

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***SELECCIÓN DE UNA PARTÍCULA VIRAL PORTADORA DE UN
SCFV DIRIGIDO CONTRA EL DOMINIO $\alpha 2$ DE MICA, PARA EL
BLOQUEO DE LA UNIÓN DE MICA CON NKG2D***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Bioquímica de Proteínas y Biotecnología por:**

JOSE ALEJANDRO RODRIGUEZ SIZA

Directora de Tesis: Dra. María Carmen Molina Sampayo

Santiago-CHILE

Agosto 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

JOSE AELJANDRO RODRIGUEZ SIZA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica de Proteínas y Biotecnología, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

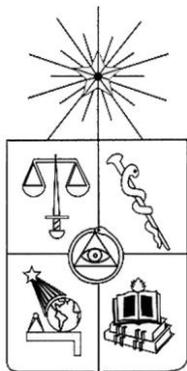
Dra. María Carmen Molina Sampayo _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Javier Puente Piccardo _____

Dr. Dante Mirando Wilson _____

Dra. María Inés Becker _____



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

SELECCIÓN DE UNA PARTÍCULA VIRAL
PORTADORA DE UN SCFV DIRIGIDO CONTRA EL
DOMINIO $\alpha 2$ DE MICA, PARA EL BLOQUEO DE LA
UNIÓN DE MICA CON NKG2D

Tesis de grado para optar por título de Magister en Bioquímica
Especialidad Bioquímica de Proteínas y Biotecnología

JOSE ALEJANDRO RODRIGUEZ SIZA

Dirigido por la Dra. María Carmen Molina Sampayo

Santiago, Chile

2020

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. MARCO TEÓRICO.....	8
1.1. MICA y NKG2D.....	8
1.2. Modelo de Unión.....	9
1.3. MICA y la respuesta inmune anti tumoral.....	11
1.4. Anticuerpos monoclonales humanos.....	14
1.5. Formato de scFv.....	17
1.6. Librería de anticuerpos.....	20
1.7. Exposición de Fagos.....	26
1.8. Anticuerpos terapéuticos completamente humanos desarrollados a partir de biblioteca de fagos.	31
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1. Soluciones, buffer y medios de cultivo.....	34
2.1.1. PBS 1X.....	34
2.1.2. TBE 1X.....	34
2.1.3. Buffer para preparar bacterias quimiocompetentes.....	34
2.1.4. Buffer de lisis.....	35
2.1.5. Buffer de lavado.....	35
2.1.6. Buffer de denaturación.....	36
2.1.7. Buffer de elución.....	36
2.1.8. Gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico al 15%.....	36
2.1.9. Buffer de corrida.....	37
2.1.10. TBS.....	37
2.1.11. Medio SOC.....	37
2.1.12. Caldo LB y LB agar.....	38
2.1.13. Caldo 2xYT.....	38
2.1.14. Caldo SB.....	39
2.2. Metodología.....	39
2.2.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	39
2.2.2. Extracción de ARN total.....	40
2.2.3. Síntesis de ADNc.....	41
2.2.4. Diseño de partidores para amplificar el exón 3 de MICA*002:01 y el diseño <i>in silico</i> del dominio $\alpha 2$	42
2.2.5. Amplificación por reacción en cadena de polimerasa.....	45
2.2.5.1. Amplificación de regiones variables de cadenas pesadas y livianas	45
2.2.5.2. Amplificación de Exón 3 de MICA*002.....	48
2.2.5.3. PCR de colonia.....	49

2.2.6. Unión de regiones variables por ISA-PCR.....	50
2.2.7. Digestión con enzimas de restricción.....	53
2.2.7.1. Digestión con <i>EcoRI</i> y <i>NheI</i>	53
2.2.7.2. Digestión con <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	54
2.2.8. Ligación de ADN a un plasmido.....	55
2.2.8.1. Inserción en vector pGEM-T®.....	55
2.2.8.2. Ligación al vector pUCH1 D1 y pUCH1 pIIIc.....	56
2.2.8.3. Ligación del Exón 3 de MICA a pET-JT.....	57
2.2.9. Purificación de ADN con glicógeno.....	58
2.2.10. Transformación de cepas de <i>E.coli</i> quimio competentes.....	58
2.2.11. Producción de proteína recombinante.....	60
2.2.12. Purificación de proteína recombinante.....	62
2.2.13. Cuantificación proteína por Bradford.....	64
2.2.14. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	64
2.2.15. Dot- Blot.....	66
2.2.16. ELISA.....	67
2.2.16.1. ELISA de detección Dominio $\alpha 2$	67
2.2.16.2. ELISA de fagos con scFv.....	69
2.2.16.3. ELISA de unión MICA-NKG2D.....	71
2.2.16.4. ELISA de desplazamiento MICA-NKG2D.....	73
2.2.7. Paneo de fagos.....	75
3. OBJETIVO ESPECÍFICO I.....	80
3.1. Resultados.....	80
3.2. Discusión.....	95
4. OBJETIVO ESPECÍFICO II.....	102
4.1. Resultados.....	102
4.2. Discusión.....	111
5. OBJETIVO ESPECÍFICO III.....	116
5.1. Resultados.....	116
5.2. Discusión.....	119
6. OBJETIVO ESPECÍFICO IV.....	124
6.1. Resultados.....	124
6.2. Discusión.....	128
CONCLUSIONES.....	135
BIBLIOGRAFIA.....	139

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Página
Figura 1	Modelo de unión MICA-NKG2D.....	11
Figura 2	Esquema de la estructura de un anticuerpo.....	16
Figura 3	Ciclo de paneo de una librería de exposición de fagos de scFv.....	30
Figura 4	Estructura del vector pET-JT1.....	43
Figura 5	Amplificación de regiones variables.....	82
Figura 6	Productos de reamplificación de VR.....	82
Figura 7	Estandarización condiciones para ISA-PCR.....	83
Figura 8	Resultados ISA-PCR con mezcla homogénea.....	84
Figura 9	Resultados ISA-PCR con mezcla homogénea de algunas muestras.....	84
Figura 10	Productos de ISA-PCR de una mezcla de muestras.....	87
Figura 11	PCR de colonia de clones pGEM-T®.....	89
Figura 12	Análisis de marco de lectura en pUCH1.....	91
Figura 13	Comparación de los sistemas de expresión de librería de scFv.....	91
Figura 14	Prueba de digestión con enzimas FastDigest (Thermo Fisher™).....	93
Figura 15	Modelo de cinta <i>in silico</i> de la estructura de MICA y el dominio $\alpha 2$	102
Figura 16	PCR de colonia Exón 3 en pET-JT.....	104
Figura 17	Comparación de secuencias de DNA clonado y MICA*002.....	105
Figura 18	Esquema de separación y purificación post producción.....	106
Figura 19	SDS-PAGE de los productos de la purificación y un Dot-Blot de los mismos.....	108
Figura 20	ELISA de reconocimiento dominio $\alpha 2$	108
Figura 21	Cromatografía de purificación dominio $\alpha 2$ y Evaluación por ELISA.....	110
Figura 22	Titulación de fagos obtenidos luego de cada ronda de paneo.....	117
Figura 23	Reconocimiento de clones de Fagos a distintas proteínas... ..	118
Figura 24	Curvas de reacción a diferentes concentraciones.....	119
Figura 25	Curva de comportamiento de la unión de NKG2D a MICA.....	125
Figura 26	Desplazamiento de NKG2D en la unión con MICA, usando un anticuerpo monoclonal recombinantes completamente humano anti- $\alpha 1$	125
Figura 27	Curva de comportamiento de la unión de NKG2D a MICA y al Dominio $\alpha 2$	126
Figura 28	Desplazamiento con scFv en Fagos.....	128

		Página
Tabla 1	Partidores utilizados para la amplificación de los genes que codifican las regiones variables.....	45
Tabla 2	Secuencias de Partidores para PCR de colonia.....	50
Tabla 3	Concentración de RNA total.....	80
Tabla 4	Concentraciones de ADN de la amplificación final de VR	83
Tabla 5	Concentración de ADN mezclado.....	85
Tabla 6	Concentraciones de genes de scFv finales.....	87
Tabla 7	Secuencia de los partidores diseñados para el subclonamiento del dominio $\alpha 2$	103

RESUMEN

En este trabajo se buscó seleccionar una partícula viral portadora de un scFv dirigido contra el dominio $\alpha 2$ de MICA, que bloquee la unión con NKG2D. Para ello se construyeron dos librerías de scFv de fagos a partir de secuencias de regiones variables humanas. Una de las librerías fue diseñada para evitar la replicación de proteínas truncadas, esto debido a la presencia de secuencias en la librería con marcos de lectura incorrectos. Por otra parte, se subclonó y produjo como proteína recombinante en *E.coli*, el dominio $\alpha 2$ de la proteína MICA. La proteína llegó a ser parcialmente purificada por una columna de Níquel y por FPLC, la cual mostró funcionalidad en la unión con NKG2D. Además, con las librerías formadas, se seleccionaron clones capaces de reconocer la molécula de MICA recombinante y la proteína dominio $\alpha 2$, verificando su funcionalidad hacia las mismas. También, se probó que es posible desplazar la unión de MICA con NKG2D, usando un anticuerpo monoclonal humano, dirigido contra el dominio $\alpha 1$ de MICA. Por último, se observó que los clones de los fagos seleccionados capaces de reconocer el dominio $\alpha 2$ de MICA, bloquean la unión de ésta molécula al receptor NKG2D.

INTRODUCCIÓN

La proteína NKG2D¹ es un receptor de activación, presente en la membrana de diferentes células del sistema inmune como lo son células NK² (1). Entre los ligandos de NKG2D, uno de los más estudiados es MICA³, el cual es una proteína transmembranal que se expresa bajo condiciones de estrés tales como shock térmico, alteraciones del ADN, infecciones o durante la oncogénesis (1). La forma de montura de NKG2D atraviesa plataforma de unión de MICA, donde cada monómero del receptor contacta principalmente cada dominio $\alpha 1$ o $\alpha 2$ (5). Mientras que cada una de las α hélices constituyen el elemento central de sitios de unión en MICA, las cadenas que hacen contacto con NKG2D son esencialmente complementarias y diferentes (5). Se ha observado que la proteína MICA se expresa en la mayoría de células tumorales y puede activar células de respuesta innata y adaptativa (6). El reconocimiento de la proteína MICA por parte de NKG2D juega un papel fundamental en la respuesta inmunológica contra el cáncer (6). A pesar de esto, se ha demostrado que los tumores pueden evadir la respuesta inmune

¹Del Inglés *Natural Killer Group 2, member D*.

²Del inglés *Natural Killer*.

³ Del inglés *MHC class I Chain-related gene A*.

gracias a la liberación y consecuente disminución de MICA en su superficie, mediante dos mecanismos principalmente observados: por corte proteolítico o por vesículas exosomales (7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13). Las moléculas liberadas compiten por el sitio de unión de NKG2D con las presentes en la membrana, además que pueden inducir la internalización y consecuente degradación del receptor NKG2D, disminuyendo los niveles de expresión en los linfocitos NK (14,15). El desarrollo de un anticuerpo que logre bloquear MICA desde sus dominios de unión, evitaría la interacción MICA liberado con NKG2D y reduciría la internalización del receptor. Aquí la inmunidad antitumoral será mediada por células NK a través del receptor CD16 que activa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o ADCC⁴ (17).

El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos ha inspirado primeramente por los enormes beneficios clínicos prometedores, ya que estos son usados en tratamientos anti inflamatorios, anti cancerígenos e inmunización pasiva, entre otros (21). Anticuerpos seleccionados de un repertorio completamente humano de scFv⁵, tienen múltiples aplicaciones, desde reactivos para ELISA, citometría, westernblot, mapeo de epítomos

⁴ Del inglés *Antibody Dependet Cellular Cytotoxicity*.

⁵ Del inglés *Single Chain Fration Variable*.

hasta terapia (24,25). Los scFv son formatos populares de anticuerpos recombinante, pues están diseñados como una cadena polipeptídica que compromete los dominios VH y VL unidos por un enlace (23, 24). La construcción de librerías de scFv a partir de genes con un reordenamiento natural, asegura la diversidad natural por ende un alto número de scFv funcionales (25). El método más común usado hasta ahora es basado en el trabajo pionero de George P. Smith, donde el genotipo y fenotipo de los oligopéptidos fueron enlazados por fusión al correspondiente gen para la proteína de la cápside III del bacteriofago M13 (21). Un anticuerpo específico expuesto por fagos en su superficie, puede ser aislado por la unión a un determinado ligando, de una colección de billones de diferentes anticuerpos expuestos (29), por una selección *in vitro* llamada “paneo” (21). En 2002, el primer anticuerpo completamente humano fue comercialmente aceptado. Adalimumab (Humira®) fue aislado usando exposición por fagos de anticuerpos (21).

En estudios previos en nuestro laboratorio, se seleccionó un scFv contra el dominio $\alpha 1$ de MICA, el cual mostró especificidad a MICA nativo presente en células de adenocarcinoma humano y a proteína recombinante. Si bien

esta molécula se une a un péptido que está presente en la unión de MICA con NKG2D, y que posee una constante de afinidad muy alta ($K_D \sim 14\text{nM}$, datos de laboratorio) en los primeros ensayos no se logró desplazar la unión. Esto podría deberse a que según el modelo de unión de NKG2D con MICA de McFarland y colaboradores del 2002 (5), el receptor es un homodímero que puede reconocer por igual ambos dominios de MICA, por lo que al bloquear sólo un dominio, el otro podría conservar la capacidad de unión a NKG2D. Con ello se estima que para lograr un completo desplazamiento de la unión entre las proteínas, podría ser necesario bloquear simultáneamente ambos dominios de MICA. Sin embargo la evidencia experimental no es suficiente para asegurarlo. Por lo que en este trabajo se propuso la selección de un anticuerpo dirigido hacia el dominio $\alpha 2$ que compruebe la siguiente **hipótesis:**

“Una partícula viral portadora de un scFv dirigido al dominio $\alpha 2$ de la proteína MICA, bloquea la unión de ésta a la proteína NKG2D, al igual que un anticuerpo anti dominio $\alpha 1$ ”

Con ésta hipótesis se planteó el **objetivo general** del trabajo:

“Seleccionar una partícula viral portadora de un scFv dirigido contra el dominio $\alpha 2$ de MICA que bloquee la unión de MICA con NKG2D”

Para cumplir el objetivo general se plantearon cuatro objetivos específicos como sigue:

- **Objetivo I:** Construir una librería de scFv de fagos con las regiones variables de inmunoglobulinas humana.
- **Objetivo II:** Subclonar y producir el dominio $\alpha 2$ de MICA de manera recombinante.
- **Objetivo III:** Seleccionar un scFv con la capacidad de unión al dominio $\alpha 2$ en MICA de una librería de Fagos.
- **Objetivo IV:** Probar la capacidad de desplazamiento de la partícula viral seleccionada y compararla con un anticuerpo recombinante.

La metodología usada para el cumplimiento del primer objetivo específico, fue seguida por lo publicado por Sotelo y colaboradores en el 2010, en la cual se construye una librería de scFv de fagos, a partir de secuencias humanas, uniendo las regiones variables por una reacción de cadena independiente. Además de ello, se construyeron dos librerías en simultáneo, en la cual una

posee la capacidad de discriminar secuencias de scFv que no poseen un marco de lectura correcta.

Para el segundo objetivo específico se siguió la metodología de producción de proteínas recombinantes por *E.coli*, publicado por Guterrez-Gonzales y colaboradores en el 2019 (55). Aquí se estandarizó la metodología de producción y purificación a través de una columna de Níquel. Sin embargo, también se usó la metodología de FPLC para mejorar la purificación.

Para el objetivo III, se usó una metodología de paneo estandarizada en el laboratorio basado en lo publicado por Burton en el 2001 (18), en la cual se realizó una selección de clones de fagos con scFv, por afinidad a un antígeno inmovilizado en placa. Además los clones seleccionados se evaluaron por inmuno-ensayos.

Por último, para el objetivo IV, se usó una metodología de inmuno-ensayo para observar el desplazamiento MICA en la unión con NKG2D, la cual al momento no se ha publicado, pero se encuentra estandarizada.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MICA y NKG2D

La proteína NKG2D⁶ es un receptor de activación, presente en la membrana de diferentes células del sistema inmune como lo son células NK⁷, linfocitos CD8⁺, linfocitos T $\gamma\delta$, entre otros; todos importantes en la respuesta inmunológica (1). La proteína es codificada por el gen *klrk1* localizado en el cromosoma 6. En humanos, la proteína se expresa de forma dimérica reclutando cuatro traductores de señal DAP10, que se asocian a la región citoplasmática de NKG2D a través de interacciones iónicas, formando un complejo hexamérico (2).

Entre los ligandos de NKG2D, uno de los más estudiados es MICA⁸, el cual es una proteína transmembranal que se expresa bajo condiciones de estrés tales como shock térmico, alteraciones del ADN, infecciones o durante la oncogénesis, pero no se expresa de manera normal en células sanas, con excepción de algunas células del epitelio gastrointestinal (1). Esta proteína se

⁶Del Inglés *Natural Killer Group 2, member D*.

⁷Del inglés *Natural Killer*.

⁸ Del inglés *MHC class I Chain-related gene A*.

encuentra codificada por el *locus* MICA que pertenece al complejo principal de histocompatibilidad, en el cromosoma 6p21.33, 46 kb dirección centromérica de HLA-B. Se ha demostrado que MICA es la proteína más polimórfica de la familia MCH⁹ clase I no clásica, pues se han descrito cerca de 108 alelos, que codifican para 87 variantes en humanos (1). La molécula posee tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), uno transmembranal (TM) y otro citoplasmático o de anclaje (GPI) (1), (2).

Cuando las moléculas de NKG2D reconocen los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de MICA, se desencadena la activación de las células a través del motivo YxxM (Presente en DAP10) donde comienzan una cascada de señales que promueven la degranulación (2). En células NK, promueven la destrucción directa de la célula blanco y/o la secreción de citoquinas como factor de necrosis tumoral (TNF¹⁰) o interferón γ (IFN- γ), restringiendo la angiogénesis tumoral y estimulando la respuesta inmune adaptativa, respectivamente (3).

1.2 Modelo de unión

⁹ Del inglés *Major Histocompatibility Complex*.

¹⁰ Del inglés *Tumoral Necrosis Factor*.

El receptor NKG2D es un homodímero, con ectodominio de lectina tipo C, distanciadamente relacionado a otros miembros de la familia NKG2 (identidad de 20%-30%) (4). Todos los ligandos de NKG2D son estructuralmente homólogos a las proteínas MHC clase I, sin embargo estos ligandos no se unen a ningún péptido antigénico (o cualquier molécula pequeña) ni a la β 2-microglobulina (4). La afinidad de NKG2D a sus ligandos se encuentra entre 1 a 0,01 μ M (4). Los sitios de unión de cada monómero de NKG2D, contribuyen de manera muy similar en una extensa interface, donde cada monómero se une a diferentes superficies (5). La forma de montura de NKG2D atraviesa plataforma de unión de MICA, donde cada monómero del receptor contacta principalmente cada dominio α 1 o α 2 (5). Mientras que cada una de las α hélices constituyen el elemento central de sitios de unión en MICA, las cadenas que hacen contacto con NKG2D son esencialmente complementarias y diferentes (5). Ambos monómeros de NKG2D pueden también hacer contacto con los dos dominios de MICA, gracias a los residuos de Asparagina que comparten los dominios (5). Sin embargo en MICA, los residuos de la sección central de la hélice del dominio α 2 son desordenados la molécula libre, pero son reordenados en el complejo con NKG2D y forman parte de la interface del mismo. Este reordenamiento es aparentemente

esencial para la unión de MICA y “acomoda” la molécula en la unión con NKG2D (4), (5).

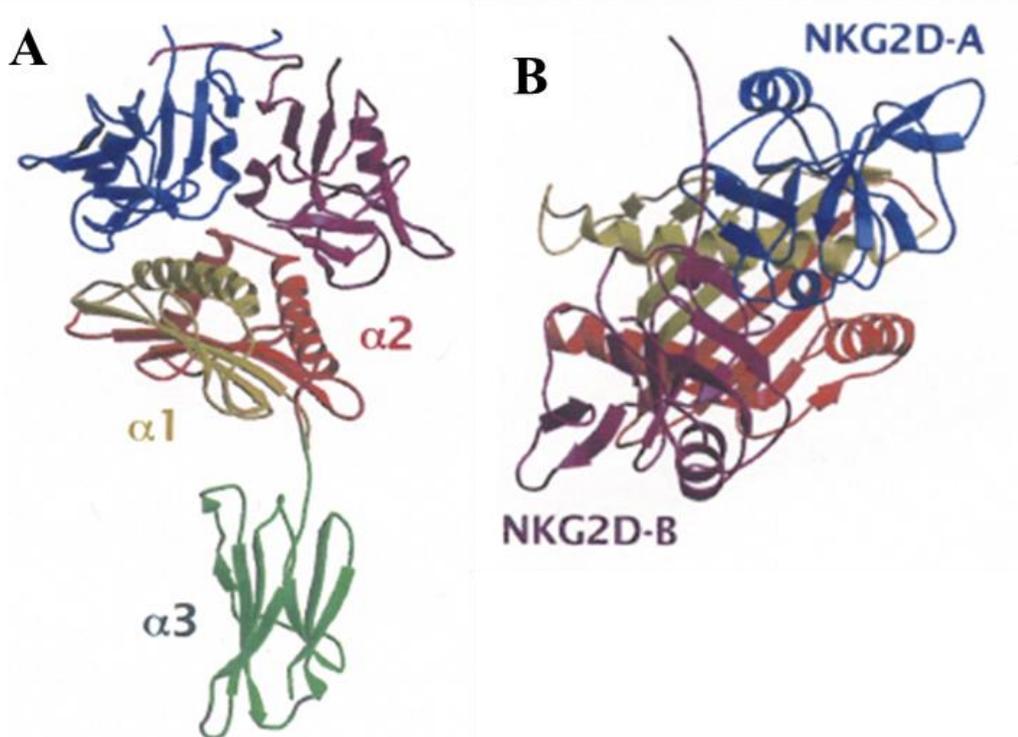


Figura 1. Modelo de unión MICA-NKG2D. La figura A muestra la vista frontal de la unión donde los colores azul y morado representan la estructura de NKG2D y los colores amarillo, rojo y verde los 3 dominios extra celulares de MICA $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, respectivamente. La figura B muestra la vista superior de la unión, señalando cada unidad del dímero de NKG2D (A y B). La imagen fue tomada y modificada de lo publicado por Li y colaboradores en el 2001 (5).

1.3 MICA y la respuesta inmune anti tumoral:

Se ha observado que la proteína MICA se expresa en la mayoría de células tumorales y puede activar células de respuesta innata y adaptativa (6). El reconocimiento de la proteína MICA por parte de NKG2D juega un papel fundamental en la respuesta inmunológica contra el cáncer, especialmente en la eliminación temprana de células tumorales, debido a que los tumores son

poco inmunogénicos y a menudo no son eliminadas por el sistema inmune adaptativo (6).

A pesar de esto, se ha demostrado que los tumores pueden evadir la respuesta inmune gracias a la liberación y consecuente disminución de MICA en su superficie, mediante dos mecanismos principalmente observados: por corte proteolítico o por vesículas exosomales. En el primero, la molécula es cortada por la acción de metaloproteasas que reconocen y cortan el dominio $\alpha 3$ (7),(8),(9),(10),(11),(12),(13). En el segundo mecanismo, el tumor puede secretar MICA a través de microvesículas exosomales, las cuales pueden además contener microRNA que regulan la expresión de NKG2D (14). Éste último mecanismo de evasión, es característico en personas que expresan la variante MICA *008. En ambos mecanismos no sólo reduce el reconocimiento de las células marcadas, las moléculas liberadas compiten por el sitio de unión de NKG2D con las presentes en la membrana, además que pueden inducir la internalización y consecuente degradación del receptor NKG2D, disminuyendo los niveles de expresión en los linfocitos NK y CD8⁺. Como consecuencia, la capacidad de las células efectoras de reconocer y lisar células tumorales se ve comprometida y por lo tanto se favorece el crecimiento del tumor (14,15).

Recientemente, Ferrari de Andrade y col, 2018 (16) publicaron el desarrollo de un anticuerpo dirigido al dominio $\alpha 3$ de MICA el cual bloqueaba el corte de la proteína en la superficie celular. El estudio muestra que a nivel *in vitro*, el anticuerpo logra reducir el MICA soluble y que además, eleva los porcentajes de citotoxicidad por parte de las células NK e, *in vivo* en un modelo murino se redujo la metástasis de melanoma humano y tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento tumoral (16). Este avance muestra la importancia del uso de MICA como blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer y aunque el desarrollo de este anticuerpo pueda proporcionar una posible inmunoterapia, existe una desventaja frente a pacientes que expresen la variante proteica de MICA*008, pues no evita la liberación de MICA por exosomas y según datos de Chile Genómico, esta variante tiene una frecuencia alélica de 0,8 en la población centro sur chilena, (Proyecto ChileGenómico, Facultad de Medicina).

Por ende, como tratamiento alternativo y/o complementario se ha propuesto el desarrollo de un anticuerpo que logre bloquear MICA desde sus dominios de unión pues con ello se evitaría la interacción MICA liberado con NKG2D y reduciría la internalización del receptor. Aquí la inmunidad antitumoral

será mediada por células NK a través del receptor CD16 que activa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o ADCC¹¹ (17).

1.4 Anticuerpos monoclonales humanos

Un anticuerpo es una glicoproteína que consiste en una estructura de cuatro cadenas (dos cadenas pesadas iguales y dos cadenas livianas iguales), organizadas en 3 unidades. Dos de ellas son unidades idénticas y permiten la unión al antígeno o molécula de reconocimiento. Estas unidades son llamadas fragmentos de unión a anticuerpo o regiones Fab¹² de la molécula. La tercera unidad, el fragmento cristalino o región Fc¹³, están generalmente involucradas en la interacción con los sistemas efectoros los cuales son complementarios. Las dos cadenas pesadas, de la molécula van desde la región Fab a la región Fc, y las dos cadenas livianas son asociadas sólo con la región Fab. En humanos hay cinco clases de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig): IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Estas clases se diferencian por su cadena pesada, la cual les da propiedades de polimerización y funciones efectoras (18).

¹¹ Del inglés *Antibody Dependet Cellular Cytotoxicity*.

¹² Del inglés *Fragment Anigen Binding*.

¹³ Del inglés *Fragment Crystalline*.

La propiedad fundamental de especificidad y afinidad de cada molécula de anticuerpo está determinada por un dominio variable de la cadena pesada (VH) y de la cadena liviana o ligera (VL). La afinidad del primer repertorio de las células B es bajo y se incrementa a medida que los genes de inmunoglobulinas de las células B activadas sufren hipermutaciones somáticas en repetidos encuentros con el antígeno. Esta acumulación de mutaciones, se da preferentemente en la región determinante de complementariedad (CDR¹⁴) de los genes de la cadena pesada y liviana. Cada VH y VL posee tres CDR, que son bucles expuestos en la superficie y que forman el sitio de unión al antígeno. Las mutaciones o cambios en estos CDR resultan en cambios estructurales del sitio de unión (19).

Los anticuerpos monoclonales pueden ser definidos como anticuerpos que tienen afinidad por el mismo antígeno y son producidos por clones de una célula germinal en común (20). Desde los años setenta, las metodologías desarrolladas para la generación de anticuerpos monoclonales han sido drásticamente evolucionadas desde el uso de la tecnología del hibridoma para producir anticuerpos monoclonales murinos hasta sofisticadas tecnologías de

¹⁴ Del inglés *Complementarity-Determining Region*.

ingeniería recombinante, con el cual se diseñan anticuerpos monoclonales específicos de elección, produciendo así quiméricos, humanizados o completamente humanos (20).

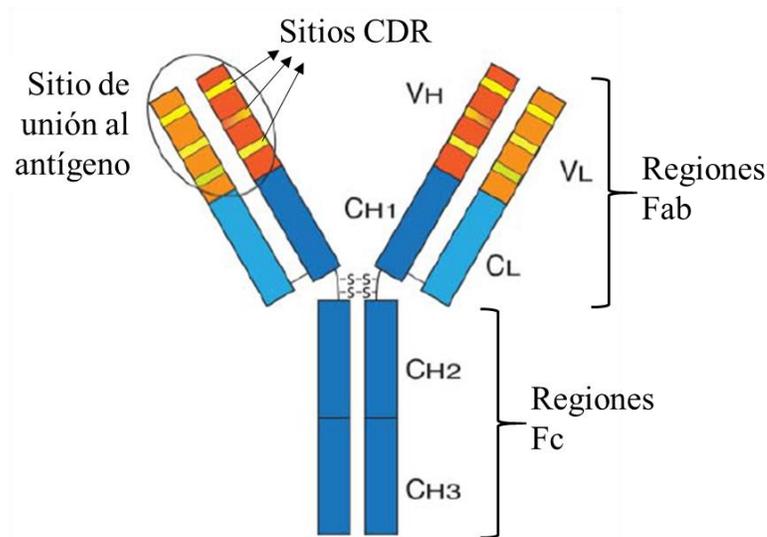


Figura 2. Esquema de la estructura de un anticuerpo. La figura muestra las dos cadenas pesadas y las dos livianas, además muestra los cuatro dominios de la cadena pesada (VH,CH1,CH2 y CH3) y los dos de la cadena liviana (VL y CL). También se muestra las tres regiones del anticuerpo (dos Fab y un Fc) y el sitio de unión al antígeno donde se señalan los sitios CDR. La imagen fue tomada y modificada de lo publicado por Feederler & Schepers en el 2017 (19).

Los anticuerpos completamente humanos son anticuerpos producidos a partir de secuencias de ADN humano, esto quiere decir que no poseen ninguna fracción en su estructura de una especie diferente. El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos ha inspirado primeramente por los enormes beneficios clínicos prometedores, ya que estos son usados en tratamientos anti inflamatorios, anti cancerígenos e inmunización pasiva,

entre otros (21). Anticuerpos quiméricos y humanizados desatan una respuesta inmune contra los mismos debido a los residuos de fragmentos murinos presentes en este tipo de anticuerpo. Actualmente, hay dos estrategias mayormente usadas para la generación de anticuerpos humanos: con ratones transgénicos y tecnologías de selección *in vitro* (21). Esta última normalmente, se utilizan fragmentos de anticuerpos como las cadenas simple formadas por la unión de regiones VH y VL denominados scFv.

