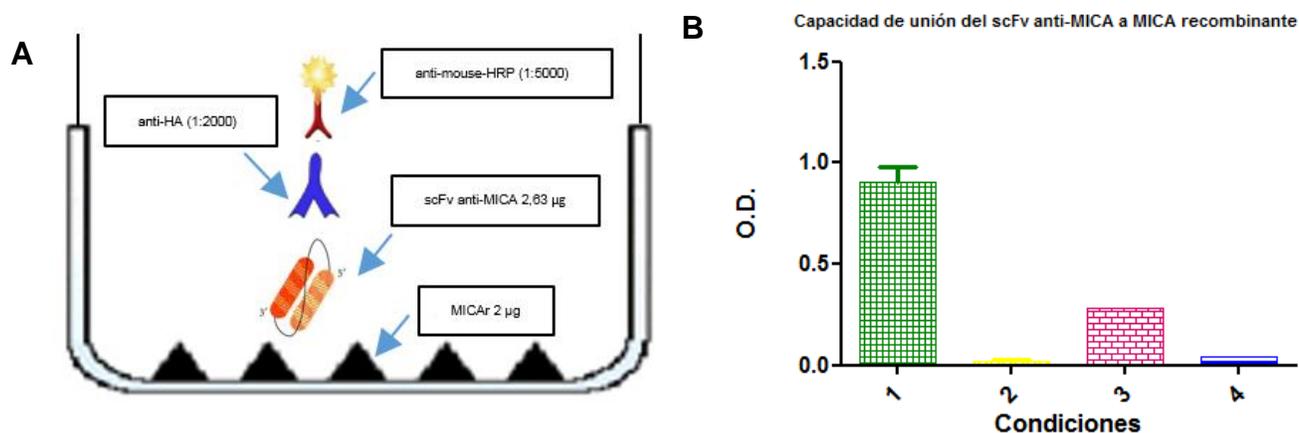


Figura 15: Capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA recombinante. (A) Esquema del ELISA indirecto que se utilizó para determinar la capacidad de unión entre scFv anti-MICA y MICA recombinante. (B) Mediante el ensayo de ELISA, en placas de microtitulación sensibilizadas con 2 μ g de MICA y bloqueados los sitios remanentes con BSA, se determinó la capacidad de unión que tiene el scFv anti-MICA del periplasma, previamente expresado y caracterizado, con un anticuerpo primario anti-Hemaglutinina (1:2000), y como anticuerpo secundario IgG acoplado a HRP (1:5000): (1) 2,63 μ g de scFv anti-MICA más los dos anticuerpos (control positivo), (2) control negativo, es decir células *E. coli* cepas HB2151 sin transformar, ni antibiótico, (3) sólo anticuerpo secundario, IgG acoplado a HRP (1:5000) sin anti-HA, (4) sólo anticuerpo anti-HA (1:2000), sin IgG acoplado a HRP. n =1, triplicado. Los resultados se expresan como promedio \pm D.S. Los "background" correspondientes se restaron a su condición equivalente.

Las condiciones a evaluar en el ELISA, fueron las siguientes, 1) control positivo entre scFv anti-MICA a MICA recombinante; 2) control negativo (*E. coli* cepa HB2151 sin transformar); 3) control negativo sin el anticuerpo anti-

Hemaglutinina y 4) control negativo sin el anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a HRP. Los valores exactos de las O.D. de las condiciones 1 y 2 fueron $0,9077 \pm 0,07226$ y $0,01867 \pm 0,006360$, revelando una tendencia positiva a que exista unión específica entre el scFv anti-MICA a MICA recombinante. Las condiciones 3 y 4 se realizaron para descartar unión inespecífica por medio de los anticuerpos utilizados.

Para la segunda parte del objetivo se quiso evaluar la unión del scFv anti-MICA a MICA nativa de dos líneas celulares de CG, éstas fueron AGS y MKN-45. La unión se determinó a partir del incremento del MFI (mediana de la intensidad de fluorescencia) con un anticuerpo anti-Hemaglutinina acoplado al fluoróforo FITC, mediante la técnica de citometría de flujo. En la **figura 16** se muestra el *density plot* representativo para las células AGS, además de la población seleccionada a evaluar (círculo negro) y sus histogramas correspondientes, tanto para los anticuerpos utilizados (anti-MICA y anti-Hemaglutinina), como también para sus isotipos, conjunto a la condición a evaluar del scFv anti-MICA a MICA nativa. En la **figura 17** se aprecia algo similar, pero para la línea celular de CG, MKN-45. Cabe mencionar que para evaluar unión específica se utilizó el anticuerpo primario de ratón anti-MICA comercial clon 159227 y como anticuerpo secundario un IgG de cabra anti-ratón acoplado al fluoróforo FITC, para ambas líneas celulares y que por pocillo se agregaron aproximadamente 5 μg del scFv anti-MICA.

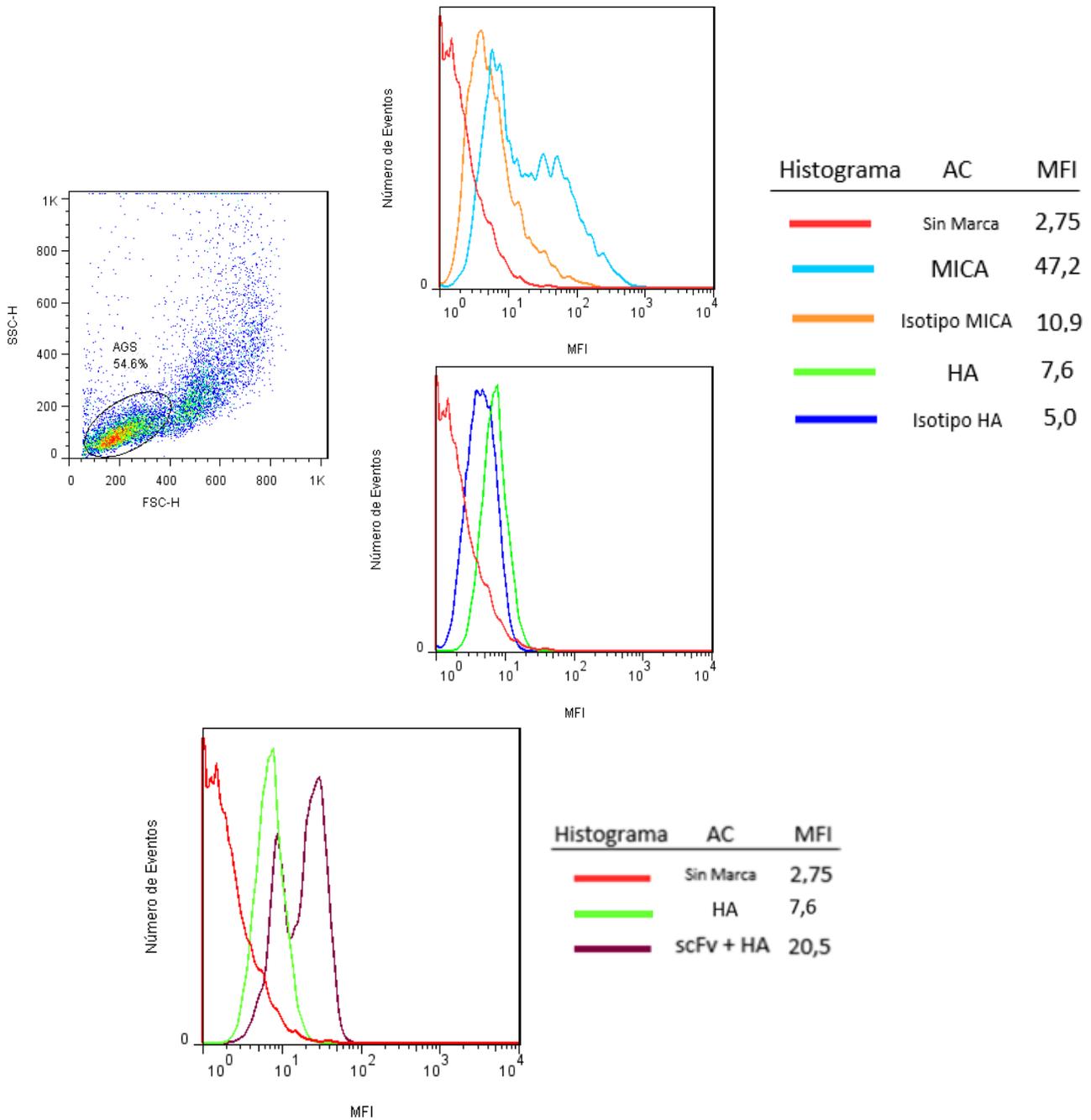


Figura 16: Capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA nativa en la línea celular de cáncer gástrico AGS. Gráficos de densidad (*dot plot*), obtenidos por citometría de flujo que muestran las propiedades de tamaño (FSC) *versus* granularidad (SSC) de las células AGS. La población de células en estudio se seleccionó según las propiedades de FSC y SSC (círculo negro), y a partir de esta selección se analizó la expresión de MICA y HA (Hemaglutinina) utilizando anticuerpos comerciales anti MICA (línea celeste) y anti HA (línea verde). El número en el *dot plot* indica el porcentaje de células en la población seleccionada. La capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA se determinó a través de la mediana de la intensidad de fluorescencia (línea de color morado), con sus isotipos correspondientes. Los valores de MFI están indicados en la leyenda coloreada sobre el histograma.

