



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Selección de anticuerpos tipo scFv, contra el complejo sHLA clase I y péptidos derivados de *Mycobacterium tuberculosis*, usando tecnología de Despliegue en Fago”.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Paola Andrea Ortega Portilla

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
[Instituto de investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Isabel Sada Ovalle
Dra. Goar Gevorkian
[Facultad de Medicina](#)
[Instituto de investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad Universitaria. Cd. Mx. Octubre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.2 Complejo Principal de Histocompatibilidad

1.3HLA clase I

1.4Estructura

1.5Procesamiento antigénico

1.6 Antecedentes

CAPITULO 2

2.1 Justificación

2.2 Hipótesis

2.3 Objetivo principal

2.4 Objetivos específicos

2.5 Diseño experimental

CAPITULO 3

3. Estrategia Experimental y resultados

3.1 Primer objetivo

3.1.1 Expresión de scHLA A2

3.1.2 Extracción de proteína a partir de cuerpos de inclusión

3.1.3 comparación de resultados y análisis

3.1.4 Formación del complejo scHLA y péptidos de *Mycobacterium tuberculosis*

3.1.5 Inducción de plegamiento

3.1.6 Verificación de formación de complejo

3.2 Segundo objetivo

3.2.1 Amplificación y cuantificación de fago coperaados M13

3.2.2 Amplificación y fusión de biblioteca I con fago coperaador M13

3.2.3 Rondas de selección

3.2.4 Evaluación de afinidad y reconocimientos especifico por inmunoensayo

CAPITULO 4

4.1 Discusión

4.2 Conclusiones

BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, (*M.tb*) que afecta principalmente los pulmones, En 2014 un estimado de 9.6 millones de personas desarrollaron tuberculosis de los cuales 12% eran VIH-positivas y 1,5 millones de personas fallecieron a consecuencia de esta enfermedad según datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (Global Tuberculosis Report. 2014) a éste panorama se suma la aparición de cepas resistentes y multidrogo resistentes (MDR-TB) con un estimado de 480000 casos para el 2014. Los avances en el entendimiento de la inmunopatogénesis de tuberculosis desarrollados en los últimos años han permitido abrir un amplio campo de investigación, como también una visión más amplia en cuanto a posibles alternativas de diagnóstico e inmunoterapia, que tendrían como finalidad complementar los ya existentes, especialmente en casos de tuberculosis asociada al VIH , así como en los casos de tuberculosis MDR-TB, para lograr tal objetivo, es necesario primero seleccionar, desarrollar y evaluar la efectividad de moléculas como proteínas, componentes celulares, anticuerpos e inmunocomplejos que permitan hacer un seguimiento del inicio de la infección y el desarrollo de la enfermedad, generando un mayor entendimiento de la interacción entre *M.tb* y su hospedero, así como el desarrollo de la respuesta inmune. Se sabe actualmente, que gran parte de la respuesta inmune en humanos, primates no humanos y ratones depende de los linfocitos T (North, R.J. & Jung, 2004) a su vez, el reconocimiento específico de epítopes antigénicos por los linfocitos T, depende de la presentación antigénica en el contexto de las moléculas codificadas por el Complejo Principal de Histocompatibilidad, CPH, (HLA clase I y II) tal interacción es vital en el direccionamiento de la respuesta inmune, razón por la cual, se han implementado técnicas de biología molecular que permiten obtener a la proteína HLA recombinante, con el fin de formar complejos entre ésta proteína y epítopes sintéticos específicos de relevancia clínica, simulando de esta forma la presentación antigénica a los linfocitos T, un criterio primario para la selección de cualquier antígeno inductor de respuesta inmune celular, es su capacidad para

despertar una respuesta en los linfocitos T. Para lograr éste fin, los epítopes seleccionados deben cumplir características, óptimas que permiten la unión con las proteínas del CPH clase I y II, las cuales varían según su longitud y afinidad de unión.

A la fecha existen diversos trabajos que utilizan epítopes involucrados en procesos cancerígenos e infecciones virales y bacterianas, por una parte, enfocados en la construcción de complejos entre la proteína recombinante HLA y péptidos sintéticos que se expresan en los diferentes enfermedades, que permiten la identificación de linfocitos T citotóxicos antígeno-específicos *in vitro* e *in situ*, así mismo, el desarrollo de anticuerpos tipo TCR, que simulan el reconocimiento del receptor de linfocitos T, hacía el complejo HLA-péptidos expuestos en la superficie celular, han sido evaluados, por ejemplo en el trabajo realizado por Denkberg, G., et al 2002, donde un anticuerpo tipo TCR, permitió identificar células tumorales de melanoma, y también han sido estudiados en infecciones virales. Herschhorn, et al 2010, la disponibilidad de anticuerpos tipo TCR contra complejos p/MHC es una herramienta que permite tener una perspectiva más amplia acerca de la presentación antigénica celular.

1.1 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El complejo Principal de Histocompatibilidad, o más conocido por sus siglas MHC (Major Histocompatibility Complex) contiene dos tipos de genes polimórficos, los genes de la clase I y la clase II, que codifican dos grupos de proteínas homólogas, pero con estructuras distintas, y otros genes no polimórficos cuyos productos participan en la presentación del antígeno. Hay tres genes de la clase I del MHC llamados HLA-A, HLA-B y HLA-C, C y tres loci de la clase II del HLA llamados HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Abbas a 2007, Teniendo en cuenta que estas moléculas poseen alto polimorfismo, la tipificación actual toma en cuenta tanto las reacciones serológicas como características moleculares, por lo que a los alelos individuales se les puede llamar HLA-A *0201, que se refiere al subtipo 01 del HLA-A2, siendo el HLA-A*0201 uno de los más frecuentes, según estudios poblacionales sobre diversidad y frecuencia alélica del HLA-A, B y C Kai Cao et al

2001, Greenbaum J et al, 2011, y la base de datos de frecuencia alélica de la población mundial. <http://www.allelefrecuencias.net>

Una de las principales funciones de las proteínas codificadas por el CPH, está implicada en la presentación antigénica a los linfocitos T, donde las moléculas de la clase I del CPH muestran los péptidos a los linfocitos T CD8+ y las moléculas de la clase II del CPH muestran los péptidos a los linfocitos T CD4+; la expresión de estas moléculas también es diferente, donde las moléculas de clase I se expresan sobre la superficie de células nucleadas de forma constitutiva, y las de clase II se expresan sobre células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, todo esto, estrechamente relacionado con la función de los linfocitos que las reconocen, por ejemplo, los linfocitos TCD8+, reconocen células infectadas con virus o proceso tumorales para su destrucción(en su mayoría péptidos de derivados de proteínas intracelular) , en cambio los linfocitos T CD4+,actúan según su estado de maduración, donde los TCD4 vírgenes reconocen partículas sobre los células dendríticas en órganos linfoides, y los linfocitos T CD4 cooperadores diferenciados actúan sobre macrófagos para fomentar la eliminación de microorganismos fagocitados, y sobre linfocitos B para la producción, por lo tanto las molécula de clase II expresan péptidos derivados de microorganismos y proteínas extracelulares.

1.2 Estructura molécula HLA-I

Las moléculas HLA –I, codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad clase I, constan de dos cadenas polipeptídicas, donde la cadena α polimórfica con un peso de 46KDa se codifica en el CPH (en el cromosoma 6 en seres humanos), y la cadena la β 2 microglobulina de 12kDa, no polimórfica codificada en el cromosoma 15. Kenneth Murphy 2008, éste heterodimero está unido de forma no covalente, por medio de enlaces disulfuro, tiene cuatro dominios, tres pertenecientes a la cadena α y uno a la cadena β 2, el dominio α 3 sirve de punto de unión con los linfocitos CD8, su extremo carboxilo se extiende con 25 aminoácido hidrófobos que atraviesan la membrana plasmática, este dominio es conservado en las moléculas MHC-I, continuando con una secuencia de 30

aminoácidos básicos que interactúan con los grupos de la cabeza de los fosfolípidos de la cara interna de la membrana y anclan a la molécula, por otra parte, la cadena β 2 microglobulina también es conservada en las moléculas MHC-I y está implicada en transporte intracelular del péptido y estabilidad conformacional Hansen, T, 1997, los dominios α 1 y α 2 plegados forman las paredes de una hendidura en la superficie de la molécula que se conoce como sitio de unión al péptido

- Unión al péptido:

La hendidura formada por los dominios α 1 y α 2, tiene una longitud aproximada de 90 residuos de aminoácidos, ubicada en el extremo amino terminal de la molécula HLA-I, está conformada por dos cadenas α hélice antiparalelas, sobre una base de ocho en conformación de hoja β . A pesar de que diferentes moléculas codificadas por el MHC, se unen a péptidos con alta diversidad, se conservan ciertos patrones de interacción péptido- molécula, generando estabilidad de unión, por ejemplo, el sitio de unión al péptido de la molécula clase I es cerrado en los extremos, lo cual limita la longitud de los epítopes (8-11 residuos de aminoácidos), los residuos de anclaje de un epítipo que se une a la molécula HLA clase I, se localizan frecuentemente en el extremo amino y carboxiterminal, y por lo regular poseen cadenas laterales de naturaleza hidrofóbica Bjorkman et al 1987.

1.3 Procesamiento Antigénico

El procesamiento y presentación de antígenos sobre las moléculas MHC clase I, es un proceso conocido, donde proteínas no propias, patógenas o alteradas, son procesadas en el citoplasma y presentadas en la superficie celular con en el contexto HLA- I, previo al procesamiento, las proteínas son unidas covalentemente a ubiquitina, lo que permite que un complejo de proteasas llamado proteasoma corte la secuencia proteica en segmentos de longitud óptima, que son translocados por el transportador asociado a procesamiento antigénico TAP hacia el retículo endoplásmico, donde son asociados a la cadena α y a la β 2 microglobulina, formando un heterodímero estable gracias a la unión del péptido,

éste complejo se mueve a través del sistema de Golgi hasta llegar a la superficie celular, donde será reconocido por el receptor de linfocitos T (TCR), consecuentemente, los linfocitos T serán activados por señalización, co-receptores y otras moléculas co-estimulantes, todo este proceso desemboca en la secreción de citosinas (IL-2) o interferón γ , direccionados a hacia la eliminación de la célula infectada. Chen Y, et al 2009

1.4 ANTECEDENTES

Existe una amplia gama de moléculas blanco que se sobre-expresan en superficies celulares en procesos específicos como cáncer (EGFR epidermal growth factor: receptor que es sobre-expresado en tumores del páncreas, pulmón y colon) F.X. Real, and Rettig, 1986, la molécula CD123 sobre células madre en leucemia mieloide aguda (Jordan, C., et al. 2000), o moléculas blanco que sirven como biomarcadores como: la L carnitina y el TNF- α , e incluso alérgenos presentes en productos alimenticios. Es por esto que el desarrollo de moléculas capaces de reconocer e identificar estos blancos terapéuticos es importante en los campos del diagnóstico e inmunoterapia. Actualmente, gracias a los avances en biología molecular es posible trabajar y evaluar *in vitro* la actividad de un amplio rango de moléculas de diferente naturaleza, por ejemplo: la formación de complejos HLA-A2 y péptidos. Sodaly M., et al 2013, ligaron covalentemente antígenos derivados de células de melanoma, a la secuencia de scHLA-A2 y evaluaron su actividad biológica mediante la producción de INF- γ de linfocitos T CD8 antígeno-específicos. Por otra parte, Rachel Bras-Gonçalves et al, 2003 usaron tetrámeros de HLA-A2 con el péptido MART para identificar *in situ* linfocitos que se infiltran en tumores de Melanoma metastásico. Asimismo, se logró evaluar el adecuado plegamiento, secuencia y actividad biológica del complejo HLA con péptidos del virus linfotrópico humano mediante la secreción de IFN- γ de linfocitos T citotóxicos antígeno específicos (Denkberg, G., et al., 2002) y la evaluación de la respuesta citotóxica en el reconocimiento específico del complejo PR1/HLA-A2 sobre-expresado en células de leucemia mieloide aguda (Sergeeva, A., et al 2011).

Como se observó en los anteriores estudios, los epítopes seleccionados para la formación de inmunocomplejos con la proteína recombinante HLA-A son muy importantes en la inmunopatogénesis de las diferentes enfermedades.