1.5 Formato de scFv:

Con la tecnología de ADN recombinante se han podido construir diferentes formatos de anticuerpos. El fragmento de anticuerpo más pequeño que contiene un sitio de unión a antígeno, es la región variable (Fv¹⁵), comprendiendo los dominios de la región variable VH y VL (22). Los fragmentos de anticuerpos Fv de cadena simple o scFv¹⁶ son formatos populares de anticuerpos recombinantes y junto a las dominios variables de inmunoglobulinas de cadena pesada de camélidos (VHH) y humanos (dAbs) sin cadena liviana, son uno de los fragmentos de anticuerpo más pequeño capaz de reconocer un antígeno (54),(21). Estos están diseñados como una

¹⁵ Del inglés *Fraction Variable*.

¹⁶ Del inglés *Single Chain Fraction Variable*.

cadena polipeptídica que compromete los dominios VH y VL unidos por un enlace (23, 24). Este enlace, es usualmente un péptido corto que mide aproximadamente 3,5 nm entre el carboxilo terminal de un dominio y el amino terminal del otro (22). El tamaño del enlace puede determinar la formación de estructuras multiméricas en los scFv, determinadas por la autoasociación de los dominios VH y VL. Enlaces largos (cerca de 20 amino ácidos) parece favorecer moléculas monoméricas, mientras que enlaces cortos favorecen los dímeros, en los cuales, el VH de una molécula de scFv es pareado con el VL de otra molécula y viceversa. Enlaces intermedios proveen mezcla de poblaciones, dependiendo de las secuencias de las regiones variables. El enlace en los dominios puede ser incorporado en la orientación VH-VL o VL-VH (22, 18).

Desde la generación del primer anticuerpo completamente humano, ha permitido la creación de grandes repertorios no inmunizados de scFv completamente humanos para la creación de anticuerpos, con afinidades comparables con los obtenidos con la tecnología de hibridoma (25). Anticuerpos seleccionados de un repertorio completamente humano de scFv, tienen múltiples aplicaciones, desde reactivos para ELISA, citometría, westernblot, mapeo de epítomos hasta terapia. A menudo, son el formato

preferido para realizar ingeniería de anticuerpo, pero pueden sufrir de una limitada estabilidad (24,25). Los scFv pueden también ser herramientas útiles ya que en contraste con la molécula estable IgG bivalente de 150 kDa, el fragmento monovalente scFv es más pequeño de 25kDa, y al ser inyectado intravenoso, posee un tiempo de vida corto en el suero de sólo unas pocas horas. Además, debido a su pequeño tamaño, el scFv se considera con mejor penetración al tumor en comparación con el IgG, también por sus propiedades de difusión es una herramienta más susceptible para el marcaje terapia anticancerígena e imagenología (26). La construcción de librerías de scFv de un reordenamiento natural de los genes, asegura la diversidad natural en los espacios CDR de las regiones variables y por ende un alto número de scFv funcionales y la expresión de scFv solubles sin la necesidad de subclonamiento (25), éstos son generalmente expuestos sobre fagos filamentosos para su selección (24).

Existen numerosos reportes de producción de fragmentos de anticuerpos incluyendo scFv usando *Escherichia coli* (*E.coli*) como un hospedador de expresión, en el cual, los fragmentos producidos tanto en el citoplasma como en el periplasma. Este formato ha mostrado un alto rendimiento de producción en sistemas de expresión bacteriana (23). La expresión de scFv

en *E.coli* es relativamente simple, y la sobre expresión de la proteína a menudo forman agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión. Como una solución para la reducción de los cuerpos de inclusión, generalmente los scFv también son expresados en el periplasma, donde los puentes disulfuros pueden ser formados, gracias a las condiciones de oxidación que facilitan la formación. Estos puentes son necesarios para el plegamiento y la actividad del scFv (27). Sin embargo, la producción en cuerpos de inclusión es abundante y puede ser fácilmente extraída (55). Sin embargo, un scFv recombinante puede ser producido en una variedad de sistemas diferentes desde bacterias hasta células de mamíferos (26).

1.6 Librería de Anticuerpos:

La clave para una generación exitosa de anticuerpos (independiente del campo de aplicación) es el uso de librería de genes para la selección (28). La esencia de los métodos *in vitro* son el clonamiento de fragmentos de anticuerpo en formatos susceptibles para la selección. Una gran ventaja de estos métodos, son la generación rápida de anticuerpos, alto potencial de rendimiento y enfoque de flexibilidad: Los anticuerpos puede ser seleccionados y sus afinidades y especificidades poden ser precisamente

ajustadas de acuerdo a las necesidades (29). Estas metodologías basadas en librerías de anticuerpos ofrecen muchas rutas alternas, que son por lo menos, tan poderosas como son los enfoques tradicionales, pues combinan la generación de billones de componentes con un rápido escaneo o procedimiento de selección para identificar los candidatos más interesantes (30). Las librerías humanas son especiales para la selección de anticuerpos terapéuticos (18).

Diferentes tipos de librerías de genes de anticuerpos pueden ser construidos. El uso del tipo de librería depende del campo aplicación (28). En la creación de librerías, dos diferentes elecciones se pueden hacer: el recurso del repertorio de la región variable y el formato de anticuerpo (29).

Inmuno librerías son construidas de donantes inmunizados y típicamente generadas y usadas en investigación médica para conseguir un anticuerpo contra un particular antígeno, por ejemplo, antígenos asociados a patógenos o marcadores de tumor. La viabilidad de conseguir inmuno librerías humanas es limitada debido a razones éticas (28). El uso de primates como chimpancés y una lista de extendida de macacos, son una alternativa porque las secuencias de inmunoglobulinas son generalmente muy cercana a los humanos. Las

librerías humanas han sido generadas de varias combinaciones de poblaciones de ratones inmunodeficientes, con linfocitos humanos de sangre periférica y que se pueden obtener de ratones transgénicos con repertorio humano. La inmunización puede ser mejor opción, si un anticuerpo de afinidad útil no es posible aislarlo fácilmente de una librería o si se desea un rango de anticuerpos contra una molécula en particular (18).

Alternativamente, librerías nativas, semisintéticas o sintéticas han sido reportadas como librerías “de recipiente único” o “universales”, pues éstas son diseñadas del aislamiento de fragmentos de unión de anticuerpos, en teoría, para cada posible antígeno (28). Las librerías universales independientes de antígeno, son una herramienta con la cual se podría seleccionar un anticuerpo de alta afinidad, directamente para cualquier antígeno elegido, independiente de la historia inmunológica del donador (30). Además, ellas son particularmente útiles para la selección de anticuerpos humanos en los cuales son difíciles de establecer con las técnicas tradicionales. Pueden ser usadas para generar anticuerpos contra antígenos no inmunogénicos y tóxicos (29,30). En el presente varias de estas librerías de “recipiente único” han sido descritas. La diferencia entre librerías nativas y sintéticas depende del recurso de genes de inmunoglobulina (30). En la

práctica, existen muchos reportes de anticuerpos con alta o moderada afinidad que han sido seleccionados por esta vía. Anticuerpos con una buena especificidad han sido seleccionados y adecuados para múltiples aplicaciones, que pueden ser un punto de partida atractivo, si simplemente se desea un anticuerpo como herramienta para monitorear una específica molécula. Además, anticuerpos seleccionados con moderada afinidad pueden ser mejorados fácilmente, con técnicas usualmente basadas en la mutagénesis y selección (18).

En librerías sintéticas, los genes de anticuerpos son generados de *novο* por síntesis de genes, por un ensamble artificialmente *in vitro* de segmentos de los genes V y D/J (29). Los genes V pueden ser ensamblados por la introducción de un predeterminado nivel de aleatorización, dentro de los segmentos que de codifican para los CDR de genes germinales. Las regiones y el grado de diversidad pueden ser elegidos como corresponde en áreas en los cuales el repertorio de anticuerpos es naturalmente más diverso (30).

Por otro lado, las librerías tipo nativas son repertorios de genes arreglados de las regiones variables que pueden ser recolectados de ARNm de células B de donadores humanos no inmunizados aislados de linfocitos de sangre

periférica, bazo, medula ósea o amígdalas. Los genes son amplificados por PCR de entre el repertorio de ARNm de células B o del ADNc procedente del mismo, usando oligonucleótidos basados en las familias de genes de las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas (29), los cuales son combinados de manera aleatoria y clonados para generar librerías de fragmentos de anticuerpos (30).

En general, librerías exitosas han usado los formatos de anticuerpos de scFv y de Fab (29). La mejor opción para la construcción de la librería por scFv o Fab, depende de las necesidades del investigador. Las ventajas de las librerías de scFv son varias, primero la construcción de la librería puede ser fácilmente aplicada pues la amplificación por PCR es sencilla y con un corto número de pasos. Segundo, la capacidad de scFv a formar multímeros puede mejorar la avidéz por el antígeno y facilita la selección contra ciertos antígenos como moléculas de superficie celular. Tercero, el rendimiento de las pequeñas moléculas de scFv en *E.coli*, tienden a ser mejores en comparación con los Fabs. Las desventajas son mayormente relacionadas a la propensión de la molécula a formar estructuras oligoméricas o cuerpos de inclusión. Las ventajas de trabajar con un Fab son mayormente relacionadas por el hecho que esta es una molécula estable y un fragmento proteico bien caracterizado.

Sin embargo, la selección de un scFv, de una librería es un buen punto de partida para el desarrollo de un anticuerpo con una función específica (18).

Un paso crítico en proceso de producción de librerías de scFv, es el ensamble de las regiones variables VH y VL en una sola molécula. Para este propósito diferentes estrategias han sido aplicadas, incluyendo métodos laboriosos tales como clonación independiente de las regiones variables de inmunoglobulinas seguido por el ensamble del gen de scFv por métodos de clonación o el uso de sistemas de recombinación involucrando bacterias llevando la región variable de la cadena Pesada y un fago llevando la región variable de la cadena liviana. La técnica más común es el empalme por solapamiento de extensión de PCR o SOE-PCR, en el cual las cadenas de VH y VL son amplificadas con primarios que comparten una región de solapamiento, que permite el enlace de ambas regiones variables por amplificación. La mezcla de los productos de amplificación son los genes de scFv. Por otro lado, Sotelo y colaboradores, en el 2010 (31) publicaron una técnica donde se modifica el SOE-PCR, generando un método simple y altamente eficiente para combinar regiones variables de anticuerpos de cadena pesada y liviana, y producir genes de scFv. La estrategia se basa en la amplificación de ADN de cadena sencilla, donde inicialmente cada región variable de

inmunoglobulina es amplificada de manera independiente usando un único partidador, con lo que se produciría cadenas simples de ADN. Luego, ambas regiones son mezcladas y amplificadas para producir un gen completo de scFv (31).

Todos los tipos de librerías son valiosos recursos para la selección de anticuerpos en investigación básica, diagnóstico y propósito terapéutico (28).

1.7 Exposición por Fagos:

En 1985 G.P. Smith (premio Nobel de química 2018) introdujo el concepto de exposición de proteínas exógenas en la superficie de fagos M13, ajustando las bases de la construcción de grandes repertorios de librerías para exposición de diferentes proteínas (29). Librerías de anticuerpos expuestas han sido la aplicación más exitosa de este concepto. El primer repertorio de genes de anticuerpos en fagos fue generado y seleccionados usando el fago Lamda, con éxito limitado (21). El método más común usado hasta ahora es basado el trabajo pionero de George P. Smith, donde el genotipo y fenotipo de los oligopéptidos fueron enlazados por fusión al correspondiente gen para la proteína de la cápside III del bacteriofago M13 (21).

Lo que hace tan atractivo esta tecnología a la ciencia, es que, usando metodologías estándares de biología molecular, se puede construir librerías altamente diversas que producirán anticuerpos funcionales de potencial interés, para una selección *in vitro* de manera controlada (32), de los cuales se pueden seleccionar aquellos con propiedades deseables (29).

Las librerías son insertadas en un vector en el marco de lectura de la secuencia que codifica para la proteína del fago pIII (29). Dos diferentes sistemas genéticos han sido desarrollado para la expresión de la proteína fusión anticuerpo:pIII para la exposición por fagos. El primer sistema consiste en que el gen del anticuerpo puede ser directamente insertado dentro del genoma del fago, fusionado éste al gen de la proteína pIII de la cápside presente en el genoma del fago. Sin embargo, la mayoría de los sistemas exitosos desacoplan la expresión del anticuerpo del genoma del fago, pues proveen los genes de la proteína de fusión anticuerpo:pIII en un plásmido distinto (llamado fagómido) que contiene una señal morfogenética para el empaque del vector dentro de la partícula viral (21). Una vez ensamblada, la partícula del fago albergará una proteína pIII exponiendo en su aminoterminal un fragmento de anticuerpo funcional (29). La resultante proteína fusión péptido:pIII permite la purificación por afinidad del péptido

y su correspondiente gen. En la misma manera, fragmentos de anticuerpos fusionados a pIII puede ser presentado en la superficie del fago M13 (21). Dado que el fago expone proteínas codificadas por su genoma, la selección de un fago permite la identificación por secuenciación de ADN y consecuente clonación del gen correspondiente al anticuerpo. (29). Con ello, pueden ser sujetos a ingeniería genética, para el caso de incrementar la afinidad y/o construir una inmunoglobulina completa con funciones efectoras deseadas (29, 32).

Debido a las limitaciones de mecanismo de plegamiento de *E.coli*, sólo los fragmentos de anticuerpo como scFv, Fab, VHH o dAbs son usados rutinariamente para la exposición por fagos de anticuerpos, así como la producción de IgGs en *E.coli* es posible en casos particulares (21). Además, la naturaleza recombinante de la tecnología, permite un rápido reformateo de los fragmentos de anticuerpos expuestos por fagos, para la producción de inmunoglobulinas completas u otro tipo de formato de anticuerpo. Las secuencias obtenidas, pueden ser integradas fácilmente a todas las tecnologías para monoclonales, y por lo tanto, proporcionan un enfoque simplificado para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (32).

Un anticuerpo específico expuesto por fagos en su superficie, puede ser aislado por la unión a un determinado ligando, de una colección de billones de diferentes anticuerpos expuestos (29), por una selección *in vitro* llamada “paneó” (21). Esta selección, permite manipular parámetro que simplemente no pueden hacerse en un animal, añadiendo un alto nivel de especificidad a los anticuerpos producidos por esta metodología (32). Además, es completamente independiente de cualquier sistema inmune (21), por esto, la velocidad en la cual los anticuerpos son producidos, caracterizados y secuenciados es mayormente optimizada (32). El enriquecimiento de los anticuerpos en fagos para un antígeno específico es llevado a cabo por “un paneo de fagos”, usando un antígeno inmovilizado o marcado. En este proceso, el antígeno de interés es inmovilizado en un soporte sólido, tales como placas de micro pocillos o lechos magnéticos. Las partículas virales son agregadas para permitir la unión del fago que está exponiendo el apropiado anticuerpo. Después de un extensivo lavado para remover todo el material unido inespecífico, fagos que muestre una relevante unión pueden ser retenidos mientras que aquellos fagos no adherentes será retirados por el lavado. El proceso de selección, es preparado de 2 a 5 rondas resultando en una población que consiste en un alto porcentaje de fagos que expresan un

anticuerpo deseable. Los fagos unidos entonces son recuperados, usados para infectar bacterias y propagados para un enriquecimiento extra y eventualmente un análisis de unión. La posibilidad de realizar rondas sucesivas de selección permite el aislamiento de proteínas presentes en un muy bajo número en una población de billones de diferentes fagos. Finalmente, los anticuerpos específicos para el antígeno dado son identificados a través de un escaneo por el ELISA o FACS, con un número de clones aleatorio (29).

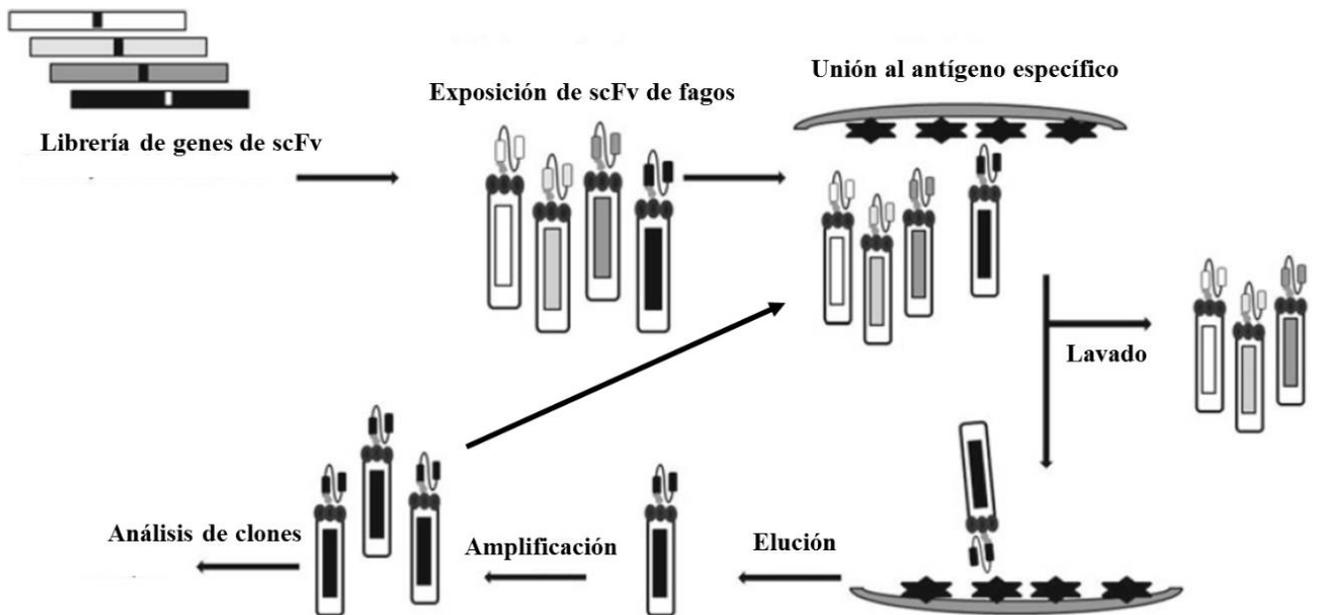


Figura 3. Ciclo de paneo de una librería de exposición de fagos de scFv. La figura muestra el esquema general de un paneo para la selección de clones de fagos que expresan scFv en su superficie. Los pasos principales del paneo son la unión al antígeno, el lavado de los fagos no específicos, la elución de los fagos específicos y la amplificación de los clones. Este proceso puede repetirse en seguidas rondas de paneo o pasar a un análisis de clones obtenidos del paneo. El esquema tomada y modificada de Deantonio y colaboradores (29).

Después de más de dos décadas de exposición por fagos de anticuerpos, esta tecnología ha generado o mejorado numerosos anticuerpos considerandos desafiantes por los métodos tradicionales (32). A pesar que existen otras metodologías *in vitro* como exposición por ribosoma, exposición por puromicina, o exposición en superficie de levadura, la exposición por fagos de anticuerpos ha venido siendo la más extensamente usada en la selección de anticuerpos humanos (21).

1.8 Anticuerpos terapéuticos completamente humanos desarrollados a partir de biblioteca de fagos

En 2002, el primer anticuerpo completamente humano fue comercialmente aceptado. Adalimumab (Humira®) fue aislado usando exposición por fagos de anticuerpos mediante selección guiada (21). Éste anticuerpo, fue desarrollado para neutralizar el factor de necrosis tumoral (TNF) y en la actualidad es mayormente usado para el tratamiento de la artritis reumatoide. Hoy en día es uno de los biológicos más vendidos. Adicionalmente 5 anticuerpos obtenidos de exposición de fagos han sido aprobados (Belimumab, Necitumumab, Ramucirumab, Ranibizumab y Raxibacumab),

así como también, más de 60 anticuerpos derivados de exposición de fagos se encuentran en pruebas clínicas (56) (57).

Por otra parte, se ha supuesto que los anticuerpos humanos son menos inmunogénicos, sin embargo, estas moléculas completamente humanas puede tener vénetos adversos. El anticuerpo Adalimumab así como el anticuerpo Golimumab, ambos anticuerpos completamente humanos han mostrado inducir respuesta inmune. Del primero, se ha descrito que induce respuesta neutralizante contra el anticuerpo, en algunos grupos de pacientes, además, se ha correlacionado la presencia de anticuerpos neutralizantes o comúnmente llamados anti droga, con la poca eficacia de algunos pacientes tratados con este anticuerpo (58).

Aplicaciones diagnosticas representan otra creciente campo de interés para el diseño y desarrollo de anticuerpos derivados de exposición de fagos. Aquí la principal característica son la sensibilidad, selectividad, especificidad y estabilidad. Por lo tanto, estrategias para el descubrimiento de anticuerpos de diagnóstico a menudo incluyen selección negativa combinada durante el paneo, para evitar reactividad indeseada (56). A la fecha hay numerosos ejemplos de anticuerpos para aplicaciones diagnósticas, derivados de la

tecnología de exposición por fago. Una gran ventaja de ello es el acceso directo a la información del ligando, permitiendo una rápida adaptación del formato de anticuerpo como por ejemplo: IgG, scFv-Fc, anticuerpo biotinilado o función scFv-phoA (21).

2. MATERIALES Y MÉTODOLOGÍAS

2.1. Soluciones, buffers y medios de cultivo

2.1.1. PBS¹⁷ 1X

El buffer fosfato salino, se preparó haciendo un stock a 10X con 80g de NaCl, 2 g de KCl, 17 g de Na₂HPO₄ y 1,63 g de KH₂PO₄ en 1 L de agua destilada. El buffer fue esterilizado. Para la preparación 1X se diluyó 100 mL en 900 mL de agua destilada.

2.1.2. TBE 1X

El buffer Tris-borato-EDTA, se preparó a partir de un stock de 10X así: 130 g de Tris-HCl, 62 g de ácido bórico (H₃BO₃) y 7,4g de Na₂EDTA.2H₂O, fueron disueltos en 900 mL de agua destilada. Al finalizar la dilución se aforó a 1 L y se esterilizó. Para la preparación 1X se disolvió 100 mL en 900 mL de agua destilada.

2.1.3. Buffer para preparar bacterias quimiocompetentes

El buffer 1 para la preparación de bacterias quimiocompetentes se disolvieron 1,2 g de RbCl, 0,99 g de MnCl, 0,15 g de CaCl.H₂O en 70 mL de agua destilada. Luego se agregó 3 mL de Acetato de potasio 1M (pH 7,5) y 12,194

¹⁷ Del inglés: *Phosphate-Buffer Saline*.

mL de glicerol al 87%. El pH se ajustó con ácido acético a 5,8 y se aforó a 100 mL con agua destilada. El buffer se filtró con una membrana de 0,22 μm de tamaño de poro.

El buffer 2 se preparó así: en 40 mL de agua destilada se disolvió 0,05 g de RbCl y 0,55 g de $\text{CaCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente se le agregó 1 mL de MOPS 0,5 M y 6,097 mL de glicerol 87%. Se aforó a 50 mL con agua destilada y se ajustó el pH a 6,8 usando NaOH. El buffer se filtró con una membrana de 0,22 μm de tamaño de poro.

2.1.4. Buffer de lisis

El buffer de lisis se preparó usando las siguientes concentraciones: 25 mM de Tris, 100 mM de NaCl, 5 mM de Imidazol y 1% de Triton X-100. Al finalizar se ajustó el pH a 7,0 y se filtró con una membrana de 0,45 μm de tamaño de poro.

2.1.5. Buffer de lavado

El buffer de lavado se preparó usando las siguientes concentraciones: 50 mM de Tris, 100 mM de NaCl, 1% de Triton X-100 y 0,1% deoxicolato de sodio. Al finalizar se ajustó el pH a 7,0 y se filtró con una membrana de 0,45 μm de tamaño de poro.

2.1.6. Buffer de denaturación

El buffer de denaturación se preparó usando las siguientes concentraciones: 50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, 6 M cloruro de guanidinio y 5 mM de Imidazol. Al finalizar se ajustó el pH a 7,0 y se filtró con una membrana de 0,45 μm de tamaño de poro.

2.1.7. Buffer de elución

El buffer de elución se preparó usando las siguientes concentraciones: 50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, 6 M cloruro de guanidinio y 300 mM de Imidazol. Al finalizar se ajustó el pH a 7,0 y se filtró con una membrana de 0,45 μm de tamaño de poro.

2.1.8. Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 15%

Para el gel de corrida al 15%, se realizó una mezcla de 15 mL totales con 3,5 mL de agua destilada, 7,5 mL de Mezcla de acrilamida al 30% (BIO-RAD), 3,8 mL de solución de Tris al 1,5 M a pH: 8,8, 0,15 mL de SDS¹⁸ al 10%, 0,15 mL APS¹⁹ al 10% y 0,006 mL de TEMED.

¹⁸ Del inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate*.

¹⁹ Del inglés: *Amonium PerSulfate*.

Para la preparación del gel de resolución, se realizó una mezcla de 3 mL totales con 2,1 mL de agua destilada, 0,5 mL de Mezcla de acrilamida al 30%, 0,38 mL de solución de Tris al 1,0 M a pH: 6,8, 0,03 mL de SDS al 10%, 0,03 mL APS al 10% y 0,003 mL de TEMED.

2.1.9. Buffer de corrida

Para preparar el buffer de corrida se realizó inicialmente una solución acuosa de Tris-Glicina 10X con 25mM y 125 mM de glicina, si ajustar pH. Posteriormente se preparó el buffer realizando una solución con 100 mL de Tris-Glicina 10X, 5 mL de SDS al 20% y aforando a 1 L con agua destilada.

2.1.10. TBS²⁰

El buffer Tris salino se preparó así: Inicialmente se preparó una solución de 50 mM de Tris, ajustando el pH a 7,5 con HCl. Posteriormente se agregó NaCl a una concentración de 150 mM. El buffer se esterilizó.

2.1.11. Medio SOC²¹

El caldo de cultivo SOC se preparó a partir del caldo SOB²², el cual se preparó disolviendo en 950 mL de agua destilada, 20 g de peptona, 5 g de extracto de

²⁰ Del inglés: *Tris-Buffer Saline*.

²¹ Del inglés: *Super Optimal Broth with Catabolite repression*.

²² Del inglés: *Super Optimal Broth*

levadura, 0,5 g de NaCl, 186 mg de KCl. Se ajustó el pH a 7 y se aforó hasta completar 1 L. El caldo SOB se esterilizó. Para preparar el caldo SOC a 50 mL de SOB, previamente esterilizado y enfriado se le agregó 0,5 mL de MgCl₂ 1 M y 1 mL de glucosa 1M, previamente esterilizados por filtración con una membrana de 0,22 µm de tamaño de poro.

2.1.12. Caldo LB²³ y LB agar

Para la preparación se disolvió en 1 L de agua destilada se disolvió 10 g peptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, se ajustó el pH a 7 y se esterilizó.

Para la preparación de LB agar, se realizó la misma mezcla, salvo que se agregó 7 g de agar-agar por cada litro de caldo. Una vez esterilizado y a una temperatura cercana a los 50 °C se suplementó con ampicilina a 100 µg/mL o ampicilina 100 µg/mL/IPTG 100 µg/mL/ X-gal 40 µg/mL, mezclando vigorosamente y se sirvieron en placas de cultivo bajo condiciones estériles, hasta su gelificación.

2.1.13. Caldo 2xYT

²³ Del inglés *Luria Broth*.

Para preparar el medio de cultivo 2xYT se disolvió en 1 L de agua destilado, 16 g peptona, 10 g de extracto de levadura, y 5 g de NaCl. Se llevó a un pH 7,5 y se esterilizó.

2.1.14. Caldo SB²⁴

Para preparar el caldo SB se disolvió 10 g de MOPS, 30 g de Peptona, 20 g de extracto de levadura en 1 litro de agua destilada. Se ajustó el pH 7,0 y se esterilizó.

2.2. Metodología

2.2.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC²⁵)

Las PBMC se obtuvieron desde 8 donantes sanos, que se seleccionaron sin ningún criterio de selección, desde donde se extrajeron, por punción intravenosa alrededor de 16 ml de sangre, que se recolectaron en tubos de heparina de litio.

De cada muestra de sangre se realizó un aislamiento de PBMC a través de gradientes de densidades usando el reactivo LymphoPrep™ de Stemcell

²⁴ Del inglés *Super Broth*.

²⁵ Del inglés *Periferal Blood Mononuclear Cells*.

Tecnologies™. Para ello se diluyó la sangre con PBS 1X en relación 1:1 en un tubo Falcon de 50 mL mezclando hasta obtener homogeneidad. En otro tubo Falcon de 50 mL, se colocaron 15 mL de LymphoPrep™ y sobre éste con una pipeta, se agregó la mezcla de Sangre/PBS 1X, deslizándola por la pared del tubo de tal manera que no se mezclaran las fases. Luego, se centrifugó por 30 minutos a 800 x g, desactivando el freno de centrifugación. Con precaución, usando una pipeta pasteur, se tomó la fase de células mononucleares que aparece como una nube opaca, y se pasó a otro tubo Falcon de 50 mL. Se lavaron las células con 20 mL de PBS 1X y se centrifugaron por 10 minutos a 300 x g a 4°C. El sobrenadante se descartó y al pellet se le agregaron 5 mL de Buffer de lisis RBC 1X de Thermo Fisher®. La mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detuvo agregando 20 mL de PBS 1X. Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a 300 x g a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet se guardó a -80°C para evitar la acción de RNAsas.