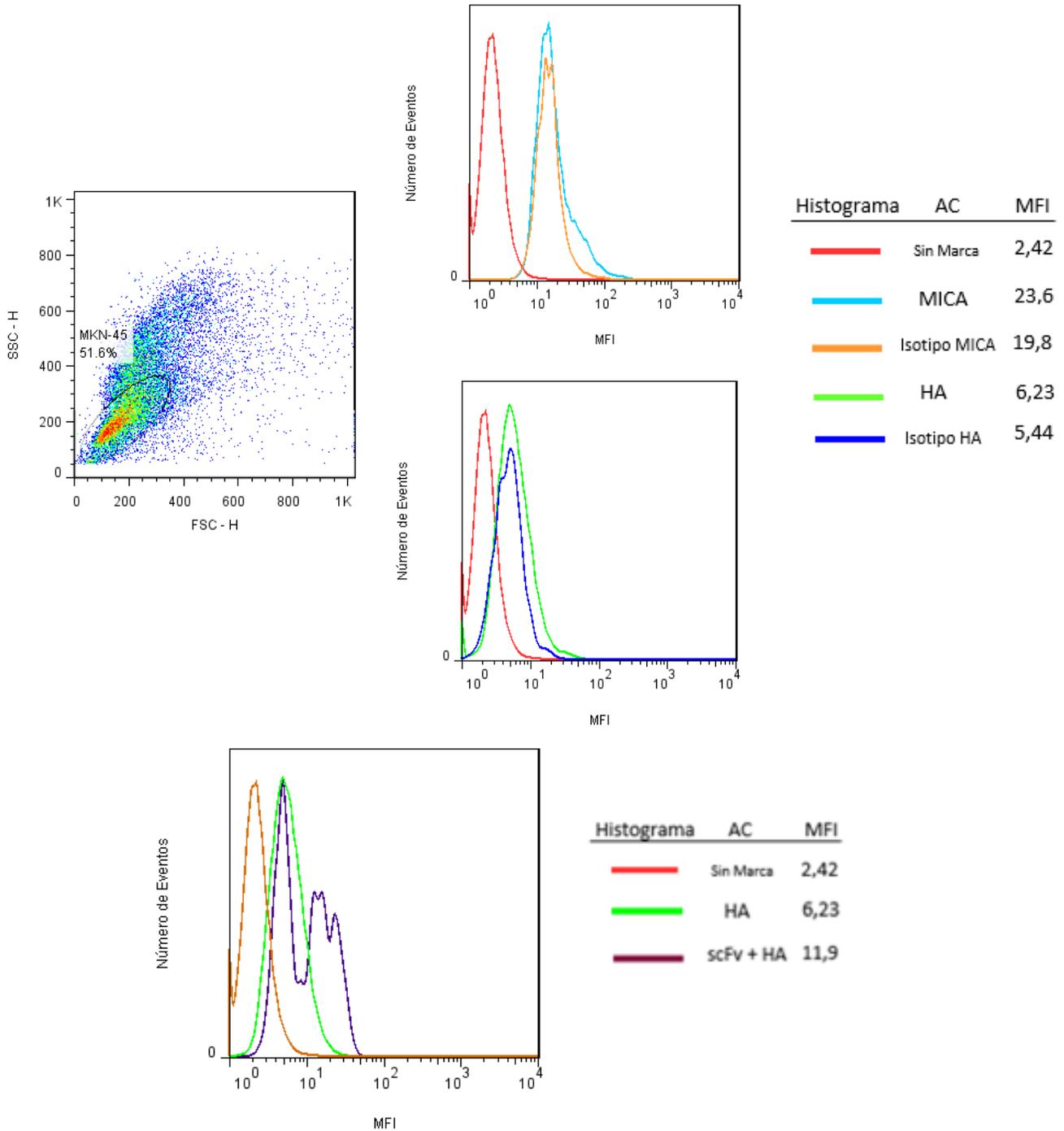


Figura 17: Capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA nativa en la línea celular de cáncer gástrico MKN-45. Gráficos de densidad (*dot plot*), obtenidos por citometría de flujo que muestran las propiedades de tamaño (FSC) *versus* granularidad (SSC) de las células MKN-45. La población de células en estudio se seleccionó según las propiedades de FSC y SSC (círculo negro), y a partir de esta selección se analizó la expresión de MICA y HA (Hemaglutinina), utilizando anticuerpos comerciales anti MICA (línea celeste) y anti HA (línea verde). El número en el *dot plot* indica el porcentaje de células en la población seleccionada. La capacidad de unión del scFv anti-MICA a MICA se determinó a través de la mediana de la intensidad de fluorescencia (línea de color morado), con sus isotipos correspondientes. Los valores de MFI están indicados en la leyenda coloreada sobre el histograma.

Tanto para la línea celular AGS, como para MKN-45, se observó un aumento del MFI, aunque no de manera significativa, al comparar el MFI del anticuerpo anti-Hemaglutinina frente a las líneas celulares, con el MFI del scFv anti-MICA a MICA nativa. Cabe mencionar que el primer caso (línea verde claro en ambas figuras) se utilizó como control negativo de unión inespecífica por acción del anticuerpo secundario y no por parte del scFv anti-MICA. En la línea celular AGS se evidenció un mayor MFI del scFv anti-MICA en comparación al obtenido en la línea celular MKN-45 (líneas de color morado en las **figuras 16 y 17**, respectivamente), debido principalmente a que en la primera hay una mayor cantidad de proteína MICA nativa que se está expresando en la membrana celular, y por tanto se puede concluir de que hay unión entre el scFv anti-MICA a MICA nativa de ambas líneas celulares.

Adicionalmente, se realizó un ensayo con fagos de citometría de flujo con líneas celulares que expresan para analizar su capacidad de unión. Para esto se tomaron dos clones de Fagos scFv anti-MICA (Clon DP30 y Clon 68) y un Fago irrelevante, luego se incubaron en cantidades iguales (10^7 partículas fágicas) en una densidad celular de 200.000 células de MKN-45 por pocillo. Los scFv Fagos fueron detectados con un anticuerpo anti-M13 conjugado a FITC, con la finalidad de ver cuánto porcentaje de la unión a MICA nativa se debe únicamente al scFv o a la partícula fágica entera. En la **figura 18** se observan los histogramas correspondientes a dos clones distintos de Fagos scFv anti-MICA y su detección frente a MICA nativa de células MKN-45, con los MFI correspondientes.

Como se puede apreciar en la **figura 18**, los MFI no presentan diferencia significativa entre la condición del Fago Irrelevante con los clones de Fagos scFv anti-MICA. Esto podría deberse a que la partícula fágica se une inespecíficamente a las células, y también podría estar interfiriendo en la unión específica, que debiese ocurrir entre el anticuerpo (scFv) con su antígeno (MICA) o que es necesario aumentar la cantidad de fagos. Por ello, fue necesario generar los scFv y no realizar los experimentos de caracterización de scFv anti-MICA con la partícula viral.

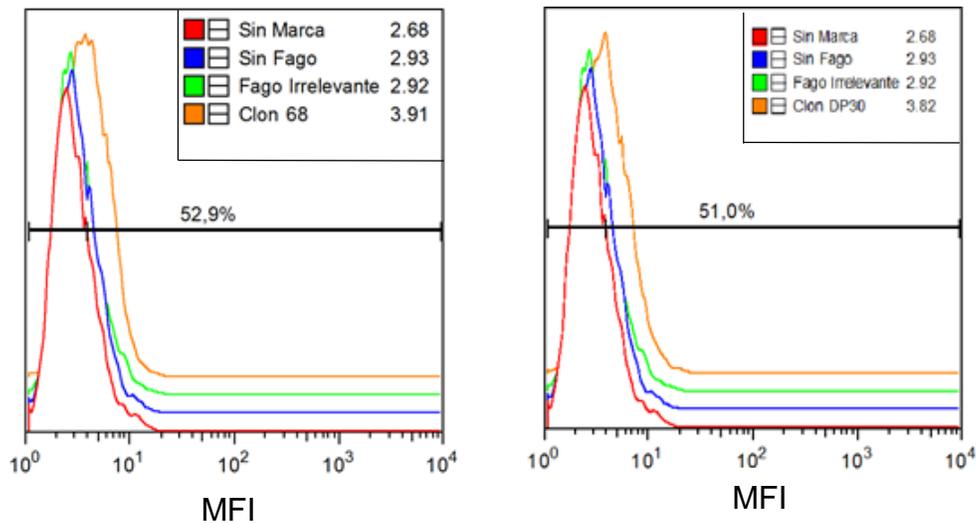


Figura 18: Detección de MICA nativa mediante scFv-Fagos anti-MICA en línea celular MKN-45. Histogramas representativos de la detección de MICA nativa en la superficie de células MKN-45, utilizando scFv-fagos anti MICA. En placas fondo "U" se incubaron 200.000 células MKN-45 con $\sim 10^7$ partículas fágicas (2h, 37°C). Los scFv-Fago anti-MICA fueron revelados con anticuerpo anti-M13 conjugado a FITC, y detectados por citometría de flujo. En el recuadro se indican las medianas de la intensidad de fluorescencia (MFI), y sobre la barra, los porcentajes de células positivas de acuerdo a la población sin marca.

5.4 O.E.4. Analizar la capacidad de expresión del receptor de activación NKG2D en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en presencia de moléculas de scFv anti-MICA mediante citometría de flujo

Teniendo en cuenta los resultados que se obtuvieron en el objetivo específico 3, es decir, donde se encontró unión entre el scFv anti-MICA a MICA recombinante y a MICA nativa, se quiso evaluar la capacidad fisiológica que tiene el scFv anti-MICA frente a los receptores de activación de NKG2D en PBMC. Para poder caracterizar aún más las funciones biológicas del scFv anti-MICA, del PBMC, se evaluó solamente a las *células NK* y a los linfocitos T CD8⁺, que son los que presentan en su superficie celular el receptor de activación NKG2D [45]. Las *células NK* y los Linfocitos T CD8⁺ se caracterizaron fenotípicamente como CD56⁺CD3⁻ [37] y CD8⁺CD3⁺ [50], respectivamente.

Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron de un sujeto sano y se dejaron 24 horas con IL-2r para aumentar su proliferación [45]. Luego se continuó con la incubación con MICAr 400 ng/mL y con scFv anti-MICA

aproximadamente 10 µg por pocillo también por 24 horas a una densidad celular de 200.000 células/pocillo, posteriormente se agregaron los anticuerpos anti-CD3-PeCy7, anti-CD56-PE, anti-CD8-FITC y se leyó la MFI con el anticuerpo anti-NKG2D-APC. Como control positivo de la técnica se utilizó un anticuerpo anti-MICA de clon AMO1.

En la **figuras 19 y 20** se muestran los *density plot* representativos para las *células NK* y los linfocitos T CD8⁺, respectivamente, además de las poblaciones seleccionadas a evaluar (cuadro negro) y sus histogramas correspondientes, tanto para el anticuerpo utilizado (anti-NKG2D), como también para su isotipo, conjunto a las distintas condiciones a evaluar. En ellas se puede observar que MICAr no disminuyó la expresión de NKG2D en la superficie de los linfocitos *NK* y T CD8⁺ (**Figuras 19 y 20, respectivamente**). Esto se ha descrito en la bibliografía ^[49] y en el laboratorio se ha observado que con la presencia de algunos sueros de CG y con MICB recombinante disminuye el NKG2D. Más aún, la presencia de scFv con MICAr disminuyó la señal de NKG2D, un comportamiento inverso a lo que se esperaba, puesto que al tener en consideración la condición de que hay unión entre el scFv anti-MICA a MICA recombinante y a MICA nativa, los niveles de NKG2D tendrían que haber sido superiores o similares al MFI de la condición de NKG2D más IL-2r (línea de color naranja vs. línea de color rosado en ambas figuras), ya que el scFv anti-MICA tendría que estar uniéndose a MICAr soluble, lo que provocaría que los niveles de NKG2D se mantuviesen en valores normales.