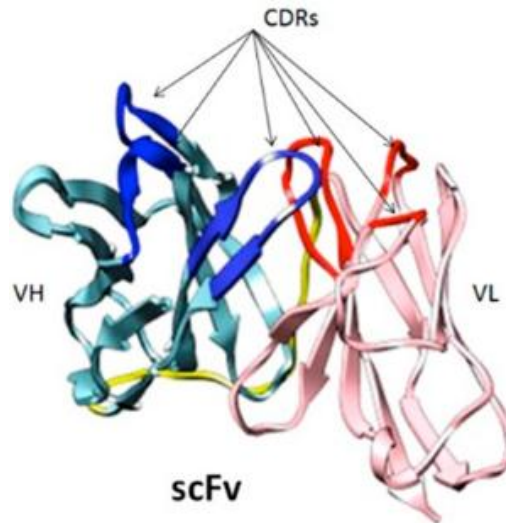
Fragmentos de anticuerpo de una sola cadena scFvs

Este tipo de anticuerpos conserva la habilidad de reconocimiento de un anticuerpo completo y pueden ser fácilmente expresados de forma funcional en *E. coli*, permitiendo modificaciones génicas (en secuencias CDR: regiones determinantes de complementariedad), para mejorar propiedades a nivel proteico, como el incremento de afinidad y alteración de especificidad A. D. Griffiths and A. R. Duncan, 1998, lo que les permite ofrecer ventajas comparado con anticuerpo monoclonales, por ejemplo presenta mejor penetración tisular y rápida eliminación de sangre, permiten unión de moléculas a su estructura como radionucleotidos para su aplicación en radioterapia y gracias a su rápida eliminación de sangre, minimiza su exposición con tejido sano Cheng, K.T. 2004 Kobayashi, N, 2011 y La ausencia de la FC, en su estructura, despierta menor inmunogenicidad, lo que los convierte en mejores agentes terapéuticos en comparación con anticuerpo monoclonales, razón por la cual los scFvs tiene potencial en el bloqueo de receptores, neutralización de patógenos, y terapia antigénica dirigida Carter, P. J. (2006).

Estructura de scFv

Constan de las regiones variables que pertenece a las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, las cuales están unidas por un péptido flexible, con un peso aproximado de (~30 kDa), la longitud del fragmento de unión ubicado entre el extremo carboxi terminal de un dominio variable y el amino terminal del otro dominio, se estima que mide 3.5nm lo cual no afecta la habilidad de los dominios para plegarse y formar un sitio de unión al antígeno. J. S. Huston et al 1991 además de la longitud, la secuencia y composición de aminoácidos también deben cumplir con ciertas cualidades, por ejemplo contar con naturaleza hidrofílica, lo que evita que éste péptido de unión se intercale con o entre los dominios variables durante el plegamiento. P. Argos, 1990 el diseño más usado

tiene en su secuencia residuos de glicina y serina lo que brinda flexibilidad y/o residuos cargados como ácido glutámico y lisina inter-espaciados potencian la solubilidad.



Fragmento variable de cadena sencilla (scFv). En amarillo se observa el péptido conector entre los dominios VH y VL. Se destacan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) que forman el sitio de reconocimiento al antígeno. Revista Digital Universitaria ISSN: 1607 - 6079

En cuanto a la manipulación de Los scfv en el laboratorio, gracias a que constan de dominios de fracción variable de cadena pesada y ligera unidos por un oligopeptidos han sido ampliamente usado para la construcción de bibliotecas, debido a su pequeño tamaño, hacen que sean fácilmente clonados, tolerados y menos degradados por bacterias, por lo tanto se obtiene altos niveles de expresión. Estas bibliotecas permiten desplegar proteínas o péptidos recombinantes sobre la superficie de bacteriófagos formando bibliotecas con alta diversidad, para ser enfrentados a moléculas blanco (Smith, G.P. 1985), una de las bibliotecas más utilizadas en trabajos de investigación es la Tomlinson I&J, la cual despliega en la superficie de sus fagos anticuerpos de fragmentos variable de una sola cadena (scFv), que constan de dominios de fracción variable de cadena pesada y ligera unidos por un oligopéptido y retienen la especificidad de unión de un anticuerpo completo, pero con ciertas ventajas frente a anticuerpos monoclonales, como la baja inmunogenicidad, y acumulación en tejidos no

específicos. Dentro de los estudios donde han seleccionados scFv a partir de biblioteca comerciales está el trabajo de Rabad M et al 2015 en el cual se identificaron y solubilizaron scFv's específicos contra la molécula L- carnitina, que podrían ser usados como un posible agente terapéutico o como herramienta diagnóstica, asimismo, Ali Akbar Alizadeh et al (2015) identificaron una clona con una secuencia de un scfv dirigido contra TNF- α , que reconoce con una apropiada afinidad la molécula blanco, convirtiéndolo en un potencial inhibidor del TNF- α en situaciones no deseadas. En el 2015 Otlewski et. al, seleccionaron un anticuerpo tipo scFv, a partir de la biblioteca Tomilinson I & J, que reconoció de forma específica a una isoforma de la proteína Hsp90, implicada en procesos cancerígenos, haciendo uso de la misma biblioteca Jing Xia, et. Al 2013, seleccionaron un scFv que reconoció a la molécula CD133 ubicada en la superficie de celular, y es fuertemente relacionada con iniciación y sostenimiento de tumores. Edward Eteshola 2010, seleccionó y caracterizó a partir de una librería comercial de origen humano un scFv, que reconoce a una proteína implicada en el rechazo de trasplantes llamada monocina inducida por INF- γ (MIG/CXCL9), catalogándose como candidato potencial para monitorear trasplantes, o en otras aplicaciones biomédicas donde la detección de los niveles de MIG sea importante. Dada la alta diversidad de las bibliotecas de scfv, es posible encontrar fragmentos de anticuerpos incluso contra macromoléculas como en el trabajo realizado por Si Wu et al (2007) donde se identificaron un scfv que reconoce al complejo SRP-SR, el cual está compuesto por una parte proteica Ffh y por una secuencia de RNA llamada 4,5SRNA, tal complejo es conservado en microorganismos, por lo tanto, éste scfv podría representar una valiosa herramienta en proyectos de investigación estructural y funcional, en el 2015 el grupo de Frank Camacho *et al*, seleccionaron y caracterizaron un scFv, tipo TCR, dirigido contra el complejo HLA y un péptido de naturaleza lipídica de M. tb, *catalogado como una valiosa herramienta de investigación.*

En M.tb se han caracterizado y purificado diferentes antígenos presentes en la pared celular, citoplasma y filtrado de cultivo que inducen inmunidad mediada por células (Andersen, P. 1997, Mustafa, A.S, 1996, Young 1992). Dentro de los

cuales destacan, la proteína de 38 kDa que predomina en el filtrado de cultivo, induce una respuesta inmune de tipo Th1 y una respuesta inmune humoral en pacientes con tuberculosis activa (Harboe, M et al 1992), el complejo Ag85 que constituye el 30% del material proteico del filtrado de cultivo (Palma C. et al 2007), está formado por tres proteínas el Ag85A, Ag85B y Ag85C (Ohara, N et al.1995, Wiker, H et al 1992). Las cuales poseen pesos moleculares entre 30 y 32 kDa: 85A, 85B, y 85C, y poseen una homología de 80% entre el Ag85B y Ag85A y de 60% entre el Ag85B y el Ag85C (Content, J., A 1991). Las proteínas del complejo Ag85 poseen actividad de micoliltransferasa *in vitro*, para el ensamblaje de la pared mediante el acoplamiento del ácido micolico al arabinogalactan y en la formación del *cord factor* (α,α' trealosa dimicolato), que se ha relacionado con la inhibición de la maduración fagosomal, importante mecanismo de sobrevivencia intracelular de M.tb. (Gomes MS et al 1999). Estas proteínas también son conocidas por su capacidad de unión a proteínas de matriz extracelular como fibronectina (proteína implicada en la unión de M.tb a macrófagos alveolares) y elastina (Naito M et al 1998), a nivel de respuesta inmune el Ag85 es un antígeno inmunodominante e induce una alta proliferación de linfocitos T CD4, CD8 , B y secreción de IFN- γ (Lozes, E, et al 1997; Palma C, et al 2007), la vacunación con ADN de Ag85A y Ag85B ha mostrado ser protectora, no así la vacunación con Ag85C (Huygen, K., J.et al 1996).

El antígeno de secreción temprana ESAT-6 es otro blanco importante de investigación, tiene peso molecular de 6 kDa, una secuencia de 95 residuos de aminoácidos (Sørensen, A.L. et al. 1995, Gordon, S.V. et al. 1999), se encuentra en diferentes cepas de M. tb. pero está ausente en la cepa vacunal M. bovis BCG, se caracteriza por ser fuertemente reconocido por linfocitos T, lo cual es independiente del fondo genético del hospedero en las diferentes especies infectadas y de las cepas de M.tb. (Brandt, L. et al. 1996; Pollock, J.M.et al 1997). En la fase temprana de la infección, ESAT-6 parece ser un blanco importante para linfocitos T, en modelo humanos y cobayos.

En vista de la importancia de los antígenos Ag85b y ESAT6, y su expresión en estadios iniciales de la infección, en el presente trabajo se seleccionaron epítopes inmunodominantes e hiper-conservados derivados de éstas proteínas, los cuales son presentados vía HLA*A2:01 y son ampliamente reconocidos por linfocitos T CD8+ de individuos expuestos a *M. tb* con el fin de generar *in vitro* la formación del complejo entre péptidos de ESAT6-Ag85b y la proteína recombinante HLA A2:01 (p/HLA*A2:01), para luego usarlo como blanco de reconocimiento en una técnica llamada despliegue en fago (phage display),

CAPITULO 2

2.1 JUSTIFICACION

Dados los avances en técnicas de biología molecular que logran complementar y fusionar la parte genotípica y fenotípica en una misma plataforma, como lo es el desarrollo de librerías de fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) desplegados en la superficies de fagos, las cuales se caracterizan por expresar éstos fragmentos que conservan la capacidad de reconocimiento específico de un anticuerpo completo además de contar con alta variabilidad de secuencias, permite su uso como herramienta para la selección e identificación de anticuerpos que reconocen una amplia gama de antígenos que pueden ser epítopes o moléculas con mayor complejidad estructural, por ejemplo, los complejos formados entre (scHLA-A2 - péptidos específicos) en cáncer e infecciones virales reportados en la literatura, que han demostrado efectividad de reconocimiento y actividad biológica. Justifican el empleo de éstas metodologías para la selección de scfvs que reconozcan de manera específica complejos formados *in vitro* entre la molécula recombinante scHLA- A2 y péptidos conservados e inmunodominante de proteínas antigénicas de *Mycobacterium tuberculosis*, la cual es el agente causal de tuberculosis, entidad catalogada como un enfermedad de salud pública, que a pesar de la existencia de vacuna y tratamiento, continua siendo una enfermedades de vigilancia mundial según la Organización Mundial de la salud.

