

# Clonación y expresión recombinante de los dominios variables tipo- Inmunoglobulina de los inmunorreceptores PD-1 y PD-L1 humanos

## Cloning and recombinant expression of the Immunoglobulin-like variable domains of humans PD-1 and PD-L1 immunoreceptors

González, P.<sup>1</sup>, Beltrán-López, E.<sup>1</sup>, López-Moreno, H.S.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biomedicina Molecular, CAC Biotecnología Biomédica UAS-264, Posgrado en Ciencias Biomédicas y Posgrado en Biotecnología, énfasis en Salud, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80010.

### RESUMEN

En la inmunoterapia contra el cáncer el uso de anticuerpos monoclonales (MAb) que bloquean la interacción de los inmunorreceptores PD-1/PD-L1 mejora el tratamiento de los pacientes. Para producción de un MAb, la disponibilidad del antígeno proteico es un aspecto crítico. En este escenario la biotecnología biomédica permite la producción de cantidades virtualmente inagotables de las versiones recombinantes de esas proteínas. En este contexto, nuestro objetivo fue clonar y expresar los dominios variables tipo inmunoglobulinas (IgV) de PD-1 y PD-L1, debido a que la interacción entre ellas se produce entre sus dominios extracelulares IgV, se diseñaron iniciadores específicos para clonarlos. Una vez clonados, individualmente se ligaron a pcDNA6 y se introdujeron en *Escherichia coli*, y las transformantes positivas se definieron mediante PCR y secuenciación. Con las respectivas transformantes, se realizaron expresiones piloto inducidas con IPTG 1 mM, y la hora óptima de expresión se definió mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 %. Los resultados de la clonación fueron productos de 375 pb para PD-1 y 357 pb para PD-L1, cuyas secuencias mostraron un 99 % de identidad para PD-1 (GenBank OM363223) y un 100% para PD-L1 (GenBank OM363224). Ambas proteínas mostraron un tiempo óptimo de expresión de 4 h post-inducción y ~14 kDa consistentes con lo estimado. En conclusión, se logró la clonación y expresión recombinante de los dominios IgV de PD-1 y PD-L1, lo que permitirá la producción de un MAb u otra herramienta inmunoterapéutica contra el cáncer, algo que aún no se ha logrado en México.

**PALABRAS CLAVE:** Clonación; Proteína recombinante; PD-1; PD-L1; Inmunorreceptor

### ABSTRACT

In cancer immunotherapy, the use of monoclonal antibodies (MAbs) that block the interaction of PD-1/PD-L1 immunoreceptors improves patient treatment. For MAb production, the availability of the protein antigen is a critical aspect. In this scenario, biomedical biotechnology allows the production of almost inexhaustible quantities of recombinant versions of these proteins. In this context, our objective was to clone and express the immunoglobulin-like variable domains (IgV) of PD-1 and PD-L1, because the interaction between them occurs among their IgV extracellular domains, specific primers were designed to clone them. Once cloned, they were individually ligated to pcDNA6 and introduced into *Escherichia coli*, and positive transformants were defined by PCR and sequencing. With the respective transformants, pilot expressions induced by 1 mM IPTG were performed, and the optimal time of expression was defined by electrophoresis in 15 % polyacrylamide gels. The cloning results were products of 375 bp for PD-1 and 357 bp for PD-L1, whose sequences showed 99% identity for PD-1 (GenBank OM363223) and 100% for PD-L1 (GenBank OM363224). Both proteins showed an optimal expression time of 4 h post-induction and ~14 kDa consistent with estimates. In conclusion, the cloning and recombinant expression of the IgV extracellular domains of PD-1 and PD-L1 was achieved, which will allow the production of a MAb or other immunotherapeutic tool against cancer, something that has not yet been achieved in Mexico.

**KEYWORDS:** Cloning; Recombinant protein; PD-1; PD-L1; Immunoreceptor

\*Autor de correspondencia: Héctor Samuel López Moreno

Email: [hslmoreno@ms.uas.edu.mx](mailto:hslmoreno@ms.uas.edu.mx)

ORCID ID: [0000-0001-7391-205X](https://orcid.org/0000-0001-7391-205X)

Registro ORCID Autores: PG: [0000-0003-3956-7752](https://orcid.org/0000-0003-3956-7752); EBL: 000-0002-8604-2847

## INTRODUCCIÓN

Las células tumorales se caracterizan por su habilidad de manipular el microambiente y evadir los mecanismos de transducción de señales que evocan la muerte celular para continuar su proceso de proliferación descontrolada (Hanahan & Weinberg, 2011; Pecorino, 2012; Zhang & Zhang, 2020). Uno de los mecanismos primordiales para la sobrevivencia de estas células es la inhibición de las respuestas adaptativas celulares del sistema inmunitario, específicamente a los linfocitos T, tanto CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, infiltrantes de tumor (TIL) (Wellenstein & de Visser, 2018). Diversos autores han demostrado que algunas de las moléculas implicadas en este proceso de inhibición son los puntos de control inmunológicos (Pecorino, 2012; Wellenstein & de Visser, 2018).