No tan sólo la condición anteriormente señalada dio un comportamiento inesperado, sino que la condición de *células NK* en presencia de MICA recombinante dio un MFI superior al control más IL-2r (línea de color amarillo vs. línea de color naranja en la **figura 19**, respectivamente). Esto no se observó con los linfocitos T CD8⁺, donde se vio el comportamiento esperado, es decir, una disminución de los niveles de NKG2D mediada por MICAr (**Figura 20**), provocado por mecanismos de down-regulation, aunque no de manera significativa. Como se ha visto en sueros de pacientes con CG, los niveles de NKG2D se ven disminuidos en *células NK* principalmente provocado por MICAs, por lo tanto en el presente trabajo se hubiese esperado algo similar, puesto que las concentraciones

de MICA recombinante que se utilizaron en este experimento son superiores a los que existen en los sueros de pacientes con cáncer gástrico [70, 71].

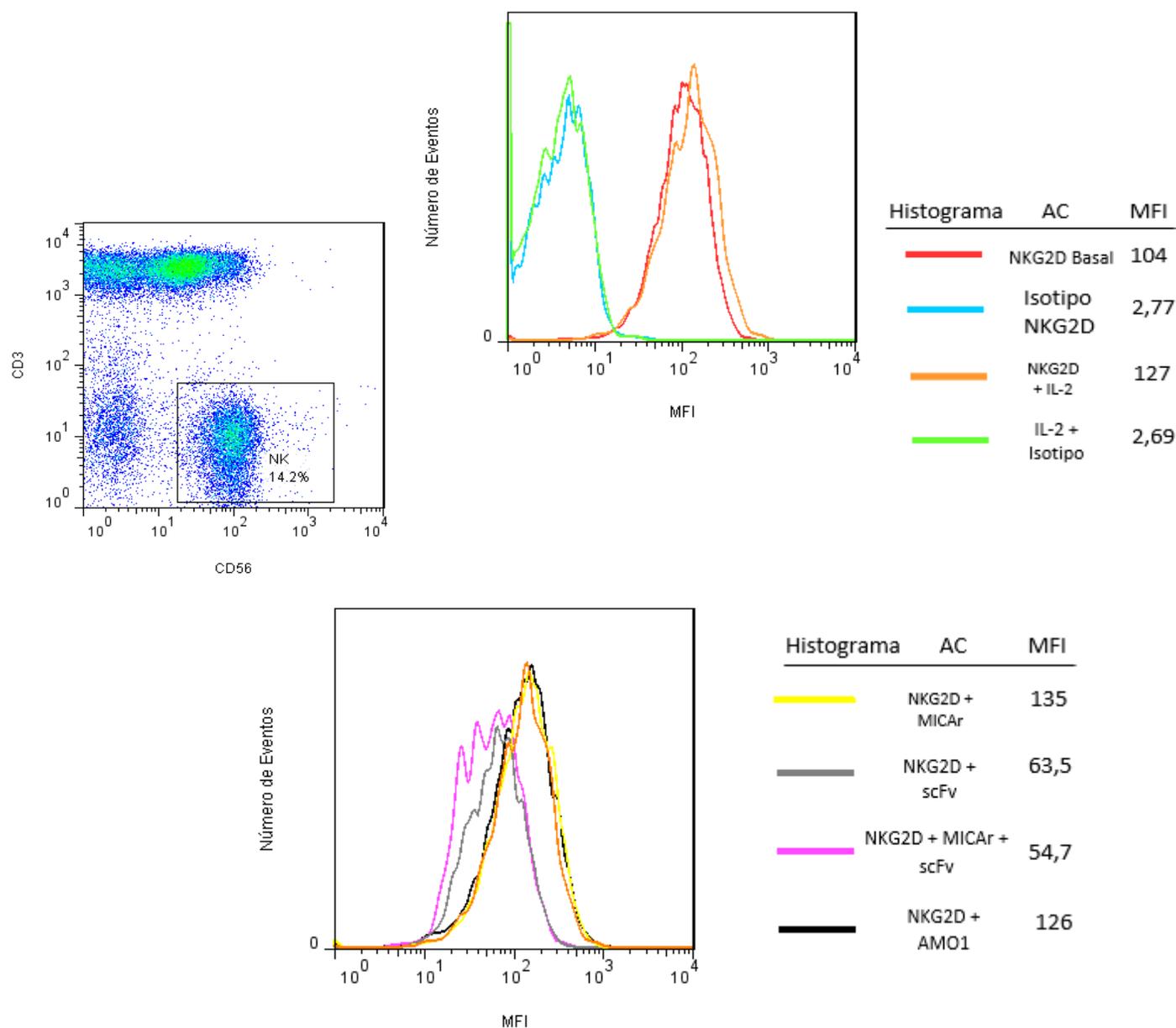


Figura 19: Análisis de la expresión del receptor de activación NKG2D en células NK. Gráficos de densidad (*dot plot*), obtenidos por citometría de flujo que muestran las propiedades fenotípicas de las células NK. La población de células en estudio se seleccionó según los marcadores específicos para células NK (cuadrado negro, CD56⁺CD3⁺), y a partir de esta selección se analizó la expresión de los niveles de NKG2D, utilizando la mediana de la intensidad de fluorescencia. El número en el *dot plot* indica el porcentaje de células en la población seleccionada. Los valores de MFI están indicados en la leyenda coloreada sobre el histograma.

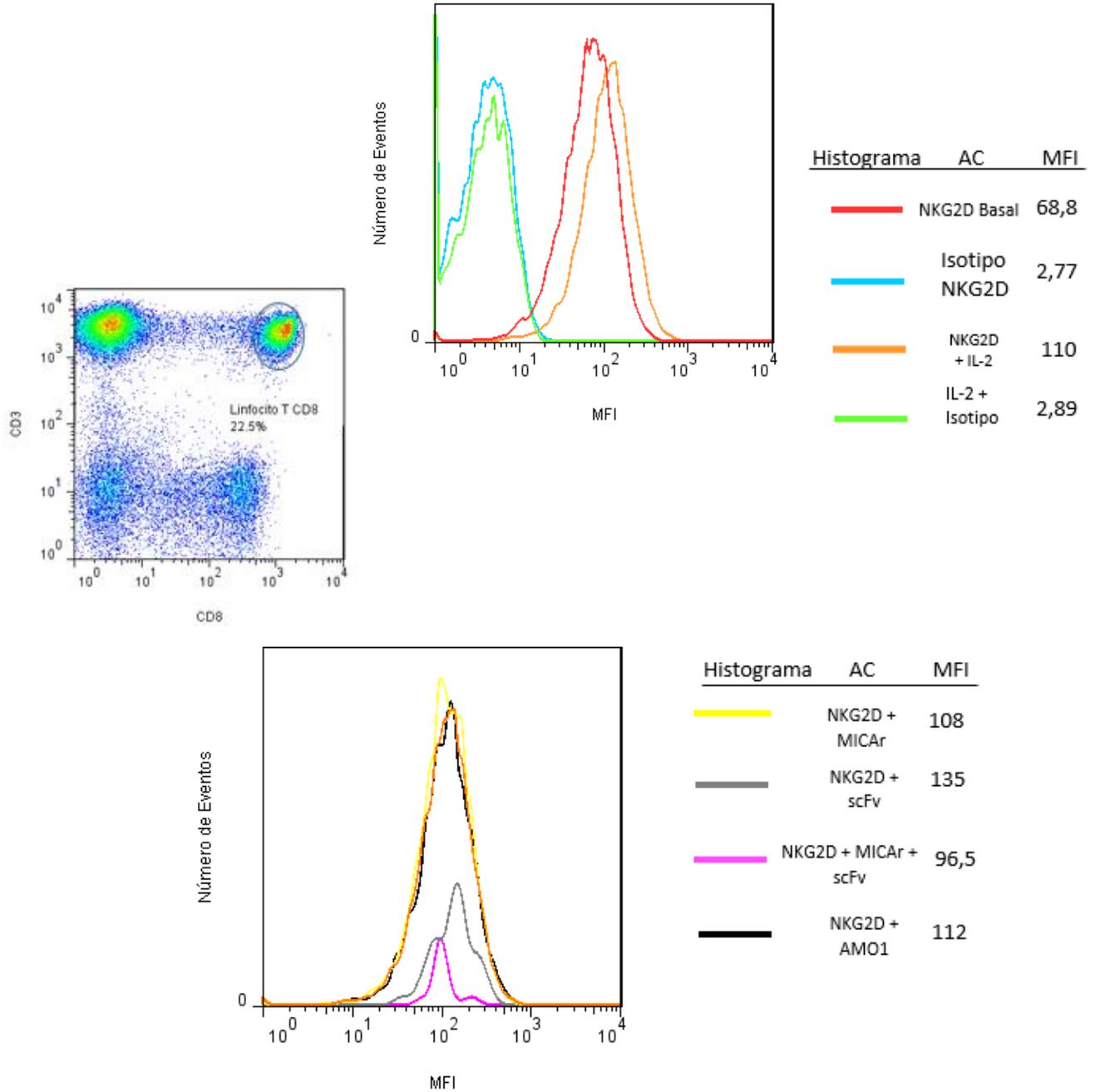


Figura 20: Análisis de la expresión del receptor de activación NKG2D en linfocitos T CD8⁺. Gráficos de densidad (*dot plot*), obtenidos por citometría de flujo que muestran las propiedades fenotípicas de los Linfocitos T CD8⁺. La población de células en estudio se seleccionó según los marcadores específicos para Linfocitos T CD8⁺ (círculo negro, CD3⁺CD8⁺), y a partir de esta selección se analizó la expresión de los niveles de NKG2D, utilizando la mediana de la intensidad de fluorescencia. El número en el *dot plot* indica el porcentaje de células en la población seleccionada. Los valores de MFI están indicados en la leyenda coloreada sobre el histograma.

Los hechos descritos, pueden explicarse en parte por la presencia de imidazol en la preparación, ya que se pudo apreciar en esta experiencia el gran porcentaje de células que se fueron muriendo en presencia del scFv anti-MICA frente a las *células NK* y Linfocitos T CD8⁺ (provenientes del PBMC). Por esta razón se evaluó el posible efecto que podría tener el imidazol frente a la muerte celular. Esto se llevó a cabo teniendo las mismas condiciones antes mencionadas en la sección de metodología, en donde se realizó una curva de dosis-respuesta frente a cambios decrecientes en la concentración de imidazol (**Figura 21**), para ver algún tipo de fenómeno apoptótico cuando se estaba en presencia del imidazol solo y/o acompañado con algún otro componente de la solución en la cual se encontraba el scFv anti-MICA.