2.2.2. Extracción de ARN total

El ARN, se extrajo desde los PBMC obtenido de cada muestra de sangre, usando el reactivo TRIzol® de Thermo Fisher®, siguiendo las indicaciones

del fabricante. Brevemente, a cada pellet de PBMC descongelado, se le agregó 1 mL de reactivo TRIzol® y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, toda la mezcla se transfirió a un Eppendorf de 1,5 mL y bajo campana de extracción se le agregó 0,2 mL de cloroformo. Luego, se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente y, se centrifugó por 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. Al terminar, se tomó la fase superior, se pasó a otro Eppendorf de 1,5 mL, se le agregó 0,5 mL de Isopropanol puro y, se incubó la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a 12.000 x g a 4°C, se descartó el sobrenadante con micropipeta de manera que no arrastrara nada de pellet y el pellet se resuspendió con 1 mL de etanol al 70% mezclando muy bien en vortex para resuspender completamente los pellet. Por último, se centrifugaron por 5 minutos a 7.500 x g a 4°C, se descartaron los sobrenadantes con micropipeta y los pellets se dejaron secar por 10 minutos con el aire de la campana de flujo. Finalmente cada pellet, se resuspendió con 50 µL de agua libre de nucleasas por pipeteo e incubando cada muestra en un baño a temperatura a 60 °C por 10 minutos.

2.2.3. Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó una reacción usando transcriptasa reversa Affinity Script® de Aligent Technologies y un partidador de oligo dT sintetizado por IDT® con el fin de obtener ADNc de ARN mensajero (ARNm). Para ello, se realizó una síntesis con cada una de las muestras purificadas, usando 5 µg de ARN y mezclándola con 12,7 µL de agua libre de nucleasas. A esta dilución se agregó 2 µL de oligo dT 1µg/ µL y la mezcla se incubó por 5 minutos a 65°C. Terminado el tiempo, se enfriaron a temperatura ambiente, se mezclaron con 2 µL Buffer affinity script 10X, 2 µL DTT, 2 µL dNTPs 10mM y 0,5 transcriptasa reversa de Aligent Technologies. La mezcla se incubó por 1 hora a 42°C y posteriormente por 15 minutos a 70°C. Al terminar el ciclo las muestras se guardaron a -20°C.

2.2.4. Diseño de partidores para amplificar el exón 3 de MICA*002:01 y el diseño *in silico* del dominio $\alpha 2$

La secuencia del Dominio $\alpha 2$ de MICA está codificada en el exón 3 del gen. Para ello, se tomó como referencia la secuencia de la variante MICA*002:01 de GenBank con código: JX275848.1 del NCBI²⁶. Con la secuencia del Exón

²⁶ Página web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JX275848.1/>

3, se tomaron los primeros y últimos 20 nucleótidos complementarios, para comenzar el diseño del Promotor y Reverso respectivamente. A estas secuencias se le agregaron sitios de corte con enzimas de restricción (*XbaI*, *NdeI* y *XhoI*) que se seleccionaron teniendo en cuenta la compatibilidad con el vector pET-JT (**Figura 4**) diseñado en el laboratorio partir del vector pET-15b, que le proporciona a la secuencia una cola de histidina y extensor de la misma.

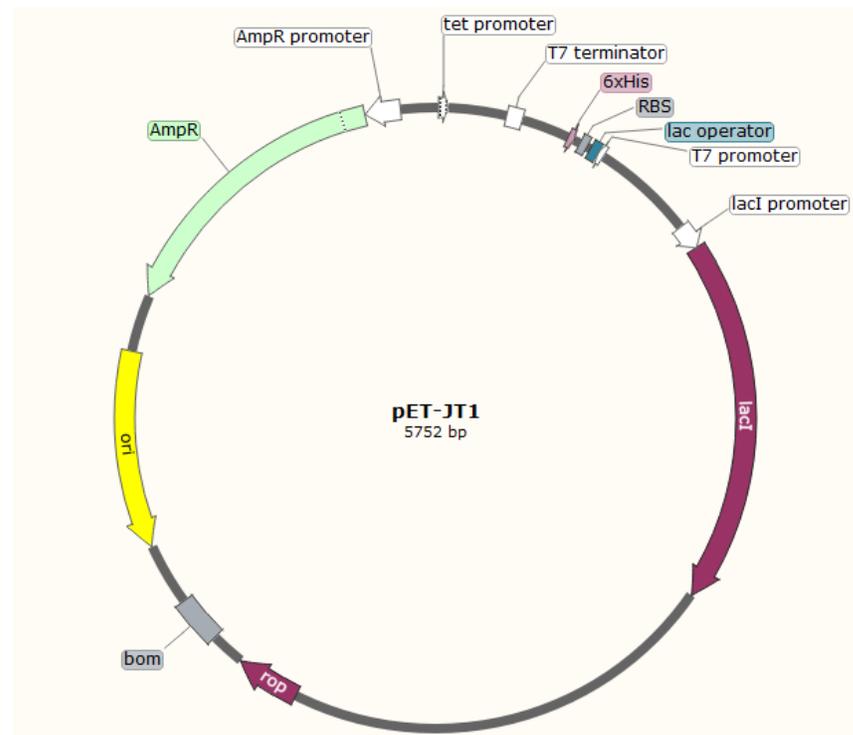


Figura 4. Estructura del vector pET-JT1. El vector pET-JT1 se construyó a partir del vector pET-15b y le proporciona una mayor diversidad de sitios de restricción y un marcador de histidina con un alargador.

Una vez armadas las secuencias, se calcularon los porcentajes de GC y las temperaturas medias de annealing con los programas libres de SnapGen²⁷ y Oligo Analyzer²⁸. Con el análisis, se disminuyeron el número de bases de cada partidor hasta llegar a un porcentaje de GC mayor a 50% y una temperatura media de annealing mayor a 50 °C, teniendo prioridad que la diferencias de temperatura entre el promotor y el reverso no superaran los 5°C. Con esto se realizó un diseño *in silico* de región que amplificaría los partidores diseñados y se determinó el marco de lectura correspondiente al amplicón unido al vector usando SnapGen. La secuencia aminoacídica de la proteína recombinante del dominio $\alpha 2$ se comparó con la secuencia de la proteína MICA*002:01 del GenBank código AFR69318.1 del NCBI²⁹ a través de la herramienta en línea Cloustral Omega³⁰. Con esta secuencia se realizó una determinación del peso molecular teórico y el punto isoeléctrico teórico a través de la plataforma Expasy compute PI/Mw tool³¹. Una vez confirmada la secuencia de los partidores se mandaron sintetizar.

²⁷ Página web: <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>

²⁸ Página web: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>

²⁹ Página web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFR69318.1/>

³⁰ Página web: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

³¹ Página web: https://web.expasy.org/compute_pi/

2.2.5. Amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR³²)

2.2.5.1. Amplificación de las regiones Variables de las cadenas pesadas y livianas

La amplificación de las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas, se realizaron mediante PCR, utilizando partidores específicos para amplificar las regiones variables de las cadenas pesadas tanto de los anticuerpos IgG como de IgM y de la cadena liviana Kappa, pues esta última es más frecuente en humanos. Para ello se utilizó una serie de partidores con nucleótidos degenerados en algunos residuos (**Tabla 1**), previamente diseñados, que permiten amplificar las diferentes familias de las regiones variables de las cadenas pesadas y dos partidores diferentes para las cadenas livianas.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de los genes que codifican las regiones variables de cadena pesada de anticuerpos IgG e IgM y cadena liviana kappa humanos

Cadena Pesada		
<i>Región variable (Promotor)</i>	VIgGHFor01L	<u>CTC GTC CTC TGG TGG CGG TGG CTC</u> GGG CGG AGG TGG GSA GGT NCA SCT GGT GSA GTC TGG
	VIgGHFor02L	<u>CTC GTC CTC TGG TGG CGG TGG CTC</u> GGG CGG AGG TGG GSA RGT GCA GCT GGT GSA GTC TGG

³² Del inglés *Polymerase Chain Reaction*

	VIgGHFor03L	CTC GTC CTC TGG TGG CGG TGG CTC GGG CGG AGG TGG GSA GGT BCA GCT GGT RCA GTC TGG
	VIgGHFor04L	CTC GTC CTC TGG TGG CGG TGG CTC GGG CGG AGG TGG GCA GGT GCA GCT GCA GGA GTC GGG
	VIgGHFor05L	CTC GTC CTC TGG TGG CGG TGG CTC GGG CGG AGG TGG GCA RGT VCA GCT GSW GSA GTC TGG
	VIgGHFor06L	CTC GTC CTC TGG TGG CGG TGG CTC GGG CGG AGG TGG GCA GRT CAC CTT GAR GGA GTC TGG
<i>Región constante (Reverso)</i>	IgGRevNheI	TTT TTT TGC TAG CGA CCG ATG GGC CCT TGG TGG ARG C
	IgMRevNheI	TTT TAT GCT AGC AAG GGT TGG GGC GGA TGC ACT CC
Cadena Liviana		
<i>Región variable (Promotor)</i>	VIgKFor01	TTT TTG AAT TCG RWR TTG TGA TGA CTC AGT CTC C
	VIgKFor03	TTT TTG AAT TCG ACA TCC AGA TGA CCC AGT CTC C
<i>Región Constante (Reverso)</i>	CIgKRev01L	<u>CAC CGC CAC CAG AGG ACG AGG</u> ATC TAG AGG AAC CAC CTG CAG CCA CAG TTC GTT TG

En rojo se muestran los nucleótidos degenerados, en negrilla las secuencias de restricción y subrayado la secuencia que codifica para el enlace entre los genes de las regiones variables para la construcción de una simple cadena.

Los partidores de la región constante de la cadena liviana y variable de la cadena pesada se diseñaron con secuencias complementarias que permite luego la unión de las dos cadenas, y los partidores de la región variable de la cadena liviana y constante de la cadena pesada tienen sitios de corte de restricción que les permiten unirse al fagómido para la construcción de la librería de fagos.

La reacción de amplificación de los ADN, se llevó a cabo en un volumen de 25 μL usando el reactivo GoTaq® Green master mix de Promega®, con 1 μL de cada muestra de ADNc previamente sintetizado, como templado y 0,5 μL de cada par de partidores (Promotor y Reverso) 10 μM , completando el volumen con agua libre de nucleasas. Los ciclos utilizados fueron descritos anteriormente por Sotelo y colaboradores en el 2012 (31). Para amplificación de las regiones variables de la cadena pesada, el ciclo consistió en un calentamiento inicial de 95°C por 5 minutos, posteriormente 30 ciclos de 95°C por 45 segundos seguido por annealing de 56°C por 45 segundos y una extensión de 72°C por 45 segundos, finalizando el PCR con una extensión final de 72°C por 10 minutos. Para la amplificación de las regiones variables de la cadena liviana el ciclo consistió en un calentamiento inicial de 95°C por 2 minutos, posteriormente 30 ciclos de 95°C por 45 segundos seguido por annealing de 54°C por 45 segundos y una extensión de 72°C por 45 segundos, finalizando el PCR con una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Una vez terminado el PCR, se procedió a correr las muestras junto con un marcador molecular de ADN de 100 bp, en un gel de agarosa al 1%, usando TBE 1X, a 100 V por 40 minutos. La banda de amplificación se espera que

sea entre 400 y 500 bp como se publicó previamente, pues no se contaba con un control positivo para cada par de partidores.

2.2.5.2. Amplificación de Exón 3 de MICA*002:01

Los partidores sintéticos y liofilizados fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas para obtener una concentración final de partidador de 100 μM , según la especificación del proveedor. La prueba de annealing se llevó a cabo usando GoTaq® Green Mix (Promega®). La reacción se realizó en un volumen total de reacción de 15 μL , que contenían 7,5 μL de GoTaq®, 0,75 μL de cada partidador 10 μM y 20 ng de DNA como templado, completando el volumen con agua libre de nucleasas. El Templado usado fue una purificación de una construcción del exodominio de MICA*002 en pGEM-T®. Para la reacción, el ciclo que se usó fue de un calentamiento inicial de 95°C por 5 minutos, luego 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, un gradiente de annealing de 62°C \pm 5°C por 45 segundos, una extensión de 72°C por 1,5 minutos, y terminado los ciclos una extensión final de 72°C por 5 minutos. Las temperaturas que se probaron fueron: 57°; 57,5°; 58,2°; 59,2°; 60,4°; 61,6°; 62,8°; 63,9°; 65,0°; 66,0°C y 67°C. Para la amplificación del Exón 3 se realizó una reacción de 25 μL de volumen total, usando 15 μL de GoTaq®, 1 μL de cada partidador 10

μM y 20 ng de templado. EL ciclo de la reacción fue igual con una temperatura de aneling de $60,5^{\circ}\text{C}$. Como control negativo se usó la misma mezcla sin templado. Los resultados de PCR fueron corridos en un gel de agarosa 1%, con TBE 1X a 100 V por 40 minutos. Los productos de PCR se purificaron usando el Kit de Promega® Wizard® SV Gel and PCR clean-up start-up.

2.2.5.3. PCR de colonias

Para el PCR de colonia se tomó una pequeña muestra de la colonia que hubiese resultado positiva en la transformación, y se resuspendió en 6 μL de agua libre de nucleasa, bajo condiciones de esterilidad. Las bacterias se lisaron por calor a 95°C por 5 minutos. Posteriormente se procedió a centrifugar los restos celulares en un spinner por 10 minutos, recuperando el sobrenadante con el ADN plasmídico. La mezcla para la reacción se realizó agregando al sobrenadante recuperado 7,5 μL de GoTaq® (Promega) Master Green Mix 2X y 0,75 μL de cada partidor (promotor y reverso) 10 μM . Para los PCR de colonias con el vector pGEM®-T se usaron los partidores T7 promotor y Sp6 reverso. Para los PCR de colonia con el vector pET-JT1,

usado para el subclonamiento del dominio $\alpha 2$, se usaron los partidores T7 promotor y T7 reverso (**Tabla 2**).

Tabla 2. Secuencia de Partidores usados para PCR de colonias de bacterias transformadas con los vectores pGEM®-T y pET-JT1.

Partidor	Secuencia (5'-3')
<i>T7 Promotor</i>	TAATACGACTCACTATAGGG
<i>Sp6 Reverso</i>	CTATAGTGTCACCTAAAT
<i>T7 Reverso</i>	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

La reacción se llevó a cabo usando el siguiente programa: un calentamiento inicial de 94°C por 2 minutos, luego 35 ciclos de un calentamiento de 94°C por 30 segundos seguido por annealing de 55°C por 1 minuto y una extensión de 72°C por 2,5 minutos segundos, finalizando el PCR con una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Una vez terminado el PCR se procedió a correr las muestras junto con un marcador molecular de ADN de 100 bp, en un gel de agarosa al 1%, usando TBE 1X, a 100 V por 40 minutos. Los resultados, se revelaron por exposición a luz U.V.

2.2.6. Unión de regiones variables por ISA-PCR

Para lograr la unión de las regiones variables de cadena liviana y pesada y formar una única cadena (scFv), se llevó a cabo un ISA-PCR³³ que consiste en dos PCR simultáneos, donde el primero amplifica cada cadena (Ligera y pesada) por separado con un sólo partidador, de tal manera que para la cadena ligera se utiliza un partidador Forward y para la cadena pesada un partidador Reverso y el segundo permite la unión de las dos cadenas por hibridación de las secuencias complementarias que se introdujeron con los partidores en el primer PCR, realizado con par de partidores como se describió anteriormente, para luego completar la secuencia complementaria. En una primera instancia, se usó la TaqPlatinum ADN Polimerasa de Thermo Fisher®, donde la mezcla de reacción para el primer PCR consistió en 2,5 µL de Buffer 10X; 0,75 µL de MgCl₂ 59 mM; 0,5 µL de dNTP 10 mM y 0,5 µL de Partidor 10 µM, ADN y agua libre de nucleasas. Cuando se mezclaron las reacciones de cadena pesada y liviana se agregó 0,2 µL de TaqPlatinum ADN Polimerasa y 1µL de dNTP 10 mM de Thermo Fisher®. En segunda instancia, se usó la GoTaq Green Master Mix de Promega®, donde la mezcla de reacción para el primer PCR consistió en 12,5 µL de GoTaq Master Green 2X, 0,5 µL de partidador 10 µM, ADN y agua libre de nucleasas. Cuando se mezclaron las

³³ Del inglés *Independent Strand Amplification*.

reacciones de cadena pesada y liviana se agregó 12,5 μL de GoTaq Master Green 2X. Para las primeras pruebas, se usó como templado una mezcla de 6,25 ng de ADN de cada uno de las muestras por donante, hasta llegar a una cantidad total de 50 ng. Luego, se usó 50 ng de una mezcla heterogénea concentrada de ADN, de cada uno de los donantes. El volumen total de reacción varió dependiendo de cada una de las mezclas de cuan diluido estaba el ADN.

La reacciones, se llevaron a cabo siguiendo lo descrito por Sotelo y colaboradores en el 2012 (31), donde el primer PCR para generar cadenas simples de ADN, para VH y VL, con un solo partidior, se realizó de la siguiente manera: una primera disociación de 95 °C por 5 minutos, posteriormente 30 ciclos de disociación de 95°C por 45 sg, seguidos por un aneling de 54°C por 45 segundos y una extensión de 72°C por 45 sg, y para finalizar el PCR una extensión de 72°C por 1 minuto. Aquí las muestras se colocaron en un reposo de 30°C mientras se hacían las mezclas de reacciones entre VH y VL. Para el segundo PCR de unión entre VH y VL, para formar una única cadena de regiones variables (scFv) se siguió de la siguiente manera: una primera disociación de 95 °C por 2 minutos, posteriormente 30 ciclos de disociación de 95°C por 45 segundos, seguidos por un aneling de

60°C por 45 segundos y una extensión de 72°C por 1 minuto. Para finalizar el PCR una extensión de 72°C por 10 minutos.

Una vez terminado el PCR se procedió a correr las muestras junto con un marcador molecular de ADN de 100 bp, en un gel de agarosa al 1%, usando TBE 1X, a 100 V por 40 minutos. La banda de amplificación se espera que sea entre 7500 y 800 bp como se publicó previamente, pues no se contaba con un control positivo para cada par de partidores.

2.2.7. Digestión con enzimas de restricción

2.2.7.1. Digestión enzimática con *EcoRI* y *NheI*

Las digestiones enzimáticas se realizaron con las enzimas *EcoRI* y *NheI* de diferentes proveedores (Promega®, Thermo Scientific™ o FastDigest™ de Thermo Scientific™). Las reacciones se llevaron a cabo, usando un volumen total de reacción de 20 µL con 1 µg de ADN. Al usar las enzimas de Promega® la reacción se llevó a cabo con 2 µL de Buffer E (10X), 0,4 µL de BSA acetilado 10 µg/µL, 0,5 µL de enzima *EcoRI* 12 U/µL, 0,5 µL de enzima *NheI* 10 U/µL y completando el volumen con agua libre de nucleasa. Al usar las enzimas de Thermo Scientific™ se realizó un corte secuencial, en el cual primero se realizó una mezcla usando 2 µL de Buffer Tango 10X, 0,5

μL de enzima *NheI* 10 U/ μL y completando el volumen con agua libre de nucleasa. Una vez terminada la digestión con esta enzima se agregó 2,5 μL de Buffer Tango 10X y 0,5 μL de enzima *EcoRI* 10 U/ μL . Al usar las enzimas FastDigest™ de Thermo Scientific™, la mezcla se realizó con 2 μL de Buffer verde FastDigest 10X, 1 μL de enzima *EcoRI* 10U/ μL , 1 μL de enzima *NheI* 10U/ μL y completando el volumen con agua. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 37°C en un tiempo que varió según la prueba realizada. Las enzimas se desactivaron a una temperatura generalmente mayor a 65°C por 15 minutos.

2.2.7.2. Digestión enzimática con *NdeI* y *XhoI*

Para realizar el corte con enzimas de restricción se usaron las enzimas *NdeI* de Thermo Fisher™ y *XhoI* de Promega®. La reacción de corte se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL donde se agregaron 2 μL de Buffer D de Promega, 0,2 μL de BSA de Promega, 1 μL de cada enzima de restricción y 1 μg de DNA de vector o de Inserto (Exón 3 de MICA), completando el volumen con agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo a 37°C por 4 horas y se desactivaron las enzimas a 65°C por 15 minutos.

El vector digerido se defosforiló usando la fosfatasa CIAP de Invitrogen™. A los productos de la digestión, se le agregó 1 µL de una dilución Fosfatasa 1 U/µL de. La reacción de defosforilación se realizó a 37°C por 15 minutos y se desactivó la enzima a 65°C por 15 minutos.

Los productos de corte se corrieron en un gel de agarosa 1%, con TBE 1X a 100 V por 40 minutos para el inserto y 90 minutos para el vector. Las bandas fueron purificadas usando el Kit de Promega® Wizard® SV Gel and PCR clean-up start-up.

2.2.8. Ligación de ADN a un plásmido

2.2.8.1. Inserción en vector pGEM®-T

Para la inserción de los genes de scFv en el vector pGEM®-T (Promega) se realizó una ligación usando dos relaciones vector:inserto de 1:1 y 1:3. La cantidad de ADN del gen a insertar para una cantidad estándar de vector se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{800 \text{ bp de inserto}}{3015 \text{ bp de vector}} * 50 \text{ ng de vector} * \frac{1 \text{ ó } 3}{1}$$

Suponiendo que el peso molecular promedio de los genes de scFv estaría en los 800 bp. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µL. La mezcla

se realizó agregando 5µL de Buffer de rápida ligación 2X, 1µL de vector pGEM®-T (50 ng), 1µL T4 ADN ligasa (3 unidades/µL), el volumen de inserto correspondiente para 13,17 ng o 39,80 ng (para relaciones vector: inserto 1:1 o 1:3 respectivamente) y completando el volumen con agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo a 4°C toda la noche, para garantizar el mayor número de ligaciones como lo especifica el proveedor.

2.2.8.2. Ligación al Vector pUCH1 D1 y pUCH1 pIIIc

Para generar la genoteca o librería de fagos, los genes de scFv fueron insertados en dos fagómidos de expresión pUCH1 D1 y pUCH1 pIIIc, diseñados en el laboratorio. Estos vectores fueron construidos a partir del vector pUC18 y les permiten la unión a una parte de proteína pIII, en el caso de pUCH1 D1 o a la proteína completa en el caso de pUCH1 pIIIc del fago M13. Además les proporcionan las secuencias de marcaje de hemaglutinina y cola de histidina.

La ligación se realizó agregando: aproximadamente 235 µg de Inserto (librería digerida y purificada), un promedio de 300 µg de vector abierto (digerido y purificado), 4 µL de Buffer T4 ADN ligasa 10X, 2 µL de T4 ADN ligasa 20 U/µL (Thermo Scientific™) y agua libre de nucleasas en

cantidad suficiente para 40 μL e incubando a 25°C por una hora y luego, 14°C por 12 horas.

2.2.8.3. Ligación de Exón 3 de MICA a pET-JT

Inicialmente se realizó una fosforilación del inserto, la cual se llevó a cabo usando la enzima T4 PNK de Thermo Fisher™. La reacción se realizó en un volumen total de 20 μL , en la cual se agregó 1 μL de T4 PNK, 2 μL de Buffer T4 PNK, 2 μL de ATP 10mM con 30 ng de inserto, completando el volumen con agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo a 37°C por 30 minutos.

La ligación del inserto al vector se realizó con ligasa de Invitrogen™. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 μL . El mix se realizó agregando 1 μL de T4 ligasa, 4 μL de buffer ligasa, y una relación 3 a 1 de inserto a vector, es decir 7,61 ng de inserto por cada 50 ng de vector, calculados con la fórmula:

$$\frac{291 \text{ bp de inserto}}{5733 \text{ bp de vector}} * 50 \text{ ng de vector} * \frac{3}{1}$$

El volumen se completó con agua libre de nucleasa. La reacción se realizó a 14°C por 12 horas. Como control positivo de ligación se hizo una reacción

usando vector fosforilado cortado con *XhoI* y como control negativo se hizo una reacción usando un vector defosforilado cortado con las enzimas *NdeI* (Thermo Fisher™) y *XhoI* (Promega®) sin agregar inserto.

2.2.9. Purificación de ADN con glicógeno

Para purificar el ADN producto de la ligación entre la librería de genes de scFv con los fagómidos, se realizó una precipitación usando glicógeno. Brevemente, a la mezcla de reacción se agregaron 4 µL de acetato de sodio 3M, 2 µL de glicógeno grado biología molecular, 40 µL de Isopropanol puro y se mezcló suavemente. Esta mezcla se incubó por 24 horas a -80°C. Pasado el tiempo, se centrifugó a 10.000 RPM por 15 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con 200 µL de etanol al 70% (previamente incubado en hielo) 4 veces, se dejó secar el etanol con la centrifuga SpeedVac y por último, se resuspendió con 10 µL agua libre de nucleasas. Para garantizar la disolución del pellet, se incubó a 37°C por una hora.

2.2.10. Transformación de cepas de *E.coli* quimio competentes

Para conseguir bacterias quimio competentes se realizó un inóculo de 5 mL de LB con la bacteria, el cual se creció toda la noche a 37°C, en agitación. Al

día siguiente, se realizó inóculo 50 mL de medio LB en un Enlermeyer de 250 mL con 1,25 uL del inóculo de la noche anterior y se dejó creciendo a 37°C, en agitación, hasta conseguir una O.D de aproximadamente 0,4 a 600 nm. Al conseguir este crecimiento se trasvasó a tubos Falcon de 50 mL enfriados previamente en hielo, donde se incubó por 15 minutos. Pasado el tiempo, se centrifugó a 3.200 g por 10 minutos a 4°C. Luego de ello, se eliminó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron con 2,5 mL de Buffer 1 por cada tubo Falcon. Luego, se incubó por 15 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 3.200 g por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron con 1,5 mL de Buffer 2 por cada tubo Falcon. Las bacterias quimio competentes se alicuotaron en tubos Eppenderof de 1,5 mL y se almacenaron a -80°C.

Para la transformación de bacterias quimio competentes, a una alícuota de éstas en hielo, se les agregaron 10 µL de solución con ADN de ligación o 1 µL de Vector con inserto. Se incubaron por 30 minutos y pasado el tiempo se realizó un shock térmico de 30 segundos en un baño maría a 42°C. Luego de ello, se incubaron en hielo por 2 minutos como mínimo y al cabo del tiempo se les agregó 250 µL de medio SOC previamente temperado a 37°C. Los cultivos se pusieron en agitación por 1 hora a 37°C. Crecido el cultivo,

se sembró en agar LB/ampicilina o agar LB/ampicilina/IPTG/X-gal para transformaciones con pGEM®-T, de 100 a 250 μ L de cultivo. Todo el proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad junto a un mechero. La placa se dejó creciendo toda la noche a 37°C. Las colonias que resultaron positivas se repicaron en otra placa con agar LB/ampicilina y se dejaron creciendo toda la noche a 37°C.

2.2.11. Producción de proteína recombinante

Para la producción del dominio $\alpha 2$ de manera recombinante, se siguió el protocolo estandarizado por Gutiérrez y colaboradores en el 2019 (55), en el cual se realizó un inóculo de 10 mL de medio LB con ampicilina 100 μ g/mL, en un Falcon de 50 mL con un clon de *E. Coli* BL21 que poseía el vector pET-JT con el Exón 3 de MICA*002. El inóculo se dejó creciendo toda la noche en agitación a 37°C. Con este inóculo, se tomó 5 mL con los que se infectaron 100 mL de medio 2xYT con ampicilina 100 μ g/mL en un Enlermeyer de 500 mL. El cultivo se dejó en agitación por aproximadamente 2 horas hasta alcanzar una O.D de $\sim 0,6$ a 600 nm. Una vez alcanzado este crecimiento, se procedió a inducir la producción de la proteína recombinante agregando 100 μ L de IPTG 1 mM. El cultivo inducido, se dejó en agitación por 2 horas más

a 37°C. Terminado este tiempo, se procedió a centrifugar la totalidad del cultivo en tubo Falcon de 50 mL a 3.200 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet de células se re suspendió con 10 mL de PBS 1X y centrifugado nuevamente a 3.200 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó nuevamente y el pellet se resuspendió en 10 mL de un buffer de lisis a pH 7, al cual se le agregó una punta de espátula de Lisosima (Thermo Fisher™) y 100 µL de coctel de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) y se incubaron las células a temperatura ambiente media hora. Los tubos Falcon con las bacterias, se mantuvieron a -80°C toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se descongelaron en hielo y se procedió a romper las células por sonicación a 12 pulsos por segundo, en 8 ciclos de sonicación de 20 segundos de duración y 40 segundos de receso. El procedimiento se realizó siempre en hielo. Terminado el proceso, se centrifugó a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante de la lisis (SL) se recuperó en un tubo Falcon de 50 mL y se conservó a 4°C hasta ser purificado. EL pellet se re suspendido con 10 mL de buffer de lavado pH 7,0 y se centrifugó nuevamente a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante descartado y el pellet se dejó con Buffer de denaturación pH 7,0 en agitación suave toda la noche a 4°C.

2.2.12. Purificación de proteína recombinante

Para la purificación, en primer lugar se usó una matriz de Níquel que permite la unión con proteínas que posean una cola de histidina. Para ello se mezcló con 1 mL de matriz de NiNTA de Thermo Fisher™ con el sobrenadante de lisis (SL) y se dejó en agitación suave durante 2 horas a 4 °C. Esta matriz, se equilibró previamente agregándole 5 mL de Buffer de Lisis, decantando la matriz y retirando el sobrenadante, proceso que se repitió por 4 veces. Al terminar la incubación de la matriz con el sobrenadante de lisis, se procedió a agregar todo el contenido de la mezcla en una columna de purificación, procurando tomar la totalidad de la matriz. Del líquido que pasó por la columna se recolectó y se marcó como Proteína No Unida (PNU). Una vez agregada la totalidad del contenido del tubo Falcon, se procedió a lavar con 1 mL de Buffer de Lisis, con el fin de recolectar la matriz que no se logró transferir, y agregarla a la columna. Este proceso se repitió por 5 veces y, por último, se procedió a Eluir la proteína unida a la Matriz con Buffer de Elución con Guanidina. Para ello se agregaron alrededor de 1 mL directamente a la columna con la matriz y el eluato, se recolectó y marcó (E1, E2, E3,..). Este proceso se realizó por 5 veces. Al final la matriz se lavó con aproximadamente 10 mL de agua destilada y se almacenó con Etanol al 20

% a 4 °C. Las muestras de la Elución como la Proteína No Unida, se almacenaron a -20°C para su análisis.