2.2 HIPÓTESIS

La formación *in vitro* de complejo conformados por la proteína scHLA-A2 y péptidos inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis*, permitirá encontrar scFvs de reconocimiento específico, usando la técnica del “phage display”(despliegue de fagos)

OBJETIVO PRINCIPAL:

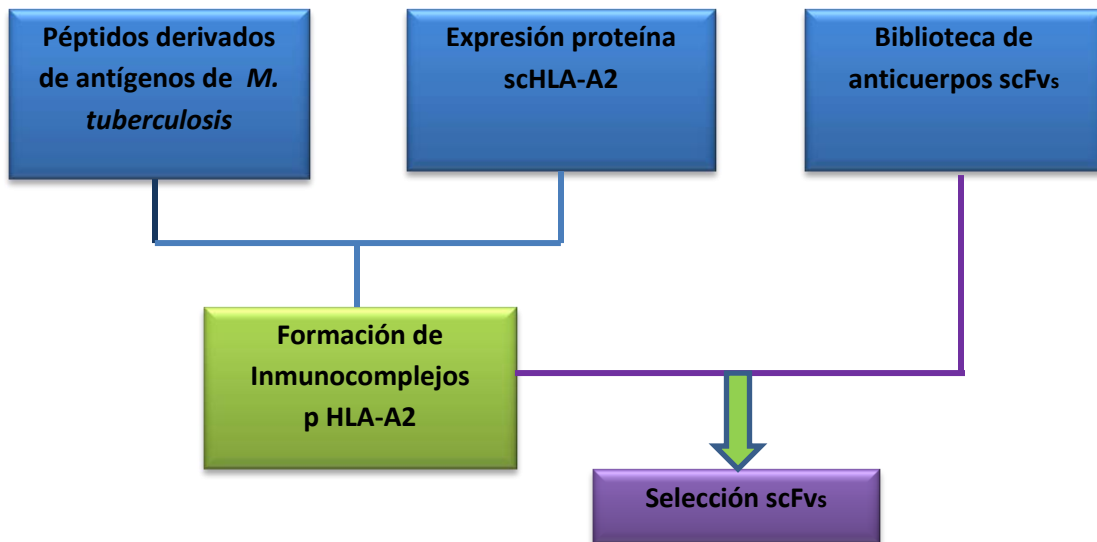
Seleccionar scFvs que reconozcan a complejos formados por la proteína recombinante scHLA-A2 y péptidos de los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85B y ESAT-6.

2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Formar inmunocomplejos compuesto por scHLA A2 Y péptidos derivados de antígenos de M. tuberculosis: scHLA-A2-ESAT-6 y scHLA-A2-Ag85B.
2. Seleccionar los fragmentos variables de una sola cadena (scFv), que reconozcan inmunocomplejos formados, a partir de librerías de anticuerpos, usando la plataforma de phage display.

2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Selección de un anticuerpo tipo scfv, contra el complejo scHLA tipo I y péptidos derivados de *Mycobacterium tuberculosis*, mediante phage display



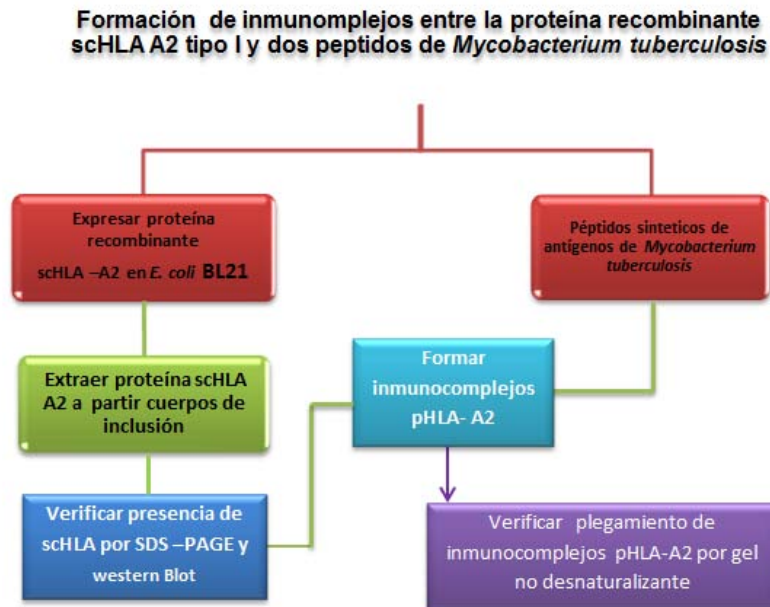
CAPITULO 3

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

El presente proyecto inició a partir de una cepa *Escherichia coli* - BL21 que se encuentra transformada con el plásmido p ET22b, el cual contiene la secuencia de scHLA- A0201 con un peso molecular total de 48,5 KDa, en el siguiente orden: el extremo amino terminal de toda la secuencia inicia con β 2microglobulina (β 2m) seguido por una secuencia de 15 aminoácidos (glicinas G y serinas S) que funciona como enlace flexible uniendo el extremo carboxiterminal de β 2m y el extremo amino terminal de la secuencia de los tres dominios de la cadena pesada (alfa α) de la proteína, a la cual en su extremo carboxilo se le adicionó, una secuencia denominada BSP sustrato peptídico de BirA, la cual será reconocida por la enzima BirA y realizara la adición de biotina (que permitirá formar tetrámeros con unión de estreptavidina en relación 4:1), seguida de 6 residuos de histidina que se usaran para posteriores purificaciones, la secuencia de HLA-

A*0201 se obtuvo a partir de leucocitos de sangre completa de donadores humanos. La secuencia de scHLA A2 presente en el plásmido p ET22b, que se encuentra transformando a *E. Coli*- BL21 se almacenó con glicerol al 20% a una temperatura de -70°C hasta su uso

3.1 Estrategia experimental y resultados del primer objetivo



3.1.1 Expresión de secuencia scHLA -A*0201

Para la expresión de la secuencia de scHLA A *0201, se sembró la bacteria *E. coli*- BL21 que contiene el plásmido p ET22b-scHLA A *0201, primero en medio de cultivo sólido, Luria Bertaini (LB) y posteriormente se inoculo en medio liquido LB, en una relación 1:100 y carbenicilina 100µg/ml como marcador selectivo, posteriormente se hizo inducción con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) 250 µM, dando lugar a la expresión de la secuencia proteica en cuerpos de inclusión, se obtuvo 2 gramos de biomasa bacteriana a partir de 600ml de LB. La expresión específica pos inducción se comprobó mediante la realización de una electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico, SDS-PAGE al 12%, donde se encontró la presencia de una banda que coincide por peso molecular

esperado (48,5 kDa), se realizó la transferencia a una membrana de Polyvinylidene difluoride (PVDF) sobre la cual se realizó un Western blot con anticuerpos anti-histidinas y se obtuvieron los siguientes resultados:

Resultados de expresión scHLA-A*0201:

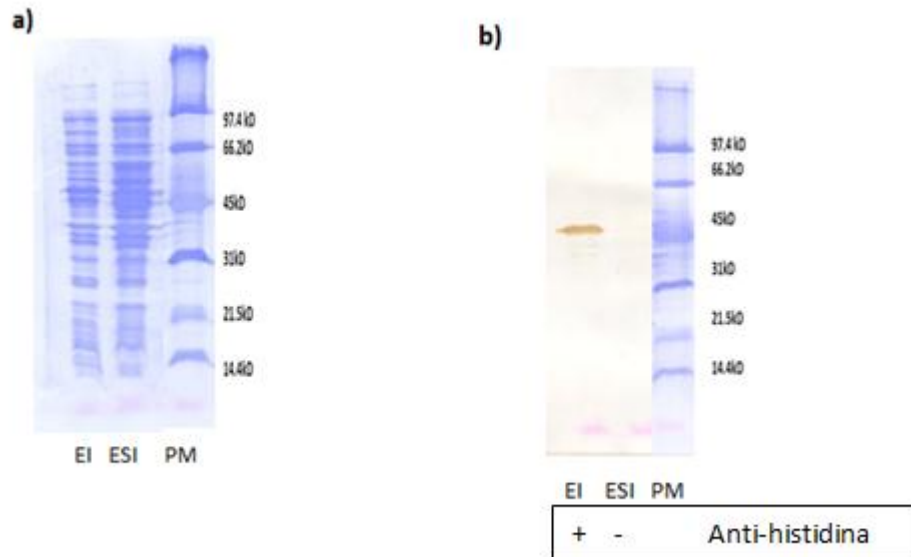


Figura N° 2: Expresión proteica de scHLA- A*0201 a partir de cuerpos de inclusión en gel de poliacrilamida 12%. a)Coomassie: EI: Expresión proteica pos Inducción con IPTG, ESI: Expresión proteica Sin Inducción con IPTG. b) anti-Histidinas EI: expresión proteica pos inducción, ESI: expresión sin inductor.

Con éstos resultados se observa la *expresión proteica específica* después de la inducción por IPTG, la cual coincide con los resultados esperados, tanto por peso como por presencia de histidinas. Una vez se comprobó, se da lugar a la extracción de la proteína.

3.1.2 Extracción de proteína a partir de cuerpos de inclusión:

Para extraer a la proteína scHLA-A*0201 a partir de los cuerpos de inclusión se probaron dos protocolos con el objetivo de seleccionar el mejor para continuar con el proceso de plegamiento, el primero se basa en la liberación de los cuerpos de inclusión de la bacteria aplicando ciclos de sonicado de 6 minutos a una

frecuencia de 70%, la eliminación de residuos por medio de 4 lavados con PBS1x y tritón x100 al 2%, y ciclos de centrifugación de 13500rpm por 15 minutos a 4°C, el segundo protocolo utiliza la acción enzimática de la lisozima para liberar los cuerpos de inclusión de la bacteria, seguido de lavados para eliminación de residuos, los dos protocolos culminaron con la disgregación de los cuerpos de inclusión con urea a altas concentraciones (8 M), se evaluó la efectividad de cada protocolo, realizando SDS PAGE 12%, con el fin de evaluar mediante peso molecular, la expresión proteica, efectividad de lavados y la presencia de proteínas contaminantes, se corrieron por duplicado con el fin de utilizar la segunda membrana de (PVDF) para realizar un western blot con anti-histidinas, los resultados obtenidos fueron:

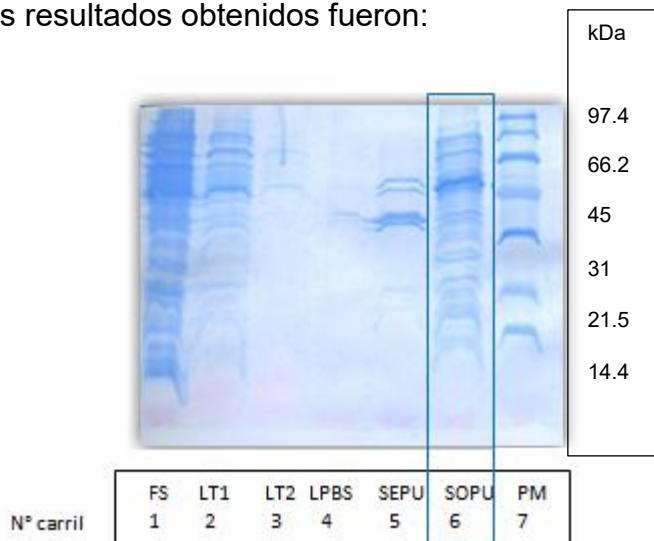


Figura N° 3: Expresión proteica de scHLA- A*0201 a partir de cuerpos de inclusión en gel de poliacrilamida 12% protocolo 1. FS: fracción soluble, LT1: lavado tritón 1, LT2: lavado tritón 2, LPBS: lavado con PBS, SEPU: sedimento pos-disgregación con urea, SOPU: sobrenadante pos disgregación urea. PM: peso molecular.