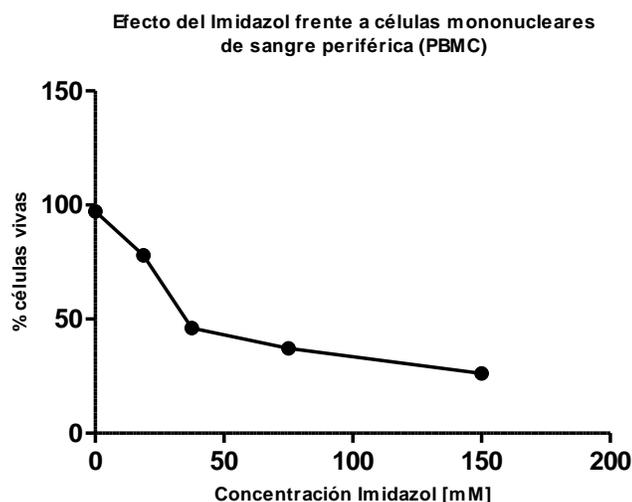


Figura 21: Efecto del imidazol en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Curva de dosis-respuesta que tuvieron las células provenientes del PBMC en presencia de distintas concentraciones de imidazol por 24 horas (150 mM, 75 mM, 37,5 mM, 18,75 mM, 0 mM). Las condiciones de aislamiento de PBMC fueron los mismos que se utilizaron en la metodología, en donde se analizó la expresión de los niveles de NKG2D de las *células NK* y Linfocitos T CD8⁺. La experiencia consta de un n = 1, triplicado.

En la **figura 21** se muestra una fuerte relación existente entre la concentración del imidazol y el porcentaje de células vivas luego de estar 24 horas expuestas a dicho componente. Se ve claramente que cuando no está presente imidazol en la solución, hay un mayor porcentaje de proliferación celular, teniendo en cuenta que fueron también estimuladas con IL-2r. Además se pudo apreciar que la concentración de 150 mM de imidazol (que es lo que está presente en el

scFv anti-MICA) provocó más del 50% de muerte celular, lo que podría haber generado los resultados inversos anteriormente mencionados, expuestos en las **figuras 19 y 20**.

Se realizó también el estudio de viabilidad a la condición de PBMC estimulado con IL-2r más 10 µg aproximadamente de scFv anti-MICA, lo que dio un porcentaje de células vivas menor, en comparación a cuando se está solamente con imidazol 150 mM (22,77% versus 26,13% de células vivas, respectivamente). Esto se pudo atribuir a que haya quedado algún resto bacteriano, como LPS, en la fracción de scFv anti-MICA utilizado en los ensayos de funcionalidad frente a MICA nativa y a PBMC.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Expresión de la proteína MICA recombinante

Para la generación de MICA recombinante se utilizó un medio de expresión eucarionte, específicamente la línea celular HEK293, la cual ha sido ampliamente utilizada en el campo de la biotecnología para la producción de diversas proteínas recombinantes, más en el campo de la electrofisiología y en el estudio de expresión de receptores de membrana, como lo son receptores acoplados a proteínas G, receptores sensibles a voltaje, canales iónicos sensibles a cambios de pH, entre otros ^[81]. Existen otras variantes heterogéneas de este tipo celular, la variante original es la que ha sido transformada con el adenovirus tipo 5 (Ad5), otras son las que han sido transformadas con el virus Epstein-Barr (variante denominada HEK293E), y con el antígeno T del virus SV40, denominada HEK293T, la cual se ocupó en este caso para la producción de la proteína recombinante.

Una de las particularidades que tiene esta línea celular es el fuerte grado de modificaciones post-traduccionales ^[81] (glicosilaciones, formación de puentes disulfuros, adición de grupos prostéticos, etc.), con las cuales están sujetas diversas proteínas que son expresadas mediante este medio. Esto mismo ocurrió en los resultados presentados en esta investigación, ya que la proteína MICA en su forma soluble presenta un peso molecular de 35 kDa, pero al realizar los Western Blot de los lisados celulares de HEK293T post-transfección (**Figuras 7c y 8c, respectivamente**), se vio una banda que correspondería a MICA en su forma madura y constitutiva de la línea celular HEK293T, la que posee un peso molecular de 65 kDa, provocado por 8 potenciales lugares de N-glicosilaciones, principalmente en los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la proteína MICA ^[55].

La transfección se define como la introducción dentro de una célula eucariota de una molécula de DNA que no pertenece a la célula. Como resultado, la célula presenta en general un gen mutado además de su gen normal. Las técnicas de transfección celular han permitido en gran medida ampliar los

conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares.

Las técnicas de transfección que se utilizan en la actualidad se pueden clasificar en dos tipos: métodos químicos o métodos físicos.

Los métodos químicos están basados en la formación de complejos que las células son capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica o a través de las membranas. Entre estos métodos podemos mencionar: método de fosfato cálcico, método del DEAE dextrano y método de lipofección (dentro de estos últimos está el utilizado para la expresión de la proteína MICA, el cual es el polímero catiónico polietilenimina).

Los métodos físicos están basados en la introducción mecánica de las moléculas de DNA en el interior de la célula. Entre ellos están: microinyección directa y electroporación.

Polietilenimina químicamente es un polímero con carga neta positiva debido a los nitrógenos de los grupos amino que posee en su estructura, los cuales a pH fisiológico son protonados, y gracias a esta característica poder unirse con los grupos fosfatos del DNA. En este caso, el vector pHLSEC-Avitag que porta el gen para la proteína MICA recombinante y formar así un complejo condensado en forma toroidal, el cual mediante mecanismos de endocitosis pueda ingresar al interior de las células HEK293T, para liberar posteriormente el DNA hacia el interior del núcleo, a través de la hipótesis que propone el mecanismo de la "esponja de protones" ^[82] y así ser utilizado para la producción de MICA recombinante. PEI ha sido empleado como transporte de material genético, tanto para la formación de alguna proteína en particular, como también en el campo de la terapia génica. Con respecto al primer punto, PEI es uno de los polímeros que más se ha usado para la producción de proteínas, debido a que presenta una atribución que lo hace único frente a los demás polímeros, está es que genera una barrera física de protección frente al DNA y además produce una solución "Buffer" alrededor del complejo DNA:PEI, lo que permite la no degradación lisosomal luego de entrar a la célula ^[83], teniendo como resultado porcentajes elevados en eficacia

de transfecciones en diversas líneas celulares, como así en las células HEK293T [75].

La eficacia de la transfección será específica para cada proteína que se está generando y el uso que se le quiera dar, en este caso con una transfección simple entre PEI y pHLSEC-Avitag (plasmidio para MICA) (**Figura 7b**) se obtuvieron 7,250 ng/mL de proteína MICA recombinante en el medio extracelular, lo que se podría considerar bueno, teniendo en cuenta los niveles de MICA que se obtienen de muestras de suero de pacientes con cáncer gástrico [49], que están dentro de los rangos de los picogramos/mL, pero también se podría considerar niveles negativos si se tiene en consideración los niveles de proteínas que se obtienen en biorreactores, los cuales están en el orden de miligramos/mL. Además se vio en el Western Blot correspondiente (**Figura 7c**) una gran banda correspondiente a la proteínas MICA soluble (que es la forma en que se transfectó), lo que demuestra que gran parte de MICA se está reteniendo en el interior de la célula y no está siendo secretada al medio celular, que es lo que se debería esperar, además se ven otras bandas (**Figura 7c**), las cuales podrían corresponder a modificaciones post-traduccionales, principalmente formas glicosiladas de MICA. En este caso se quería potenciar aún más la producción de la proteína recombinante para poder utilizarla en posteriores ensayos, como lo son ELISA y FACS.

Para esto se quiso aumentar la cantidad del agente transfectante PEI, pero se vio en la literatura el alto grado citotóxico que presenta éste, principalmente a nivel mitocondrial, puesto que genera cambios en el potencial de membrana de la mitocondria generando liberación de citocromo c y por tanto muerte celular mediada por apoptosis [84]. Hanzlíková y colaboradores [82], además demostraron que al agregar una mayor cantidad de PEI, y por tanto aumentar la relación PEI:DNA, aumenta el PEI libre en el medio extracelular, el cual afecta negativamente la eficacia de la transfección. Es por estos antecedentes que se buscó otro método que potenciara la producción de MICA recombinante.

De por sí los procesos de transfección generan un estrés a las células, más cuando se hace a través de métodos químicos y citotóxicos (como se realiza en

este caso, a través de PEI), lo cual puede llevar a diversas manifestaciones en las células que pueden modificar el grado de producción de la proteína recombinante que se quiera expresar, en este caso MICA. Las células HEK293T en su estado basal no presentan estrés de retículo endoplásmico, como sí lo hacen las células CHO (células de ovario de hámster) ^[85], es por esto que en las primeras se produce un estrés de retículo forzado por medio de la transfección y por tanto una disminución en la cantidad de proteína que se expresa al medio extracelular. Por este motivo se realizó una co-transfección con un plasmidio que expresara mRNA de XBP1s de origen de hámster expresado en células CHO (previamente elaborado en el laboratorio).

Las proteínas se sintetizan en el retículo endoplásmico, específicamente en el lumen de este organelo, en el cual también ocurren las modificaciones post-traduccionales, y debido a este proceso es que las proteínas pueden quedar mal plegadas, principalmente provocado por un desbalance entre la capacidad secretora que tiene la célula y la capacidad de producción de proteínas, lo cual lleva al retículo a un proceso de estrés, principalmente sentido por tres proteínas de membrana denominadas: IRE1 α , PERK y ATF6 ^[86], las cuales colectivamente dan nombre al proceso de la UPR (Unfolded Protein Response, Respuesta a Proteínas Mal Plegadas). IRE1 α en su dominio del lumen del retículo endoplásmico, sensa a las proteínas mal plegadas, lo que lleva a una dimerización del receptor IRE1 α , seguida por una autotransfosforilación y por tanto llegar a su forma activa. Gracias a su actividad RNasa en el dominio citoplasmático, procesa el mRNA del XBP1, para generar a través de un "splicing" una forma más pequeña de mRNA XBP1 (que es la forma en que se transfectó para potenciar la producción de MICA recombinante), el cual posteriormente actúa como factor de transcripción de diferentes genes que potencian la producción de proteínas y hace que el retículo endoplásmico vuelva a su normalidad ^[86].

XBP1 ha sido utilizado en muchas ocasiones para potenciar la producción de proteína en diversas líneas celulares, aunque mayoritariamente hay evidencia de su uso en las células CHO ^[85, 87]. Se ha postulado que el mecanismo principal por el cual XBP1 incrementa la eficiencia de producción de proteína está mediada

a tres niveles: mejora los procesos de tráfico celular de proteínas, aumenta la generación de proteínas anexas, denominadas chaperonas que están relacionadas con los procesos post-traduccionales de las proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico y aumenta el tamaño del retículo endoplásmico, y por tanto toda su maquinaria ^[87]. Como se puede apreciar en la **figura 8b**, las aplicaciones que tiene XBP1 en las células CHO, pueden ser extrapolable a las células HEK293T, debido a que hubo un aumento 4 veces mayor de producción de MICA recombinante, en el caso de la co-transfección entre los vectores pHLSEC-Avitag y XBP1, en comparación con la transfección simple, que sólo contenía pHLSEC-Avitag (**Figura 7b**). Este efecto potenciador que tuvo XBP1s con la producción de MICA recombinante también se pudo ver en el Western Blot (**Figura 8c**), ya que sólo se vio la banda correspondiente a la forma de MICA propia de la línea celular (65 kDa), y no la forma de MICA soluble (35 kDa) (**Figura 7c**), lo que sugiere es que toda la proteína recombinante en la condición de co-transfección fue secretada al medio extracelular, provocado por algún mecanismo previamente señalado con respecto a la fisiología del retículo endoplásmico estimulado por XBP1s, evidenciándose también en el ELISA correspondiente (**Figura 8b**). Estos resultados propondrían una buena estrategia para la síntesis de proteínas en las células HEK293T, teniéndolas presentes para usos futuros relacionado a nuestro laboratorio, como por ejemplo la producción a diferentes escalas de anticuerpos monoclonales.