En segundo lugar, se realizó una purificación por cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC³⁴). Para ello se usó el equipo ÄKATA Purifier 10 y la columna HisTrap™ HP 1 mL de GE Healthcare. El buffer de unión contenía 20 mM NaPO₄, 0,5 M NaCl y 30 mM de Imidazol, y el buffer de elución contenía 20 mM NaPO₄, 0,5 M NaCl y 500 mM de Imidazol. Para la purificación, los buffers, el agua ultra pura, el etanol 70% y la muestra se filtraron por una membrana de tamaño de poro de 0,2 µM. Previo a la corrida de la muestra, la columna se lavó con aproximadamente 10 mL de agua ultra pura, con el fin de eliminar los rastros de Etanol que pudiese tener. Luego de ello, se equilibró con 10 mL de buffer de unión. Terminado el equilibrio, se inyectó automáticamente 500 µL de una muestra de Lisis celular filtrada. El lavado posterior se realizó con 5 mL de buffer de unión y seguido, se eluyó con 5 mL buffer de elución, sin gradiente. En el proceso de elución se fraccionó el eluyente, recolectando 1 mL de muestra, hasta finalizar el proceso. Luego de ello, se realizó un reequilibrado a la columna, usando 5 mL de

³⁴ Del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*.

buffer de unión. Para almacenar la columna, se realizó un lavado con etanol al 70% filtrado de 10 mL aproximadamente. Todo el proceso se llevó a cabo en un flujo de 0,5 mL/minuto sin superar la presión de 0,3 MPas.

2.2.13. Cuantificación de proteína por Bradford

Para la cuantificación de la proteína se usó el método de Bradford en el cual, la proteína se hace reaccionar con el reactivo de Bradford y se compara con una curva de calibración de BSA. Para ello, se tomaron 5 μ L de cada punto de la curva y de cada muestra, en una placa de 98 pocillos fondo plano, por triplicado. Se añadieron 200 μ L de reactivo de Bradford de BIO-RAD previamente diluido 1 en 5 con agua destilada. Una vez realizada la reacción se procedió a hacer la lectura de la placa a 595 nm.

2.2.14. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE³⁵)

Para realizar el SDS-PAGE, se preparó la mezcla para el gel de corrida de poliacrilamida al 15%. El cual se colocó en las dos placas de vidrio y gelificó a 50°C en una estufa de secado por 10 minutos. A la par, se preparó la mezcla para el gel de resolución de poliacrilamida, el cual se colocó sobre el gel de

³⁵ Del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*.

corrida y gelificado a temperatura ambiente. Antes que éste último gelificara se colocó la peineta para general los pocillos. Cuando el gel completo estuviese gelificado, se retira la peineta y se monta el equipo de corrida, en la cual, se llena la cubeta con buffer de corrida. Una vez montado el gel para la corrida, se colocan no más de 15 μ L de muestra, previamente a mezclados (4:1) con el buffer 4X Laemmli de BIO-RAD, preparado con 2-mercaptoetanol (según indicaciones del proveedor). El marcador usado fue el Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de BIO-RAD, el cual se usó 5 μ L para cada corrida. Las muestras se corrieron a 80V por 40 minutos, hasta que lograr atravesar el gel de apilamiento y por 120 V hasta que el frente de corrida llegara a la parte más baja del gel.

Para la tinción y revelado del SDS-PAGE, se usó una solución de azul de Coomassie, como describen Carrillo y colaboradores (39). La solución de tinción estuvo compuesta por 50% Metanol, 10% ácido acético, 40% agua destilada y azul de Coomassie 0,05%. La cual se agregó hasta cubrir completamente el gel, en un recipiente con tapa, el cual se dejó en agitación toda la noche. Al día siguiente se retiró la solución de tinción y se agregó una solución compuesta por 50% Metanol, 10% ácido acético y 40% agua destilada (Solución 1) para desteñir el gel, la cual se dejó por 2 horas.

Posteriormente, se retiró la Solución 1, y se agregó una solución compuesta por 5% Metanol, 7% ácido acético y 88% agua destilada (Solución 2), la cual se dejó en agitación hasta observar transparencia en el gel. Al finalizar, se retiró la Solución 2, y el gel fue secado al vacío sobre papel de filtro.

2.2.15. Dot-Blot

Para realizar el Dot-blot de reconocimiento, se sembró directamente sobre una membrana de nitrocelulosa 10 μ L de muestra, sobre puntos diferentes de la membrana, procurando que no se mezclaran entre ellas. De igual forma, se colocó un control con una muestra de MICA recombinante (MICAr) y un control negativo con el buffer de elución. La membrana se colocó cuidadosamente sin ser tocada en un tubo Falcon de 50 mL, al cual se le agregó 15 mL solución bloqueante (PBS 1X-Leche descremada 4%). La membrana, se dejó bloqueando toda la noche en agitación rotativa a 4°C. Al día siguiente, se descartó la solución de bloqueo y la membrana se lavó usando 5 mL de PBS 1X- Tween 20 0,05%, en agitación rotativa por 5 minutos. Este procedimiento de lavado, se repitió 5 veces. La solución de lavado, se descartó y se agregó el anticuerpo primario, un anti-Histidina producido en ratón, a una concentración de 1:5.000 en una solución de PBS

1X-Leche descremada 4%, el cual se dejó en agitación rotativa por aproximadamente 8 horas a 4°C. Al finalizar, se retiró el anticuerpo primario y se repitió el lavado. Posteriormente se agregó, el anticuerpo secundario un anti-IgG de Ratón conjugado con HRP³⁶ en una concentración de 1:10.000 en PBS 1X-Leche descremada 4%, el cual se dejó toda la noche a 4°C en agitación rotativa. Finalmente, se lavó y reveló bajo oscuridad agregando 1,4 mL de la mezcla de sustrato quimio luminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS de Thermo Fisher™, sobre toda la membrana de nitrocelulosa. La luminiscencia se capturó con una lámina fotográfica.

2.2.16. ELISA

2.2.16.1. ELISA de detección Dominio $\alpha 2$

Para reconocer la proteína recombinante producida, se realizaron dos ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA³⁷). Para ambos ensayos, se sensibilizó una placa de 96 pocillos con 100 μ L de la muestra a analizar y se incubaron toda la noche a 4°C. Posterior, se eliminó el contenido de los pocillos y se agregó 100 μ L de PBS 1X-BSA³⁸ 1% (Albumina de suero

³⁶ Del inglés *Horseradish Peroxidase*.

³⁷ Del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

³⁸ Del inglés *Bovine Serum Albumin*.

bovino) como proteína bloqueante y se incubó por 1 hora a 37°C. Pasado el tiempo se lavó cada pocillo con 200 µL de PBS 1X-Tween 20 0,05% por 3 repeticiones.

Para un ELISA, se agregó 100 µL a cada pocillo del anticuerpo primario anti-histidina (Invitrogen™) producido en ratón en una concentración 1:5.000 en PBS 1X-BSA 1%. Éste se incubó a 37°C por 1 hora. Luego de ello, se eliminó el contenido y se realizó un lavado con PBS 1X-Tween 20 0,05% con 5 repeticiones. Adicionalmente se agregó 100 µL del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Invitrogen™) a 1:5.000, que fue incubado a 37°C por 1 hora. Pasado el tiempo se eliminó el contenido y se lavó con 7 repeticiones.

Para el segundo ELISA, se agregó 100 µL a cada pocillo del anticuerpo anti-MICA policlonal biotinilado (Invitrogen™), en una concentración 1:4.000 en PBS 1X-BSA 1%. Éste se incubó a 37°C por 1 hora. Luego de ello, se eliminó el contenido y se realizó un lavado con 5 repeticiones. Adicionalmente se agregó 100 µL de estreptavidina conjugado con HRP (Invitrogen™) a 1:4.000, que se incubó a 37°C por 1 hora. Pasado el tiempo se eliminó el contenido y se lavó con 7 repeticiones.

Finalmente para ambos ELISA, se agregó 50 μL del sustrato TMB³⁹ de Thermo Fisher™, el cual se dejó reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente por 5 minutos. La reacción se paró con solución finalizadora (Ácido sulfúrico 2M). La señal asociada a la reacción se midió a 450 nm de longitud de onda en un lector de ELISA (Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HTX).

2.2.16.2. ELISA de Fagos con scFv

Para la identificación de los clones que tenían capacidad de unión, se realizó un ELISA identificando la proteína IV del fago M13. Para ello se sensibilizaron placas de microtitulación con 100 μL de MICAr, MICArS/H (MICA recombinante sin cola de Histidina) y la Elución del dominio $\alpha 2$ de la columna de NiNTA, a concentraciones de 40, 40 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, en TBS o con únicamente el buffer para los controles negativos. La placa se dejó sensibilizar toda la noche a 4°C. Al otro día, se retiró el contenido de los pocillos y se bloqueó con 200 μL TBS-BSA 1% por 1 hora a 37°C. Pasado el tiempo se eliminó el contenido de los pocillos y se lavó 3 veces con 100 μL de TBS-Tween 20 0,05%. Posteriormente, se agregó

³⁹ 3,3',5,5' tetrametilbenzidina

100 μ L de fago previamente purificado y resuspendió en TBS-BSA 1%. El fago se dejó incubar por 2 horas a 37°C. Terminado el tiempo, se retiró el contenido y se lavó 4 veces. Luego, se agregó 100 μ L del anticuerpo Anti-M13 producido en ratón (GE Healthcare Life Sciences) a una concentración de 1:2.500 en TBS-BSA 1%. Se dejó incubar por 2 horas a 37°C. Posteriormente, se retiró el contenido y se lavó 5 veces. Se agregó 100 μ L de anticuerpo Anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Invitrogen™), en una concentración de 1:2.500 en TBS-BSA 1% y se incubó por 1 hora a 37°C. Terminado el tiempo, se retiró el contenido y se lavaron 6 veces los pocillos. Finalmente, se reveló con 50 μ L del sustrato TMB™ de Thermo Fisher, el cual se dejó reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente por 10 minutos. La reacción se paró con solución finalizadora (Ácido sulfúrico 2M). Las lecturas se realizaron a 450 nm de longitud de onda.

Para las curvas de reacción, se sensibilizaron dos diferentes placas por triplicado para cada clon a evaluar, con 100 μ L de MICAr y dominio α 2 de MICA (Purificado por FPLC) en concentraciones de 20, 10, 5 y 2,5 μ g/mL diluidos en buffer bicarbonato. El procedimiento fue el mismo mencionado anteriormente con la diferencia que se agregó 50 μ L de fago a cada punto y se incubó por 1 hora a 37°C, en lugar de 100 μ L e incubar por 2 horas.

También, el anticuerpo Anti-M13 producido en ratón (GE Healthcare Life Sciences) se incubó solamente por 1 hora. Además, el revelado con el sustrato TMB™ de Thermo Fisher se realizó a los 5 minutos.

2.2.16.3. ELISA de unión MICA-NKG2D

Para detectar la unión de MICA con NKG2D, mediante un ELISA, se sensibilizó una placa de microtitulación con 100 µL de MICA recombinante sin cola de Histidina (MICArS/H) en concentraciones de 40; 20; 10, 5; 2,5; 1,25; 0,625 y 0,3125 µg/mL en PBS 1X. Se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se descartó el contenido y se agregó 200 µL de PBS 1X-BSA 1% para bloquear la placa. El bloqueo se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente, se descartó el contenido y se lavó con 200 µL de PBS 1X-Tween 20 0,05% (PBS-T). El lavado se repitió 5 veces. Posteriormente se le agregó 100 µL de NKG2D recombinante en concentraciones de 20, 10, 5 y 2,5 µg/mL en PBS 1X-BSA 1%. El NKG2D se dejó incubar por 2 horas a 37°C. Pasado el tiempo se retiró el contenido y se lavó 6 veces con PBS-T. Luego, se añadió 100 µL de un anticuerpo anti-Histidina producido en ratón, en una concentración de 1:5.000 en PBS 1X-BSA 1%. El anticuerpo primario se dejó incubar 1 hora a 37°C. Al finalizar se descartó el contenido y se lavó

8 veces con PBS-T. Como anticuerpo secundario se agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP, en una concentración de 1:5.000 en PBS 1X-BSA 1% y, se incubó por 1 hora a 37°C. Al finalizar se descartó el contenido y se lavó 8 veces con PBS-T. Finalmente, se reveló con 50 µL del sustrato TMB™ de Thermo Fisher, el cual se dejó reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente por 5 minutos. La reacción fue detenida con solución finalizadora (Ácido sulfúrico 2M). Las lecturas fueron realizadas a 450 nm de longitud de onda.

Para la estandarización con NKG2D biotinilado, sensibilizó una placa de microtitulación con 100 µL de MICA recombinante (MICA_r) y de dominio α2 obtenido a través de FPLC, ambas proteínas en concentraciones de 2,5; 1,25; 0,625 y 0,3125 µg/mL en PBS 1X. Se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se descartó el contenido y se agregó 200 µL de PBS 1X-BSA 1% para bloquear la placa. El bloqueo se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente se descartó el contenido y se lavó con 200 µL de PBS -T. El lavado se repitió 5 veces. Posteriormente se le agregó 100 µL de NKG2D recombinante conjugado con biotina (NKG2D_rBiot) en una concentración de 5 µg/mL en PBS 1X-BSA 1%. El NKG2D_rBiot se dejó incubar por 2 horas a 37°C. Pasado el tiempo se retiró el contenido y se lavó 6 veces con PBS-T.

Luego, se añadió 100 μ L de Estreptavidina conjugada con HRP en una concentración de 1:4.000 en PBS 1X-BSA 1%. La Estreptavidina se dejó incubar 1 hora a 37°C. Al finalizar se descartó el contenido y se lavó 8 veces con PBS-T. Finalmente, se reveló con 50 μ L del sustrato TMB™ de Thermo Fisher, el cual se dejó reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente por 3 minutos. La reacción fue detenida con solución finalizadora (Ácido sulfúrico 2M). Las lecturas fueron realizadas a 450 nm de longitud de onda.

2.2.16.4. ELISA de desplazamiento MICA-NKG2D

Inicialmente, se realizó un ELISA de desplazamiento, usando un anticuerpo dirigido contra el dominio α 1 de MICA. Para este experimento, se sensibilizó una placa de microtitulación con 100 μ L MICArS/H en una concentración de 5 μ g/mL en PBS 1X. Se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se descartó el contenido y se agregó 200 μ L de PBS 1X-BSA 1% para bloquear la placa. El bloqueo se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente se descartó el contenido y se lavó con 200 μ L de PBS-T. El lavado se repitió 4 veces. Posteriormente, se le agregó 50 μ L de NKG2Dr en una concentración de 2,5 μ g/mL en PBS 1X-BSA 1%, y sobre el mismo se agregó 50 μ L del anticuerpo monoclonal anti- α 1 en concentraciones de 1,2 y 0,6, ng/mL en PBS 1X-BSA

1%. El NKG2Dr y el anticuerpo se dejaron incubar por 2 horas a 37°C. Pasado el tiempo se retiró el contenido y se lavó 6 veces con PBS-T. Para la detección de la unión MICA con NKG2D, se agregó 100 mL de un anticuerpo anti-Histidina producido en ratón, en una concentración de 1:5.000 en PBS 1X-BSA 1%. Al finalizar se descartó el contenido y se lavó 8 veces con PBS-T. Como anticuerpo secundario se agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP, en una concentración de 1:5.000 en PBS 1X-BSA 1%. Se dejó incubar 1 hora a 37°C. Al finalizar se descartó el contenido y se lavó 8 veces con PBS-T. Finalmente, se reveló con 50 µL del sustrato TMB™ de Thermo Fisher, el cual se dejó reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente por 3 minutos. La reacción fue detenida con solución finalizadora (Ácido sulfúrico 2M). Las lecturas fueron realizadas a 450 nm de longitud de onda.

Por otra parte, para probar si los clones de los fagos lograban desplazar la unión de NKG2Dr a MICA o al dominio $\alpha 2$, se realizó un ELISA sensibilizando la placa de microtitulación con 100 µL de MICAr o el dominio $\alpha 2$ purificado de FPLC, en concentraciones de 0,625 µg/mL en PBS 1X e incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente se descartó el contenido y se agregó 200 µL de PBS 1X-BSA 1% para bloquear la placa. El bloqueo se

incubo a 37°C por 1 hora, se descartó el contenido y se lavó con 200 µL de PBS 1X-Tween 20 0,05%. El lavado se repitió por 4 veces más. Posteriormente se le agregó 50 µL de NKG2DrBiot en una concentración de 5 µg/mL en PBS 1X-BSA 1%, y sobre el mismo se agregó 50 µL de solución de fagos directa o en diluciones a la mitad y a un cuarto en PBS 1X-BSA 1%. El NKG2DrBiot y los fagos se dejaron incubar por 2 horas a 37°C. Pasado el tiempo se retiró el contenido y se lavó por 6 veces con PBS-T. Luego, se añadió 100 µL de Estreptavidina conjugada con HRP en una concentración de 1:4.000 en PBS 1X-BSA 1%. La Estreptavidina se dejó incubar 1 hora a 37°C. Al finalizar, se descartó el contenido y se lavó por 8 veces con PBS-T. Finalmente, se reveló con 50 µL del sustrato TMB™ de Thermo Fisher, el cual se dejó reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente por 3 minutos. La reacción fue detenida con solución finalizadora (Ácido sulfúrico 2M). Las lecturas fueron realizadas a 450 nm de longitud de onda.

2.2.17. Paneo de fagos

Para el paneo de fagos, es decir, la selección de los clones con mayor afinidad hacía un antígeno, se realizó con la técnica de inmovilización en placa, descrita previamente por Sotelo y colaboradores en el 2012 (31).

Inicialmente para obtener la librería de Fagos, se realizó una amplificación de los mismos. Las bacterias *E.coli* DH5 α F⁺ y *E.coli* DH5 α F⁺/M13, transformadas con las librerías D1 y pIIIc respectivamente, se hicieron crecer en dos tubos Falcon de 50 mL con 10 mL de medio SB a 37°C en agitación, durante 30 minutos. Posteriormente, se agregó a cada tubo Falcon, 2 μ L de ampicilina 100 mg/mL y se dejó en agitación a 150 rpm 30 minutos más a 37°C. Posterior a ello, se agregó 3 μ L de ampicilina (United State Biological) 100 mg/mL y se dejó a 37°C en agitación a 150 rpm por 30 minutos más, con el fin de adaptar las bacterias al antibiótico. Al término del tiempo, se agregaron a los cultivos 40 mL de medio SB precalentado, y se le añadió a cada cultivo, 40 μ L de ampicilina 100 mg/mL. Al cultivo que contenía la librería D1, se infectó con 2 μ L de Fago Helper M13K07 de New England Biolabs®. Los dos cultivos se dejaron sin agitación por 30 minutos a 37°C. Ambos cultivos, se transfirieron a dos Enlermeyer de 200 mL, y se incubaron a 37°C en agitación por 1 hora. Finalmente a cada Enlermeyer, se le agregó 25 μ L de kanamicina (United States Biloical) 100 mg/mL. Se dejaron incubando toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, la mitad de cada cultivo se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó a 3.500 g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante, se recuperó en otro tubo Falcon de

50 mL. Este proceso se repitió con el restante cultivos. Los sobrenadantes se mezclaron con 2 g de PEG-8000 y 1,5 g de NaCl. La mezcla se agitó a 20 rpm por rotación a 4°C por 30 minutos hasta diluir completamente los sólidos. Luego, la mitad de cada mezcla se transfirió a un tubo de alta centrifugación, y se centrifugó a 15.000 g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante, se descartó teniendo cuidado de no resuspender el pellet blanquecino y el proceso se repitió con la otra mitad de la mezcla. Con el pellet completo, los tubos se dejaron escurrir por 15 minutos sobre papel absorbente para eliminar la mayor cantidad de medio. Posteriormente, los pellets se resuspendieron en 1 mL de TBS-BSA 1 %- Azida de sodio 0,02%. El total de los fagos, se filtraron primero por un filtro de 0,4 μm de tamaño de poro y seguidamente por uno de 0,22 μm . Las librerías de fagos recién purificadas y filtradas se mantuvieron en hielo hasta ser usadas para el paneo. Para el paneo, inicialmente en una placa de 96 pocillos de fondo plano, se sensibilizaron pocillos con 100 μL de MICA producido recombinante en *E.coli* (MICAr) el cual está construido con los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y una cola de Histidina; con una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ en TBS. Además, otros pocillos fueron sensibilizados únicamente con 100 μL de TBS, para observar las reacciones cruzadas posibles en los clones contra la proteína bloqueante.

La sensibilización se dejó a 4°C toda la noche. Al día siguiente, los pocillos sensibilizados se descartó el contenido y se bloqueó cada pocillo con 200 µL de TBS-BSA 1% para la 1° ronda de paneo, TBS-soja al 1% para la 2° ronda de paneo y TBS-Leche descremada 4% para la 3° ronda de paneo. El bloqueo se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente se descartó la solución bloqueante y se lavó con 200 µL de TBS-Tween 20 0,05% dos veces. Luego, se agregó 100 µL de cada librería en los dos pocillos (uno que contenía muestra de MICAr y otro sin ella). La librería se dejó incubar a 37°C por 2 horas. Posterior a esto, se lavaron los fagos que no consiguieron unirse, agregando 200 µL de TBS-Tween 20 0,05%, pipeteando arriba y abajo varias veces e incubando a temperatura ambiente por 1 minuto. Para la primera ronda se realizó por 5 veces y las demás fueron por 10 veces. Una vez lavados los fagos, se procedió a eluir los fagos con capacidad de unión, para ello se agregó 100 µL glicina 100mM a pH 2,2, y se incubó por 10 minutos a 37°C. Al terminar el tiempo la solución, se neutralizó con 6 µL de Tris base 2 M. Con los fagos eluidos, se infectaron 2 mL de cultivo de *E.coli* DH5α F⁺ y *E.coli* DH5α F⁺/M13 previamente crecidos, hasta una O.D de 1 a 600 nm en medio SB. Estos se dejaron incubar a 37°C sin agitación por 15 minutos.

Finalmente, con este cultivo se continuó con el proceso mencionado anteriormente para la producción de fagos.

Para la cuantificación de los fagos posterior al paneo, se tomó 2 μL del cultivo infectado con la librería pasados los 15 minutos y se realizó una dilución en 198 μL de medio SB (dilución 10^{-2}), del cual se sembraron 10 y 100 μL en placas de agar LB/ampicilina. Las placas se dejaron incubando toda la noche a 37°C . Se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) que crecieron sobre la placa.

3. OBJETIVO ESPECÍFICO I

CONSTRUIR UNA LIBRERÍA DE SCFV DE FAGOS CON LAS REGIONES VARIABLES DE INMUNOGLOBULINAS HUMANA

3.1. Resultados

Luego del reclutamiento de los donantes sanos, los cuales firmaron su consentimiento informado, se extrajo la muestra de sangre periférica y con ello, se realizó la extracción de ARN total (**Tabla 3**). Con cada una de estas muestras de ARN, se realizó la síntesis de ADN complementario usando un partidador oligo dT que permite la síntesis de ADNc del ARN mensajero (ARNm).

Tabla 3. Concentraciones de RNA total.

Sample Read#	260	280	260/280	ng/ μ L	Mean	CV (%)
RNA Persona 1	1,456	0,736	1,978	1164,405	1165,503	0,133
	1,458	0,739	1,973	1166,6		
RNA Persona 2	1,753	0,963	1,821	1402,406	1466,042	6,139
	1,912	1,03	1,857	129,678		
RNA Persona 3	1,565	0,84	1,863	1252,019	1117,587	17,011
	1,229	0,674	1,824	983,156		
RNA Persona 4	3,506	2,568	1,365	2804,437	219,266	16,008
	2,793	1,599	1,747	2234,095		
RNA Persona 5	0,0857	0,489	1,754	685,634	739,581	10,316
	0,992	0,555	1,786	793,529		

RNA Persona 6	1,932	1,036	1,865	1545,481	1533,803	1,077
	1,903	1,014	1,876	1522,125		
RNA Persona 7	2,117	1,165	1,817	1693,853	2280,731	36,391
	3,585	2,374	1,51	2867,609		
RNA Persona 8	2,467	1,391	1,773	1973,216	2318,817	21,078
	3,331	2,094	1,591	2664,418		

Con cada una de las muestras de ADNc obtenidas se realizó un PCR para amplificar las regiones variables de la cadena pesada gamma y de la cadena liviana kappa (**Figura 5**). Como control negativo se usó agua como templado para verificar que no hubiese contaminación en los reactivos con ADN. Como puede observarse la amplificación en la mayoría de las muestras fue muy reducida. Esto se replicó al usar los partidores para la amplificación de las cadenas Mu y con el partidador VIgKFor03 (datos no mostrados). Por ello, se realizó un segundo PCR usando los productos del primer PCR. Los resultados de algunas muestras se observan en la **Figura 6**, desde donde se cortaron las bandas amplificadas entre los peso 400 a 500 bp y se purificados los ADN. Los resultados del ADN obtenido se muestran en la **Tabla 4**. Con estas muestras de ADN se procedió a unir las regiones variables a través de la metodología descrita en materiales y métodos de ISA-PCR, donde primero

se determinaron las condiciones óptimas para realizar esta amplificación (Figura 7), las cuales correspondieron al uso de la enzima GoTaq (Promega®) y 100 ng totales de ADN.

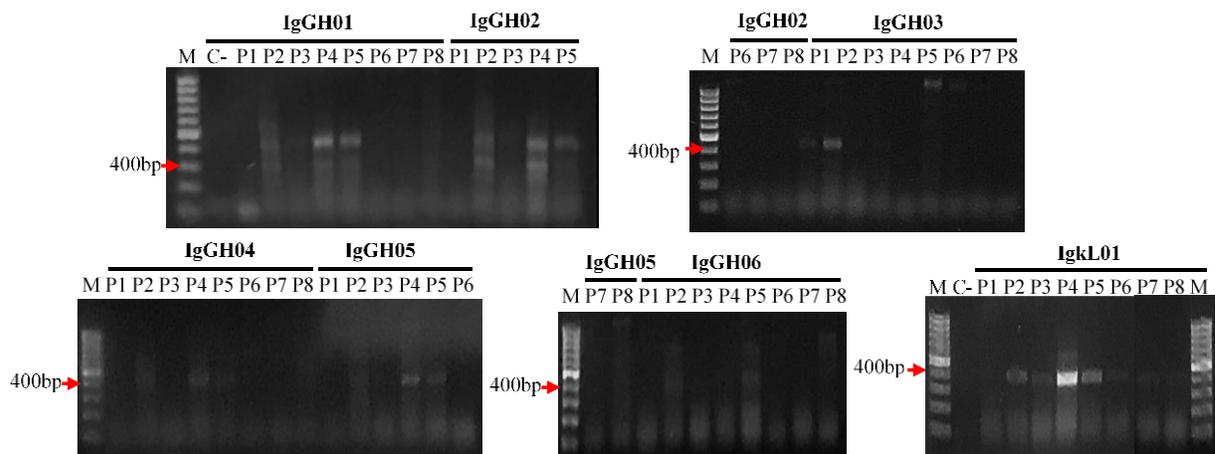


Figura 5. Amplificación región variables (VR). Productos de PCR de todas las muestras de ADNc (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 y P8) usando las parejas de partidores VIgHFor 01L, 02L, 03L, 04L, 05L y 6L con IgGRev y VIgKFor01 con CIgKRev01L. El marcador de peso molecular usado fue de 100 bp. El control negativo (C-) corresponde a una reacción con agua como templado. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X a 100V por 40 min.

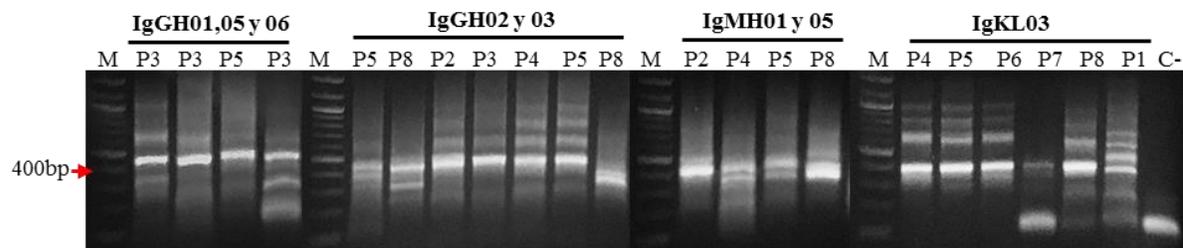


Figura 6. Productos de reamplificación de VR. Resultados de algunas muestras de la segunda amplificación de las VR. El marcador de peso molecular usado fue de 100 bp. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X a 100V por 40 min.

Con las condiciones para el ISA-PCR estandarizadas, se procedió a realizar una prueba de unión de los genes VR amplificados usando una mezcla

homogénea de todas las muestras de ADN obtenidas (**Figura 8**), observándose muy poca amplificación de ADN de aproximadamente 800pb.

Tabla 4. Concentraciones de ADN [ng/μL] de la amplificación final de VR.

Persona	IgG						IgM			IgK	
	VH01	VH02	VH03	VH04	VH05	VH06	VH01	VH05	VH06	VL 01	VL03
1	2,85	2,701	3,755	3,017	9,559	5,05	*	0,126	*	2,672	1,655
2	1,583	7,351	5,41	8,86	2,702	8,946	4,131	7,726	3,67	13,288	14,3
3	7,502	3,2065	7,91	4,312	9,548	4,041	*	5,152	7,177	10,704	9,194
4	5,12	14,381	3,843	6,885	2,628	12,069	6,16	6,674ig	5,7	13,809	10,769
5	1,586	2,836	8,424	5,41	7,539	7,449	6,66	5,728	2,162	22,401	9,64
6	5,818	5,717	1,718	3,737	7,037	8,653	3,159	14,701	5,675	7,669	9,189
7	3,332	1,7	4,676	1,7	3,638	6,581	1,146	3,162	4,146	4,6575	2,638
8	3,617	8,407	5,824	16,517	5,106	1,367	4,682	6,233	2,657	6,694	12,244

* Muestras en las cuales no se logró obtener ADN amplificado. El ADN se purificó de gel a través del Kit de Promega® Wizard® SV Gel and PCR clean-up start-up y la concentración del ADN se midió a través del lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HTX.