En la figura 3, se observa la disminución de contenido proteico desde el carril número uno el cual es el resultado después del ciclo de sonicado, seguido de los lavados con tritón, carriles (2,3,4) y los carriles 5 y 6 que hacen referencia a sedimentos y sobrenadante después de la disgregación con urea por 18 horas respectivamente, aquí se observa que tanto en el carril número 5 y 6 sobresale una banda de peso molecular aproximado a 45 kDa, lo cual corresponde con el peso aproximado de scHLA A*0201, sin embargo en el carril número 6 se observan muchas bandas tanto hacia arriba y abajo de la banda de interés. Por lo que se concluye que aunque si hay una expresión más abundante en el sobrenadante pos disgregación con urea en comparación con el sedimento, hace

falta un proceso adicional para tener una extracción proteica sin la presencia de tantos contaminantes. Para confirmar que la banda que sobresale pertenezca a la proteína de interés, se realiza western blot con anticuerpos, antihistidina como anticuerpo primario y se usó anticuerpo tipo anti IgG de ratón marcados con peroxidasa, se revelo con diaminobencidina. Obteniendo el siguiente resultado:

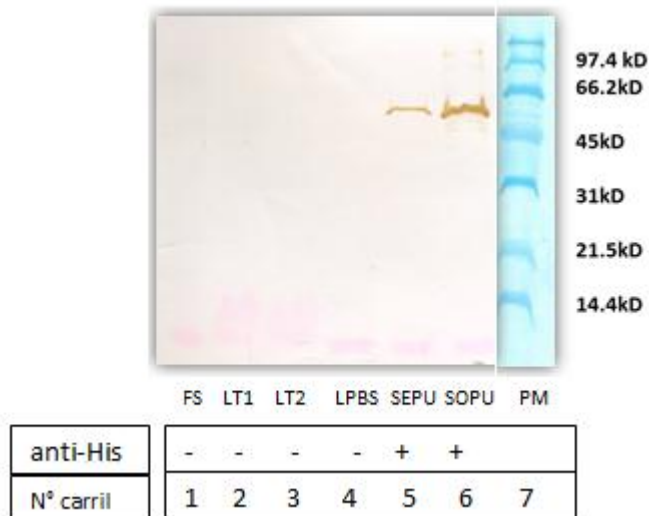


Figura N° 4: Expresión proteica de scHLA- A2 a partir de cuerpos de inclusión en gel de poliacrilamida protocolo 1 y Anti-histidina. FS: fracción soluble, **LT1:** lavado tritón 1, **LT2:** lavado tritón 2, **LPBS:** lavado con PBS, **SEPU:** Sedimento pos disgregación con urea 8M, **SOPU:** sobrenadante pos disgregación con urea 8M, **anti-His:** ant-ihistidina (-) negativo, (+): positivo, **PM:** peso molecular

La expresión de scHLA-A*0201, se observó mediante peso molecular y positividad a anti-histidina, sin embargo con el uso de este protocolo se observa que el contenido de proteínas contaminantes es alto en la fracción donde se ve mayor expresión, carril 6 de las figuras 3 y 4

Para la extracción de la proteína se estandarizó otro protocolo, teniendo en cuenta otros ya existentes: protocolo número 8 de Sambrook y Russel, Molecular Cloning a Laboratory Manual, protocolo descrito por David Garboczi, y sigma aldrich.com Lysozyme from chicken egg White for Molecular Biology, catalogo L7651. En el protocolo estandarizado, por cada gramo de biomasa bacteriana, se mezcló con 3ml de solución que contiene lisozima y DNA asa y otros compuesto que mantienen el pH constante, posteriormente se aplicó dos ciclo de sonicado de minuto y medio con frecuencia de 50% y se realizaron 5 lavados con tritonx100 al 0.5%, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, entre cada lavado se hizo la separación con centrifugación a 13500rpm durante 20 minutos a 4°C,

posteriormente se disgregan los cuerpos de inclusión con urea 8 Molar por 20 minutos y se centrifuga, se recolecta sobrenadante y sedimento. Se realiza un gel de electroforesis en poliacrilamida de cada uno de los pasos anteriormente descritos. Los resultados obtenidos fueron:

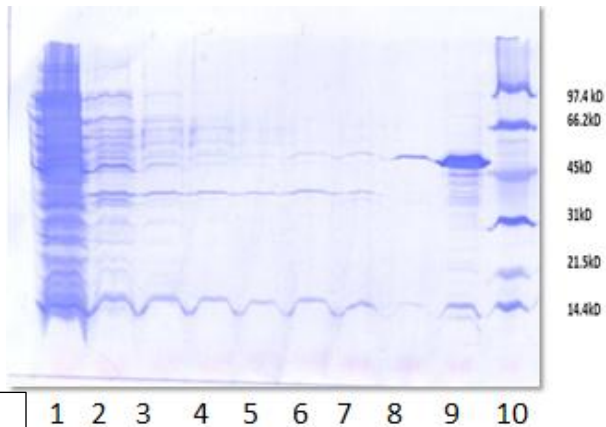


Figura N°5: **expresión proteica de scHLA- A2, protocolo N°2 purificaciones de cuerpos de inclusión con lisozima en gel de poliacrilamida:** carril N°1 y 2: sobrenadantes pos ciclos de sonicado carriles N°3, 4, 5, 6 lavados con tritón, carril N°7: lavado con PBS, carriles 8 y 9: sedimento y sobrenadante pos disgregación con urea 8 M, carril N°10 peso molecular.

En la figura número 5 se observa una membrana de PVDF, de electroforesis en gel de poliacrilamida, de sobrenadantes pos sonicado, lavados y disgregación con urea, realizados en el protocolo de extracción de proteínas de cuerpos de inclusión con lisozima a partir de bacterias *E. coli* BL21, transformadas. Los carriles 1 y 2 pertenecen a los sobrenadantes resultado de la mezcla de la biomasa bacteriana con el buffer de lisis (lisozima) y dos ciclos cortos de sonicado, donde se observa un alto contenido proteico soluble. En los pozos 3, 4, 5, y 6 se observan los carriles del contenido proteico pos lavados con tritón, se puede observar la disminución en la presencia de proteínas a medida que aumenta el número de lavados. El pozo 7 es el resultado del último lavado realizado sin tritón. y en los pozos 8 y 9 se observan sedimento y sobrenadante respectivamente, después de la disgregación con la solución de urea 8 M, evidenciando la presencia de una banda sobresaliente en el peso molecular esperado (48kDa aproximadamente), en menor cantidad en el sedimento (carril N° 8) y una banda definida y de mayor tamaño en la fracción del sobrenadante (carril N° 9) en éste carril se observa que el contenido proteico predominante se encuentra muy cercano al peso de la proteína de interés, además que la presencia de otras bandas es mínima en comparación con el sedimento y los otros carriles

pertenecientes a pos sonicados y lavados, razón por la cual se continuara trabajando a partir de ésta fracción.

Con el fin de confirmar que la banda que se observó en el carril número 9 cercana al peso de 45 KDa, del gel anterior, se realizó un western blot con antihistidina sobre la misma membrana y se obtuvo el siguiente resultado:



Figura N°6: **Expresión proteica de schLA- A2, protocolo N°2 extracción de cuerpos de inclusión con lisozima (anti-histidina):** carril N°1 y 2: sobrenadantes pos ciclos de sonicado, carriles N° 3, 4, 5, 6 lavados con tritón, carril N°7: lavado con PBS, carriles 8 y 9: sedimento y sobrenadante pos disgregación con urea 8 M, carril N°10 peso molecular.

En la figura número 6 se observa una membrana de PVDF de electroforesis en gel de poliacrilamida –anti histidina, de sobrenadantes de pos sonicado, lavados y disgregación con urea, realizados en el protocolo de purificación de cuerpos de inclusión con lisozima a partir de bacterias *E. coli* BL21, transformadas: evidenciando la presencia de una banda definida en el peso molecular esperado (aproximadamente 45 kDa) y un resultado de positividad con el anticuerpo anti-histidina, En menor cantidad en el sedimento (pozo 8) y una banda definida y de mayor tamaño en la fracción del sobrenadante (pozo 9), lo cual lleva a la conclusión que banda que predomina en el pozo número 9, pertenece a la proteína que se expresó pos inducción con IPTG caracterizándola por peso molecular y por positividad a anti-histidina.

3.1.3 Comparación de resultados:

Al comparar la presencia de bandas de las fracciones de sobrenadantes pos disgregación con urea, del protocolo N°1 con ciclo prolongado de sonicado y el protocolo N°2 utilizando lisozima, se observa menor cantidad de proteínas contaminantes en la fracción obtenida del protocolo utilizando lisozima, a diferencia de la presencia de múltiples bandas en la fracción del protocolo solo con ciclos de sonicado prolongado. Por esta razón se establece que el protocolo de elección para extraer la proteína scHLA A0201 de los cuerpos de inclusión, será el protocolo donde se utilizan soluciones de lisis que contienen lisozima, puesto que requiere menos tiempo y se obtiene un fracción de la proteína de interés con presencia de menos contaminantes, por lo cual se decide continuar la fase de plegamiento a partir de esta fracción.

Con éstos resultados se logró el cumplimiento de una primera parte del proyecto que consistió en la expresión, extracción y verificación de la proteína a partir de cuerpos de inclusión, para dar inicio a la formación de inmunocomplejo entre la proteína scHLA y los péptidos de ESAT 6 y Ag85b

3.1.4 Formación de complejos entre la proteína recombinante scHLA-A02 y los péptidos inmunodominantes de M. tb. ESAT-6 y Ag85B.

Para llevar a cabo el plegamiento entre la proteína y el péptido es necesario contar con las concentraciones de cada uno de los componentes del sistema, dado que la extracción de la proteína termina una fase de disgregación con altas concentraciones de urea, se realizó una determinación de concentración semi-cuantitativa por densitometría usando el software Image J, para lo cual se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida del 12% de una curva de concentración de BSA, con el fin de utilizar el coeficiente de correlación de la curva de BSA y las unidades de densitometría calculadas por el programa, el cual fue de 0.9954,

Con éstos datos se procedió al cálculo de la concentración de scHLA -A2 a partir de la fracción soluble pos extracción de proteína a partir de cuerpos de

inclusión, la concentración final calculada fue: 7,6mg/ml. Con un rendimiento final de 68,4mg de proteína a partir de 600 ml de cultivo.

3.1.5 Inducción de plegamiento entre scHLA y péptidos ESAT 6 y Ag85b

Las secuencias de los epítopes seleccionados de ESAT6 Y Ag85b seleccionados figuran en la siguiente tabla:

Antígeno	Secuencia del epítope	Numero de referencia (IEDB)*
ESAT-6	AMASTEGRV	3064
Ag85B	KLVANNTLR	32213

* Immune Epitopes Database

Éstas secuencias se obtuvieron de un estudio realizado sobre análisis de variación en la secuencias de epítopes presentados a los linfocitos T, pertenecientes a seis linajes de Mtb. Comas et al 2010

Para realizar el plegamiento entre la proteína recombinante scHLA A0201 y los péptidos inmunodominantes de *M. tb* seleccionados, se utilizó el principio de eliminación de urea, para inducir plegamiento de la proteína, mediante diálisis, utilizando una membrana de MWCO (Molecular weight cut-off) de 100-500 Daltons, en el sistema interno se mezclaron proteína : péptido relación 5:1, en un volumen de 20 ml de una solución (20 mM de Tris-Hcl, Urea 8M, pH 8), el sistema externo consistió en 200ml de una solución 20 mM de Tris-Hcl, Nacl 150 mM, pH 8, durante 72 horas a 4°C, realizando 5 cambios en total de la solución externa. Una vez pasado éste tiempo se separó por centrifugación fracción soluble de precipitado, y se sometió a purificación con cromatografía de afinidad a níquel, el comportamiento del complejo en el proceso de purificación mostro un pico de elusión a una concentración de 100 -150 mM de Imidazol, éstas fracciones se sometieron a concentración usando Amicon Ultra -15 MWCO 5000, por centrifugación a 4000g a 4°C, se llevó a un volumen de 1200µl. se almacenaron alícuotas a -70 hasta su uso. En éste proceso, se hizo control por SDS-PAGE a cada uno de los pasos a los cuales fue sometida tanto la proteína como el péptido con el objetivo de hacer un seguimiento y evaluación, se usó como control a la molécula de scHLA -A2 la cual fue sometida a todo el proceso bajo las mismas

condiciones pero sin la presencia del péptido. Las imágenes de los resultados durante el proceso se mostraran a manera de ejemplo y se mostrara los resultados de las tres muestras trabajadas al final del plegamiento.

Las fracciones del sobrenadante pos plegado de las tres muestras (scHLA sin péptido, scHLA+ESAT6 y scHLA+Ag85b) se sometieron a purificación por cromatografía de afinidad d Níquel, a continuación se muestra la imagen de solo uno de las muestras, puesto que las tres mostraron igual comportamiento, los volúmenes usados para correr el gel fueron iguales para las tres).