Lo novedoso también que se puede obtener de estos resultados, es que el XBP1 que siempre se utiliza para potenciar la producción de proteínas es de origen humano, el cual tiene un 76% de homología que el XBP1 de origen de ratón ^[85-87], pero en este caso se utilizó un XBP1 de origen de hamster para transfectar las células HEK293T y que también se está utilizando en las mismas células CHO en el laboratorio.

Otros cambios que se pueden hacer para potenciar la producción de MICA recombinante, específicamente en las células HEK293T, es ir agregando diversos componentes al medio en el cual las células se mantendrán, con la finalidad de mejorar su capacidad metabólica, como la resistencia a la apoptosis, entre las

estrategias que hay son: utilizar concentraciones elevadas de algunos aminoácidos, incorporar químicos inhibidores de caspasas como suramina, activar genes anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL, detener el ciclo celular en G1 luego de tener una densidad celular alta, para así evitar la duplicación celular y aumentar la producción, agregando algún suplemento como rapamicina o disminuyendo la temperatura del cultivo [88].

Es así como son diversas las maniobras que existen para poder mejorar la producción de una proteína específica en un medio de expresión a nivel de laboratorio, con el fin de elegir la mejor de ellas y adaptarla a una escala mayor a través de la utilización de biorreactores.

6.2 Expresión del fragmento scFv anti-MICA

Existen diversos métodos para la producción de anticuerpos monoclonales con carácter terapéutico, entre los que se pueden mencionar y más utilizados están: la tecnología del hibridoma y el "Phage Display", cada una con sus limitaciones y ventajas [89]. La ventaja, como también su limitación de la tecnología del hibridoma es que a través de un mieloma se puede generar un solo anticuerpo, pero con una gran afinidad, otra desventaja que está limitando cada vez más su uso es el tema de la bioética, por el contrario, a través de la tecnología de "Phage Display" (que es la que se utilizó para generar los scFv anti-MICA), se pueden producir múltiples anticuerpos para diversos antígenos, en los cuales durante su desarrollo se va direccionando la especificidad y afinidad que tendrá el futuro anticuerpo desarrollado. Con la tecnología del "Phage Display" [90], se puede trabajar con la producción de los scFv, lo cual puede ser una desventaja, puesto que primero se debe realizar un extenso trabajo entre la selección, maduración y construcción de un anticuerpo monoclonal, pero la gran utilidad que tiene trabajar con los scFv, que son más fácil de manipular, ya que por ejemplo al trabajar en ensayos *in vivo* con ratones, los scFv tienen una mayor penetración en los tejidos tumorales, los cuales los hacen idóneos en experimentos donde se obtienen imágenes moleculares de distribución del scFv en el cuerpo de estos animales [91].

Una limitación bastante compleja que tiene la tecnología del "Phage Display" es el medio de expresión que se utiliza para obtener los scFv, que principalmente es en bacteria, lo cual puede generar un producto con algún resto bacteriano y por tanto con un mayor poder inmunogénico frente a la respuesta que tendrá en su futuro en el cuerpo humano. Es por esto que en los últimos años cada vez más se está utilizando una nueva técnica, la cual es la de utilizar animales, principalmente ratones transgénicos humanizados ^[92], por ende los anticuerpos que se obtendrán tendrán en su totalidad un origen humano, lo que reduciría a cero el carácter inmunogénico del anticuerpo monoclonal terapéutico, frente al sistema inmune del huésped y de un futuro paciente.

Como se mencionó anteriormente, el principal sistema de expresión de los scFv a partir de la tecnología del "Phage Display" son las bacterias. En este trabajo se utilizó la bacteria *E. coli* cepa HB2151, los cuales mediante la técnica del shock osmótico se facilitaría la expresión del scFv hacia el periplasma, pero esto no ocurrió así, es más, hubo una mayor expresión de scFv anti-MICA en el lisado de la bacteria, específicamente en la fracción insoluble del pellets, también denominado como cuerpos de inclusión (**Figuras 9 y 10, respectivamente**). La técnica del shock osmótico generalmente se usa debido a que es sencilla, rápida y no necesita reactivos de alto costo para un laboratorio, pero se puede generar el problema anteriormente señalado, es decir, la poca producción de scFv y post-secreción hacia el periplasma ^[93].

El proceso de formación de cuerpos de inclusión es un problema complejo que siempre se tiene que tener presente cuando se está expresando un scFv, o en general cualquier proteína en bacterias, ya que disminuye la eficacia en el proceso de producción de estos mismos. A los cuerpos de inclusión se les podría denominar como un proceso de estrés que hay en el citoplasma bacteriano, ya que hay un desbalance entre el proceso de agregación y solubilización de proteínas que posteriormente son secretadas ^[94], tanto al periplasma como al medio celular de crecimiento de la bacteria. Diversos autores han ideado métodos que van a suprimir la formación de cuerpos de inclusión, y por tanto mejorar la tasa de producción de proteínas y de scFv, como por ejemplo realizar co-

transfecciones con vectores que expresen diversas chaperonas, que ayudan en el proceso de translocación de proteínas desde el citoplasma hacia el periplasma [95], realizar el proceso de producción de scFv a bajas temperaturas y a altas presiones [96], ya que ambos factores disminuirían el proceso de agregación de proteínas y por tanto estimulando la solubilización de ellas en el citoplasma. Otro método es utilizar marcadores anexos en el vector, como por ejemplo, la secuencia señal que expresa la proteína verde fluorescente [97], la cual se ha visto que estimula la expresión de proteínas hacia el periplasma.

Luego que se forman los cuerpos de inclusión, lo que se hace comúnmente es la solubilización de ellos a partir de agentes detergentes, como urea o guanidina. La que más se usa es la guanidina, ya que presenta mejores propiedades caotrópicas. Más aún, un aspecto del por qué no se utiliza mucho la urea es porque produce cianato, y este puede carbamoilar los grupos aminos de las proteínas, además un buen proceso de solubilización de proteínas por urea es pH dependiente y específico para cada proteína. Esto produce un trabajo más extenso, en comparación que al utilizar guanidina, y por el cual se obtuvieron buenos resultados en este trabajo, evidenciando una gran banda en la porción insoluble, luego de haber sido expuestas al reactivo de guanidina correspondiente al scFv anti-MICA, con un peso molecular de 32 kDa (**Figura 10**) [98].

Debido a que nuestro scFv anti-MICA proviene de una bacteria, hace obligatorio un proceso de purificación para eliminar cualquier contaminante que quede en él. En este caso se utilizó la cromatografía FPLC, la cual por mecanismos de afinidad entre el níquel que se encuentra en la columna *HisTrap HP* y la poli-histidina presente en el scFv anti-MICA, esta última es retenida en la columna y luego por medio de un mecanismo de competencia entre la histidina y el imidazol, el scFv es liberado. Entre una de las ventajas que tiene esta cromatografía es que además de poder purificar al compuesto en cuestión, también se puede concentrar desde volúmenes grandes, donde la proteína se encuentre muy diluida a volúmenes pequeños pero más sencillos de manipular [99]. Esto se vio con claridad en la fracción del periplasma, puesto que de un volumen inicial de 18 mL, se llegó a un volumen final funcional de 1,5 mL (cada elución era

de 500 μ L, y el scFv anti-MICA se concentró en tres de ellas, aunque la cantidad de scFv haya sido muy poca), lo opuesto se vio en la fracción insoluble (1,5 mL de volumen final, pero con una alta cantidad de scFv anti-MICA) (**Figuras 11 y 13, respectivamente**). Otra ventaja que presenta la FPLC es que se puede cuantificar la cantidad exacta que hay de proteína en una solución, acá es donde hubo una limitación grande al momento de cuantificar el scFv anti-MICA, puesto que para poder cuantificarlo se necesita de un estándar, atributo que no existe aún en el mercado aún, generando "un cuello de botella" en el proceso de elaboración del scFv anti-MICA. Lo único que se pudo realizar, fue una estimación de proteínas totales a través del método de Bradford (**Figura 14**).

Se esperaría que la fracción del periplasma del scFv anti-MICA presentara un mayor porcentaje de purificación, en comparación a la fracción insoluble ^[100], principalmente ya que, tanto en el periplasma, como también lo puede ser en el medio extracelular de la bacteria, las proteínas y en este caso el scFv anti-MICA estarían más limpios, es decir, sin restos bacterianos, los que podrían producir algún cambio en la respuesta funcional del scFv en producción.

6.3 Caracterización biológica del fragmento scFv anti-MICA

Las metodologías que se utilizaron para caracterizar biológicamente al scFv anti-MICA, fue a través de la determinación de su capacidad de unión a MICA recombinante (por medio de un ELISA), y su capacidad de unión a MICA nativa (mediante el uso de la citometría de flujo).

En el caso de la unión entre el scFv anti-MICA y MICA nativa (**Figura 15**), se vio una buena tendencia de que existe unión específica entre anticuerpo y antígeno, respectivamente, puesto que la fracción del scFv que se utilizó para realizar este ensayo es la del periplasma (que tendría que tener una mayor pureza en comparación a la fracción insoluble). Aunque la mejor manera de comparar la unión específica con un control negativo, es que hubiesen habido varios scFv contra distintas proteínas irrelevantes, para descartar todo tipo de uniones inespecíficas, y por lo tanto asegurar unión netamente entre scFv anti-MICA a

MICA recombinante. También haber hecho ensayos de competencia entre MICA en fase sólida y en solución.

Aunque los datos obtenidos a través del ELISA son buenos, para caracterizar aún mejor la unión entre un scFv y su antígeno, es mediante otra técnica, la cual se denomina Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR), la cual determina cambios específicos en el índice de refracción que ocurre en una interfase, provocada por una superficie química donde queda inmortalizado el antígeno (en este caso MICA recombinante) ^[101], y por la cual se deja pasar el scFv anti-MICA en solución. Cabe mencionar que para poder utilizar esta técnica se necesita que ambos componentes estén 100% puros y con una alta concentración, parámetros que hay que mejorar en la producción tanto de MICA, como del scFv anti-MICA.