Los puntos de control inmunológicos mejor caracterizados hasta el momento, son mediados por el Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico (CTLA-4 o CD152), y la proteína de Muerte celular Programada-1 (PD-1 o CD279), y su ligando PD-L1 (CD274) (Iwai *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2013).

PD-1 fue descrita por primera vez por Honjo y colaboradores (1992) en la Universidad de Kyoto (Hamanishi *et al.*, 2016). Esta proteína es codificada por el gen *Pdcd1* ubicado en el brazo largo del cromosoma 2, se encuentra conformado por cinco exones que codifican para una proteína transmembranal que consta de 288 residuos y un peso molecular de 31 kDa, perteneciente a la superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig) (Iwai *et al.*, 2017; Odales *et al.*, 2020). Por otro lado, PD-L1 y PD-L2 fueron identificados en 2000 y 2001 respectivamente (Iwai *et al.*, 2017). PD-L1 se ha reportado como indicativo de un mal pronóstico en pacientes con diversos tipos de cáncer (Chen *et al.*, 2016; Hamanishi *et al.*, 2016; Iwai *et al.*, 2017; Muenst *et al.*, 2015) y aunque PD-L2 logra unirse a PD-1 con afinidad comparable, poco ha sido descrito sobre su participación en procesos tumorales, por lo que se considera a PD-L1 como el ligando principal (Yang *et al.*, 2019), argumento que sustenta nuestra elección de PD-L1 en el presente trabajo. PD-L1 pertenece a la familia coestimuladores B7(CD80) /CD28 y el gen codificante *Pd1* está constituido por siete exones y se encuentra en el brazo corto del cromosoma 9 en el ser humano, como proteína está conformada por 290 residuos y un peso molecular de 34 kDa (Chen *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2013; Zak *et al.*, 2015).

Tanto PD-1 como PD-L1 contienen un dominio extracelular variable tipo inmunoglobulina (IgV) y es mediante estos dominios que se efectúan las interacciones entre ambas moléculas (Borst *et al.*, 2021; Fantacuzzi *et*

*al.*, 2024; Shi *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016; Zak *et al.*, 2015) cuya interacción inhibe la proliferación de los linfocitos T, mediada por la fosforilación de secuencias aminoacídicas intracitoplasmáticas conservadas, denominadas como Motivos Inhibitorios de Inmunorreceptores asociados a Tirosinas (o ITIM por sus siglas en inglés) de PD-1 (Borst *et al.*, 2021; Fantacuzzi *et al.*, 2024), a este ITIM fosforilado se reclutan las fosfatasa de fosfotirosinas (SHP) 1 y 2, que desfosforilan a las proteínas tirosina-cinasas ZAP70 y PKC $\theta$  (del inglés *Protein Kinase C*) y a la cadena CD3 $\zeta$  del receptor del linfocito T (TCR), afectando río abajo la cascada de señalización de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/Proteína Cinasa B (PKB o AKT, del inglés *Protein Kinase B*) e inhibiendo la proliferación, producción de citocinas como interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), promoviendo la apoptosis mediante la inhibición del factor de sobrevivencia Bcl-XL (Muenst *et al.*, 2015). Todo este escenario contribuye al "agotamiento" de los TIL, afectando sus funciones efectoras pudiendo evocar la apoptosis o la anergia de estas importantes células inmunitarias contra los tumores (Borst *et al.*, 2021; Muenst *et al.*, 2015).