Figura N°7: seguimiento pos plegamientos, después de purificar por cromatografía de afinidad a Níquel, muestra scHLA+ Ag85b

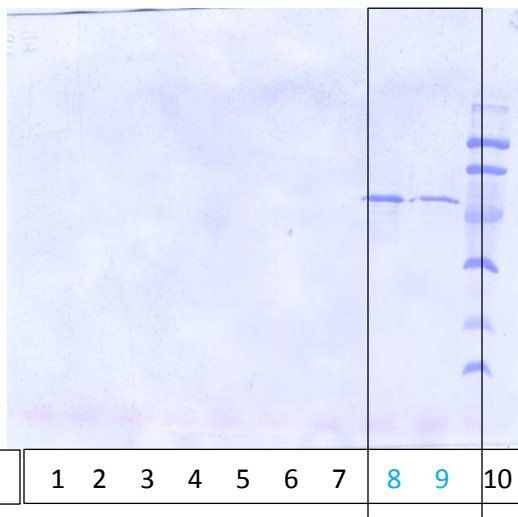
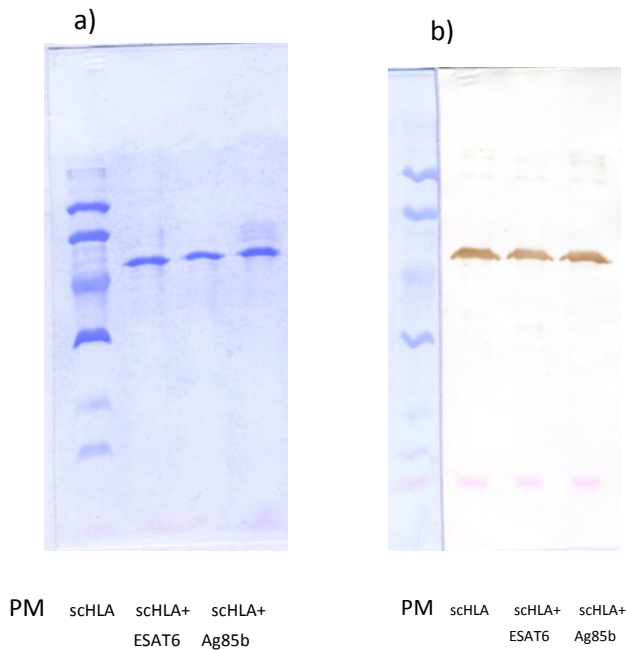


Figura N°7: membrana PVDF, de SDS-PAGE pos purificación por cromatografía de afinidad a Níquel: carriles N° 1 a 7 pertenecen a las fracciones no pegadas a la columna, carriles 8 y 9 pertenecen al pico de elusión con imidazol a una concentración de 100 y 150 mM. Los volúmenes usados fueron 15 µl de carriles 1 a 7 y 10µl carriles 8 y 9.

Despues de la purificacion por cromatografia de afinidad a Níquel, se obtiene una cantidad de proteinas scHLA soluble libre de proteinas contaminantes detectadas por SDS- PAGE 12%, se somete a dialisis toda la noche para eliminar el imidazol y la totalidad del volumen (8ml) de las fracciones 8 y 9 se somete a concentracion, se corrieron geles de control y tambien se hizo un western blot con antihistidinas para confirmar presencia de proteinas scHLA-A2. Se obtuvieron los siguientes resultados



**Figura N°8: seguimiento pos plegamiento,
Después de purificar y concentrar.**

**Figura N°8: seguimiento y control después de
plegamiento, pos purificación, y pos concentración,
membrana PVDF, de SDS-PAGE: a) coomassie, b)
western Blot anti-histidina, el volumen usado para
todas muestras fue 2 μ l**

Una vez se verificó la presencia de proteína scHLA soluble presente pos plegamiento por medio de peso molecular y anti-histidinas, se prosiguió a realizar la medición de la concentración por método de lowry, los resultados figuran en la tabla número 2:

muestra	Concentración μ g/ml
ScHLA control	417
ScHLA+ESAT6	449
ScHLA+Ag85	546

4.1.6 Verificación de formación de complejos

Ésta se realizó mediante la observación del patrón de corrida tanto de la muestra control scHLA sin péptido, scHLA+ESAT6 y scHLA+Ag85b en un gel no desnaturalizante, el porcentaje de acrilamida fue 10%, la cantidad de las tres muestras que se usó en ésta prueba fue la misma para todas 15 μ g, a continuación se observa el resultado obtenido:

Figura N°9. Verificación de formación de complejos scHLA-ESAT6 y scHLA-Ag85b.

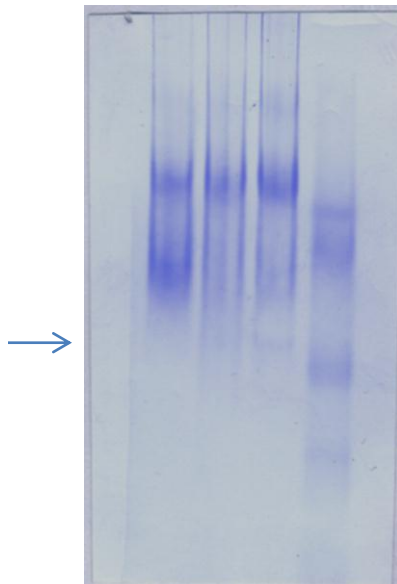


Figura N°9: membrana PVDF de gel no desnaturizante, Porcentaje de acrilamida 10%: carril N°1 scHLA control Sin péptido, carril N°2 scHLA+ESAT6, carril N°3:scHLA +Ag85b, Carril N°4: PM: peso molecular.

N° carril 1 2 3 4

La observación de una banda en el carril número 2 y 3 a la altura de la tinea, es evidencia de la formación de inmunocomplejos, puesto que esta banda no se observó en el carril número uno que pertenece a la muestra control scHLA sin péptido. Sin embargo, no fue posible realizar la separación entre las fracciones de la proteína plegada y no plegada, el intento de separación se realizó mediante cromatografía de exclusión, utilizando la columna TSKgel6300, donde se esperaba encontrar un pico perteneciente al complejo, sin embargo el patrón de corrida que se obtuvo no permitió separar tal fracción. En cuanto al rendimiento del complejo, según datos reportados es aproximadamente entre el 10 al 20% de la proteína extraída a partir de la totalidad de cultivo inducido, pero no lograr la separación del complejo, no permitió calcular el rendimiento neto. Razón por la cual se decidió probar otro protocolo de formación de complejos con el objetivo de aumentar el rendimiento, siendo uno de los más citados el trabajo realizado por Galit Denkberg et al 2002, la inducción del plegamiento se realizó siguiendo sus lineamientos: se mezcló a la proteína recombinante scHLA y el péptido de interés en una relación 1:10, en 100ml de una solución con 0.1M Tris, 0.5 M L-arginina, 0.09 mM

glutati3n oxidado a pH 8.0, a 4°C durante 48 horas, seguido la concentraci3n de la muestra a 3000µl, usando membranas de 10kDa, 3sta metodolog3a usa inductores de plegamiento como la L arginina que disminuye la agregaci3n proteica y el glutati3n oxidado que est3 implicado la formaci3n de puentes disulfuro presentes en la prote3na, se realizaron controles por medio de un gel no desnaturalizante y se cuantifico obteniendo una concentraci3n de 136µg/ml, menor con respecto al primer protocolo de plegamiento, el patr3n de corrida sobre el gel nativo, no permiti3 obtener ninguna conclusi3n. Luego se prob3 otro protocolo de plegamiento utilizado por Bahman akbari et al 2016, donde fusiona los dos protocolo anteriormente probados en el presente proyecto, se realiz3 de la siguiente manera: se indujo plegamiento entre la prote3na y el p3ptido en un sistema de di3lisis, se utiliz3 la membrana con MWCO (Molecular weight cut-off) de 100-500 Daltons, la relaci3n prote3na: p3ptido fue 1:10, la reducci3n de la concentraci3n de urea de la soluci3n externa fue, 4,2,1,0,5, y 0 molar, cuando se lleg3 a la concentraci3n de 1M, y se adicionaron los inductores de plegamiento L-arginina 400mM y glutati3n oxidado 375µM, una vez finalizada la di3lisis, se purifico por cromatograf3a de afinidad a n3quel, se obtuvo el siguiente resultado:

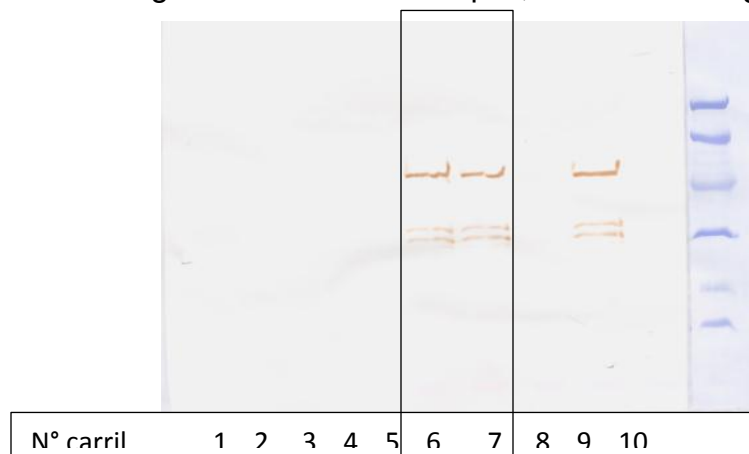


Figura N°10: Membrana PVDF, pos purificaci3n por afinidad a N3quel de plegado scHLA+ESAT6 anti-histidinas, seg3n Bahman et al 2016: carriles 1,2, fracciones no pegadas a la columna, carriles 4,5,6 y 7 fracciones pegadas a la columna, carril 8:fracciones concentradas de carriles 5 y 6, carril 9: fracciones concentradas de carriles 4 y 7

Se obtuvo el mismo resultado con la proteína scHLA sin péptido, se realizó la cuantificación de las fracciones purificadas pero la concentración fue 80µg/ml, inferior con respecto al primer protocolo de plegamiento, al realizar el gel no desnaturalizante no se observó un patrón de corrida concluyente de la formación del complejo. Con éstos resultados se decide iniciar las rondas de enfrentamiento con Phage-display a partir de la biblioteca Tomlinson I. utilizando el complejo formado con el primer protocolo de plegamiento. (figura N°9).

3.2 Estrategia experimental segundo objetivo

El objetivo de ésta fase del proyecto es seleccionar clonas con fago-scFvs, que reconozcan los inmunocomplejos formados, a partir de librerías de anticuerpos, usando la plataforma de phage display



Para dar cumplimiento a éste objetivo, se utilizó la biblioteca de anticuerpos desplegados en superficie de fago Tomlinson I, que cuenta con una diversidad de $1,47 \times 10^8$ de scfvs, los procesos de amplificación del fago cooperador M13, fusión con la biblioteca y las rondas de selección se realizaron según, "Selection of human antibody fragments by phage display", Nat. Protoc., 2(11):3001-3008.

3.2.1 Amplificación y cuantificación del fago cooperador M13

Se sembraron las células TG1 a partir de glicerol, en medio mínimo M9 se incubó por 36 horas a 37°C, se tomó una sola colonia y se inoculo en 5 ml de medio 2x TY, se dejó en incubación toda la noche a 37°C a 250 rpm, al siguiente se diluyó 100 veces en 5 ml de medio 2x TY y se incubó a 37°C a 250rpm, hasta alcanzar densidades ópticas a 600nm, de 0.4 a 0.5) se prepararon diluciones del fago M13 en PBS estéril ($10^{12}/\text{ml}$ a $10^4/\text{ml}$), y se adicionaron 10 μl de cada dilución a 200 μl del medio 2x TY con células TG1 (DO600 0.4-0.5), se dejaron incubando 30 minutos a 37°C y se mezcló con 3ml de TOP agar semi-sólido y se transfirió el volumen total sobre agar TYE (solido) se dejó incubando toda la noche a 37°C, al siguiente día se observó la presencia de placas en la dilución 10^6 , se seleccionó una placa y se amplificó en medio 2xTY una vez alcanzó a DO600 0.4-0.5 de absorbancias, se incubó por dos horas a 37°C, a 250 rpm, luego se diluyó en 500ml de medio 2x TY con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se incubó a 30°C toda la noche, a 250 rpm, al siguiente día se purificó con polietilenglicol PEG 6000. Se realizó cuantificación a 260 nm se obtuvo el siguiente resultado:

Concentración: 1.545×10^{13} fagos/ml, se realizaron alícuotas y se almacenaron a -70 en glicerol al 20%.