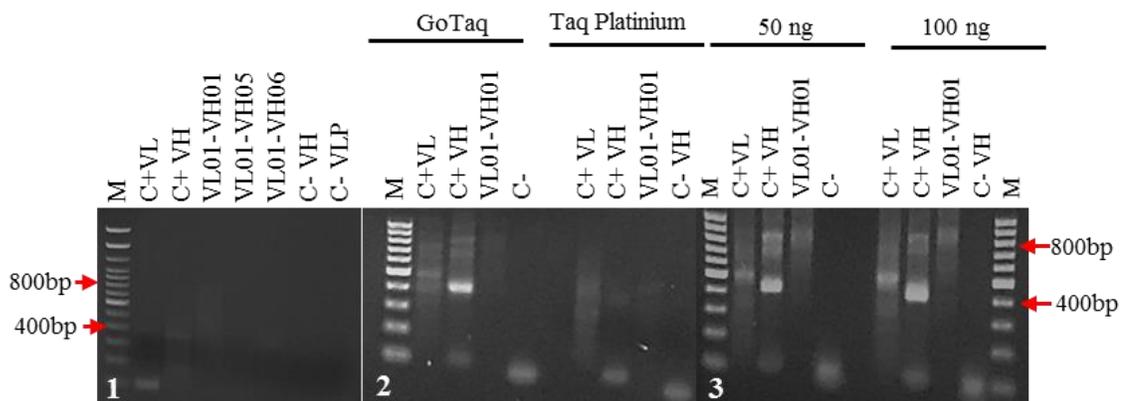


Figura 7. Estandarización de condiciones para ISA-PCR. El 1° gel muestra los resultados del ISA-PCR usando TaqPlatinum (Thermo Fisher®) y los partidores VlgKFor01 e IgGRev. El 2° gel muestra una prueba comparativa entre la amplificación con GoTaq (Promega) y Taq platinum. El 3° gel muestra una prueba comparativa de un ISA-PCR con GoTaq con 50 ng y 100 ng de ADN usado. El control positivo C+VL corresponde a una reacción usando los partidores VlgHFor01L e IgGRev, el control positivo C+VH a una

reacción usando los partidores VIgKFor01 y CIgKRev01L; y el control negativo a una reacción sin ADN, sin y con todos los partidores. El marcador de peso molecular usado fue de 100 bp. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X a 100V por 40 min.

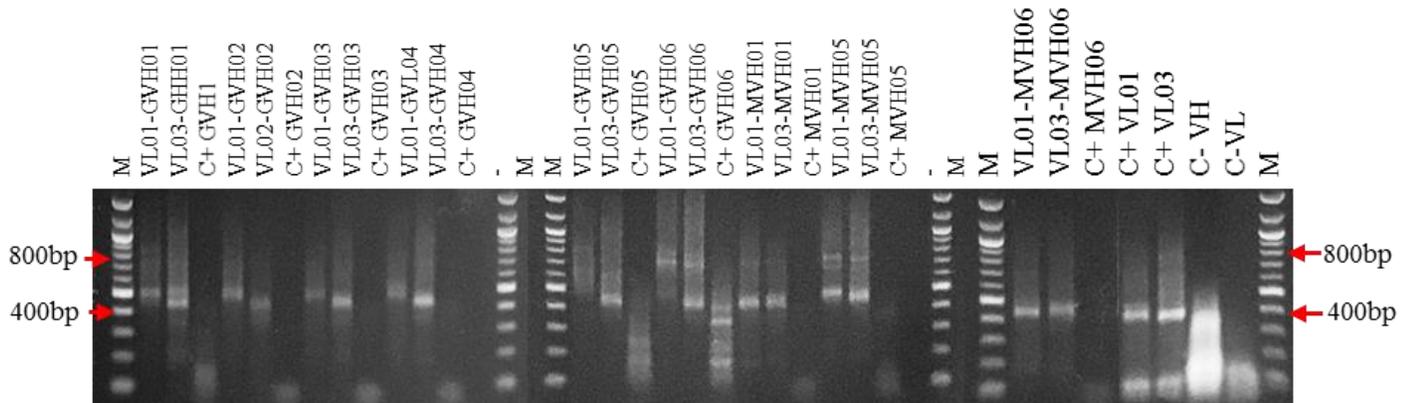


Figura 8. Resultados ISA-PCR con mezcla homogénea. Cada muestra se realizó con 50 ng de ADN mezclado en cantidades igualitarias de cada uno de las muestras amplificadas de los mismos partidores. El control positivo C+GVH corresponde a la reacción usando los partidores VIgHFor01L-06L junto con IgGRev/IgMRev. El control positivo C+VL01 y 03 corresponde a la reacción con los partidores VIgKFor01,03 con CIgKRev01L. Los controles negativos C- VH y C-VL corresponde a una reacción sin ADN. El marcador de peso molecular usado fue de 100 bp. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X a 100V por 40 min.

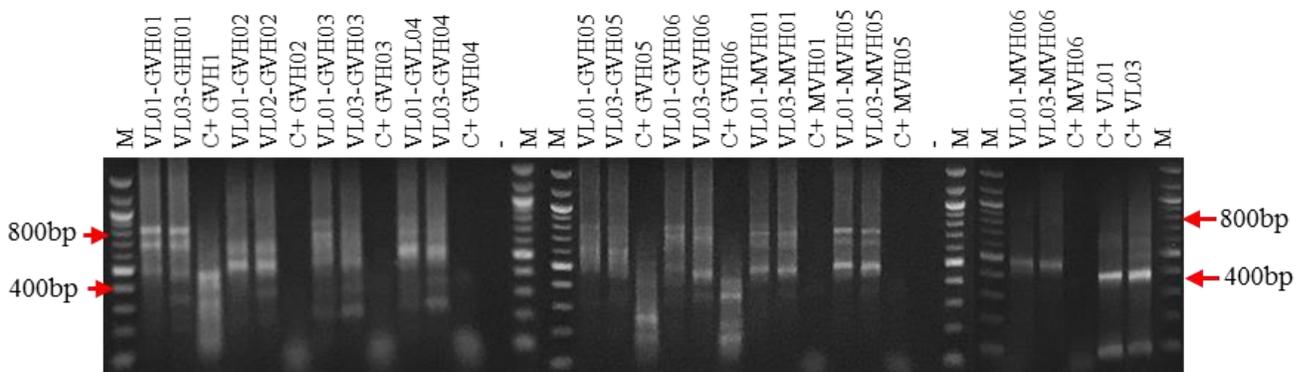


Figura 9. Resultados ISA-PCR con mezcla homogénea de algunas muestras. Se seleccionó las muestras que superaban los 4 ng/μL y se mezcló de manera homogénea hasta conseguir 50 ng. El control positivo C+GVH corresponde a la reacción usando los partidores VIgHFor01L-06L junto con IgGRev/IgMRev. El control positivo C+VL01 y 03 a la reacción con los partidores VIgKFor01,03 con CIgKRev01L. El marcador de peso molecular usado fue de 100 bp. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X a 100V por 40 min.

Al observarse una baja formación de genes de scFv, que estarían presente alrededor de los 800 bp, se realizó una segunda prueba, en la cual se realizó una mezcla de ADN de las muestras que tenían una concentración superior a 4 ng/μL (**Figura 9**). De igual forma, se observó una baja formación de genes de scFv, por lo que se decidió hacer una mezcla completa usando el ADN amplificado por un mismo par de partidores y concentrándolos a través de la centrífuga SpeedVac. Los resultados de la cuantificación se muestran en la **Tabla 5**. Con estas muestras de ADN, se realizó un ISA-PCR donde se logró observar formación exitosa de genes de scFv (**Figura 10**) y con el cual se logró obtener la librería, realizando una extracción de ADN directa de gel, tomando las bandas correspondientes a los pesos entre 800 a 900 bp. Los resultados de la cuantificación de los genes de scFv se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Concentración de ADN mezclado.

Sample Read#	260	280	260/280	ng/μL	Mean	CV (%)
IgMH06	0,021	0,023	0,898	20,95	27,536	33,827
Mix Concet.	0,034	0,022	1,52	34,123		
IgGH04	0,024	0,014	1,67	23,966	26,671	14,342
Mix Concet.	0,029	0,013	2,343	29,376		
IgGH05	0,021	0,012	1,697	21,123	23,624	14,975
Mix Concet.	0,026	0,012	2,101	26,125		

IgGH02	0,015	0,009	1,6	15,103	15,149	0,428
Mix Concet.	0,015	0,009	1,6	15,194		
IgMH05	0,017	0,012	1,495	17,347	18,836	11,18
Mix Concet.	0,02	0,012	1,758	20,325		
IgGH06	0,024	0,014	1,794	24,311	24,805	2,815
Mix Concet.	0,025	0,015	1,739	25,299		
IgGH03	0,02	0,011	1,758	20,117	18,634	11,254
Mix Concet.	0,017	0,01	1,639	17,151		
IgGH01	0,009	0,005	1,674	9,126	8,615	8,39
Mix Concet.	0,008	0,005	1,488	8,104		
IgMH01	0,023	0,013	1,72	22,945	24,519	9,081
Mix Concet.	0,026	0,014	1,809	26,094		
IgkL01	0,025	0,013	1,869	24,965	23,119	11,295
Mix Concet.	0,021	0,009	2,24	21,272		
IgkL03	0,023	0,011	2,022	23,134	24,127	5,822
Mix Concet.	0,025	0,013	1,869	25,121		

* Muestras en las cuales no se logró obtener ADN amplificado. El ADN se purificó de gel a través del Kit de Promega® Wizard® SV Gel and PCR clean-up start-up y la concentración del ADN se midió a través del lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HTX.

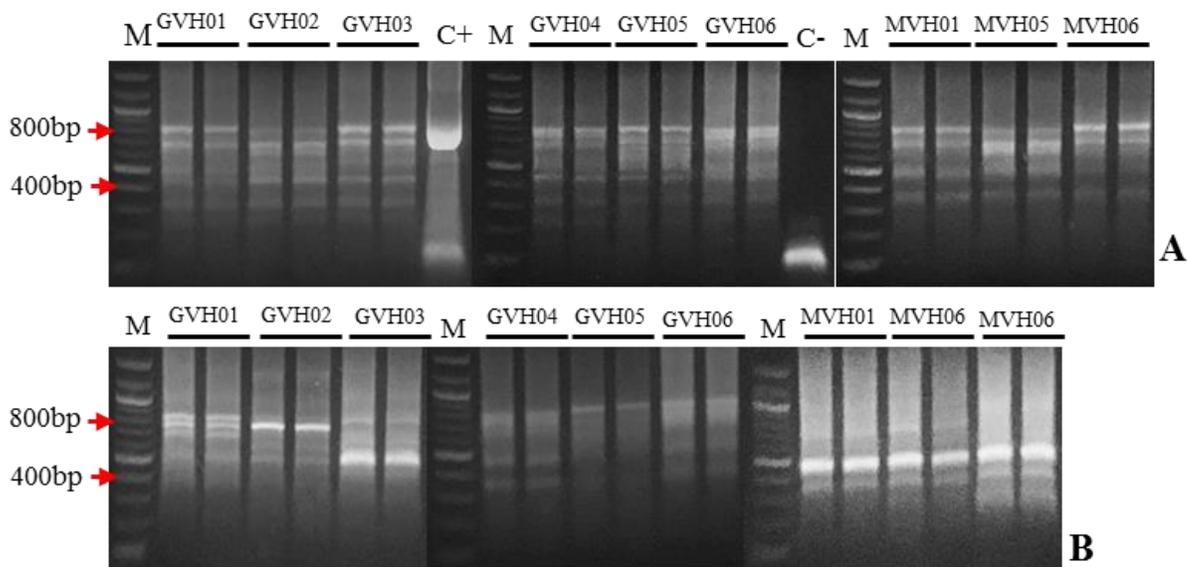


Figura 10. Productos de ISA-PCR de una mezcla de muestras. La parte **A** corresponde a los resultados de las uniones de las cadenas VIGKFor01 con IgGRev e IgMRev. La parte **B** corresponden a los resultados de las uniones de las cadenas VIGKFor03 con IgGRev e IgMRev. Como control positivo se usó una reacción con varios pares de partidores de VH como de VI. Como control negativo se realizó una reacción sin ADN. El marcador de peso molecular usado fue de 100 bp. Los productos se corrieron en un gel de agarosa 1% en TBE 1X a 100V por 40 min.

Tabla 6. Concentraciones de genes de scFv finales.

Muestra	260	280	260/280	ng/ μ L	Promedio	CV (%)
VHL01-GVH01	0,005	0,002	2	4,614	4,126	16,724
Purf Gel	0,004	0,002	1,568	3,638		
VL01-GVH02	0,005	0,003	1,396	4,619	4,145	16,146
Purf Gel	0,004	0,001	2,762	3,672		
VL01-GVH03	0,005	0,003	1,396	4,652	7,162	49,559
Purf Gel	0,01	0,004	2,232	9,671		
VL01-GVH04	0,005	0,002	2	4,657	4,671	0,428
Purf Gel	0,005	0,002	2	4,685		
VL01-GVH05	0,004	0,002	1,568	3,699	3,691	0,288
Purf Gel	0,004	0,002	1,568	3,684		
VL01-GVH06	0,007	0,003	2	6,711	6,202	11,616

Purf Gel	0,006	0,003	1,698	5,692		
VL03-GVH01	0,003	0,001	2	2,64	2,644	0,214
Purf Gel	0,003	0,001	2	2,648		
VL03-GVH02	0,009	0,004	2	8,746	8,235	8,774
Purf Gel	0,008	0,005	1,435	7,724		
VL03-GVH03	0,004	0,002	1,568	3,616	3,627	0,425
Purf. Gel	0,004	0,002	1,568	3,638		
VL03-GVH04	0,005	0,003	1,396	4,619	4,652	1,01
Purf. Gel	0,005	0,002	2	4,685		
VL03-GVH05	0,002	0,001	1,238	1,634	2,638	53,814
Purf. Gel	0,004	0,003	1,094	3,642		
VL03-GVH06	0,009	0,004	2	8,684	9,217	8,176
Purf. Gel	0,01	0,005	1,812	9,75		
VL01-MVH01	0,005	0,003	1,396	4,719	4,71	0,288
Purf. Gel	0,005	0,002	2	4,7		
VL01-MVH05	0,006	0,002	2,432	5,698	4,683	30,646
Purf. Gel	0,004	0,002	1,568	3,668		
VL01-GVH06	0,005	0,002	2	4,652	5,163	14,009
Purf. Gel	0,006	0,003	1,698	5,675		
VL03 MVH01	0,007	0,003	2	6,718	7,221	9,853
Purf. Gel	0,008	0,004	1,768	7,724		
VL03-MH05	0,005	0,002	2	4,614	4,628	0,425
Purif Gel	0,005	0,002	2	4,642		
VL03-MH06	0,008	0,004	1,768	7,614	6,656	20,359
Purif Gel	0,006	0,002	2,432	5,698		

Con los genes de scFv formados se realizó una ligación a un vector pGEM-T® para secuenciar y determinar que las secuencias amplificadas correspondieran a regiones variables de inmunoglobulina. Para esto se tomó una muestra de los genes formados por los partidores VIgKFor01-IgGRev (VL01-GVH01) de IgG y VIgKForL03-VIgMRor (VL03-MVH01) de IgM. Con esta ligación se transformaron bacterias *E.coli* DH5α quimio competentes y de las colonias positivas, se realizó con un PCR de colonia usando partidores T7 promotor y SP6 terminador (**Figura 11**), esperándose observar una banda aproximadamente de 900pb (por la suma del gen de scFv unido más los que aporta el vector).

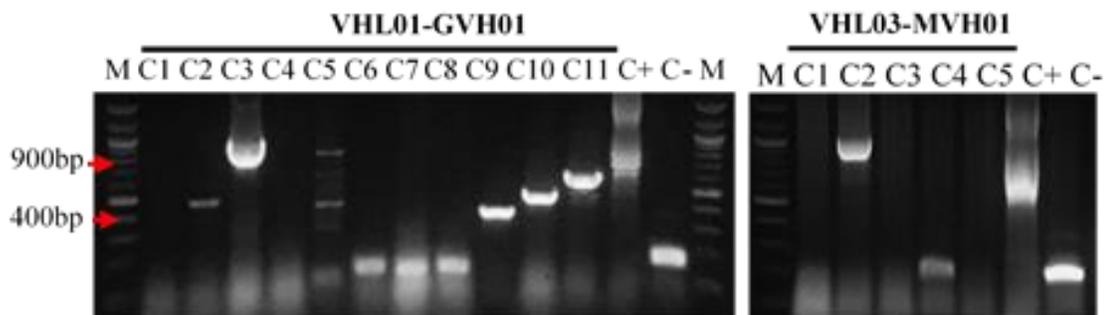


Figura 11. PCR de colonia de clones pGEM-T®. El PCR de colonia se realizó usando un lisado celular de la colonia seleccionada al azar con los partidores externos del vector (T7 Promotor y Sp6 reverso). El volumen de la reacción fue de 15 µL usando GoTaq. El ciclo usado se estandarizó previamente por el laboratorio. Como control positivo C+ t y como control negativo C- se usó una colonia del control positivo y negativo respectivamente de pGEM-T®. El marcador de peso molecular usado fue de 100 bp. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X a 100V por 40 min.

Confirmadas las colonias que presentara una amplificación en los 900 bp, se realizó una purificación del mismo y una secuenciación usando la tecnología Sanger. Las secuencias se analizaron y estudiaron *in silico* dentro del

fagómido de expresión (**Figura 12**). Con todo ello, se logró determinar que la librería podría presentar una baja eficiencia, pues al poseer scFv sin un marco de lectura correcto, la probabilidad de selección sería baja, por ello se decidió construir en simultaneo una librería con un sistema diferente de expresión (**Figura 13**). Por ello, se construyeron dos librerías: una librería construida con el fagómido pUCH1 D1 (Librería D1) y una con el fagómido pUCH1 pIIIc (librería pIIIc). El fagómido pUCH1 D1 corresponde a un vector de expresión que fue diseñado por el laboratorio, derivado del plásmido pUC18, el cual cuenta con un origen de replicación viral ori f1, que le permite el empaquetamiento de este vector en las partículas virales. Además cuenta con los elementos genéticos para la expresión de scFv fusionado a dos marcadores (Histidina y Hemaglutinina) y a una parte de la proteína pIII del fago filamentoso M13, necesaria para la exposición de fago. El fagómido pUCH1 pIII corresponde a una modificación del vector pUCH1 D1, donde la secuencia de la proteína pIII se encuentra completa. Este vector, junto con una cepa de *E.coli* DH5 α F⁺, donde se ha co-transformado el genoma del fago filamentoso M13 sin la proteína pIII, forman un sistema de

expresión de scFv en la superficie de fagos, que excluye secuencias de genes con marcos de lecturas incorrectos.

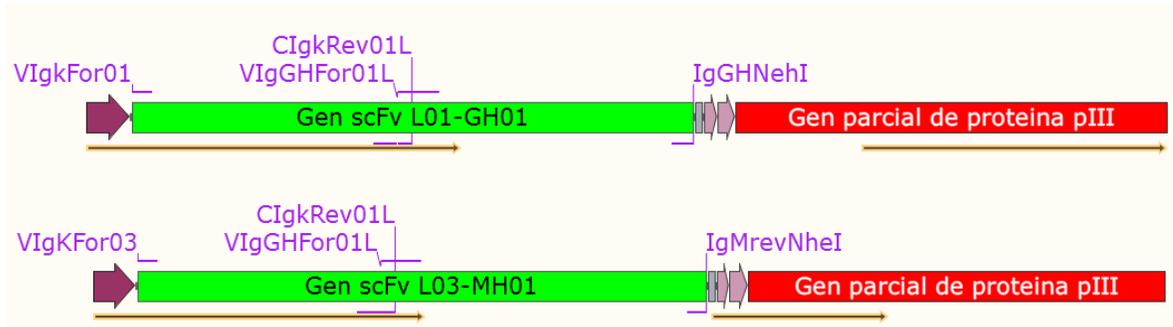


Figura 8. Análisis de marco de lectura de secuenciaciones en pUCH1. La figura muestra el análisis de marco de lectura *in silico* de los “genes” de scFv secuenciados dentro del vector de expresión pUCH1. La flecha naranja representa el posible marco de lectura al ser ligado al vector pUCH1. La secuenciación se analizó usando diferentes programas entre ellos el Snap Gene y ApE. La secuencia obtenida de la secuenciación se corroboró con el Electroferograma.

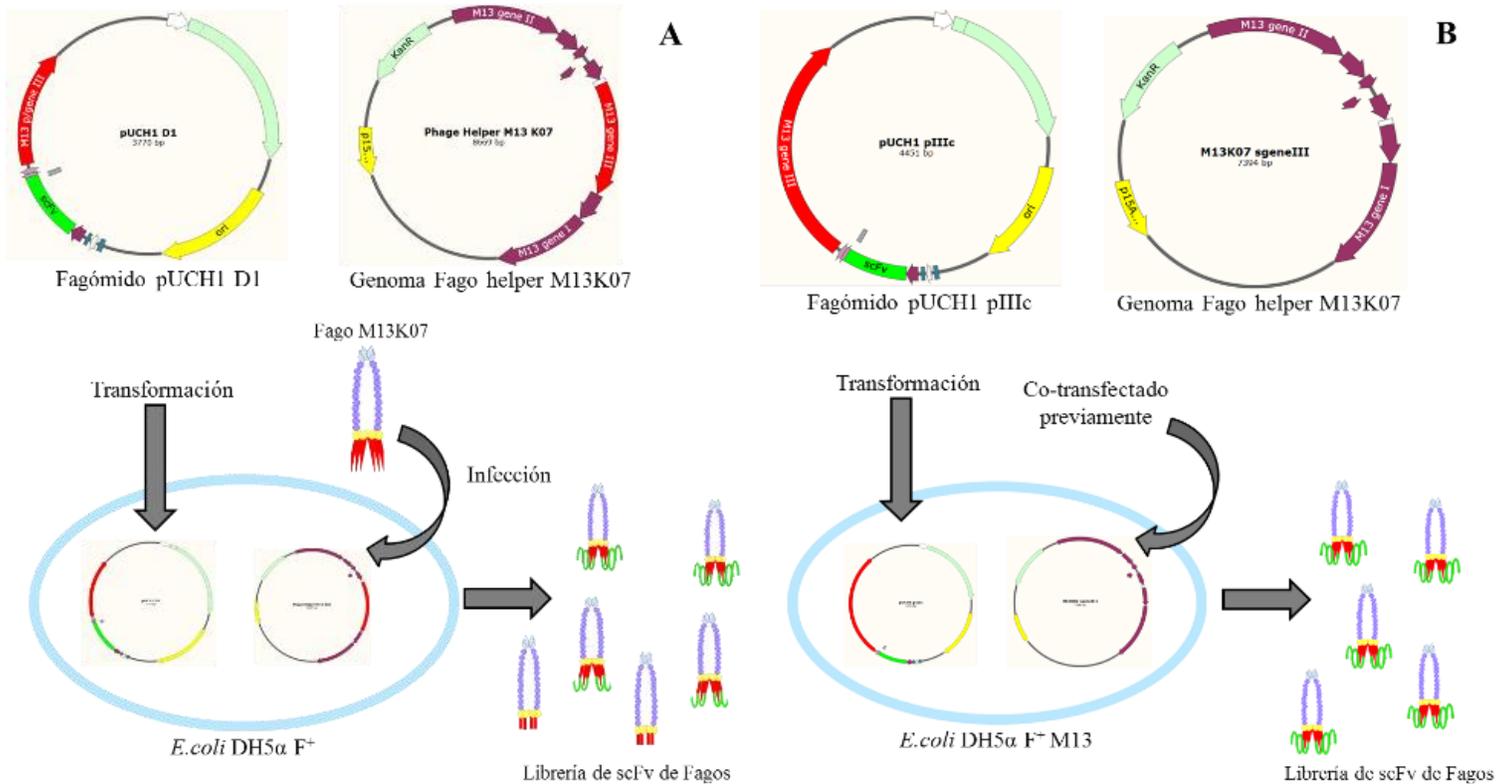


Figura 9. Comparación de los sistemas de expresión de librería de scFv. El sistema de expresión clásico A, está formado por el fagómido pUCH1 D1, el cual posee el gen III del fago incompleto, que le permite

producir el scFv unido a una parte de la proteína pIII. Además, las proteínas estructurales del fago están proporcionadas por el genoma del fago helper M13K07 que es infectado a la bacteria *E.coli* DH5 α F⁺. Este sistema puede producir fagos con scFv, sin scFv y con proteínas truncadas. El sistema nuevo **B** está formado por el fagómido pUCH1 pIIIc, el cual posee el gen III del fago completo, que le permite producir el scFv unido a la proteína pIII completa. Las proteínas estructurales del fago están proporcionadas por el genoma del fago helper M13K07, exceptuando la proteína pIII. Éste se co transfectó previamente a la bacteria *E.coli* DH5 α F⁺. Este sistema puede producir únicamente fagos funcionales pues la expresión de la proteína pIII, esencial para la formación e infección de las partículas virales, está ligada a un correcto marco de lectura del gen de scFv.

Para la inserción de la genoteca de scFv dentro de los vectores pUCH1 D1 y pUCH1 pIIIc, se probaron diferentes digestiones enzimáticas con *EcoRI* y *NheI*, tanto de Promega® como de Thermo Fisher™, donde se esperaba, para ambos vectores, observarse una liberación de una secuencia de alrededor de los 300 bp. Sin embargo, se observó linealización del vector pero no liberación de inserto, bajo todas las condiciones probadas, que incluyeron diferentes tiempos de corte y digestiones secuenciales enzima a enzima (No mostrado). Más aún, digestiones largas con la enzima *EcoRI* mostraron cortes inespecíficos de la enzima (No mostrado). Además, se probaron diferentes estrategias de corte como fue variar las concentraciones de la enzima *NheI* a 2, 4, 8 veces, la concentración de *EcoRI* a 4 veces y el uso de diferentes buffer afines a cada enzima. Sin embargo tampoco se obtuvieron resultados positivos (No mostrado). Finalmente se cambiaron las enzimas por las

FastDigest (Thermo Fisher™) las cuales usan un buffer común para todas las enzimas (**Figura 14**).

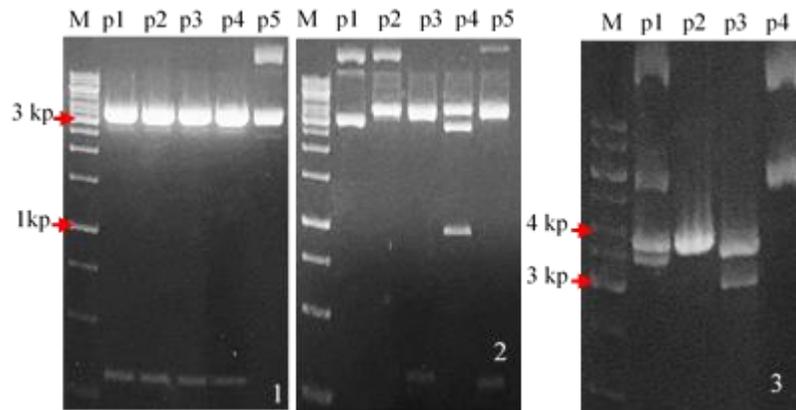


Figura 14. Prueba de digestión las enzimas FastDigest (Thermo Fisher™). En el gel 1 se observan los resultados de la cinética de digestión de pUCH1 D a los 15 min (p1) a los 30 min (p2) a la hora (p3), a las 2 horas (p4) y sin digerir (p5). En el gel 2 se observan los resultados de la digestión con *EcoRI* y *NheI* (p3), con *EcoRI* y *HindIII* (p4), con *EcoRI* y *BamHI*(p5), sólo con *EcoRI* (p2) y sin digestión (p1). En el gel 3 se observa la digestión de pUCH1 D1 con *EcoRI* y *NheI* simultáneamente (p1), con sólo *EcoRI* (p2), con *EcoRI* primero y luego con *NheI* (p3) y sin digestión (p4). La digestión se llevó a cabo en un VT de 20 uL con 1 ug de ADN, usando las enzimas FastDigest (Thermo Fisher™). El marcador de peso molecular usado fue de 1 Kb. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X a 100V por 90 min para los geles 1 y 2 y 120 min para el gel 2.

Con estas enzimas se observó la liberación de inserto, aunque en menor medida que con la enzima *HindIII*. Además por el tamaño del inserto, el espacio entre las bandas del vector linealizado y el vector abierto, fue muy poco y presentó dificultades para su separación.

En vista de la dificultad para lograr una separación efectiva del vector digerido con la dos enzimas y el vector linealizado, se escindió la banda correspondiente al primero, procurando no tomar material genético del vector linealizado. De aquí se purificó el material genético del vector para la

construcción de la librería de fagos. Con éste material, se realizó una prueba de religamiento para descartar la presencia de vector no digerido o parcialmente digerido. La prueba consistió en realizar una reacción de ligación sin agregarle inserto. Como control negativo, para verificar que no hubiese vector no digerido, se realizó una ligación sin ligasa. Como control positivo para la ligación, un vector linealizado y fosforilado, al cual se le agregó ligasa. Por último, como control de transformación para verificar una efectiva inserción de ADN en bacterias quimio competentes, se usó un vector sin digerir. Los resultados no mostraron crecimiento en la muestra ni en el control negativo, pero sí en el control positivo y el control de transformación, lo que indicó que el material genético del vector digerido con *NheI* y *EcoRI*, era óptimo para la inserción de la genoteca y no contenía vector no digerido o parcialmente digerido.

Finalmente luego de digerir y purificar el ADN tanto de los vectores como de la genoteca, se realizó una ligación de 300 µg de vector digerido (tanto pUCH1 D1 como pUCH1 pIIIc) con 235 µg de genes de scFv. Las librerías se purificaron por glicógeno y con ellas se transformaron bacterias quimio competentes *E.coli* DH5α F⁺ y *E.coli* DH5α F⁺ M13, que fueron expandidas

y con las cuales se produjo las librerías de fagos D1 y pIIIc respectivamente, dando por finalizado el objetivo específico 1.