SPR puede directamente medir el grado de unión de un anticuerpo a su antígeno (K_{on}) y el grado en el cual el complejo antígeno/anticuerpo se forma (K_{off}). La afinidad de un antígeno a menudo es expresada como una constante de disociación (K_d), la cual se entiende como la concentración molar de un anticuerpo a la cual, la mitad del total de antígeno presente en la solución está unido al anticuerpo, calculado como la razón entre K_{off}/K_{on} . En muchos casos se ha visto que la unión que presentan los scFvs a su antígeno, es más débil que la unión que presenta su anticuerpo completo respectivo; esto se debe a que un scFv tiene sólo una región Fv de unión al antígeno, en cambio el anticuerpo completo presenta dos regiones Fv ^[93], por ello posee una afinidad funcional o también llamada avididad mayor.

Con respecto a la unión que presente el scFv anti-MICA a MICA nativa de dos líneas celulares de CG (AGS y MKN-45, **figuras 16 y 17** respectivamente), se demostró que hay interacción entre ambos compuestos, aunque muy poca, teniendo en cuenta los MFI de las condiciones scFv anti-MICA más hemaglutinina (líneas de color morado en los histogramas de ambas figuras anteriormente señaladas), lo cual se puede deber a tres efectos principalmente: primero, a que se está expresando en poca cantidad la proteína MICA en la superficie de ambas líneas celulares (menos en la línea MKN-45 que en la línea AGS), provocado a lo

mejor por una alta cantidad de pasajes a las cuales se hayan sometido las células utilizando tripsina, segundo, a que el scFv que se expresó y que se está utilizando tenga una afinidad muy baja por la proteína MICA, y tercero a que se está viendo a una porción de un anticuerpo (sólo las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras). En este sentido en ambas figuras, utilizando un anticuerpo comercial anti-MICA, se puede ver que tanto MKN-45 como AGS tienen baja concentración de MICA en sus superficies.

Las estrategias que se pueden utilizar para mejorar la unión entre el scFv anti-MICA a MICA nativa son variadas y se pueden esquematizar según el problema apreciado: para aumentar la expresión de MICA en la membrana celular de las líneas celulares MKN-45 y AGS se pueden utilizar agentes que produzcan estrés celular, como por ejemplo ácido valproico o dejar expuesta las células a luz UV por un tiempo determinado ^[102]. Para poder aumentar la afinidad del scFv hacia MICA existen técnicas que involucran la biología molecular, por ejemplo maduración de la afinidad a través de mutaciones dirigidas por PCR en el CDR3 principalmente ^[103], que es la zona del epítipo del anticuerpo que se une al parátipo del antígeno y por último a partir del punto anterior generar un anticuerpo monoclonal completo humanizado, que efectúe una unión dirigida a la proteína MICA sin generar una respuesta inmunogénica que pueda ser fatal al ser humano, y así desarrollar un anticuerpo humanizado con una alta eficacia, potencia y seguridad.

Con respecto a la unión que tienen los scFv-Fagos anti-MICA a la proteína nativa en la línea celular MKN-45 (**Figura 18**), se vieron dos cosas principalmente, una de ellas, es que la partícula fágica está interponiéndose entre la unión de la molécula del scFv a la proteína MICA, y lo otro, es el bajo porcentaje de células positivas de acuerdo a la población sin marca, lo que se podría mejorar aumentando la cantidad de fagos para detectar a la proteína MICA, cabe mencionar también que el problema podría deberse a la poca afinidad que tenga el scFv-Fagos anti-MICA a MICA nativa, como se vio en las **figuras 16 y 17**.

Se ha determinado que las *células NK* son células efectoras importantes que tiene el cuerpo humano como primera línea de defensa contra los tumores en

general. El receptor de activación NKG2D juega un papel crítico en la eliminación de las células tumorales por células citolíticas, como son las *células NK* y linfocitos T CD8⁺. Se ha demostrado que la eficiencia que tienen estos receptores frente a la inmunidad antitumoral juega un papel crítico en la superficie de las células tumorales. Por lo tanto, una fina regulación de la expresión de los ligandos del receptor NKG2D es importante para la inmunoedición contra el cáncer [104] y la evasión inmune [105], es por esto que el objetivo general de este trabajo es realizar estudios pre-clínicos de un posible biofármaco dirigido a uno de estos ligandos, específicamente MICA, en su forma de anticuerpo monocatenario (scFv anti-MICA). El impacto que tendría el desarrollo de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-MICA a nivel de salud pública, es que no se restringiría su uso como tratamiento contra el cáncer gástrico, sino que este ligando además se ha detectado en varios carcinomas, tales como de pulmón, mama, ovario, próstata y cáncer de colon, y por consiguiente, ha sido considerado como un antígeno asociado a tumores [53, 56, 57].

Para poder llegar a la idea de generar un anticuerpo contra la proteína MICA, se debe tener un conocimiento a cabalidad del complejo sistema que existe entre NKG2D-NKG2DL. Debido a que se ha demostrado que uno de los principales mecanismos que tienen los tumores para evadir la respuesta del sistema inmune mediada por NKG2D, es a través de la inducción sostenida de sus ligandos de forma soluble frente al receptor, lo que genera la internalización del receptor de activación de NKG2D y por tanto dejando sin funcionalidad citolíticas a las células que lo expresan (*células NK* y linfocitos T CD8⁺) [67, 68]. Así, la unión de scFv a MICA y revertir este efecto podría ser otro mecanismo de acción de esta molécula como futuro farmacóforo de un anticuerpo monoclonal terapéutico. Normalmente, los anticuerpos terapéuticos pueden unirse directamente a las células tumorales y al activarse las funciones efectoras de estos inducen la muerte celular, también se podría neutralizar a MICA soluble y dejar disponible NKG2D en los linfocitos citolíticos NK y T CD8⁺, para unirse a la célula tumoral y lisar estas últimas células.

Este nuevo mecanismo de inhibición no se pudo observar en este trabajo (**Figuras 19 y 20**), en donde de partida la expresión de los niveles de NKG2D no se disminuyó en presencia de MICA recombinante a una concentración de 400 ng/mL, siendo que hay estudios *in vitro* que han provocado una leve disminución de este receptor a una concentración de 100 ng/mL ^[49]. Esto se puede explicar principalmente a un error en la metodología, debido a que se vio que más del 50% de células se murieron cuando estaba presente el scFv anti-MICA (**Figura 21**). Esto generó resultados de manera inversa, ya que al haber menor cantidad de células que presentan el receptor NKG2D, menor va hacer el efecto que tengan estos frente a MICA soluble y menor será la frecuencia de verlos por citometría de flujo. Lo que quedó demostrado en este trabajo es que el principal componente que produjo la muerte celular fue el imidazol (**Figura 21**) a la concentración que se encuentra en el scFv anti-MICA, y el cual además, es de vital importancia para la elución de este mismo en la columna de la FPLC, es más, cada vez que se utilizan procesos de purificación en los cuales se usa imidazol, la solución resultante se dializa con el fin de poder eliminarlo ^[93, 95, 99].

El imidazol es un compuesto orgánico que está presente en muchos fármacos como estructura principal, algunos ejemplos de ellos son antifúngicos y antineoplásicos ^[106], los cuales de por sí son citotóxicos al ser agentes externos a las células presentes en el organismo, como se pudo ver en este trabajo en las *células NK* y linfocitos T CD8⁺ (**Figuras 19 y 20, respectivamente**); aunque también no se debe dejar de lado que la solución en la cual se encuentra el scFv tenga algún resto bacteriano, como LPS o cualquier otro componente, el cual está descrito que es un factor de virulencia de bacterias ^[107] y aumenta la expresión de NKG2D. En el laboratorio se ha observado la disminución de NKG2D en células citolíticas tratadas con suero de paciente y con MICB recombinante.

Debido al por qué se eligió como ligando de NKG2D a MICA, es porque existen estudios que demuestran que pacientes con cáncer gástrico presentan altas concentraciones de MICA soluble, lo que provoca una reducción en los niveles de expresión del receptor de activación NKG2D en *células NK* y linfocitos T CD8⁺ ^[49] y por tanto un mayor crecimiento tumoral por mecanismo de evasión.

Aunque hay que tener presente que además de MICA soluble, en los sueros de pacientes se ha visto que también hay otros ligandos de NKG2D en su forma soluble, tales como MICB y ULBP1-3 [57, 108], los cuales por mecanismos sinérgicos pueden estar provocando esta disminución del receptor de activación NKG2D. Notablemente, sin embargo, este impacto funcional de los NKG2DL no siempre se ha observado [109] (como también se pudo ver en este trabajo). Por ejemplo, el suero proveniente de ratones transgénicos a MICA, los cuales contienen altos niveles de sMICA, tienen sólo un efecto marginal en la expresión de NKG2D en la superficie de *células NK* no transgénicas [110].

En algunos estudios, el rol de los NKG2DLs fue examinado a través de su inhibición utilizando anticuerpo anti-MIC [111] o proteínas fusionadas de NKG2D-Fc [112]. Estos estudios sugirieron una correlación entre altos niveles de ligandos de NKG2D solubles en tumores específicos de pacientes y una reducción de la respuesta inmune dependiente de NKG2D. Además, se encontraron que los sueros de pacientes de estos tumores presentan adicionalmente factores inmunosupresivos, como por ejemplo TGF- β [63], el cual se ha reportado que produce una "down-regulation" de NKG2D. Otro punto que hay que tener en consideración, es que además de que los ligandos de NKG2D provengan principalmente por un "shedding" de las células tumorales provocados por ellas mismas, se ha reportado que algunos ligandos son liberados por exosomas, los cuales van actuar conjunto a los otros para impactar en la respuesta inmune de las *células NK* y linfocitos T CD8⁺ [113].

Estos últimos antecedentes hay que tenerlos en consideración para futuros estudios, es más, existe la posibilidad de que se pudiesen desarrollar anticuerpos bi-funcionales, es decir, dirigidos a dos ligandos del receptor de NKG2D, lo que aumentaría el espectro de utilización como biofármaco antineoplásico y por tanto se mejorarían las respuestas de las células citolíticas frente a las células tumorales.

CONCLUSIONES

1. La generación de la proteína MICA recombinante fue 4 veces superior cuando se co-transfectó con el factor de transcripción XBP1s.
2. El scFv anti-MICA se expresó principalmente en la fracción insoluble (denominada cuerpos de inclusión) de las bacterias *E. coli* cepas HB2151.
3. ScFv anti-MICA se une a MICA recombinante producida en el laboratorio y a MICA nativa de dos líneas celulares de cáncer gástrico.
4. No se pudo responder la hipótesis ya que por problemas metodológicos no se observó la disminución de la expresión de NKG2D en *células NK* y linfocitos T CD8⁺.
5. El imidazol fue el responsable de la muerte celular de las *células NK* y linfocitos T CD8⁺, pudiendo provocar los resultados inesperados.
6. Debido a estos últimos inconvenientes, lo más probable, que para realizar futuros ensayos funcionales sea necesario cambiar el sistema de expresión y protocolo de purificación de las proteínas.