3.2.2 Amplificación y fusión de biblioteca scfv I con fago M13

Este proyecto inició a partir de la biblioteca I previamente amplificada, por lo cual se utilizó una alícuota de 2 ml, y se adicionó a 200 ml de medio 2xTY suplementado con glucosa al 2% (inhibe la expresión de anticuerpos durante el crecimiento bacteriano) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de carbenicilina, se incubó a 37°C a 250 RPM, hasta alcanzar las DO600 entre 0.4-0.5, y se adicionaron 8×10^{11} partículas del fago M13 cooperador formado en el numeral 4.3.1, esta mezcla se dejó incubando durante una hora a 37°C en agua sin agitación, luego se centrifugó por 10 minutos a 3200g, el sedimento se re-suspendió en 200 ml de medio de cultivo 2xTY suplementado con 0,1% glucosa, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ carbenicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina, lo que permitió crear un ambiente selectivo para bacterias que se encuentren transfectadas con el fago cooperador y contengan la secuencia de

interés en el fagemido. Se dejó incubando a 25°C a 250 RPM, durante 18 horas. Éste paso fue de vital importancia, puesto que se amplifica y fusiona la librería con el fago cooperador, para dar inicio al proceso de selección. Al siguiente día se se precipitaron los fagos utilizando la totalidad del cultivo incubado, la concentración de fagos obtenida fue: $2,94 \times 10^{12}$ fagos/ml. (el cálculo de concentraciones se realiza utilizando la formula empírica: fagos/ml: $DO260 \times 100 \times 22.14 \times 10^{10}$), esta concentración fue suficiente según el protocolo, para dar inicio a la ronda numero 1

3.2.3 Rondas de selección de fagos-scfv

Aunque se indujo la formación de complejos entre la proteína recombinante scHLA-A - péptidos de ESAT-6 y Ag85b, como cumplimiento del primer objetivo, no fue posible separar la fracción de proteína plegada y no plegada presentes en la misma muestra, por lo cual se utilizó una estrategia, en las rondas de selección con el objetivo se disminuir reconocimiento inespecífico, ésta consistió en exponer a los fagos amplificados en cada ronda, a un inmunotubo sin la presencia de la molécula blanco, pero si bloqueado con leche al 5%, esto con el fin de eliminar los fagos que reconozcan de forma inespecífica a la superficie del inmunotubo, una vez pasado el tiempo de incubación, se pasa la totalidad del volumen a un inmunotubo cubierto con la proteína scHLA sin péptido, esto con el fin de eliminar los fagos que reconozcan ésta molécula, posteriormente la totalidad del volumen se transfiere finalmente al inmunotubo cubierto con el complejo de interés, en éste primer intento se utilizó al complejo formado entre la proteínas scHLA- Ag85b, con el fin de aumentar la afinidad de los fagos, se disminuyó la concentración de la proteína blanco a medida que avanzaban las rondas, y se aumentó el porcentaje de tween 20, desde 0.1%, 0,15% y 0.2% desde la primera a tercera ronda respectivamente, la elusión de los fagos se realizó con tripsina (1mg/ml) durante 10 minutos. Éstos fagos eluidos se utilizaron para transfectar a células TG1, a una DO600 entre 0.4 y 0.5, las cuales se incubaron durante una hora a 37°C sin agitación, su sedimento se utilizó para sembrar sobre medio de cultivo TYE suplementado con glucosa al 2% y carbenicilina 100µg/ml, en diluciones de 1/10, para cuantificar los fagos eluidos de cada ronda, al siguiente día, la totalidad de

las clonas se recuperaron y una parte de ellas se utilizó para inocular 200ml de medio de cultivo 2Xty y una vez alcanzó DO600 entre 0.4-0.5 se infecta con 1×10^{12} partículas de fagos cooperador, se dejaron incubando durante una hora a 37°C sin agitación, luego se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en 200 ml de medio 2Xty suplementado con 0,1% glucosa, 100µg/ml carbenicilina y 50µg/ml de kanamicina, se dejó incubando durante 18 horas a 25°C a 250 RPM. Al siguiente día se precipitaron los fagos con PEG6000, y se dio inicio a las siguientes rondas.

Los resultados de las tres rondas se resumen en la tabla numero 3:

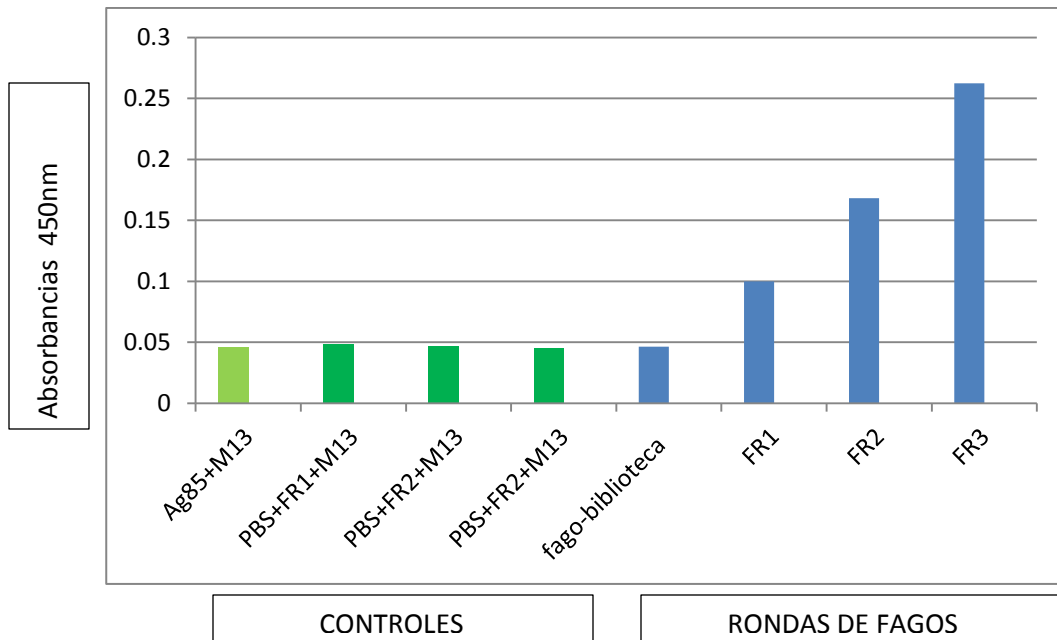
N° Ronda	Concentración de molécula blanco	Origen del fago	Fagos eluidos de inmunotubo cubierto con complejo scHLA-Ag85b(México)	Fagos amplificados
1	15µg/ml	Fago cooperador +biblioteca I	93×10^6 ufc/ml*	5.8×10^{12} fagos/ml*
2	5µg/ml	Fagos ronda 1	42×10^8 ufc/ml*	8.05×10^{12} fagos/ml*
3	2,5µg/ml	Fagos ronda 2	66×10^8 ufc/ml*	6.35×10^{12} fagos/ml*

*Los títulos obtenidos en cada ronda, fueron acordes con los esperados según protocolo de biblioteca.

3.2.4 Evaluación de afinidad por ELISA-Policlonal

Ésta prueba consiste en evaluar el aumento de afinidad de los fagos a medida que avanzan las rondas, para lo cual se utilizan los fagos precipitados en cada una y se exponen de nuevo a la molécula blanco, se evalúa su reconocimiento en un inmunoensayo. Se utilizaron 2,5µg/ml de complejo scHLA-Ag85b, 1×10^{10} partículas de fagos precipitados de cada ronda, anti-M13- acoplado a HRP 1/5000 como anticuerpo secundario y el sistema revelador o-Phenylenediamine OPD, la lectura se hizo a 450nm sin parar la reacción. Las placas de ELISA que se usaron se cubrieron toda la noche a 4°C también con el complejo scHLA-Ag85b (México) y se bloquearon con leche al 5%. Cada ronda se evaluó por duplicado, se obtuvo el siguiente resultado:

Grafica N°1: ELISA POLICLONAL DE FAGOS QUE RECONOCEN COMPLEJO scHLA-Ag85b (MEXICO)



En la gráfica N°1, se observa sobre el eje Y, la escala de absorbancias a 450nm, y en el eje X, controles y fagos de la biblioteca sin enfrentamiento al complejo y los fagos de cada una de las rondas. De izquierda a derecha: el control Ag85+M13, se realizó para evaluar inespecífica de anticuerpo secundario, controles PBS+FR1,2,3 hace referencia a fagos ronda 1,2 y 3, para evaluar reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario sobre la placa y PBS, el control fago-biblioteca hace referencia al reconocimiento que ejecutan los fagos de la biblioteca previo a la rondas, y FR1, 2, 3, a los fagos pertenecientes a cada ronda, todos los controles emitieron absorbancias inferiores a 0.05, catalogándose como negativos, el aumento de afinidad se observó, con respecto a la biblioteca previo al enfrentamiento, como también entre cada una de las rondas, presentó un aumento desde de 2,6 veces desde la primera ronda hasta la tercera ronda. Con éste resultado estaría pendiente continuar con la evaluación de las clonas individuales en la tercera ronda.

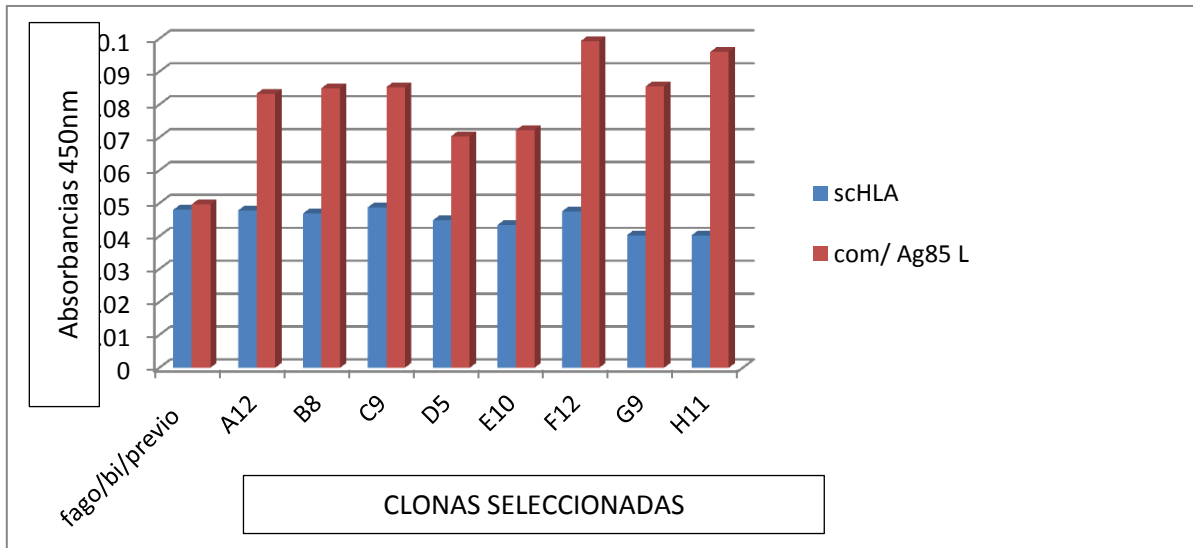
Dado que el complejo scHLA-Ag85b en nuestro laboratorio, no fue posible separarlo de la proteína sin plegamiento, se sometió a tres rondas de selección al complejo scHLA-Ag85 desarrollado en el laboratorio de Tom H. M. Ottenhoff, ubicado en The Department of Immunohematology & Blood Transfusion and Department of Infectious Diseases, Leiden University Medical Center, Leiden, Th

Netherlands, con quien se trabajara en colaboración, las rondas se realizaron utilizando la misma estrategia de selección y las mismas concentraciones, y se obtuvieron los siguientes resultados:

N° Ronda	Concentración de molécula blanco	Origen del fago	Fagos eluidos de inmunotubo cubierto con complejo scHLA-Ag85b(Londres)	Fagos amplificados
1	15µg/ml	Fago cooperador +biblioteca I	50 x 10 ⁵ ufc/ml*	8,3x10 ¹² fagos/ml*
2	5µg/ml	Fagos ronda 1	15 x10 ⁶ ufc/ml*	8.15x10 ¹² fagos/ml*
3	2,5µg/ml	Fagos ronda 2	13.6 x10 ⁷ ufc/ml*	Se evaluaron 96 clonas

*Los títulos obtenidos en cada ronda, fueron acordes con los esperados según protocolo de biblioteca

Dado que la información que se obtiene de un ELISA PHAGE policlonal, es general en cuanto a la tendencia de reconocimiento realizada por los fagos de cada ronda, en ésta ocasión se decidió realizar un ELISA PHAGE monoclonal, el cual evalúa el reconocimiento del fago-scfv contenido en cada clona de la tercera ronda. . Se evaluaron 96 clonas, (75%) utilizando 50µl del sobrenadante del fago de la tercera ronda y se expusieron tanto a la molécula control scHLA sin péptido, como al complejo scHLA-Ag85b (Londres) a concentraciones de 5µg/ml, de las 96 clonas evaluadas, se seleccionaron 8 clonas que emitieron mayor reconocimiento hacia el complejo, que a la molécula scHLA sin péptido, los resultados se observan en la siguiente gráfica:



Con éstos resultados, se ve mayor reconocimiento de las clonas seleccionadas hacia el complejo, con respectos a la proteína scHLA sin péptido, el promedio de las absorbancias de los controles fue: 0.044 con una desviación estándar de 0.003, las absorbancias que se obtuvieron están acorde con trabajos anteriores, donde el máximo valor de absorbancia emitido por una clona seleccionada de la biblioteca I fue: 0.06 Rabab M, et al 2016. Sin embargo se esperaban encontrar en éste primer intento mayor diferencia entre el reconocimiento hacia el complejo scHLA-Ag85, en comparación con la proteína scHLA sin péptido.