3.2. Discusión

La construcción de las dos librerías de scFv de fagos, representan herramientas prominentes para el desarrollo de anticuerpos humanos. La librería pIIIc, representa una mejora a la librería con la cual se pudiesen obtener mejores resultados.

Las librerías de scFv de fagos se construyeron exitosamente, a pesar de los obstáculos presentados en el camino. En primer lugar, el ARN total extraído a partir del PBMC, mostró una baja pureza pues el cálculo de la razón entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm fue menor a 2,0⁴⁰. Esto quiere decir, que existen contaminación por ADN, proteína e incluso por compuestos fenólicos. Los valores oscilaron entre 1,978 a 1,365, de los cuales las muestras de las de ARN de las personas 1, 2, 3 y 6 presentaban valores >1,8, lo cual indica que la contaminación podría ser por ADN únicamente, en cambio, el ARN de las personas 4, 5, 7 y 8 presentaban valores <1,8, que podría presentar además de contaminación por ADN como por proteínas y

⁴⁰ Tomado de *Trizol™ Reagent User Guide*. 2016. Thermo Fisher Scientific Inc.

fenoles. Cabe resaltar que la menor concentración de ARN se obtuvo por las personas 4 y 5, sin embargo, fueron los ADNc de estas muestras quienes amplificaron más fácilmente las regiones variables de inmunoglobulina. Además, en diferentes protocolos publicados para la construcción de librerías humanas de scFv a partir de sangre periférica (18,21, 22, 25), incluyendo lo reportado por Sotelo y colaboradores (31) no se menciona que la pureza del ARN, afecte la construcción de la librería. Es posible que el ADN genómico, presente en las muestras de ARN y no eliminado por ADNsas, permita la amplificación de regiones variables, sin embargo, estas bandas corresponderían a pesos moleculares mayores a los buscados (~400 bp), ya que los genes de las inmunoglobulinas sufren un rearreglo en el ARNm antes de ser traducido (33).

Por otro lado, la escasa amplificación que hubo en el primer PCR y la subsecuente amplificación doble, es un factor importante en la aparición de secuencias que no pertenecían a ninguna región variable o que presentaban marcos de error incorrecto, como se observó en los dos genes de scFv secuenciados. Diferentes factores pudieron influir en la baja amplificación en el primer PCR. Una escasez de secuencias de inmunoglobulinas sería un factor relevante pues la amplificación de las VR se realizó para cada persona

usando uno a uno los diferentes pares de partidores y no a partir de una mezcla de ADNc obtenida de cada donante. También, problemas de unión de los partidores, aunque Sotelo y colaboradores (31) no reportaron ningún inconveniente en la amplificación de las regiones variables, sin embargo, otros protocolos (21 y 28) reportan realizar dos PCR, el primero para amplificar las cadenas variables directo de ADNc y el segundo para amplificar y añadir sitios de restricción. Se ha descartado que las bandas no se observaran en el gel realizado, ya que la mayoría de los protocolos muestra la separación del ADN con geles de mayor porcentaje al 1%, el cual fue el porcentaje usado. El segundo PCR se realizó usando en su mayoría productos del primero, purificados directo de la mezcla sin pasar por gel. Esto fue necesario debido a que, al no observarse bandas en un gel, era imposible lograr una adecuada purificación, sin embargo, al usar como templado productos de PCR purificados directos, no solo contenía ADNc, sino también ADN genómico que fue arrastrado desde la purificación de ARN. Este ADN genómico pudo ser reconocido por los diferentes partidores, ya que contienen nucleótidos degenerados que le permiten amplificar versátilmente diferentes secuencias. Hust y colaboradores (28) muestran un resultado de un gel con la

amplificación del primer PCR directo del ADNc y se logra observar de igual manera diferentes amplificaciones inespecíficas.

La unión de las regiones variables se realizó de tal forma que se produjese una gran diversidad de genes de scFv. Por ello se realizó la unión de los genes de VH y VL por cada par de partidores usados en la amplificación. La primera prueba donde se mezclaron cantidades iguales de ADN de cada donador, fue infructuosa pues la concentración final del templado se reducía drásticamente, debido a las bajas concentraciones de algunas muestras que hacía aumentar el volumen final de la mezcla. La segunda prueba realizada con el fin de reducir el volumen de la mezcla total y aumentar la concentración del templado, por eso se usaron sólo las muestras que superaban los 4 ng/ μ L. Sin embargo, los volúmenes del templado seguían siendo altos para una formación adecuada de los genes de scFv. Además, con este ISA-PCR se perdía diversidad al dejar de lado algunas muestras de ADN. Al final se resolvió mezclar las muestras amplificadas de cada donador por cada par de partidores y concentrando el ADN por eliminación de soluto. Con esto se logró obtener síntesis de genes de scFv exitosos, pues la concentración del templado era alta en un muy bajo volumen, lo que permitía una rápida unión de la región compartida entre el VH y el VL. Es importante aclarar, que a

diferencia de lo realizado por Sotelo y colaboradores (31), donde mezclaron todas las muestras de las VH y todas las muestras de las VL y con ello realizaron el ISA-PCR, en este trabajo se realizó 9 diferentes ISA-PCR, haciendo las diferentes combinaciones posibles de los genes VH de las cadenas γ y μ con las de los VL de las cadenas κ .

La inserción de la librería al fagómido se realizó en un solo paso a diferencia de lo que muestran diferentes autores (21, 25 y 28), donde realizan esta inserción en dos o tres pasos de clonación. Este es un punto crítico para garantizar una buena diversidad de scFvs. Los protocolos donde se muestra más de un clonamiento, generalmente son realizados para unir las regiones variables VH y VL, sin hacer ninguna amplificación extra. Las enzimas con las que se construyó la librería y que están presentes en los fagómidos pUCH1 D1 y pIIIc, se seleccionaron teniendo en cuenta la baja frecuencia presente en las VR de las inmunoglobulinas en ratones (34). Sin embargo, la enzima *NheI* presente en las VHs, posee una digestión máxima del 50% del ADN⁴¹, que representa una actividad desfavorable para la construcción de librerías de fagos pues repercutiría directamente en la diversidad. Diferentes autores,

⁴¹ Según el proveedor New England Biolabs en su documento *Cleavage Close to the End of DNA Fragments (oligonucleotides)*.

presentan otros sitios de restricción para la inserción de los genes de scFv. Para el corte de las VL, los vectores pComb3H y pComb3X usan *SfiI* y *XbaI*, los vectores pCANTAB6 y pCANTAB3his6 usan *ApaI* y *NotI* y el vector pHAL14 que usa *MluI* y *NotI*. Para el corte de las VH pComb3H y pComb3X usan *XhoI* y *SpeI* (35); pCANTAB6 y pCANTAB3his6, *sfiI* y *XhoI* (25) y pHAL14 *NocI* y *HindIII* (28). En este sentido se debe hacer un mejoramiento en la región de inserción de los vectores pUCH1 D1 y pIIIc, proporcionándole una mayor diversidad en sitios de corte, que permita realizar la digestión de manera más efectiva y se reduzca las posibilidades de pérdida de diversidad de la librería.

La estrategia de la nueva librería pIIIc, construida a partir del vector pUCH1 pIIIc, provee una gran ventaja frente a la selección de los fagos en comparación con la librería clásica D1, pues con en la librería pIIIc sólo serán producidos y ensamblados aquellos fagos que posean un marco de lectura correcto, ya que la expresión de la proteína pIII del fago M13 está ligada únicamente a la expresión de un scFv, y esta proteína es esencial para la infectividad del fago y su formación (35), mientras que la librería D1 permite la producción de mezclas de fagos, que pueden contener o no scFv funcionales y no funcionales, y que competirán entre ellos por sus

capacidades de ser infectivos. Con esto, en la librería pIIIc, con un marco de lectura correcto en el fagómido se expresará el scFv fusionado a la proteína pIII, y permitirá el ensamblaje completo del fago filamentoso, que puede ser infectivo y podrá replicarse exitosamente, sin entrar en competencia con distintos tipos de fagos. Sin embargo, esta propiedad también puede ser una desventaja, pues al expresarse el scFv fusionado al dominio N-terminal de la proteína pIII, limita su infectividad por un impedimento estérico. Esto puede verse reflejado en una reducción del número de fagos antes de un panning en comparación con la librería tradicional D1. Esta tecnología ha sido usada previamente (36, 37 y 38), donde se demuestra que se eliminan los problemas de fagos que no presentan scFv en su superficies, lo cuales son un ruido significativo de la técnica. El trabajo de Shi y colaboradores (36) concluye que la técnica no sólo ayuda a aumentar los niveles de expresión de scFv en la superficie de fagos, sino que también supera el problema de resistencia a la infección por fagos, que generan las bacterias al ser sometidas a un constante contacto con la proteína pIII.

4. OBJETIVO ESPECÍFICO II:

SUBCLONAR Y PRODUCIR EL DOMINIO $\alpha 2$ DE MICA DE MANERA RECOMBINANTE

4.1 Resultados

Para la construcción del Dominio $\alpha 2$ de MICA se tomó como referencia la variante proteica de MICA*002, por ser la más frecuente en la población chilena, según datos previos en el laboratorio. El primer diseño *in silico* del dominio $\alpha 2$ a partir de la secuencia del Exón 3 de MICA se muestra en la

Figura 15.

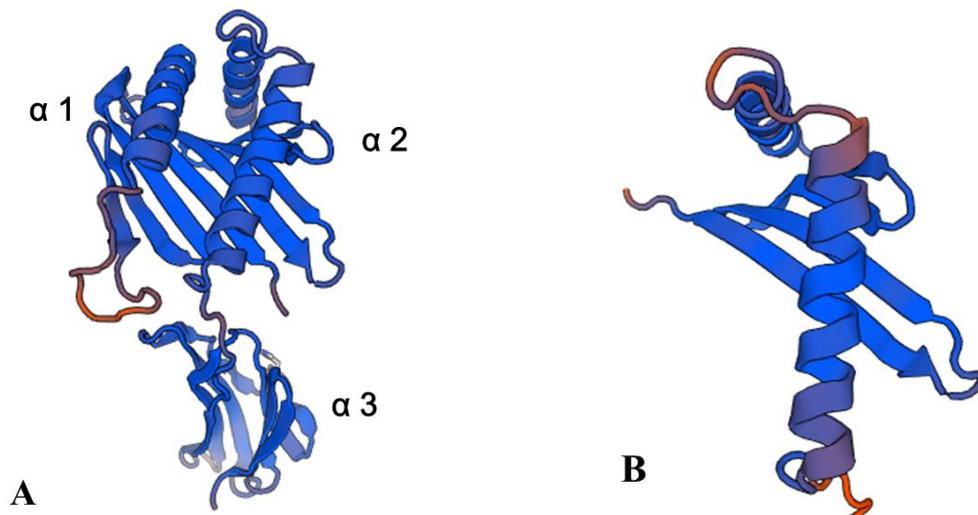


Figura 15. Modelo de cinta *in silico* de la estructura de MICA y el dominio $\alpha 2$. En la imagen A se muestra el modelo del ectodominio de MICA*002 ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). En la imagen B el modelo del dominio $\alpha 2$ a partir de la secuencia del exón 3 de MICA. Los modelos se realizaron con la bases de datos en línea Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>), la cual determinó su estructura 3D en base a una secuencia con el 97,67% de identidad, con la región N-terminal en la parte inferior de la figura.

En base a la secuencia del Exón 3 de MICA*002 se realizó los diseños de partidores que se muestran en la **Tabla 7**. Los partidores se sintetizaron y los liofilizados de cada partidor se resuspendieron para su prueba de amplificación.

Tabla 7. Secuencia de los partidores diseñados para el subclonamiento del dominio $\alpha 2$

Partidor	Secuencia (5' --> 3')	Sitio de Restricción	%CG	Tm °C
Exon3MICA002For	TTT TCT AGA CAT ATG GGC CTG CAC TCC CTG C	<i>Xba</i> I, <i>Nde</i> I	52	57
Exon3MICA002Rev	TTT CTC GAG GGT TCT TCT CAG CAC CAC G	<i>Xho</i> I	54	58

Al estandarizar el PCR para la amplificación, se obtuvo la secuencia del Exón 3 con los sitios de restricción. El ADN se purificó directamente desde los productos de PCR, y junto con el vector pET-JT1, previamente purificado, se procedió a digerirlos con las enzimas *Nde*I y *Xho*I. Los productos de la digestión se separaron en gel de agarosa y se purificaron desde el mismo. Luego de ello, se procedió a ligar el inserto con el vector, y seguidamente a transformar bacterias *E.coli* DH5 α . Las colonias positivas se les realizaron un PCR de colonia usando los partidores T7 promotor y T7 reverso. Los resultados del PCR se muestran en la **Figura 16** donde se observa una

amplificación de aproximadamente 500 pb, similar al valor esperado con el clon 4.

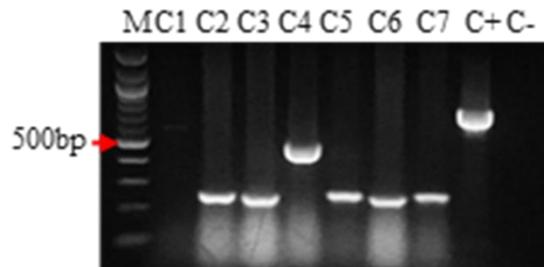


Figura 16. PCR de colonia Exón 3 en pET-JT. En el gel se muestran los resultados del PCR de colonia donde se evaluaron los 7 clones obtenidos de la transformación de *E.coli* DH5 α con la construcción del Exón 3 de MICA en pET-JT1 (C1 a C7). Como control positivo (C+) se usó una colonia transformada con el vector pET-JT1. Como control negativo (C-) se realizó una reacción sin DNA. Las reacciones se hicieron con GoTaq (XXX) en un volumen total de 20 μ L.

A la colonia positiva, se le realizó una extracción de ADN plasmídico y esta muestra, se mandó a secuenciar usando la tecnología de Sanger, realizada por un laboratorio externo. La secuenciación del Clon 4, tanto con el promotor como con el terminador, se comparó con la secuencia original de Exón 3 de MICA*002, como se muestra en la **Figura 17**. Se logró comprobar que el clon obtenido efectivamente poseía el gen de interés en el vector con un porcentaje del 98 % de homología en la secuencia.

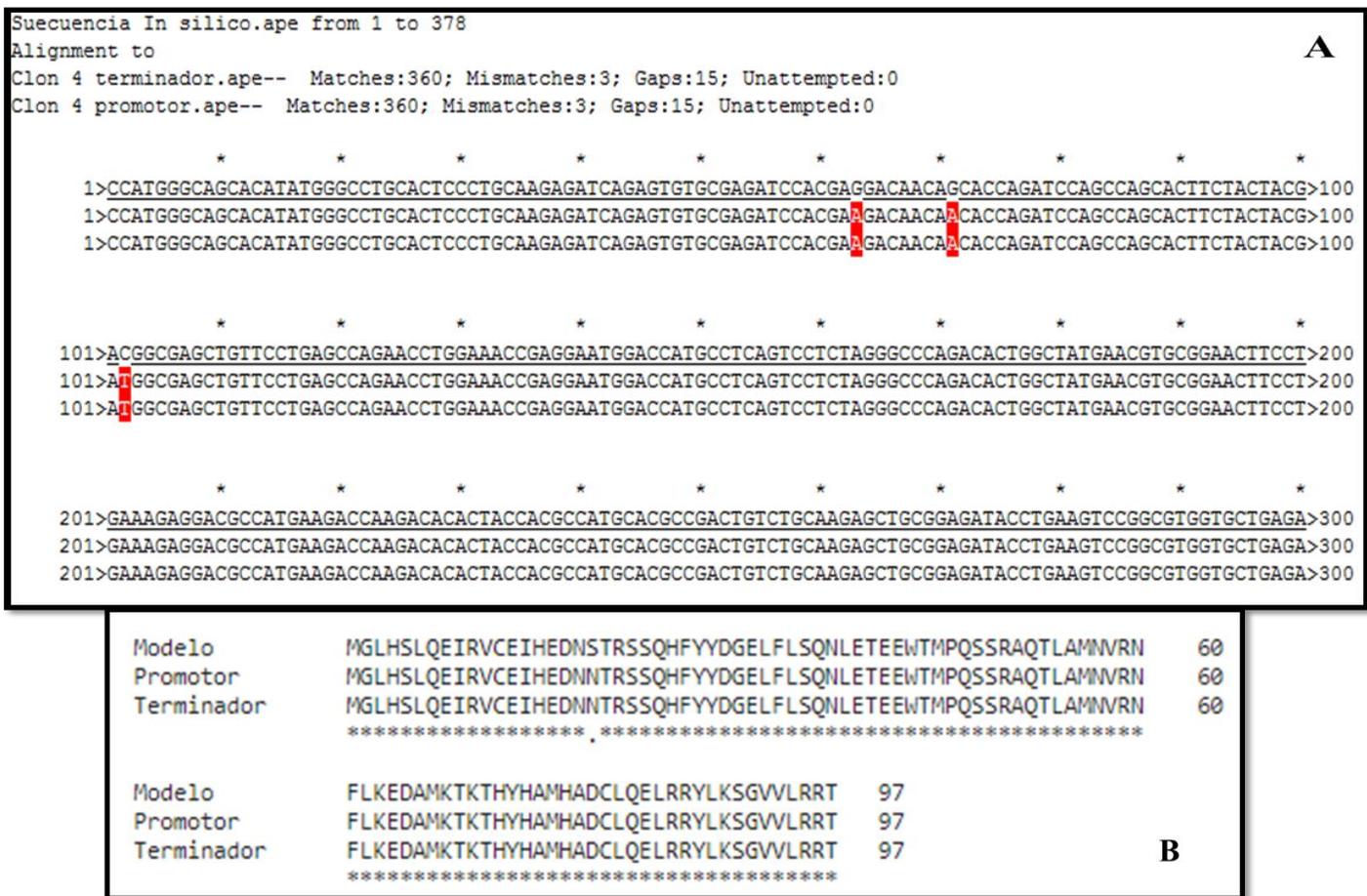


Figura 17. Comparación de secuencias de DNA clonado y MICA*002. En la imagen A se observa el alineamiento de la secuencia del Exón 3 de MICA*002 de NCBI con la secuencia obtenida del subclonamiento, realizada en el programa libre ApE (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>). En la imagen B se observa el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio α 2 de MICA*002, tomado del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFR69318.1/>) con la secuencia obtenida del DNA secuenciado. El alineamiento se realizó usando la plataforma Clustal Omega de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

De igual forma, se compararon las secuencias aminoacídicas, que mostraron una homología de 99%, con un cambio de nucleótido de Serina a Asparagina en la posición 19. Comprobada la similitud de las secuencias, se procedió a subconar la construcción de bacterias *E.coli* BL21 para su producción. De los clones que resultaron positivo se seleccionaron dos, el clon 1 y el clon 3, con

los cuales se realizó la producción de la proteína. En la **Figura 18** se muestra el proceso aguas abajo que se siguió post producción.

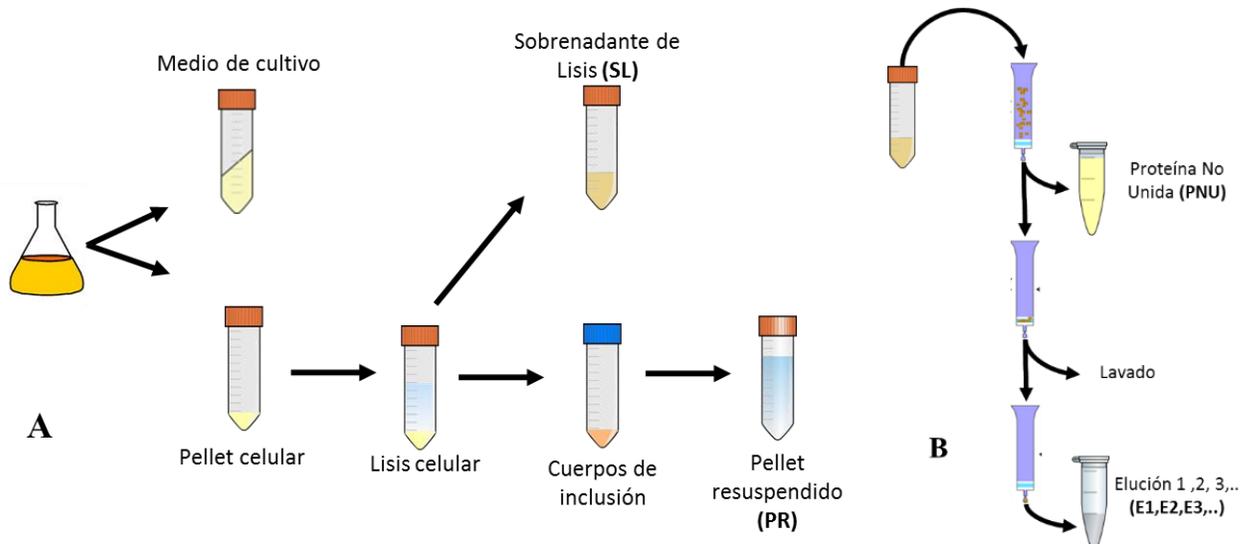


Figura 18. Esquema de separación y purificación post producción. En la figura A se muestra el esquema de separación de las diferentes fases post producción que comienza con el cultivo de bacterias *E.coli* BL21 inducido. Las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación y luego se lisaron. De la lisis celular, se obtiene dos subproductos: el Sobrenadante de Lisis (LS) y los cuerpos de inclusión, que se resuspendieron en un buffer con guanidina, donde se obtienen el Pellet Resuspendido (PR). En la figura B se muestra el procedimiento cromatografico para la purificación de proteína recombinante, usando una columna de NiNTA (Thermo Fisher™). En él, se liga la proteína recombinante del PR o LS, luego, se coloca en una columna y toda aquella proteína no ligada se descartará por lavado de la columna, la cual se nombra Proteína No Unida (PNU). La columna se lavó varias veces con el buffer de lisis, donde se encontraba la proteína soluble y finalmente es eluido a través de un buffer elución que libera la proteína del lecho y esta es recolectada a través de diferentes eluatos nombrados según el número de secuencia E1, E2, E3.

Previamente, se realizó una prueba de producción donde se observó que el sobrenadante de Lisis (LS) presentaba una alta cantidad de Proteína, mucho mayor a la del Pellet Resuspendido (PR) (Datos no mostrados), por lo que la purificación con la columna de NiNTA se llevó acabo usando la fracción SL de las producciones de los dos clones. Con las diferentes muestras de la purificación de la producción de los dos clones se realizó un SDS-PAGE y

paralelamente a los productos de un clon, se realizó un Dot-blot para poder identificar la proteína. Los resultados se muestran en la **Figura 19**. En el SDS-PAGE, se observó un enriquecimiento desde el SL a las Eluciones (E1 y E2), en la banda de ~13 KDa, que corresponde al peso molecular esperado de la proteína recombinante. Sin embargo, se enriqueció otras bandas de tamaño superior, que por el contrario a la fracción PNU, no se observan. El patrón de las bandas en ésta última fracción es muy similar al del SL. Por otra parte el Dot-blot mostró señal en la Elución 1, la cual es la que contiene la mayor cantidad de proteína.

Debido al bandeo irregular en las fracciones E1 y E2, se decidió realizar dos ELISA para confirmar que las Eluciones de la columna de Níquel contenían efectivamente el dominio $\alpha 2$. Los resultados de los ELISA se muestran en la **Figura 20**.

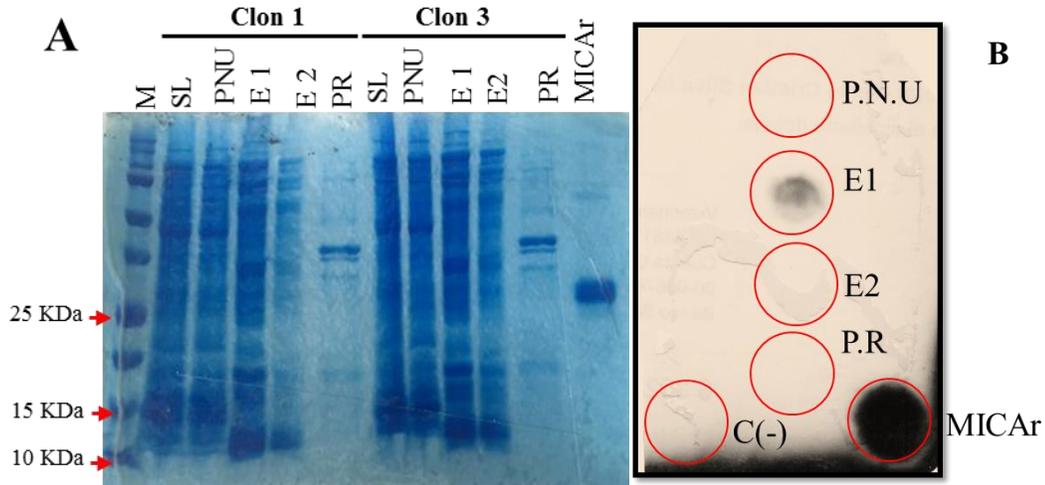


Figura 19. SDS-PAGE de los productos de la purificación y un Dot-Blot de los mismos. La figura A muestra los resultados del SDS- PAGE de los dos clones seleccionados. Se corrieron las muestras de sobrenadante de lisis antes de la purificación (SL), la proteína no unida a la columna (PNU), las eluciones 1 (E1) y 2 (E2), el pellet de la lisis celular resuspendido en buffer con guanidina (PR) y una muestra de MICA recombinante purificado. El marcador molecular usado fue Precision Plus Protein Dual color standard de Bio Rad. La figura B muestra los resultados del Dot-blot de los productos de la purificación del clon 1. Las muestras usadas fueron iguales que en el SDS-PAGE, salvo que se realizó un punto con buffer de lisis celular como control negativo (C-).

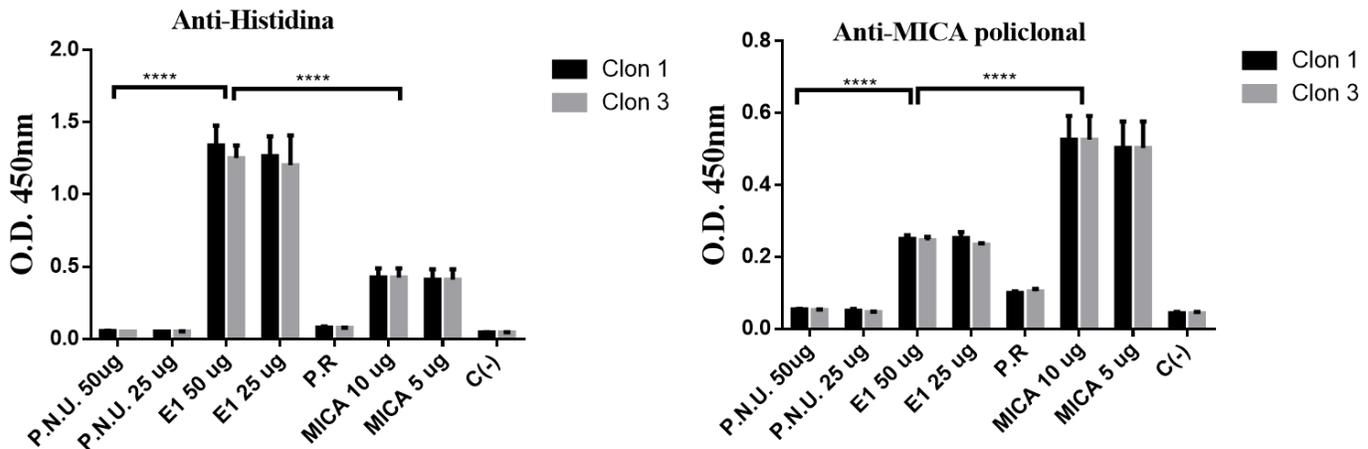


Figura 20. ELISA de reconocimiento dominio $\alpha 2$. Se muestran los resultados de los ELISA realizados para reconocer la proteína recombinante. Las placas fueron sensibilizadas con dos concentraciones de la proteína no unida (PNU), la elusión 1 (E1), Pellet de lisis celular resuspendido (PR), MICA recombinante como control positivo (C+) 10 y 5 ug y Buffer de lisis como control negativo (C-). El bloqueo de los ELISA se realizó con BSA 1%. Para el ELISA 1 se reconoció con Anti-His (1:5.000) y se usó un anticuerpo secundario Anti-Ratón HRP. Para el ELISA 2 MICA recombinante se reconoció con anticuerpo policlonal Anti-MICA Biotinilado (Invitrogen™) (1:4.000) y se detectó con Estreptavidina conjugada a HRP. La reacción se reveló con TMB y se leyó la OD a 450 nm. Cada columna indica la Media y cada barra sobre la

columna la varianza por medidas de triplicado. ****P<0,0001 calculado por análisis de varianza 2ways (ANOVA).

El primer ELISA se realizó con un anticuerpo que detectaría la presencia de la cola de Histidina, que debería estar presente en la proteína recombinante. El segundo ELISA se realizó con un anticuerpo policlonal dirigido a MICA, por lo que su reconocimiento garantizaría la presencia del dominio $\alpha 2$.

Los resultados del ELISA, muestran que los anticuerpos tienen la capacidad de reconocer la fracción E1 de manera significativa, lo que indica que la proteína recombinante se encuentra presente, sin embargo, como se observó en el SDS-PAGE, las eluciones obtenidas presentan una gran cantidad de proteínas de mayor tamaño, por lo que para la lograr una mejor purificación, se usó la técnica de cromatografía por FPLC, usando una columna de Niquel con afinidad para proteínas con cola de Histidina. Previo a la purificación se estandarizó la concentración de imidazol del buffer de unión, para una óptima purificación (Datos no mostrados). Con el protocolo estandarizado, se realizó una purificación de una muestra de LS provenientes de una producción anterior, almacenados a -20°C . El resultado del cromatograma se muestra en la **Figura 21**. Se observó una gran cantidad de proteína que no se unía a la

columna, que fue recolectada y analizada, de igual manera que las eluciones obtenidas. La **Figura 21** muestra una prueba ELISA para determinar la presencia del dominio $\alpha 2$ en las muestras recolectadas comparado con una muestra de la elución obtenida por la columna de NiNTA en la cromatografía tradicional como control positivo.