REFERENCIAS

1. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
2. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., Thompson, C. B. (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism* 7, 11-20.
3. Smyth, M. J., Dunn, G. P., Schreiber, R. D. (2006) Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in Immunology* 90, 1-50.
4. Itriago, L., Silva, N., Cortes, G. (2013) Epidemiology of Cancer in Chile and worldwide: present and future. *Rev. Med. Clin. Condes.* 24, 531-552.
5. Bornschein, J., Rokkas, T., Selgrad, M., Malfertheiner, P. (2011) Gastric cancer: clinical aspects, epidemiology and molecular background. *Helicobacter* 16 Suppl 1, 45-52.
6. Gonzalez, C. A., Lujan-Barroso, L., Bueno-de-Mesquita, H. B., Jenab, M., Duell, E. J., Agudo, A., Tjonneland, A., Boutron-Ruault, M. C., Clavel-Chapelon, F., Touillaud, M., Teucher, B., Kaaks, R., Boeing, H., Steffen, A., Trichopoulou, A., Roukos, D., Karapetyan, T., Palli, D., Tagliabue, G., Mattiello, A., Tumino, R., Ricceri, F., Siersema, P. D., Numans, M. E., Peeters, P. P., Parr, C. L., Skeie, G., Lund, E., Quiros, J. R., Sanchez-Cantalejo, E., Navarro, C., Barricarte, A., Dorronsoro, M., Ehrnstrom, R., Regner, S., Khaw, K. T., Wareham, N., Key, T. J., Crowe, F. L., Blaker, H., Romieu, I., Riboli, E. (2012) Fruit and vegetable intake and the risk of gastric adenocarcinoma: a reanalysis of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study after a longer follow-up. *International Journal of Cancer.* 131, 2910-2919.
7. Mayne, S. T., Risch, H. A., Dubrow, R., Chow, W. H., Gammon, M. D., Vaughan, T. L., Farrow, D. C., Schoenberg, J. B., Stanford, J. L., Ahsan, H., West, A. B., Rotterdam, H., Blot, W. J., Fraumeni, J. F., Jr. (2001) Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 10, 1055-1062.
8. Nagel, G., Linseisen, J., Boshuizen, H. C., Pera, G., Del Giudice, G., Westert, G. P., Bueno-de-Mesquita, H. B., Allen, N. E., Key, T. J., Numans, M. E., Peeters, P. H., Sieri, S., Siman, H., Berglund, G., Hallmans, G., Stenling, R., Martinez, C., Arriola, L., Barricarte, A., Chirlaque, M. D., Quiros, J. R., Vineis, P., Masala, G., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Bingham, S., Boeing, H., Bergmann, M. M., Overvad, K., Boutron-Ruault, M. C., Clavel-Chapelon, F., Olsen, A., Tjonneland, A., Trichopoulou, A., Bamia, C., Soukara, S., Sabourin, J. C., Carneiro, F., Slimani, N., Jenab, M., Norat, T., Riboli, E., Gonzalez, C. A. (2007) Socioeconomic position and the risk of gastric and oesophageal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *International Journal of Epidemiology* 36, 66-76.

9. Ye, W., Held, M., Lagergren, J., Engstrand, L., Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Nyrén, O. (2004) Helicobacter pylori infection and gastric atrophy: risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 388-396.
10. Arkenau, H. T. (2009) Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 135, 855-866.
11. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61, 69-90.
12. Lee, K., Caceres, D., Varela, N., Csendes, D. A., Rios, R. H., Quinones, S. L. (2006) Allelic variants of cytochrome P4501A1 (CYP1A1), glutathione S transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and their association with smoking and alcohol consumption as gastric cancer susceptibility biomarkers. *Revista Médica de Chile* 134, 1107-1115.
13. Medina, E., Kaempffer, A. M. (2001) Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations. *Revista Médica de Chile* 129, 1195-1202.
14. Noffsinger, A., Waxman, I. (2007) Preinvasive neoplasia in the stomach: diagnosis and treatment. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 5, 1018-1023.
15. Lazar, D., Taban, S., Sporea, I., Dema, A., Cornianu, M., Lazar, E., Goldis, A., Vernic, C. (2009) Gastric cancer: correlation between clinicopathological factors and survival of patients (III). *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 50, 369-379.
16. Ku, G. Y., Ilson, D. H. (2014) Management of gastric cancer. *Current Opinion in Gastroenterology*. 30, 596-602.
17. Sanford, M. (2013) Trastuzumab: a review of its use in HER2-positive advanced gastric cancer. *Drugs* 73, 1605-1615.
18. Dicken, B. J., Bigam, D. L., Cass, C., Mackey, J. R., Joy, A. A., Hamilton, S. M. (2005) Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Annals of Surgery* 241, 27-39.
19. Fuchs, C. S., Tomasek, J., Yong, C. J., Dumitru, F., Passalacqua, R., Goswami, C., Safran, H., dos Santos, L. V., Aprile, G., Ferry, D. R., Melichar, B., Tehfe, M., Topuzov, E., Zalcborg, J. R., Chau, I., Campbell, W., Sivanandan, C., Pikiel, J., Koshiji, M., Hsu, Y., Liepa, A. M., Gao, L., Schwartz, J. D., Tabernero, J., Investigators, R. T. (2014) Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 383, 31-39.

20. Wilke, H., Muro, K., Van Cutsem, E., Oh, S. C., Bodoky, G., Shimada, Y., Hironaka, S., Sugimoto, N., Lipatov, O., Kim, T. Y., Cunningham, D., Rougier, P., Komatsu, Y., Ajani, J., Emig, M., Carlesi, R., Ferry, D., Chandrawansa, K., Schwartz, J. D., Ohtsu, A., for the, R. S. G. (2014) Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. 15, 1224-1235.
21. Satoh, T., Lee, K. H., Rha, S. Y., Sasaki, Y., Park, S. H., Komatsu, Y., Yasui, H., Kim, T. Y., Yamaguchi, K., Fuse, N., Yamada, Y., Ura, T., Kim, S. Y., Munakata, M., Saitoh, S., Nishio, K., Morita, S., Yamamoto, E., Zhang, Q., Kim, J. M., Kim, Y. H., Sakata, Y. (2014) Randomized phase II trial of nimotuzumab plus irinotecan versus irinotecan alone as second-line therapy for patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 24, 31-40.
22. Zhang, C., Li, G., Fan, C., Xu, J., Cao, J., Liu, S., Li, N. (2012) Comparison of efficacy of different route of administration of chemotherapy on unresectable, advanced gastric cancer. *World Journal of Surgical Oncology* 10, 162-169.
23. Kozlowski, S., Woodcock, J., Midthun, K., Sherman, R. B. (2011) Developing the nation's biosimilars program. *The New England Journal of Medicine* 365, 385-388.
24. Aguillon, J. C. and Molina, M. C. (2013) Manual de laboratorio para la generación de anticuerpos recombinantes y sus aplicaciones terapéuticas 1, 33-49.
25. Hong, K. W., Kim, C. G., Lee, S. H., Chang, K. H., Shin, Y. W., Ryoo, K. H., Kim, S. H., Kim, Y. S. (2010) A novel anti-EGFR monoclonal antibody inhibiting tumor cell growth by recognizing different epitopes from cetuximab. *Journal of Biotechnology* 145, 84-91.
26. Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S., Arteaga, C. L. (2002) Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Research* 62, 4132-4141.
27. Ferrara, N., Hillan, K. J., Novotny, W. (2005) Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333, 328-335.
28. Carlson, B. A., Dubay, M. M., Sausville, E. A., Brizuela, L., Worland, P. J. (1996) Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Research* 56, 2973-2978.
29. Ling, Y. H., Liebes, L., Ng, B., Buckley, M., Elliott, P. J., Adams, J., Jiang, J. D., Muggia, F. M., Perez-Soler, R. (2002) PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 841-849.
30. Gabelloni, P., Da Pozzo, E., Bendinelli, S., Costa, B., Nuti, E., Casalini, F., Orlandini, E., Da Settimo, F., Rossello, A., Martini, C. (2010) Inhibition of

metalloproteinases derived from tumours: new insights in the treatment of human glioblastoma. *Neuroscience* 168, 514-522.

31. Yano, H., Thakur, A., Tomaszewski, E. N., Choi, M., Deol, A., Lum, L. G. (2014) Ipilimumab augments antitumor activity of bispecific antibody-armed T cells. *Journal of Translational Medicine* 12, 191-201.
32. Dunn, G. P., Old, L. J., Schreiber, R. D. (2004) The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 22, 329-360.
33. O'Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C. M., Arthur, C., White, J. M., Uppaluri, R., Andrews, D. M., Ngiow, S. F., Teng, M. W., Smyth, M. J., Schreiber, R. D., Bui, J. D. (2012) Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 1869-1882.
34. Zwirner, N. W., Furtjes, M. B., Girart, M. V., Domaica, C. I., Rossi, L. E. (2007) Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18, 159-170.
35. Kalbasi, A., June, C. H., Haas, N., Vapiwala, N. (2013) Radiation and immunotherapy: a synergistic combination. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 2756-2763.
36. Farag, S. S., Caligiuri, M. A. (2006) Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews* 20, 123-137.
37. Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 22, 633-640.
38. Lanier, L. L. (2005) NK cell recognition. *Annual Review of Immunology* 23, 225-274.
39. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S. (2008) Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* 9, 503-510.
40. Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., Long, E. O. (2006) Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunological Reviews* 214, 73-91.
41. Long, E. O. (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annual Review of Immunology* 17, 875-904.
42. Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R., Moretta, L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology* 19, 197-223.
43. Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., Bach, F. H. (1991) DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* 173, 1017-1020.

44. Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L., Phillips, J. H. (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-732.
45. Garrity, D., Call, M. E., Feng, J., Wucherpfennig, K. W. (2005) The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7641-7646.
46. Wu, J., Cherwinski, H., Spies, T., Phillips, J. H., Lanier, L. L. (2000) DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 1059-1068.
47. Horng, T., Bezbradica, J. S., Medzhitov, R. (2007) NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nature Immunology* 8, 1345-1352.
48. Burgess, S. J., Marusina, A. I., Pathmanathan, I., Borrego, F., Coligan, J. E. (2006) IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *Journal of Immunology* 176, 1490-1497.
49. Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhou, Z., Zhang, J., Tian, Z. (2008) Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Human Immunology* 69, 490-500.
50. Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T. (2002) Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734-738.
51. Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D. E., Spies, T. (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6259-6263.
52. Radosavljevic, M., Cuillerier, B., Wilson, M. J., Clement, O., Wicker, S., Gilfillan, S., Beck, S., Trowsdale, J., Bahram, S. (2002) A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* 79, 114-123.
53. Ullrich, E., Koch, J., Cerwenka, A., Steinle, A. (2013) New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology. *Oncoimmunology* 2, 10-18.
54. Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., Cosman, D. (2001) The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. *Immunological Reviews* 181, 185-192.
55. Schrambach, S., Ardizzone, M., Leymarie, V., Sibilias, J., Bahram, S. (2007) In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS one* 2, 518-528.
56. Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., Spies, T. (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12445-12450.