CAPITULO 4

4.1 DISCUSIÓN

La formación de complejos *in vitro* entre la proteína recombinante HLA-A2 y péptidos que se presentan en éste contexto, se encuentra bien documentada en la literatura (Xiao-Ling Lu, et al, 2013, Denkberg et al, 2002, Xian-Hui He et al 2005, Garboczi, et al 1992). En estos trabajos se utilizan estrategias de inducción para el plegamiento, que se basan en un mismo principio, que consiste en la eliminación de la alta concentración de urea que se utiliza en la disgregación de los cuerpos de inclusión, ya sea por dilución rápida (solución sin urea) y o paulatina (a través de diálisis donde las concentraciones de urea se disminuyen en periodos más largos de tiempo), Sin embargo existen variables en cuanto a las

metodologías que se usan para la expresión de las proteínas que conforman el complejo (proteína α , β 2 microglobulina y péptido), la separación, purificación y evaluación de la formación del complejo; por ejemplo, en los trabajos citados anteriormente se formaron los complejos a partir de sistemas separados de expresión, excepto Denkberg et al, 2002, quien utilizó un péptido de unión entre la proteína α y β 2microglobulina en un mismo sistema de expresión. Otra variable observada fue el método de purificación, donde uno de los más utilizados es la cromatografía de exclusión molecular donde gracias a la diferencia de peso entre las dos cadenas (α (\approx 45) y β 2microglobulina (\approx 12 kDa) y la conformación facilitan la separación. Por otra parte, para verificar la formación del complejo se han utilizado herramientas como la electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturizantes, y la evaluación de la actividad biológica mediante la identificación o activación específica de linfocitos T CD8. En el presente trabajo se probaron tres protocolos diferentes de inducción de plegamiento, en los cuales se observaron algunos inconvenientes como el rendimiento final, y la separación de la proteína no plegada del inmunocomplejo; a pesar de estos inconvenientes, se logró evidenciar la formación del complejo sobre un gel nativo, el protocolo con el cual se obtuvieron mejores resultados fue en el cual no se usaron inductores de plegamiento, la eliminación de urea fue mediante diálisis directa (de 8M a 0M), y los volúmenes de reacción fueron menores en comparación con el protocolo más citado (Garboczi, et al 1992), lo que disminuyó la manipulación de la muestra durante todo el experimento, la cual se vio reflejada en menor pérdida de la proteína, dicha pérdida varía dependiendo del sistema seleccionado. En cuanto al cálculo de los rendimientos, **Lars Ø. P., et al (2001)** utilizaron como base la totalidad del volumen del medio de cultivo para realizar la inducción de la expresión de la proteína, con lo cual obtuvieron un rendimiento de formación de complejo entre el 40 -50% de la totalidad de proteína expresada a partir de un litro de cultivo; Garboczi, et al (1992), utilizaron como base la totalidad de la proteína expresada (cuerpos de inclusión), lo cual podría llegar a ser una limitante, dependiendo del sistema de expresión que se utilice y la disponibilidad de péptido. En otro trabajo donde formaron complejos con la

proteína HLA–A2 y péptidos de citomegalovirus (CMV), con fines diagnósticos, el grupo de **Guang-Ping Ruan et al 2006**, reporta el rendimiento, según el volumen de la solución donde se indujo el plegado obteniendo 200µg, por cada 200ml, como se observa en éstos trabajos, los rendimientos son variables, y dependen del método de cálculo y la metodología usada. Además, se ha sugerido que la implementación del uso de inductores como L-arginina (agente disgregante) y glutatión oxidado/reducido (formación de puentes disulfuro), aumenta los rendimientos de formación del complejo y facilita el proceso de purificación y evaluación del mismo; sin embargo, en nuestro trabajo, no se observó éste comportamiento, Como se ha descrito, existen muchas variables que pueden llegar a afectar la formación de un complejo *in vitro*, para nuestro caso entre la proteína recombinante HLA –A2 y un péptido de interés, aunque se dio cumplimiento al primer objetivo del proyecto, usando tres protocolos citados, los resultados en las condiciones de nuestro laboratorio no fueron los esperados; según nuestra experiencia, el manejo de volúmenes superiores a los citados en el proceso de plegamiento no son convenientes debido a una mayor manipulación de la muestra, sin embargo para posteriores estudios, se tendrán en cuenta todas estas variables con el fin de obtener mejores rendimientos de inmunocomplejo. Dado que el objetivo principal de éste proyecto es encontrar una clona con un scFv desplegado en un fago, que ejecute un reconocimiento específico, se decidió someter el complejo formado a rondas de reconocimientos, los resultados obtenidos en cuanto a la obtención de fagos en cada ronda tanto eluidos como amplificados, fueron acordes con lo esperado según protocolo y según trabajos reportados en la literatura, **Qian Wu et al 2016**, **Ali Akbar et al 2015**, éste comportamiento se repitió en los dos experimentos independientes donde se sometió a rondas de selección a los dos complejos Ag85- scHLA, también, se evaluó el aumento de afinidad entre las rondas en el experimentos donde se enfrentó el complejo desarrollado en México, mediante un inmunoensayo policlonal de fagos precipitados en cada ronda, y se seleccionaron 8 clonas, de las 96 evaluadas (75% de las clonas en tercera ronda), en las rondas donde se utilizó al complejo desarrollado en otro laboratorio, las cuales emitieron mayor

reconocimiento sobre el complejo en comparación con la proteína sin péptido, aunque los niveles de absorbancias están acordes con trabajos previos donde utilizaron la misma biblioteca, las diferencias de reconocimiento entre el complejo y la proteína sin péptido, solo fueron 2 veces, la del control. Esto nos llevó a concluir que después de cada ronda de enfrentamiento si hay aumento de afinidad, y que la estrategia utilizada si, dio lugar a la formación de clonas de reconocimiento específico, sin embargo para aumentar la especificidad, se podrían aumentar el número de rondas, o probar la biblioteca J, que también expone scFv en la superficie del fago. También, se debe tener en cuenta que la mayoría de trabajos donde seleccionan scfvs a partir de bibliotecas, lo hacen contra antígenos específicos compuestos por una sola secuencia proteica, lo que facilita una selección específica, en nuestro caso, se probó una estrategia de selección, para eliminar los fagos que reconocieran de forma a la proteínas scHLA presente sin plegar, y se complementó con otra estrategia utilizada Si Wu et al 2007, donde enfrentaron a la biblioteca a un complejo formado entre una parte proteica y otra de RNA, la cual consistió en aumentar el porcentaje de Tween 20 a medida que aumentaban las rondas y una previa absorción de los fagos con un inmunotubo sin antígeno pero bloqueado. Un dato a tener en cuenta, es que en la mayoría de trabajos, donde usaron ésta biblioteca, en la fase de evaluación al realizar el inmunoensayo tanto poli como monoclonal, utilizaron concentraciones de 100 µg/ml de molécula blanco, siendo carnitina en el trabajo realizado por Rabab M, et al 2016, TNF- alfa para ali Akbar et al 2015, 50 µg/ml de proteínas Hsp90, en el trabajo realizado por Edyta Petter et al 2015, y 30µg/ml de alérgenos en el trabajo realizado por Silvia de Cruz, y colaboradores, 2015, en nuestro caso, la concentración utilizada fue, 2,5 µg/ml y 5µg/ml lo cual es una concentración muy baja en comparación a las reportadas en la literatura, y aun bajo éstas condiciones se logró evaluar y evidencia el aumento de afinidad.

4.2 Conclusiones

- A pesar de la existencia de las variables que pueden afectar la formación de complejos *in vitro* entre la proteína recombinante scHLA-A2 y péptidos específicos, se logró evidenciar su formación mediante un gel desnaturalizante.
- El uso de éste complejo como molécula de reconocimiento, para seleccionar scFvs desplegados en fagos de la biblioteca Tomlinson I, mediante phage display, permitió evidenciar el aumento de afinidad entre las rondas de selección en un inmunoensayo de fagos policlonal,

4.3 Perspectivas

Dado que la exposición de una molécula blanco, usando phage display, permite seleccionar scFv, a partir de bibliotecas comerciales, y que la evaluación inicial de reconocimiento, se hace mediante un inmunoensayo, tener resultados satisfactorios o no, en ésta etapa de la metodología, es determinante para saber si es posible continuar con su caracterización direccionada hacia la solubilización del scfv presente en la clona seleccionadas o, dar inicio a nuevas estrategias para mejorar el proceso en las rondas de selección. Con los resultados obtenidos en el inmunoensayo de fagos policlonales en el primer intento de selección utilizando al complejo scHLA-A/Ag85b desarrollado en éste mismo proyecto, se obtuvo buen comportamiento de afinidad, sin embargo es necesario la evaluación de clonas individuales obtenidas en la tercera ronda, lo que permitirá, la selección de clonas, de las cuales se espera contar con suficiente afinidad y especificidad, para continuar con la caracterización. En cuanto a los resultados obtenidos con el complejo scHLA-Ag85b, desarrollado en otra entidad con la cual se trabajara en colaboración, se realizara, rondas adicionales, esperando mejorar la especificidad de reconocimiento obtenida hasta el momento. Por tanto las situaciones aquí planteadas estarán direccionadas hacia la selección de las clona de interés, para dar inicio a la caracterización de un scFv soluble.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas A. Andrew Lichtman, Shiv Pillai. (2007). cellular and molecular immunology. China: SAUNDERS ELSEVIER

A. Bardelli, S. Siena, Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 1254e1261.

AD. Griffiths and A. R. Duncan, "Strategies for selection of antibodies by phage display," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 9, no. 1, pp. 102–108, 1998.

A Klimka and Matthey, Roovers et al., 2000, "Human anti- CD30 recombinant antibodies by guided phage antibody selection using cell panning," *British Journal of Cancer*, vol. 83, no. 2, pp. 252–260, 2000.

Adams, G.P and Weiner, L.M Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 1147–1157

Aizhi Zhao et al, Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy, 2016, pag 1.

Ali Akbar Alizadeh, Maryam Hamzeh-Mivehroud Siavoush Dastmalchi, Identification of Novel Single Chain Fragment Variable Antibodies Against TNF- α Using Phage Display Technology, *Adv Pharm Bull*, 2015, 5(Suppl 1), 661-666

Bahman Akbari, Safar Farajni, Nosratollah Zarghami, Nejat Mahdieh, Mohammad Rahmati, Shiva Ahdi Khosroshahi, Leila Rahbarnia. Design, expression and evaluation of a novel humanized single chain antibody against epidermal growth factor receptor (EGFR) 2016, 127, 8-15

Barbas, C.F., 3rd, Kang, A.S., Lerner, R.A. & Benkovic, S.J. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7978-7982 (1991).

Bass, S., Greene, R. & Wells, J.A. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* 8, 309-314 (1990).