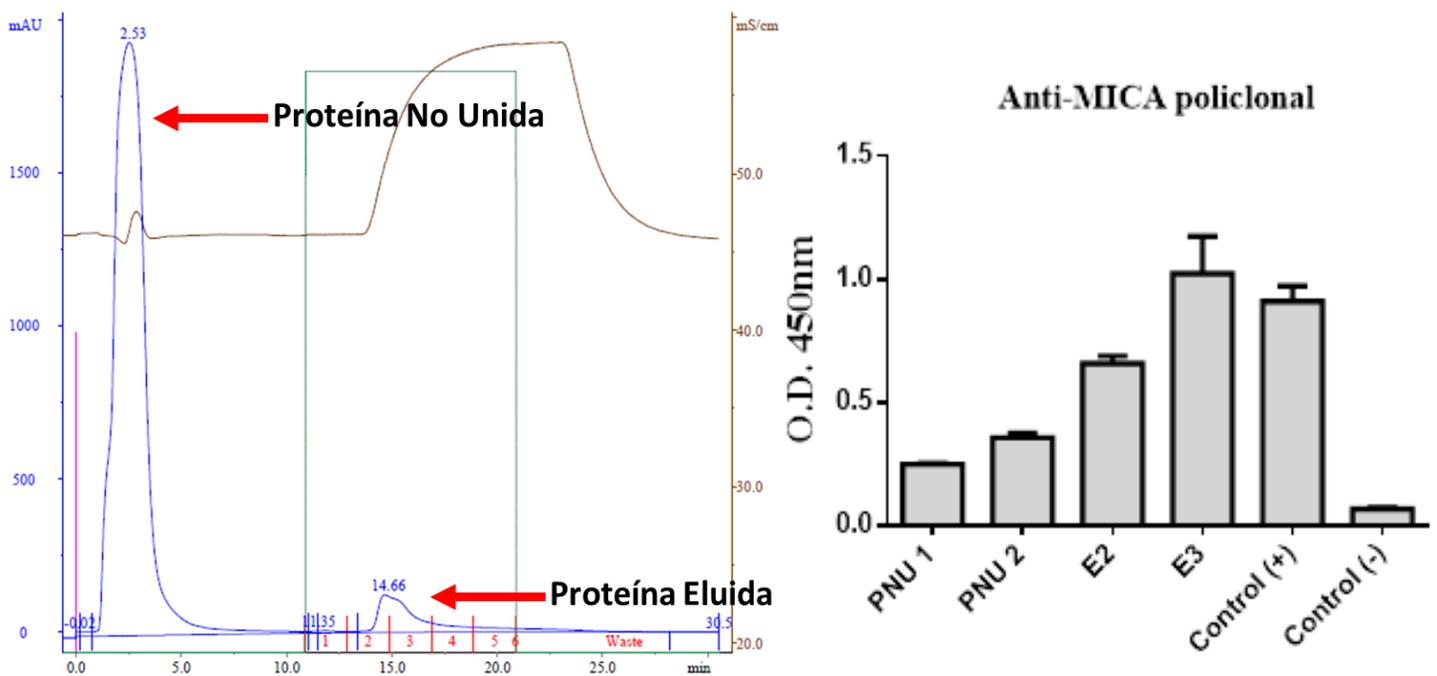


Figura 21. Cromatografía de purificación dominio $\alpha 2$ y Evaluación por ELISA. La primera Figura muestra el comportamiento de la purificación de una fracción de sobrenadante de lisis celular. La columna usada fue una HisTrap de GE para cromatografía de afinidad con proteínas que poseen cola de Histidina. La marca rosa muestra el tiempo de inyección de la muestra. La línea azul representa la lectura de UV del equipo, la línea verde la concentración de buffer de elución y la línea café la lectura de la conductividad del equipo. Las marcas rojas representan los tiempos de fraccionamientos del equipo. La figura no contempla el tiempo de equilibrio de la columna. Las lecturas de UV se realizó a 280nm. La segunda Figura muestra los resultados del ELISA con los productos de la purificación por FPLC. Las muestras PNU 1 y PNU 2, representan las fracciones de la proteína no unida colectadas durante la corrida. Las muestras E2 y E3 representan las fracciones recolectadas de la Elución donde se observó más del 90% de la señal en el cromatograma. El control positivo usado fue una muestra de elución de la proteína recombinante, purificada con columna de NiNTA y el control negativo una muestra de buffer de elución. Las lecturas se realizaron a 450 nm.

Con estos resultados se confirma la presencia de la proteína recombinante del dominio $\alpha 2$ en la Elución de la cromatografía, con lo cual se da por finalizado el objetivo específico II.

4.2. Discusión

El dominio $\alpha 2$ de MICA recombinante, representa una herramienta útil en la selección de anticuerpos dirigidos a bloquear la unión de MICA con su receptor, así como también para el estudio del rol que cumple esta fracción de la proteína en la unión a NKG2D. Al momento no se existe algún reporte de la producción del subclonamiento, producción y purificación de ésta proteína recombinante, el único trabajo que reporta la producción de manera recombinante de un dominio es el realizado por Wang y colaboradores en el 2016 (40) con el dominio $\alpha 1$ de MICB.

Para el modelo del MICA y el dominio $\alpha 2$, el programa Swiss-Model usó como templatado el modelo 1HYR del Protein Data Bank publicado a partir de la cristalización del complejo de MICA con NKG2D por Li y colaboradores en el 2001 (5), y es el modelo más aceptado hasta ahora de la estructura de MICA.

Los partidores diseñados amplificaron de manera exitosa el Exón 3 de MICA, en un amplio rango de temperaturas, lo que demuestra una buena especificidad de los mismos. Al momento, no se han reportado partidores para la amplificación de ésta secuencia con fines de producir proteína recombinante. Sin embargo, se han descrito muchos partidores para la amplificación y secuenciación de MICA (42,43,44), que normalmente no coinciden con los diseñados, ya que se unen normalmente entre las regiones intrónicas del gen o bien, amplifican más de un exón (usualmente amplifican los exones 2 y 3 juntos) (41).

En cuanto a la secuencia obtenida luego del clonamiento cabe resaltar que dos de los cambios de nucleótidos se debieron a que la secuencia de MICA usada para la amplificación del Exón 3, había sido optimizada por el proveedor para la producción en procariontes, esto quiere decir, que algunos de los codones encontrados en la secuencia del GenBank habían sido modificados para que fueran óptimamente leídos en bacterias, pero que codificarían para el mismo aminoácido. Sin embargo, el cambio de nucleótido en la posición 64 produce un cambio de aminoácido de Serina a Aspargina, correspondiente al residuo 19 del dominio $\alpha 2$ de MICA. Este cambio de nucleótido puede deberse a la fidelidad de la polimerasa usada,

pues la GoTaq® Green Master Mix, no es una polimerasa con una alta fidelidad⁴², por lo que eventualmente pudo incorporar un error en la amplificación de la secuencia. En cuanto al cambio de aminoácido, este se localiza en el primer bucle de cambio de dirección de la lámina β , el cual no representa un lugar de unión a la proteína NKG2D (4,5), además los residuos de los aminoácidos Serina y Asparagina, son aminoácidos polares sin carga, ambos con una cadena alifática, lo cual, no los hace tan lejanos uno del otro, por lo que los cambios estructurales de la mutación no serán de gran significancia.

La producción de la proteína recombinante fue exitosa, aunque a diferencia de muchos reportes de producción en *E.coli*, incluyendo las diferentes proteínas producidas en el laboratorio, el dominio $\alpha 2$ no formó cuerpos de inclusión que coincide con lo reportado por Wang y colaboradores en el 2016 (40), donde produjeron el dominio $\alpha 1$ de la proteína MICB. En este trabajo de igual forma, se presenta una producción de un solo dominio a través de *E.coli*, sin embargo, la cepa, el vector y el protocolo de producción usado, fueron diferentes. La solubilidad del dominio $\alpha 2$ de MICA, así como la del

⁴² Información provista por el proveedor.

dominio $\alpha 1$ de MICB, puede deberse al tamaño de la proteína, pues son de aproximadamente 13 KDa y 20 KDa respectivamente, que por lo reportado, son proteína susceptibles a la solubilidad y con baja probabilidad de formar cuerpos de inclusión (45). Sin embargo, en este trabajo se observó una pequeña formación de cuerpos de inclusión, pero que al ser probados con un anticuerpo anti- Histidina en el Dot blot, no muestra señal alguna, por lo que pueden ser proteínas insolubles propias de la bacteria.

La purificación de la proteína recombinante fue más compleja de lo esperado, pues como se observó en el SDS-PAGE a pesar de pasar por la columna de NiNTA, no se consigue una correcta purificación de la proteína, aunque se observa el enriquecimiento de la banda del peso molecular esperado para el dominio $\alpha 2$ (~13 KDa). A pesar de ello, con el Dot blot se detecta la presencia de la proteína en una de las eluciones (la que tiene mayor concentración de proteína), aunque con una señal muy tenue. Esto quiere decir, que a pesar que la proteína está contenida en la Elusión su concentración es baja, por lo que para ser evaluada en un Western blot, deben ajustarse mejor las condiciones experimentales. Los resultados de los ELISA permiten dilucidar la presencia de la proteína a pesar de su impureza. En el trabajo de Wang y colaboradores en el 2016 (40), la proteína recombinante también está marcada con una cola

de Histidina, pero en éste trabajo hay una exhaustiva purificación de varios pasos, que incluyen precipitación de proteínas, cromatografía hidrofobia, cromatografía de intercambio iónico, diálisis y al final una cromatografía de afinidad con una columna que retiene proteínas ricas en Histidina. Esto demuestra la complejidad cromatográfica con la que debimos purificar el dominio $\alpha 2$ antes de ser purificada con la columna de NiNTA. Sin embargo, la purificación por FPLC aparenteme mostró mejores resultados, obteniendo una señal por ELISA del eluato, bastante similar a la obtenida con la elución por la columna de NiNTA, pero con una pureza mayor, pues el cromatograma muestra un solo pico en la fase de la elución. Sin embargo, estas observaciones deben ser verificadas, como trabajo futuro a través de técnicas como SDS-PAGE y Wetern Blot o en su defecto Dot Blot.

5. OBJETIVO ESPECÍFICO III

SELECCIONAR UN SCFV CON LA CAPACIDAD DE UNIÓN AL DOMINIO A2 EN MICA DE UNA LIBRERÍA DE FAGOS

5.1. Resultados

Para poder obtener clones con fagos que reconocieran el dominio $\alpha 2$ de MICA, primero se realizó un paneo de la librería usando como antígeno de selección la molécula de MICA recombinante (dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ con una cola de Histidina). Los resultados del paneo se muestran en la **Figura 22** donde se observa el comportamiento del enriquecimiento del total de clones en cada ronda del paneo, tanto para la librería D1 como para la librería pIIIc.

Al final del paneo, se tomaron 7 clones de cada librería, de los cuales, en una selección rápida, se tomaron 8 (4 de cada librería) que fueron evaluados por ELISA con un solo punto, para observar si tenían afinidad por MICAr, un MICA recombinante sin cola de Histidina (MICArS/H) y el dominio $\alpha 2$ obtenido por purificación con columna de NiNTA. Los resultados del ELISA se muestran en la **Figura 23**, donde se observa un comportamiento muy variable en la unión a los diferentes antígenos, pues los clones muestran un reconocimiento diferente para las proteínas MICAr y MICArS/H, las cuales

su única diferencia es la presencia de Histidina, además que el reconocimiento hacia el Dominio $\alpha 2$, en algunos clones se ve aumentado y en otros disminuido.

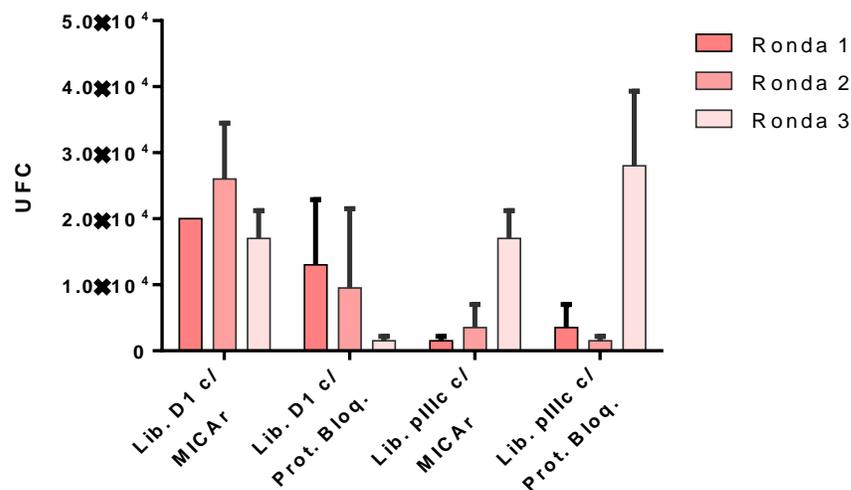


Figura 22. Titulación de fagos obtenidos luego de cada ronda de paneo. Para la cuantificación del número de fagos eluidos de cada ronda de paneo, se cuantificó la concentración de UFC en una dilución 10^{-2} de un cultivo infectado de 2 mL. Las cuantificaciones se realizaron sembrando 10 y 100 μ L de una dilución 10^{-2} de un cultivo infectado de *E.coli* DH5 α F⁺, en Agar LB^{amp}. Los cultivos se incubaron toda la noche a 37°C. En cada paneo se realizó un control con la proteína bloqueante de cada ronda, las cuales fueron BSA para la primera, Soya para la segunda y Leche descremada para la tercera ronda.

De estos clones, se evaluarían inicialmente el D1Clon4 y el pIIIcClon1 presentaban el comportamiento esperado, es decir, una variación muy baja entre las diferentes proteínas. El clon D1Clon1 fue seleccionado como un control, pues aparentaba tener afinidad por la cola de Histidina presente en MICAr y el dominio $\alpha 2$ y ausente en MICArS/H. Por otro lado, el clon pIIIcClon7 mostró afinidad por MICAr, pero no por las otras dos proteínas

lo que aparentaba ser una unión inespecífica del fago, por lo que de igual forma se tomó como control. Estos 4 clones fueron evaluados mediante una curva de reacción para verificar que la afinidad por las proteínas era dependiente de la cantidad de proteína (**Figura 24**). Para ello, se usó MICAr que fue la proteína con la cual fueron paneados y el dominio $\alpha 2$ recombinante obtenido de la purificación con FPLC.

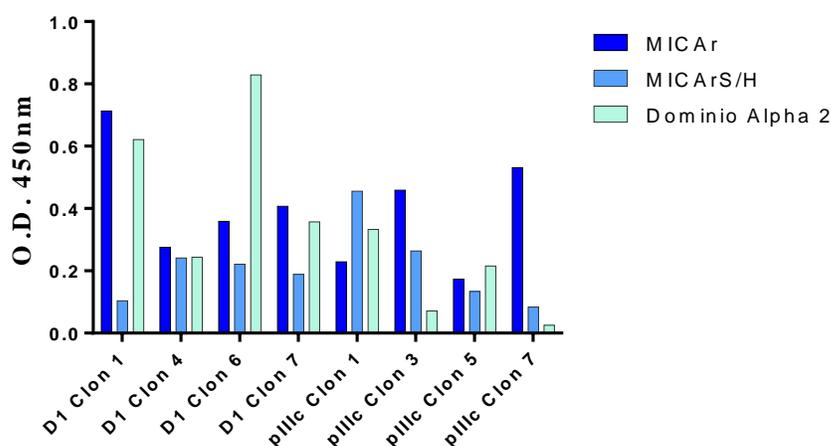


Figura 23. Reconocimiento de clones de Fagos a distintas proteínas. Se muestra los ELISA de reconocimiento a 3 diferentes proteínas recombinantes: MICA con cola de Histidina (MICAr), MICA sin cola de Histidina (MICArS/H), la elución del dominio $\alpha 2$ (dominio Alpha 2). Las placas fueron sensibilizadas con 4 μg de MICAr s/His y c/His y 10 μg totales de Elusión 1 de dominio $\alpha 2$. A cada lectura se le restó la señal de ruido que presentaba el control con la proteína bloqueante. El reconocimiento de la unión del fago a la proteína se realizó mediante un anticuerpo Anti-M13 monoclonal de ratón (GE Healthcare Life Sciences) diluido 1:2.500 y de anticuerpo secundario se usó Anti-IgG de ratón HRP (Invitrogen™) diluido 1:2.500. La reacción se reveló con TMB y se leyó la OD a 450 nm.

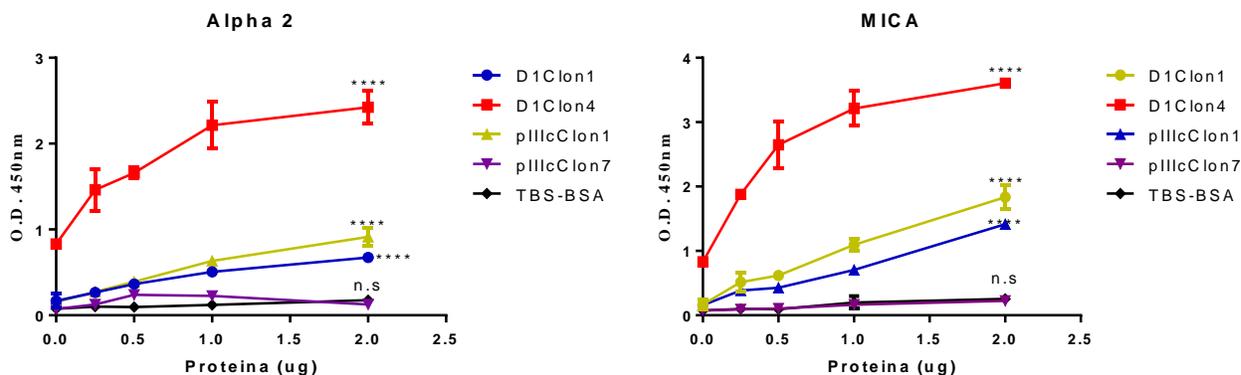


Figura 24. Curvas de reacción a diferentes concentraciones. La figura muestra el comportamiento de los clones seleccionados bajo diferentes concentraciones de MICAR y $\alpha 2$. Para ambos casos, se usó para detectar la unión de los fagos a la proteína un Anti-M13 monoclonal de ratón (GE Healthcare Life Sciences) como anticuerpo primario y un Anti-IgG de ratón HRP (Invitrogen™) como anticuerpo secundario. La reacción se reveló con TMB y se leyó la OD a 450 nm. Los puntos corresponden a valores de media y las barra verticales a desviación estándar de cada determinación, realizada por triplicado. ****P<0,0001 calculado por análisis de varianza 2ways (ANOVA).

Con estos resultados, se observó un reconocimiento hacia MICAR y al Dominio $\alpha 2$ dependiente de concentración, en los clones esperados (D1Clon1, D1Clon4 y el pIIIcClon1), lo que sugiere la selección de clones dirigidos hacia el dominio $\alpha 2$, dando por finalizado el objetivo específico III.

5.2. Discusión

Con la librería construida, fue posible seleccionar clones de fagos que portan un scFv con la capacidad de unión al dominio $\alpha 2$, a pesar de las posibles pérdidas en la diversidad en la librería al momento de construirla. Sin embargo, esto indica que, tanto el uso de los partidores para amplificar las cadenas de las IgM, como la técnica de ISA-PCR, promueven un aumento

en la diversidad de la librería, por la amplificación del repertorio primario de las inmunoglobulinas y por la eficiente unión de las regiones variables.

Al comparar estos resultados con los publicados por Sotelo y colaboradores (31), el número de fagos obtenidos de ambas librerías, por cada ronda de paneo, fue superior para la mayoría de las proteínas que evaluaron. Sin embargo, otras publicaciones como la de Lakzaei y colaboradores (46) muestran un mayor número de fagos por cada ronda de paneo, llegando a órdenes de magnitud de 10^6 . Por otro lado, los resultados del número de fagos con cada paneo (**Figura 22**) muestran un enriquecimiento para ambas librerías, donde se observa un mayor enriquecimiento para la librería pIIIc que para la librería D1, a pesar que para esta última se estimó un número mayor de fagos en todas las rondas, sin embargo, este mismo comportamiento de un mayor enriquecimiento por parte del sistema pIIIc se muestra en lo publicado por Shi y colaboradores (36), donde el sistema modificado, presenta mayor enriquecimiento al sistema clásico, con la diferencia que éste último presenta un menor número de clones por ronda. En el último paneo, usando la librería pIIIc, se observó un aumento inesperado en la cantidad de fagos, en el control de la proteína bloqueante, esto indica que los fagos seleccionados en los anteriores paneos tuvieron una

reacción cruzada con la leche descremada. Estas reacciones cruzadas se dan, ya que los scFv de los fagos reconocen fosfotirosinas, histonas y enzimas como fosfatasa alcalina propia de la leche (47).

Todos los clones mostraron una reactividad con la proteína con que fueron rápidamente seleccionados pero su valor cambió cuando se usó otro tipo de proteína. Los clones provenientes de la librería D1 mostraron mejor señal cuando se usó la Elución que contenía el dominio $\alpha 2$. Los clones D1Clon1, pIIIcClon3 y pIIIcClon7 mostraron señales muy bajas con la MICArS/H y los dos últimos con la Elución de $\alpha 2$. Sin embargo, otros clones podrán ser evaluados en un futuro, incluyendo el clon D1Clon6, el cual mostró inicialmente, gran señal por la elución del dominio $\alpha 2$ recombinante. Sotelo y colaboradores (31), mostraron una baja eficiencia en la selección de clones que pudieran unirse, es decir, un número de clones con capacidad de unión muy bajo en comparación con el número evaluado. En la actualidad, las nuevas librerías semisintéticas muestran eficiencias de hasta el 83% (48). Además, a diferencia de lo mostrado por Shi y colaboradores (36) y Baek y colaboradores (49), el sistema nuevo no mostró una notable capacidad de unión de los diferentes clones, en comparación con el sistema clásico.

A pesar que se había planteado la posibilidad de realizar un paneo usando como antígeno el dominio $\alpha 2$ recombinante, para obtener clones más específicos, al observar la afinidad de ciertos clones por la Elusión que contenía el dominio $\alpha 2$, se decidió en cambio probar la capacidad de unión de los clones D1Clon1, D1Clon4, pIIIcClon1 y pIIIcClon7 a las dos diferentes proteínas (MICAr y dominio $\alpha 2$), en curva de reacción. Los resultados mostraron que en efecto, los clones seleccionados en el paneo con MICAr y escogidos como candidatos para el reconocimiento del dominio $\alpha 2$, tienen afinidad a las dos proteínas dependiente de la concentración las mismas (**Figura 24**). El clon D1Clon4 fue el que tuvo mejor señal, y el clon pIIIcClon7 no tuvo un comportamiento dependiente de concentración, por el contrario, fue igual a la curva control sin fago, esto indicó, como se esperaba, que este fago no tenía afinidad hacia las proteínas, y se seleccionó por unión inespecífica en el paneo. Sin embargo, cabe resaltar que las señales de todos los clones fueron mayores para la proteína MICAr que para el dominio $\alpha 2$, que puede sugerir que los clones seleccionados se unen a epítomos conformacionales donde no solo reconozcan al dominio $\alpha 2$, sino que también muestren algo de afinidad por el dominio $\alpha 1$ o que la disposición

espacial del epítipo está conformacionalmente mejor expuesta en la proteína MICAr.

Es necesario comprobar que los genes contenidos en los fagos corresponden a un scFv, sin embargo, la contingencia sanitaria no permitió realizar estos análisis en éste trabajo, por lo que, para la continuación del proyecto, se sugiere la secuenciación de los genes y la comparación de los mismos en una base de datos para determinar la naturaleza de la proteína y la similitud de las regiones variables con genes de inmunoglobulinas anteriormente reportados.

6. OBJETIVO ESPECÍFICO IV

PROBAR LA CAPACIDAD DE DESPLAZAMIENTO DE LA PARTÍCULA VIRAL SELECCIONADA Y COMPARARLA CON UN ANTICUERPO RECOMBINANTE

6.1. Resultados

En primer lugar, se realizó una estandarización de la unión de MICA con NKG2D por el ELISA, usando diferentes concentraciones de ligando y receptor, esto para determinar las concentraciones óptimas de las proteínas donde se pudiese observar un desplazamiento. La **Figura 25** muestra el comportamiento de la unión de MICA a NKG2D, se determinó la concentración de saturación y a partir de ese dato se seleccionaron las concentraciones de 5ug/mL de NKG2D y de MICA, ya que se encontraban en la zona de linealidad de la curva. Esto es necesario para luego, poder observar el desplazamiento con un anticuerpo recombinante generado en el laboratorio y dirigido al dominio de unión de MICA $\alpha 1$. Con esto se podría determinar si bloqueando un solo dominio es posible desplazar la unión. En la **Figura 26** se muestra la prueba de desplazamiento, donde se observa que

el anticuerpo anti dominio $\alpha 1$ de MICA, desplaza a NKG2D de la unión de MICA, en forma dosis dependiente.

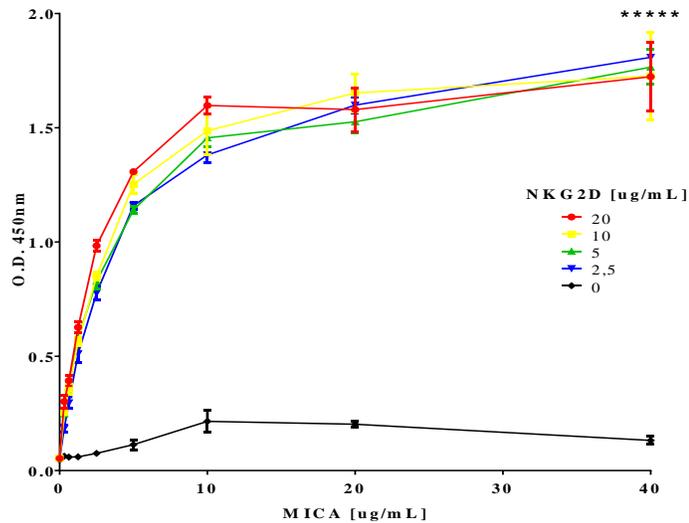


Figura 25. Curva de comportamiento de la unión de NKG2D a MICA. Se realizó una curva de reacción con concentraciones de 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 y 0,3125 $\mu\text{g/mL}$ de MICA rS/H. con concentraciones de NKG2D de 20, 10, 5 y 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Se detectó la unión con anti-His de ratón y con Anti-IgG de ratón-HRP. Como controles se realizaron diferentes puntos con proteína bloqueante. Las lecturas fueron realizadas a una longitud de onda de 450 nm. Media y varianza por medidas de triplicado. **** P<0,0001 calculado por análisis de varianza 2ways (ANOVA). Cada determinación se hizo por triplicado.

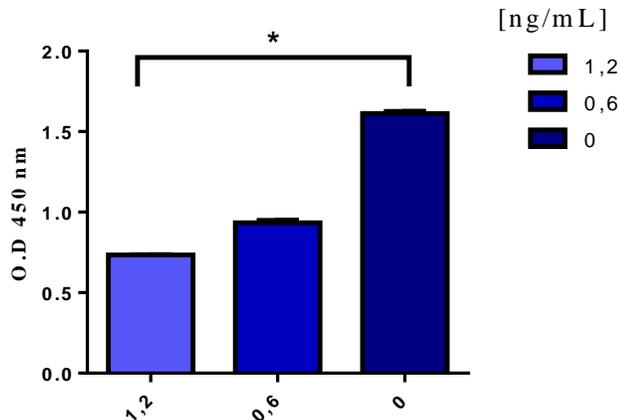


Figura 26. Desplazamiento de NKG2D en la unión con MICA, usando un anticuerpo monoclonal recombinantes completamente humano anti- $\alpha 1$. La figura muestra comportamiento de la unión de MICA y NKG2D, en presencia (1,2 y 0,6 ng/mL) o ausencia (0 ng/mL) de un anticuerpo monoclonal dirigido al dominio de unión $\alpha 1$ de MICA. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 450 nm. Media y varianza por medidas de triplicado. * $P < 0,0001$ calculado por análisis de varianza 2ways (ANOVA).

Con estos resultados se logra observar un desplazamiento de alrededor del 50%, usando una concentración de anticuerpo de 1,2 ng/mL. En consecuencia, se procedió a evaluar por ELISA el comportamiento *in vitro*, de la unión de NKG2D a el dominio $\alpha 2$, purificado previamente por FPLC, bajo una única concentración de NKG2D y compararlo con la unión a MICA. (Figura 27).

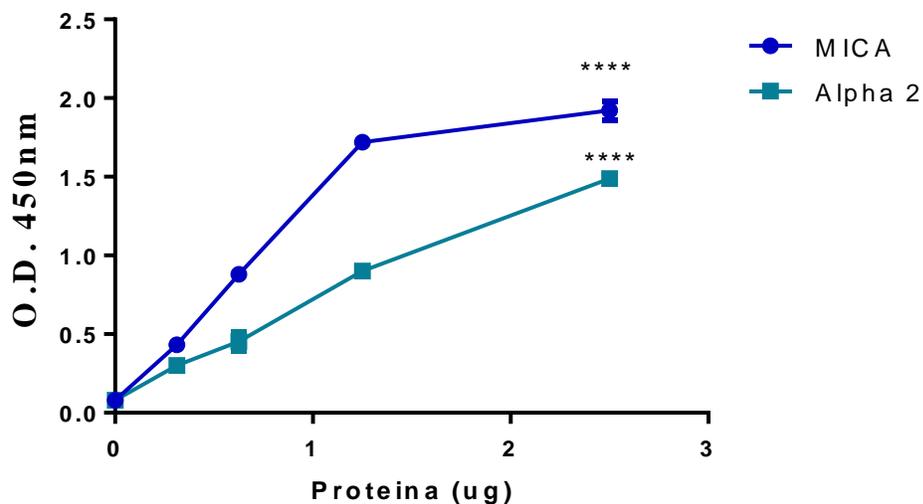


Figura 27. Curva de comportamiento de la unión de NKG2D a MICA y al Dominio $\alpha 2$. Se realizó un ELISA con concentraciones de 0,25 , 0,125 , 0,0625 , 0,03125 μg de MICA o Dominio $\alpha 2$. Se realizó por duplicado el punto 0 únicamente con proteína bloqueante. Se reconoció con 0,5 μg de NKG2D, previamente biotinilado, y se detectó con Estreptavidina-HRP (Invitrogen®). Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 450 nm. Media y varianza por medidas de duplicado. **** $P < 0,0001$ calculado por análisis de varianza 2ways (ANOVA).