57. Mistry, A. R. and O'Callaghan, C. A. (2007) Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 121, 439-447.
58. Fernandez-Messina, L., Ashiru, O., Boutet, P., Aguera-Gonzalez, S., Skepper, J. N., Reyburn, H. T., Vales-Gomez, M. (2010) Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 8543-8551.
59. Stagg, J. and Smyth, M. J. (2007) NK cell-based cancer immunotherapy. *Drug News & Perspectives* 20, 155-163.
60. Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., Spies, T. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
61. Cerwenka, A. and Lanier, L. L. (2001) Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews: Immunology* 1, 41-49.
62. Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblauch, S., Cado, D., Greenberg, N. M., Raulet, D. H. (2008) NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28, 571-580.
63. Sers, C., Kuner, R., Falk, C. S., Lund, P., Sueltmann, H., Braun, M., Buness, A., Ruschhaupt, M., Conrad, J., Mang-Fatehi, S., Stelnic, I., Krapfenbauer, U., Poustka, A., Schafer, R. (2009) Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *International journal of cancer* 125, 1626-1639.
64. Eisele, G., Wischhusen, J., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Waldhauer, I., Steinle, A., Weller, M., Friese, M. A. (2006) TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain: A Journal of Neurology* 129, 2416-2425.
65. Serrano, A. E., Menares-Castillo, E., Garrido-Tapia, M., Ribeiro, C. H., Hernandez, C. J., Mendoza-Naranjo, A., Gatica-Andrades, M., Valenzuela-Diaz, R., Zuniga, R., Lopez, M. N., Salazar-Onfray, F., Aguillon, J. C., Molina, M. C. (2011) Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunology and Cell Biology* 89, 447-457.
66. Tamaki, S., Kawakami, M., Yamanaka, Y., Shimomura, H., Imai, Y., Ishida, J., Yamamoto, K., Ishitani, A., Hatake, K., Kirita, T. (2009) Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clinical Immunology* 130, 331-337.
67. Salih, H. R., Holdenrieder, S., Steinle, A. (2008) Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13, 3448-3456.
68. Raffaghello, L., Prigione, I., Airoldi, I., Camoriano, M., Levreri, I., Gambini, C., Pende, D., Steinle, A., Ferrone, S., Pistoia, V. (2004) Downregulation and/or

- release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 6, 558-568.
69. Oppenheim, D. E., Roberts, S. J., Clarke, S. L., Filler, R., Lewis, J. M., Tigelaar, R. E., Girardi, M., Hayday, A. C. (2005) Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nature Immunology* 6, 928-937.
 70. Saito, H., Osaki, T., Ikeguchi, M. (2012) Decreased NKG2D expression on NK cells correlates with impaired NK cell function in patients with gastric cancer. *Gastric cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 15, 27-33.
 71. Vitale, M., Cantoni, C., Pietra, G., Mingari, M. C., Moretta, L. (2014) Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *European Journal of Immunology* 44, 1582-1592.
 72. Sotelo, P., Collazo, N., Zuniga, R., Gutierrez-Gonzalez, M., Catalan, D., Ribeiro, C. H., Aguillon, J. C., Molina, M. C. (2012) An efficient method for variable region assembly in the construction of scFv phage display libraries using independent strand amplification. *mAbs* 4, 542-550.
 73. Kramer, I. (2008) Pharmacy and pharmacology of biosimilars. *Journal of Endocrinological Investigation* 31, 479-488.
 74. Crommelin, D., Bermejo, T., Bissig, M., Damiaans, J., Kramer, I., Rambourg, P., Scroccaro, G., Strukelj, B., Tredree, R., Ronco, C. (2005) Biosimilars, generic versions of the first generation of therapeutic proteins: do they exist? *Contributions to Nephrology* 149, 287-294.
 75. Godbey, W. T., Wu, K. K., Mikos, A. G. (1999) Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 60, 149-160.
 76. Aricescu, A. R., Lu, W., Jones, E. Y. (2006) A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 62, 1243-1250.
 77. He, Y., Sun, S., Sha, H., Liu, Z., Yang, L., Xue, Z., Chen, H., Qi, L. (2010) Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expression* 15, 13-25.
 78. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 79. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
 80. Spector, T. (1978) Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Analytical Biochemistry* 86, 142-146.

81. Thomas, P., Smart, T. G. (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51, 187-200.
82. Hanzlikova, M., Ruponen, M., Galli, E., Raasmaja, A., Aseyev, V., Tenhu, H., Urtti, A., Yliperttula, M. (2011) Mechanisms of polyethylenimine-mediated DNA delivery: free carrier helps to overcome the barrier of cell-surface glycosaminoglycans. *The Journal of Gene Medicine* 13, 402-409.
83. Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., Gopferich, A. (2005) Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60, 247-266.
84. Grandinetti, G., Ingle, N. P., Reineke, T. M. (2011) Interaction of poly(ethylenimine)-DNA polyplexes with mitochondria: implications for a mechanism of cytotoxicity. *Molecular Pharmaceutics* 8, 1709-1719.
85. Ku, S. C., Toh, P. C., Lee, Y. Y., Chusainow, J., Yap, M. G., Chao, S. H. (2010) Regulation of XBP-1 signaling during transient and stable recombinant protein production in CHO cells. *Biotechnology Progress* 26, 517-526.
86. Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 13, 89-102.
87. Ku, S. C., Ng, D. T., Yap, M. G., Chao, S. H. (2008) Effects of overexpression of X-box binding protein 1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering* 99, 155-164.
88. Dietmair, S., Hodson, M. P., Quek, L. E., Timmins, N. E., Gray, P., Nielsen, L. K. (2012) A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells. *PLoS one* 7, 43394-43407.
89. Wang, S. (2011) Advances in the production of human monoclonal antibodies. *Antibody Technology Journal*. 1, 1-4.
90. Wiley, J. (2002) Phage Display of Single-Chain Antibody Constructs. *Current Protocols in Immunology* 1, 10.19B.11-10.19B.31.
91. Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M., Schlom, J. (1992) Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Research* 52, 3402-3408.
92. Little, M., Kipriyanov, S. M., Le Gall, F., Moldenhauer, G. (2000) Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunology Today* 21, 364-370.
93. Drees, J. J., Augustin, L. B., Mertensotto, M. J., Schottel, J. L., Leonard, A. S., Saltzman, D. A. (2014) Soluble production of a biologically active single-chain antibody against murine PD-L1 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 94, 60-66.
94. Carrio, M. M. and Villaverde, A. (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of Biotechnology* 96, 3-12.

95. Wang, S., Tan, A., Lv, J., Wang, P., Yin, X., Chen, Y. (2012) Soluble expression of recombinant human CD137 ligand in *Escherichia coli* by co-expression of chaperones. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39, 471-476.
96. Hust, M., Steinwand, M., Al-Halabi, L., Helmsing, S., Schirrmann, T., Dubel, S. (2009) Improved microtitre plate production of single chain Fv fragments in *Escherichia coli*. *New Biotechnology* 25, 424-428.
97. Coutard, B., Gagnaire, M., Guilhon, A. A., Berro, M., Canaan, S., Bignon, C. (2008) Green fluorescent protein and factorial approach: an effective partnership for screening the soluble expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 61, 184-190.
98. Vallejo, L. F., Rinas, U. (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories* 3, 11-23.
99. Young, C. L., Britton, Z. T., Robinson, A. S. (2012) Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal* 7, 620-634.
100. Wang, H., Liu, X., He, Y., Dong, J., Sun, Y., Liang, Y., Yang, J., Lei, H., Shen, Y., Xu, X. (2010) Expression and purification of an anti-clenbuterol single chain Fv antibody in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 72, 26-31.
101. Thillaivinayagalingam, P., Gommeaux, J., McLoughlin, M., Collins, D., Newcombe, A. R. (2010) Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878, 149-153.
102. Yang, F., Shao, Y., Yang, F., Liu, M., Huang, J., Zhu, K., Guo, C., Luo, J., Li, W., Yang, B., Shi, J., Zheng, J. (2013) Valproic acid upregulates NKG2D ligand expression and enhances susceptibility of human renal carcinoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity. *Archives of Medical Science* 9, 323-331.
103. Chang, K. H., Kim, M. S., Hong, G. W., Seo, M. S., Shin, Y. N., Kim, S. H. (2012) Affinity Maturation of an Epidermal Growth Factor Receptor Targeting Human Monoclonal Antibody ER414 by CDR Mutation. *Immune Network* 12, 155-164.
104. Hayakawa, Y., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Darcy, P. K., Diefenbach, A., Raulet, D., Smyth, M. J. (2002) Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *Journal of Immunology* 169, 5377-5381.
105. El-Gazzar, A., Groh, V., Spies, T. (2013) Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *Journal of Immunology* 191, 1509-1515.
106. Yang, F., Nickols, N. G., Li, B. C., Marinov, G. K., Said, J. W., Dervan, P. B. (2013) Antitumor activity of a pyrrole-imidazole polyamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1863-1868.

107. Silke, J. and Hartland, E. L. (2013) Masters, marionettes and modulators: intersection of pathogen virulence factors and mammalian death receptor signaling. *Current Opinion in Immunology* 25, 436-440.
108. Song, H., Kim, J., Cosman, D., Choi, I. (2006) Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cellular Immunology* 239, 22-30.
109. von Lilienfeld-Toal, M., Frank, S., Leyendecker, C., Feyler, S., Jarmin, S., Morgan, R., Glasmacher, A., Marten, A., Schmidt-Wolf, I. G., Brossart, P., Cook, G. (2010) Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 59, 829-839.
110. Wiemann, K., Mittrucker, H. W., Feger, U., Welte, S. A., Yokoyama, W. M., Spies, T., Rammensee, H. G., Steinle, A. (2005) Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *Journal of Immunology* 175, 720-729.
111. Wang, H., Yang, D., Xu, W., Wang, Y., Ruan, Z., Zhao, T., Han, J., Wu, Y. (2008) Tumor-derived soluble MICs impair CD3(+)CD56(+) NKT-like cell cytotoxicity in cancer patients. *Immunology Letters* 120, 65-71.
112. Hilpert, J., Grosse-Hovest, L., Grunebach, F., Buechele, C., Nuebling, T., Raum, T., Steinle, A., Salih, H. R. (2012) Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *Journal of Immunology* 189, 1360-1371.
113. Lee, J. C., Lee, K. M., Kim, D. W., Heo, D. S. (2004) Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *Journal of Immunology* 172, 7335-7340.