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329:506–12

Brodin, P., et al., ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *TRENDS in Microbiology*, 2004. 12(11): p. 500-508

Carter, P. J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology*, 6(5), 343–357

Chasteen, L., Ayriss, J., Pavlik, P., and Bradbury, A.R. 2006. Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Res.* 34:e145

Chen Y, Shi Y, Cheng H, An YQ, Gao GF. Structural immunology and crystallography help immunologists see the immune system in action: how T and NK cells touch their ligands. *IUBMB Life* 2009;61:579–90

Cheng, K.T. Radioiodinated-anti-TAG-72 covalently linked CC49 divalent single-chain Fv antibody. In *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*; National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD, USA, 2004

Christ, D., Famm, K. & Winter, G. Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains. *Protein Eng Des Sel* (2007).n *Biotechnol*, 9, 102–8. Phage display.

Comas, I., et al., Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nature Genetics*, 2010. **42**(6): p. 499

Content, J., A. de la Cuvelierie, L. De Wit, V. Vincent-Levy-Frebault, J. Ooms, and J. De Bruyn. 1991. The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. *Infect. Immun.* 59:3205– 3212.

Denkberg, G., et al., Direct visualization of distinct T cell epitopes derived from a melana tumor-associated antigen by using human recombinant antibodies with MHC-restricted T cell receptor-like specificity. *PNAS*, 2002. **99**(14): p. 9421-9426. 61.

Endemann, H. and Model, P. 1995. Location of filamentous phage minor coat proteins in phage and in infected cells. *Journal of Molecular Biology* 250:496-506.

Frank Camacho.,Maria E. Sarmiento, Fatima Reyes, Louise Kim, Jim Huggett,Marco Lepore e, Oscar Otero f, Martine Gilleron g,h, Germain Puzo, Mohd Nor Norazmi, Graham Rook d, Lucia Mori, Gennaro De Libero, Selection of phage-displayed human antibody fragments specific for CD1b presenting the *Mycobacterium tuberculosis* glycolipid Ac2SGL, *International Journal of Mycobacteriology* 5 (2016) 120–127

F.X. Real, Rettig, P.G. Chesa, M.R. Melamed, L.J. Old, J. Mendelsohn, Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation, *Cancer Res.* 46 (1986) 4726e4731

Flynn, J. L., M. M. Goldstein, K. J. Triebold, B. Koller, and B. R. Bloom. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*89:12013.

Garboczi, D. N., Hung, D. T. and Wiley, D. C., HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992.. 89: 3429 – 3433

Geluk, A., et al., Identification of Major Epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* AG85B That Are Recognized by HLA-A*0201-Restricted CD8⁺ T Cells in HLA-

Transgenic Mice and Humans 1. *The Journal of Immunology*, 2000. **165**: p. 6463-6471

Global Tuberculosis Report. 2014, World Health Organization.(WHO)

Gomes MS, Paul S, Moreira AL, Appelberg R, Rabinovitch M, Kaplan G. Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in acidified vacuoles of murine macrophages. *Infect Immun* 1999;67:3199–206.

Gordon, S.V. et al. (1999) Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32, 643–656

Greenbaum J, Sidney J, Chung J, Brander C, Peters B, Sette A. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics*. 2011 Jun;63(6):325-35. doi: 10.1007/s00251-011-0513-0. Epub 2011 Feb 9. PMID: 21305276

Griffiths AD, Duncan AR. (1998). Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Smith, G.P.* Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned, antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317 (1985)

Guang-Ping Ruan, Li Ma, Min-Jie Meng, Yong Zhu, Ze-Hong Chen, Ying Lin, Zheng-Qiang Wu, Xiao-Wei He, Ju-Fang Wang, Xiao-Ning Wang, Improved preparation of class I HLA tetramers and their use in detecting CMV-specific CTL, *Journal of Immunological Methods* 312 (2006) 148–156

Harboe, M. and H.G. Wiker, The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *Journal of Infectious Diseases*, 1992. 166(4): p. 874-884.

Herschhorn, A., W.A. Marasco, and A. Hizi, Antibodies and Lentiviruses That Specifically Recognize a T Cell Epitope Derived from HIV-1 Nef Protein and Presented by HLA-C. *The Journal of Immunology*, 2010. 185: p. 7623-7632.

Holliger, P. and Hudson 2005 P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 1126–1136

Hoogenboom, H.R., et al. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 19, 4133-4137 (1991).

Hudson, P.J. 1998 Recombinant antibody fragments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998, 9, 395–402.

Hust, M.; Jostock, T.; Menzel, C.; Voedisch, B.; Mohr, A.; Brenneis, M.; Kirsch, M.I.; Meier, D.; Dubel, S. Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol.* 2007, 7, 14.

Huygen, K., J. Content, O. Denis, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, R. R. Deck, C. M. Dewit, I. M. Orme, S. Baldwin, C. D'Souza, A. Drowart, E. Lozes, P.

Vandenbussche, J.-P. Van Vooren, M. A. Liu, and J. B. Ulmer. 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat. Med.* 2:893–988

Iannolo, G., Minenkova, O., Petruzzelli, R., and Cesareni, G. 1995. Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein. *J. Mol. Biol.* 248:835-844

J. S. Huston, M. Mudgett-Hunter, M. S. Tai et al., “Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins,” *Methods in Enzymology*, vol. 203, pp. 46–88, 1991.

Jordan, C., et al. (2000). The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*, 14(10), 1777–1784.

Kai Cao, Jill Hollenbach, Xuejiang Shi, Wenxia Shi, Michael Chopek, and Marcelo A. Fernandez-Vina, Analysis of the Frequencies of HLA-A, B, and C Alleles and Haplotypes in the Five Major Ethnic Groups of the United States Reveals High Levels of Diversity in These Loci and Contrasting Distribution Patterns in These Populations. *Human Immunology* 62, 1009–1030 (2001)

Kenneth Murphy, Paul Travers, Mark Walport. (2008). *INMUNOBIOLOGIA DE JANEWAY*. MEXICO: MC GRAW HILL

Kfir Oved et al, Antibody-mediated targeting of human single-chain class I MHC with covalently linked peptides induces efficient killing of tumor cells by tumor or viral-specific cytotoxic T lymphocytes, *Cancer Immunol Immunother*, 2005

Kobayashi, N.; Odaka, K.; Uehara, T.; Imanaka-Yoshida, K.; Kato, Y.; Oyama, H.; Tadokoro, H.; Akizawa, H.; Tanada, S.; Hiroe, M.; et al. Toward in vivo imaging of heart disease using a radiolabeled single-chain Fv fragment targeting tenascin-C. *Anal. Chem.* 2011, 83, 9123–9130.

Lalvani, A., R. Brookes, R. J. Wilkinson, A. S. Malin, A. A. Pathan, P. Andersen, H. Dockrell, G. Pasvol, and A. V. Hill. 1998. Human cytolytic and interferon-gamma-secreting CD81 T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:270–275.

Lars Østergaard Pedersen , Mogens Holst Nissen , Nils Jakob Vest Hansen , Lise Lotte Nielsen , Sanne Lise Lauenmøller , Thomas Blicher , Annelise Nansen , Christina Sylvester-Hvid , Allan Randrup Thromsen and Søren Buus, Efficient assembly of recombinant major histocompatibility complex class I molecules with preformed disulfide bonds, *Eur. J. Immunol.* 2001. 31: 2986–2996.

Lee, C.M, Iorno, N., Sierro, F. and **Christ, D.** (2007) "Selection of human antibody fragments by phage display", *Nat. Protoc.*, 2(11):3001-3008

Little, M.; Kipriyanov, 2000S.M.; le Gall, F.; Moldenhauer, G. Of mice and men: Hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol. Today* 2000, 21, 364–370.

Lozes, E., K. Huygen, J. Content, O. Denis, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, P. Vandenbusche, J.-P. Van Vooren, A. Drowart, J. B. Ulmer, and M. A. Liu. 1997. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. *Vaccine* 15:830

M. O'Connor and P. Forsyth et al 1997 "The rapid diagnosis of acute promyelocytic leukaemia using PML (5E10) monoclonal antibody," *British Journal of Haematology*, vol. 99, no. 3, pp. 597–604, 1997.

McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554 (1990).

Mustafa, A. S. 1996. Recombinant mycobacterial antigens and epitopes recognized by human T cells, p. 201–211. In A. S. Mustafa, R. J. Al-Attayah, I. Nath and T. D. Chugh (ed.) *T-cell subsets and cytokines interplay in infectious diseases*. S. Karger AG, Basel, Switzerland.

N. A. Watkins and W. H. Ouwehand 2000 "Introduction to antibody engineering and phage display," *Vox Sanguinis*, vol. 78, no. 2, pp. 72–79, 2000.

Naito M, Ohara N, Matsumoto S, Yamada T. The novel fibronectin-binding motif and key residues of mycobacteria. *J Biol Chem* (1998) 273:2905–9. doi:10.1074/jbc.273.5.2905

North, R.J. & Jung, Y.J. Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 599–623 (2004)

Ohara, N., H. Kitaura, H. Hotokezaka, T. Nishiyama, N. Wada, S. Matsumoto, T. Matsuo, M. Naito, and T. Yamada. 1995. Characterization of the gene encoding the MPB51, one of the major secreted protein antigens of *Mycobacterium bovis* BCG, and identification of the secreted protein closely related to the fibronectin binding 85 complex. *Scand. J. Immunol.* 41:433–442.

P. Argos, "An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion," *Journal of Molecular Biology*, vol. 211, no. 4, pp. 943–958, 1990.

Palma C, Iona E, Giannoni F, Pardini M, Brunori L, Orefici G, et al. The Ag85B protein of *Mycobacterium tuberculosis* may turn a protective immune response induced by Ag85B-DNA vaccine into a potent but non-protective Th1 immuneresponse in mice. *Cell Microbiol* 2007;9:1455–65.

Pollock, J.M. and Andersen, P. (1997) Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.* 65, 2587–2592

Rabab M. Abou El-Magd, Nicolas F. Vozza, Jack A. Tuszynski, David S. Wishart, Isolation of soluble scFv antibody fragments specific for small biomarker molecule, L-Carnitine, using phage display, 2015, 428, 9-19

Rachel Bras-Gonçalves et al, situ detection of antigen-specific tumor-infiltrating lymphocytes using newly designed tetramers, journal immunological methods, 2003

Russel, M. and Model, P. 1989. Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it. *J. Virol.* 63:3284-3295

Scott, J.K. and Barbas, C.F.I. 2001. Phage display vectors. In: *Phage Display Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2.1-2.19 pp.

Sergeeva, A., et al., An anti-PR1/HLA-A2 T-cell receptor-like antibody mediates complement-dependent cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood*, 2011. **117**(16): p. 4262-4272.

Shima Moradi-Kalbolandi, Dariush Davani, Majid Golkar, Mahdi Habibi-Anbouhi et al. Soluble Expression and Characterization of a New scfv Directed to Human CD123, 2015, 178, 1390-1406

Skerra, A.; Pluckthun, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 1988, 240, 1038–1041.

Smith, G.P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-1317

Sodaly Mongkhone, et al, A constructed HLA-A2- restricted pMAGE- A1278–286 tetramer detects specific cytotoxic T lymphocytes in tumour tissues in situ, *Journal of International Medical Research*, 2013

Sørensen, A.L. et al. (1995) Purification and characterization of a lowmolecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 1710–1717

Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B., and Winter, G. 1992. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* 227:776-798.

Wiker, H. G., and M. Harboe. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* 56:648– 661.

Wu Si, Ke A, Doudna JA. A fast and efficient procedure to produce scFvs specific for large macromolecular complexes. *Journal of immunological methods.* 2007;318(1-2):95-101. doi:10.1016/j.jim.2006.10.005.

Wu, A.M.; Senter, P.D 2005. Arming antibodies: Prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 1137–1146.

Wu, Q., Wang, X., Gu, Y., Zhang, X., Qin, Y., Chen, H., Xu, X., Yang, T., and Zhang, M. (2016). Screening and identification of human ZnT8-specific single-chain variable fragment (scFv) from type 1 diabetes phage display library. *Sci China Life Sci.* doi: 10.1007/s11427-016-5077-7

Young & Kaufmann, P. W. M. Hermans, and J. E. R. Thole. 1992. Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol. Microbiol.* 6:133– 145.