Es importante mencionar que aunque se realizó inicialmente una estandarización para la unión de MICA, este ELISA no fue posible usarlo para probar el desplazamiento de los clones de los fagos seleccionados, pues el dominio $\alpha 2$ así como el scFv presente en el fago, poseen cola de histidina, que distorsionarían la señal de unión a través del anticuerpo anti-Histidina. La estrategia que se siguió para corregir este problema fue la de biotinilar el NKG2Dr, y con ello detectar directamente la señal de unión, usando Estreptavidina.

Con los resultados anteriores, se procedió a probar un desplazamiento usando los clones de fagos D1Clon4, pIIIcClon1 y como control D1Clon1 para observar si este clon tenía afinidad propiamente hacia la cola de Histidina de la proteína, y el clon pIIIcClon7 como control negativo. Para ello se usó tres diluciones de una producción de fagos estandarizada. El desplazamiento se probó usando tanto el dominio $\alpha 2$ como MICAr. Los resultados se observan en la **Figura 28**.

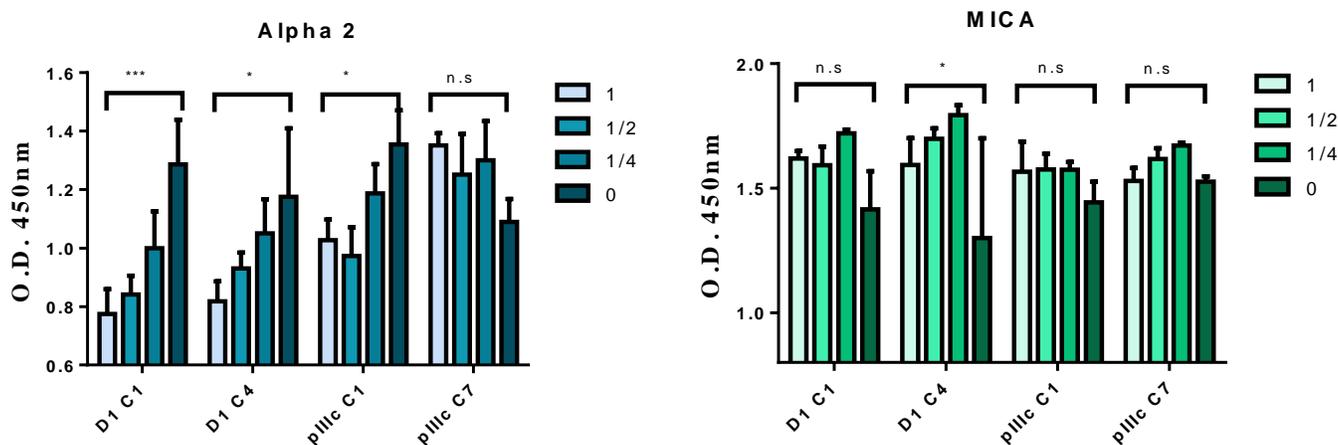


Figura 28. Desplazamiento con scFv en Fagos. En la figura se observa la prueba de desplazamiento, con los diferentes clones obtenidos del paneo. La placa fue sensibilizada con 0,625 μ g MICA α 2 o Dominio α 2 obtenido por FPLC. Se añadió 0,5 μ g de NKG2Dr biotinilado, para cada punto y se colocó en competencia purificado de fagos con diluciones de 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ y un control sin fago. Se detectó la unión de NKG2D a MICA o dominio α 2 de MICA, usando Estreptavidina- HRP. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 450 nm. Media y varianza por medidas de triplicado. ** P<0,0011 calculado por análisis de varianza 2ways (ANOVA).

Con estos resultados se logra observar el desplazamiento de la unión del dominio α 2 MICA a NKG2D, bloqueando un solo dominio de unión. Mientras que el desplazamiento de la molécula completa de la unión a NKG2D sólo se observó con el fago D1C4 a la máxima concentración, lo que podría deberse, a que el ensayo ELISA se observó un poco saturado. Por lo que para demostrarse la capacidad de desplazamiento de la molécula completa MICA de la unión con NKG2D, debe realizarse un ELISA con menores concentraciones de reactivos.

6.2. Discusión

Con las pruebas de desplazamiento realizadas podemos entender un poco más el comportamiento de la unión de las proteínas MICA y NKG2D, mostrándonos que aunque NKG2D sea un homodímero que reconoce los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, necesita del aporte de ambos dominios para lograr una unión estable.

Además con los resultados obtenidos, se puede determinar la gran afinidad que existe entre MICA y NKG2D. La **Figura 25** muestra que a pesar de las distintas concentraciones de NKG2D se presenta una gran señal en concentraciones bajas, donde la saturación de la unión se da muestra a los 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MICA. Por otra parte, en la **Figura 27** se pudo observar claramente que la molécula de MICA recombinante ($\alpha 1$ - $\alpha 2$), tiene mayor afinidad que el dominio $\alpha 2$ solamente, pues al observar la señal de unión bajo una misma cantidad de proteína, la molécula de MICA recluta con mayor fuerza al NKG2D en comparación que el dominio $\alpha 2$. Sin embargo, este resultado también permite corroborar que la proteína recombinante del dominio $\alpha 2$, fue subclonada y producida de manera correcta.

En cuanto al desplazamiento, se pudo observar que usando el anticuerpo anti dominio $\alpha 1$ fue posible el desplazamiento de la unión de NKG2D con MICA en más de un 50%. Esto responde a que se interrumpe los sitios unión del

ligando con su receptor. En la actualidad muy pocos anticuerpos dirigidos contra MICA como inmunoterapia, han sido desarrollados. En el 2018, Ferrari de Andrade y colaboradores (16), desarrollaron un anticuerpo monoclonal, dirigido contra el dominio $\alpha 3$, con el cual se evitaba la evasión por corte proteolítico de MICA en la superficie de las células tumorales. Lo publicado muestra, que con una concentración de aproximadamente 10^3 nM, se bloquea casi un 100% el corte proteolítico de MICA en la superficie celular. Este trabajo es de gran importancia, pues el anticuerpo no sólo bloquea el corte, sino que promueve la activación de las células NK por el receptor NKG2D, al reconocer MICA y el receptor Fc γ RIII, al reconocer la región Fc del anticuerpo. El anticuerpo además fue probado en un modelo murino con tumor humano, que demostró aumentar la supervivencia y evitar la metástasis. Esto refleja la gran relevancia que tiene MICA en la evasión inmune de las células tumorales y la posibilidad de ser un blanco terapéutico exitoso. Por otra parte, en el 2017 fue publicada una patente (*WO 2017/157895 A1*), que describe un anticuerpo humanizado (**D7**) dirigido contra un epítipo conformacional ubicado en una región polimórfica del dominio $\alpha 2$ que interviene indirectamente en la interacción entre NKG2D y MICA y que mostró actividad antitumoral en modelo murino (53). Este

anticuerpo mostró un porcentaje de lisado cercano al 80% cuando se usó una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, concentración mucho más alta a la usada en nuestro experimento. En el experimento de desplazamiento usando los clones de fagos (**Figura 28**) se observó un desplazamiento únicamente en presencia del dominio $\alpha 2$. Aquí el desplazamiento fue de más del 40 % en promedio usando los clones D1Clon1, D1Clon4 y pIIIcClon1. En cada uno de ellos se observa un desplazamiento dependiente de la concentración de fagos. Los clones D1Clon4 y pIIIcClon1 mostraron el resultado esperado, pues ya habían mostrado afinidad hacia la molécula, y se pensaba que estaban dirigidos al dominio de unión $\alpha 2$ de MICA. El clon D1Clon1 mostró desplazamiento igual que los otros dos clones y a diferencia de lo que se esperaba, este clon había sido seleccionado por mostrar afinidad hacia moléculas con cola de Histidina, por lo que se pensaba tenía afinidad hacia el marcador y no propiamente de la molécula de MICA, sin embargo, mostró capacidad de desplazamiento dependiente de concentración. Por último el clon pIIIcClon7 no mostró desplazamiento, lo que coincide con los resultados anteriores donde no muestra afinidad hacia las moléculas. Con los resultados con la molécula de MICAr, no se observó un desplazamiento, aunque dichos resultados no son concluyentes, debido a que las señales se

encuentran en la fase de saturación de la unión de NKG2D con MICA, lo cual no permite distinguir si existe un desplazamiento por los clones fagos seleccionados. Sin embargo, para futuros trabajos se recomienda realizar de nuevo este experimento, reduciendo la concentración de MICA, con ello obtener señales fuera de saturación y poder concluir respecto al bloqueo de la unión de MICA con la molécula NKG2D.

Aunque los experimentos de desplazamiento, no pueden ser comparados, pues fueron experimentos independientes con metodologías diferentes, es posible concluir que bloqueando uno de los dominios de MICA, puede desplazarse en mayor medida la unión al receptor. Sin embargo, en futuros trabajos podría ser posible observar un desplazamiento completo de la molécula, bloqueando los dos dominios de unión ($\alpha 1$ y $\alpha 2$). Por otro lado, es importante determinar la afinidad de los scFv obtenidos contra el dominio $\alpha 2$, pues su capacidad de desplazamiento puede deberse al número de clones de fagos usados y las valencias que puedan tener, y no por la afinidad del anticuerpo al antígeno. Aunque para todos los clones se usó una metodología estándar de producción de fagos, la cantidad de los mismos no fue posible medirla pues el número de colonias obtenidas fue incontable con la dilución usada.

Al momento no es usual que se use fagos fusionados a un scFv para lograr el desplazamiento de un antígeno a su receptor, generalmente estos estudios se realizan usando los fragmentos de anticuerpo (scFv o Fab) o la molécula completa. El uso de los scFv en fusionados a Fagos son usados para otras aplicaciones, como la que muestran Simonovic´ & Simonovic´, en el 2012 (50), donde usan este tipo de sistemas para la detección de TNT, o en combinación con otras tecnologías como lo muestra Chang y colaboradores en el 2020 (51), que combinan la tecnología de scFv de fagos con micro arreglos fluorescentes.

Por otra parte, para la continuación de este trabajo y para confirmar el efecto de bloqueo que tienen los clones de fagos, se recomienda realizar un experimento *in vitro* usando células que expresen en su superficie NKG2D, ya sea líneas celulares o líneas recombinantes, o en dado caso, muestra de PBMC y con ellas medir la capacidad que tienen moléculas de MICA recombinante marcadas a unirse receptor NKG2D expresado en la superficie, en presencia o ausencia de fagos con scFv, medido por citometría de flujo. De esta manera se simularía el fenómeno que sucede en los tumores, donde el MICA liberado de las células tumorales se une al NKG2D de los linfocitos y lo que se busca es bloquear esta unión, para evitar la reducción del

reconocimiento del receptor al MICA de la superficie celular y la internalización del mismo producto de la unión con el MICA liberado. Al momento, el uso de la técnica de citometría de flujo para el estudio de scFv de fagos se ha limitado para la selección de estos mismos como alternativa al peneo.

Sin embargo, para llevar este scFv a una posible terapia, el formato de IgG es el más aceptado al momento. La conversión del fragmento de anticuerpo a IgG puede resultar en una unión similar o inclusive mejor unión al antígeno, aunque los efectos por el incremento de la avidéz o afinidad funcional, tienen que ser considerados a ser responsables de éste mejoramiento. El cambio de molécula monovalente a bivalente puede incrementar la aparente unión al antígeno en varios órdenes de magnitud. Aunque, estudios han también demostrado pérdida de la afinidad después de la conversión del fragmento de scFv en IgG, sin embargo, se demuestra que dicha pérdida de afinidad no es tan severa (<20%) en la conversión a IgG y que al pasarlos a formatos tipo scFv-Fc o scIgG, mantienen su afinidad (52).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos dan cuenta del cumplimiento de los objetivos planteados. Primero fue posible generar dos librerías de fagos que expresan scFv humanos, de las cuales una de éstas tiene la capacidad de excluir y enriquecer scFv funcionales. Esto representa una herramienta moderna que permite la mejor selección de scFv para el desarrollo de anticuerpos. Aunque faltan datos para asegurar esto, los reportes de este tipo de tecnologías muestran una ventaja clara frente a los sistemas clásicos.

Por otra parte, fue posible construir, producir y purificar el dominio $\alpha 2$ de MICA como proteína recombinante, hecho que no se ha reportado al momento. Esta proteína demostró funcionalidad frente a la unión a su receptor NKG2D. Sin embargo, es necesario verificar su pureza, pues aunque fue purificado por dos metodologías cromatográficas, específicas para la proteína, la literatura muestra que para este tipo de proteínas, las cuales no forman cuerpos de inclusión, es necesario una purificación más fina, con diferentes tipos de cromatografía.

También fueron seleccionados clones de fagos, de ambas librerías, capaces de reconocer tanto la proteína MICAr como el dominio $\alpha 2$ recombinante, y

que mostraron comportamiento dependiente de la concentración de la proteína. Caber resaltar en primer lugar, que hace falta la estudiar la secuencia de estos clones, para un posible subclonamiento y desarrollo de anticuerpo. Por otra parte, se podrían explorar más clones de los seleccionados en el paneo y que no fueron incluidos en esta primera evaluación. Además, podría ser posible hacer un paneo con el dominio $\alpha 2$, para seleccionar con mayor fineza los clones.

Por último, se logró demostrar que el bloqueo de uno de los dominios de unión de MICA es suficiente para interrumpir el reconocimiento de NKG2D, a través de un anticuerpo monoclonal humano, dirigido contra el dominio $\alpha 1$ MICA, seleccionado y construido a partir de una librería de fagos. De manera paralela, los clones seleccionados de las librerías de fagos, que mostraron comportamiento dosis dependiente de la proteína, tuvieron la capacidad de bloquear la unión del dominio $\alpha 2$ a NKG2D, que indicaría una interrupción similar a la presentada por el anticuerpo. Sin embargo, hace falta mayor evidencia para demostrar esto, pues los resultados no fueron del todo concluyentes y las limitaciones por la emergencia sanitaria, no permitieron llegar hasta estos resultados. De igual manera, con proyecciones a futuro, se recomienda realizar más experimentos, no solo con la técnica ELISA, sino

además con la técnica de citometría de flujo, que simularía el comportamiento de bloqueo en un ambiente fisiológico.

Con todas estas evidencias es posible afirmar que una partícula viral portadora de un scFv dirigido al dominio $\alpha 2$ de la proteína MICA, bloquea la unión de ésta a la proteína NKG2D, al igual que un anticuerpo anti-dominio $\alpha 1$. Por lo que la hipótesis es comprobada.

En este trabajo se demostró que una librería creada con un número reducido de muestras de individuos, y a pesar de las pérdidas de diversidad que se presentan en su construcción, posee altas posibilidades de seleccionar clones que puedan reconocer el antígeno al cual se quiere dirigir un anticuerpo y que tengan funcionalidad. Todo esto deja en evidencia que las librerías de fagos son una herramienta versátil para la selección de anticuerpos monoclonales, pues facilitan su identificación y caracterización. Además de ello, son altamente útiles en el desarrollo de anticuerpos humanos con fines terapéuticos, pues no es necesaria la inmunización de personas para la obtención de los anticuerpos y posibilita la selección de los mismos contra antígenos no inmunogénicos.

Este trabajo aporta información clave en el desarrollo de librerías de scFv de fagos a partir de secuencias humanas, pues demuestra los grandes retos que se pueden enfrentar en la construcción de una librería. Aquí se propone dos grandes metodologías que optimizan la construcción, como lo son el ISA-PCR para la unión de las regiones variables y la metodología de la librería pIIIc que excluye secuencias con errores en el marco de lectura. Esto se comprueba al lograr la selección de clones funcionales con sólo un paneo. Por otra parte, la producción del dominio $\alpha 2$ de MICA, comprende un avance para el desarrollo de anticuerpos dirigidos hacia esta parte de la molécula y una herramienta para entender mejor el comportamiento de la unión a NKG2D. Por último, el desarrollo de un anticuerpo monoclonal humano, dirigido al dominio $\alpha 1$ de MICA y la demostración del bloqueo de la unión con NKG2D, además de la selección de los clones, que puedan dar paso a un anticuerpo contra dominio $\alpha 2$, son un gran paso en el camino del desarrollo de una inmunoterapia, contra los distintos tipos de tumores que evadan el reconocimiento del receptor NKG2D de las células NK, por su ligando MICA. A pesar que es un largo camino por recorrer, los resultados de este trabajo son un aporte positivo para el objetivo éste objetivo final.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) YANG, X., KUANG, S., WANG, L. & WEI, Y. 2018. MHC class I chain-related A: Polymorphism, regulation and therapeutic value in cancer. *Biomed Pharmacother* 103: 111-7.
- (2) JELENCIC, V., LENARTIC, M., WENSVEEN, F. M. & POLIC, B. 2017. NKG2D: A versatile player in the immune system. *Immunol Lett* 189: 48-53.
- (3) SMYTH, M. J., HAYAKAWA, Y., TAKEDA, K. & YAGITA, H. 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 850-861.
- (4) MCFARLAND BJ, KORTEMME T, YU SF, BAKER D, STRONG RK. 2003. Symmetry recognizing asymmetry: analysis of the interactions between the C-type lectin-like immunoreceptor NKG2D and MHC class I-like ligands. *Structure* 11: 411-22.
- (5) Li, P., Morris, D., L., Willcox, B., E., Steinle, A., Spies, T. & Strong, R., K. 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature immunology* 2 (5): 444-451.
- (6) LODOEN, M. B. & LANIER, L. L. 2006. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Current opinion in immunology* 18, 391-398.
- (7) RAULET DH, GASSER S, GOWEN BG, DENG W, JUNG H. 2013. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* 31: 413-41.

- (8) CHITADZE G, BHAT J, LETTAU M, JANSSEN O, KABELITZ D. 2013. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol* 78: 120-9.
- (9) FERNANDEZ-MESSINA L, REYBURN HT, VALES-GOMEZ M. 2012. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front Immunol* 3: 299.
- (10) FERNANDEZ-MESSINA L, ASHIRU O, BOUTET P, AGUERA-GONZALEZ S, SKEPPER JN, REYBURN HT, VALES-GOMEZ M. 2010. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem* 285: 8543-51.
- (11) ASHIRU O, BOUTET P, FERNANDEZ-MESSINA L, AGUERA-GONZALEZ S, SKEPPER JN, VALES-GOMEZ M, REYBURN HT. 2010. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 70: 481-9.
- (12) SALIH HR, RAMMENSEE HG, STEINLE A. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169: 4098-102.
- (13) LOPEZ-COBO S, CAMPOS-SILVA C, MOYANO A, OLIVEIRA-RODRIGUEZ M, PASCHEN A, YANEZ-MO M, BLANCO-LOPEZ MC, VALES-GOMEZ M. 2018. Immunoassays for scarce tumour-antigens in exosomes: detection of the human NKG2D-Ligand, MICA, in tetraspanin-containing nanovesicles from melanoma. *J Nanobiotechnology* 16: 47.

- (14) RAFFAGHELLO, L. ET AL. 2004. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* **6**, 558-568.
- (15) LANIER, L. L. 2015. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer immunology research* **3**, 575-582
- (16) FERRARI DE ANDRADE L, TAY RE, PAN D, LUOMA AM, ITO Y, BADRINATH S, TSOUCAS D, FRANZ B, MAY KF, JR., HARVEY CJ, KOBOLD S, PYRDOL JW, YOON C, YUAN GC, HODI FS, DRANOFF G, WUCHERPFENNIG KW. 2018. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science* **359**: 1537-42.
- (17) BARANWAL AK, MEHRA NK. 2017. Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A (MICA) Molecules: Relevance in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* **8**: 182.
- (18) BURTON., D., R. 2001. *Antibody Libraries*. EN: BARBAS., C., F., BURTON., D.,R., SCOTT., J., K., & SILVERMAN., G., J. *Phage Display A Laboratory Manual*. Nueva York, EUA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (19) FEEDERLE, R. & SCHEPERS, A. 2017. Antibodies Specific Nucleic acid Modifications. *RNA Biology*. **14**(9): 1080-1098.
- (20) KOTSOVILIS, S. & ADREKOS, E. 2014. Therapeutic Human Monoclonal Antibodies in Inflammatory Diseases. EN: STEINITZ., M. (Ed). *Human Monoclonal Antibodies Methods and Protocols*. Jerusalem, Israel. Human Press.

- (21) FRENZEL., A., KÜGLER., J., WILKE., S., SCHIRMANN., T., & HUST., M. 2014. Construction of Human Antibody Gene Library and Selection of Antibody by Phage Display. EN: STEINITZ., M. (Ed). Human Monoclonal Antibodies Methods and Protocols. Jerusalem, Israel. Human Press.
- (22) TOLEIKIS., L. & FRENZEL., A. 2012. Cloning Single-Chain Antibody Fragments (scFv) from Hybridoma Cells EN: CHAMES., P. (Ed). Antibody Engineering Methods and Protocols 2 Ed. Marseille, Francia. Human Press.
- (23) POWERS., G., A., HUDSON., P., J. & WHEATCROFT M., P. 2012. Design and Production of Multimeric Antibody Fragments, Focused on Diabodies with Enhanced Clinical Efficacy. EN: CHAMES., P. (Ed). Antibody Engineering Methods and Protocols 2 Ed. Marseille, Francia. Human Press.
- (24) BROCKMANN., E., C. 2012. Selection of Stable Antibodies by Phage Display. EN: CHAMES., P. (Ed). Antibody Engineering Methods and Protocols 2 Ed. Marseille, Francia. Human Press.
- (25) LENNARD., S. 2002. Standard Protocols for the Construction of scFv Libraries. EN: O'Brien., P., M. y Aitken., R. (Eds). Antibody Phage Display Methods and Protocols. Totowa, New Jersey, Estados Unidos. Humana Press. Pp 59.
- (26) VAKS., L. & BENHAR., I. 2014. Production of Stabilized scFv Antibody Fragments in the *E.coli* Bacterial Cytoplasm. EN: STEINITZ., M. (Ed). Human Monoclonal Antibodies Methods and Protocols. Jerusalem, Israel. Human Press.

- (27) KATSUDA., T., SONODA., H., KUMADA., Y., & YAMAJI., H. 2012. Production of antibody Fragments in *Escherichia coli*. EN: CHAMES., P. (Ed). Antibody Engineering Methods and Protocols 2 Ed. Marseille, Frnacia. Human Press.
- (28) HUST., M., FRENZEL., A., MEYER., T., SCHIRMANN., T.,DÜBEL., S. 2012. Construction of Human Naïve Antibody Gene Libraries. EN: CHAMES., P. (Ed). Antibody Engineering Methods and Protocols 2 Ed. Marseille, Frnacia. Human Press.
- (29) DEANTONIO., C., COTELO., D., MACOR., P., SANTORO., C., SBLATTERO., D. 2014. Phage Display Technology for Human Monoclonal Antibodies. EN: STEINITZ., M. (Ed). Human Monoclonal Antibodies Methods and Protocols. Jerusalem, Israel. Human Press.
- (30) HOOGENBOOM., H., R. 2002. Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications. EN: O'Brien., P., M. y Aitken., R. (Eds). Antibody Phage Display Methods and Protocols. Totowa, New Jersey, Estados Unidos. Humana Press. Pp 1.
- (31) SOTELO., P., H., COLLAZO., N., ZUÑIGA., R., GUTIERREZ-GONZALEZ., M., CATALÁN., D., RIBEIRO., C., H., AGUILLON., J., C. & MOLINA., M., C. 2012. An efficient method for variable región assembly in the construction of scFv phage display libraries using independent strand amplification. *mAbs* 4(4): 542-550.
- (32) ADAMS., J., J., NELSON., B. & SIDHU., S., S. 2014. Recombinant Genetic Libraries and Human Monoclonal Antibodies. EN: STEINITZ., M. (Ed). Human Monoclonal Antibodies Methods and Protocols. Jerusalem, Israel. Human Press.

- (33) MURPHY, K. & WEAVER, C. 2017. Janeway's Immuno Biology. 9^a Ed. Nueva York, USA. Garland Since/ Taylor & Francis Group. 176p.
- (34) CHAUDHARY V., K., BATRA J., K., GALLO M.,G., WILLINGHAM M., C., FITZGERALD D., J. & PASTAN A. I. 1990. A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in Escherichia coli as single-chain immotoxins. Proc. Nadl. Acad. Sci.87: 1066-1070.
- (35) SCOTT, J., K. & BARBAS, C., F. 2001. Phage Display Vector. EN: BARBAS., C., F., BURTON., D.,R., SCOTT., J., K., & SILVERMAN., G., J. Phage Display A Laboratory Manual. Nueva York, EUA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (36) SHI, B., WANG, H., GOU, S., XU, Y., LI., Z. & GU, J. 2007. Protein III-based single-chain antibody phage display using bacterial cells bearing an additional genome of a gene-III-lacking helper phage. BioTechnique 42: 760-765.
- (37) RONDOT, S., KOCH, J., BREITLING F., & DÜBEL, S. 2001. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. Nature Biothechnology 19: 75-78.
- (38) BAEK, H., SUCK, K., KIM, Y., & CHA, S. 2002. An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. Nuceic Acids Research 30 (5) e18.
- (39) CARRILLO, J., G., CANDIA, M., C., LUGO, R., E., ESPINOZA, O., & NORIEGA, J., A. 2013. Evaluación de Procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). INVURNOS 8(1):19-26.

- (40) WANG, S., XIANG, Z., WANG, Y., XU, H., ZHANG, D., WANG, X., & SHENG, J. 2016. Expression and purification of human MHC class I-related chain molecule B- α 1 domain. *Protein Expression and Purification* 123: 83-39.
- (41) ZOU, Y., & STASTNY, PETER. 2012. High Resolution MICA Genotyping by Sequence-Based Typing (SBT). EN: CHRISTIANSEN, F., T., & TALT, B., D. *Immugenetics: methods and applications in clinical practice*. Springer Science-Busniess, Nueva Yor, USA.
- (42) ZHANG, Y., LAZARO, M., LAVINGIA, B., & STASTNY, P. 2000. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Human Immunology* 62: 620-631.
- (43) ZWIRNER N., W., MARCOS, C., Y., MIRBAHA, F., ZUO, Y., & STASTNY, P. 2000. Identification of MICA as a new Polymorphic alloantigen recognized by antibodies in Sera of organ transplat recipients. *Human immunology*, 61: 917-924.
- (44) KATSUYAMA, Y, OTA, M., ANDO, H., SAITO, S., MIZUKI, N., KERA, J., BAHARAM, S., NOSE, Y. & INOKO, H. 1999. Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54: 178-184.
- (45) FRANCIS, D. M. & PAGE, R. 2010. Strategies to optimize protein expression in *E.coli*. *Current Protocols in Protein Scince*, 5(21):1-29.
- (46) LAKZAEI, M., RASEE M., J., FAZAEI A., A., & AMINIAN M. 2018. A comparison of three strategies for biopanning of phage-scFv library against diphtheria toxin. *Journal Cell Physio*: 1-9.

- (47) GIBBS J., VESSELS M. & ROTHENBERG M. 2017. Effective Blocking Procedures in ELISA assays. Application Note CORNING Ing.10/17.
- (48) VALADON P., PEREZ-TAPIA S., M., NELSON R., S., GUZMÁN-BRIGAS O., U., ARRIETA-OLIVA H., I., GOMEZ-CASTELLANO K., M., POLH M.,A., & ALMAGRO J., C. 2019. ATHEA Gold Libraries™: antibody libraries for therapeutic antibody discovery. mAbs.
- (49) BAEK H., SUK K., KIM Y., & CHA S. 2002. An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. *Nucleic Acids Research* 30(5) e18.
- (50) SIMONOVIC´ M. & SIMONOVIC´ B. 2012. Detection of TNT-derivatives with recombinant phages. *Bacteriophage* 2(2): 61-69.
- (51) CHANG S., KIM S., HAN J., HA S., LEE H., SONG S., W., LEE D., KWON S., CHUNG J., & KIM J. 2020. A high-Throughput Single-Clon Phage Fluorescence Microwell Immunoassay And Laser-Driven Clonal Retrieval System. *Biomolecules* 10 (517).
- (52) STEINWAND M., DROSTE P., FRENZEL A., HUST M., DUBEL S. & SCHIRMANN T.2014. The influence of antibody frangment format on phage display based affinity maturation of IgG. mAbs, 6(1) 204-218.
- (53) BLERY, M. & GAUTHIER, L. 2017. *WO 2017/157895 A1*. Marseille, Francia: Anti-MICA antibodies.
- (54) VINCKE, C., GUTIERREZ, C., WERNEY, U., DEVOOGDT, N., HASSANZADEH-GASSSABEH, G. & MUYLDERMANS, S. 2012. Generation of single domain antibody fragments derived from camelids and

- generation of manifold constructs. EN: CHAMES., P. (Ed). Antibody Engineering Methods and Protocols 2 Ed. Marseille, Francia. Human Press.
- (55) GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, M., FARÍAS., C., TELLO, S., PÉREZ-ETCHEVERRY, D., ROMERO, A., ZÚÑIGA, R., RIBEIRO, C.,H., LORENZO-FERREIRO, C. & MOLINA, M.,C. 2019. Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. SCIENTIFIC REPORTS (9):16850.
- (56) FREZEL, A., KÜGLER, J., HELMSING, S., MEIER, D., SCHIRRMANN, T., HUST, M. & DÜBEL, S. 2017. Designing human antibodies by phage display. Transfusion Medicine and Hemotherapy 44: 312-218.
- (57) FRENZEL, A., SCHIRRMANN, T. & HUST, M. 2016. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. mAbs, 8(7): 1177-1194.
- (58) HARDING, F., A., STICKLER, M., M., RAZO, J. & DUBRIDGE, R. 2010. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies, mAbs, 2(3): 256-265.