Se ha determinado que dentro del microambiente tumoral de diversos tipos de cáncer existe una sobreexpresión de PD-L1, misma que ha sido asociada a una mala respuesta al tratamiento y por lo tanto a un mal pronóstico de la salud de los pacientes (Chan *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2016). Es por ello, que se han desarrollado inmunoterapéuticos y otros fármacos, para restringir la interacción entre PD-1 y PD-L1 obteniendo mejores resultados terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo* (Brahmer *et al.*, 2012; Hirano *et al.*, 2005). Sin embargo, estos plausibles esfuerzos se han realizado en el extranjero, por lo que la disponibilidad de estos inmunoterapéuticos se encuentra limitada para muchos de los pacientes con cáncer en México. Para el desarrollo de inmunoterapéuticos, como los anticuerpos monoclonales (MAb) donde la disponibilidad del antígeno es limitada, la biotecnología biomédica permite la producción virtualmente inagotable de proteínas antigénicas recombinantes. En este contexto, en el presente proyecto se clonaron las regiones codificantes de los dominios extracelulares IgV de PD-1 y PD-L1, y se lograron expresar los fragmentos polipeptídicos recombinantes empleando un sistema de expresión procarionte, como abordaje inicial para la producción local de variantes de inmunoterapéuticos como MAb anti ( $\alpha$ )-PD-1/aPD-L1, accesibles para la población general, especialmente para los pacientes con cáncer en México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### DISEÑO DE INICIADORES Y ANÁLISIS *IN SILICO*

A partir de las secuencias de los genes *Pdcd1* y *Pdl1* disponibles en el GenBank, con los números de acceso NC\_000002.12:241858908-241849881 y NC\_000009.12:5450503-5470567 respectivamente seleccionaron a la secuencia del exón 2 de *Pdcd1* y a la secuencia del exón 3 de *Pdl1*. Debido a que estos exones codifican para los dominios extracelulares IgV con las que interactúan estas proteínas (Zak *et al.*, 2015). Los iniciadores se diseñaron *in silico* con la secuencia de cada gen de interés empleando los programas bioinformáticos Primer Blast, Primer 3, Oligo Analyzer, Serial Cloner y CLC Sequence Viewer, siguiendo la estrategia descrita previamente en nuestro grupo de investigación (López-López *et al.*, 2018). A cada uno de los iniciadores sentido se les adicionó la secuencia diana para la enzima de restricción BamHI al igual que un codón de inicio de la traducción para facilitar su expresión debido a que se excluyó al primer exón en cada caso (Figura 1A). Por otro lado, a los iniciadores antisentido se le agregó la secuencia diana para la enzima de restricción XbaI (Figura 1A), de esta manera asegurando la inserción en sentido, en el sitio de clonación múltiple del vector de clonación/expresión mediante mutagénesis sitio-dirigida, en este caso pcDNA6 virtual. La calidad de los iniciadores y sus productos fue evaluada *in silico* mediante ClustalX, BLAST, y el programa Serial Cloner (López-López *et al.*, 2018).

### CULTIVO CELULAR

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATCC HTB-22) se cultivó en medio RPMI-10 [RPMI-1640 con alta glucosa (Sigma-Aldrich), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco) descomplementado previamente a 56 °C, 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y 50 µg/mL de gentamicina (Gibco) empleando botellas de plástico con cuello angular y tapa ventilada estériles de 25 cm<sup>2</sup> (Corning), los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C en una incubadora (Binder), con atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub> siguiendo el protocolo descrito previamente (López-Moreno *et al.*, 2003).

### CLONACIÓN DE LOS DOMINIOS IgV DE PD-1 Y PD-L1

Se realizó una extracción DNA genómico (gDNA) a partir de la biomasa de las células MCF-7 obtenidas por centrifugación, y procesadas

mediante el método de Aljanabi (Aljanabi & Martinez, 1997), dicho gDNA fue utilizado como templado para la clonación del dominio IgV de PD-L1. La clonación del dominio IgV de PD-1, se realizó mediante una extracción de sangre periférica a través de punción venosa en un voluntario sano. Se aislaron las células mononucleares empleando un kit comercial de LymphoPrep (Sigma-Aldrich), y se procedió a la extracción del gDNA, empleando la metodología previamente descrita. La región génica de interés de *Pdcd1* fue clonada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un máster-mix cristal (Jena Bioscience), y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Miniamp Plus (Applied Biosystem) con las siguientes condiciones: 35 ciclos de reacción, con una etapa de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, una etapa de alineamiento a 63 °C por 1 minuto 30 segundos y finalmente una etapa de elongación a 72 °C por 1 minuto 30 segundos. Por otro lado, la región génica de interés de *Pdl1* fue clonada por PCR empleando las siguientes condiciones: 35 ciclos de reacción, con una etapa de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, una etapa de alineamiento a 52 °C por 1 minuto 30 segundos y finalmente una etapa de elongación a 72 °C por 1 minuto 30 segundos. Los amplicones obtenidos fueron observados en un gel de agarosa (GE) al 1.5 % p/v y teñidos con SybrGold (Invitrogen) siguiendo las condiciones descritas previamente (López-López *et al.*, 2018).

### SECUENCIACIÓN DE LOS IgVS

La banda correspondiente a cada producto de la PCR observada en los geles de agarosa de los genes *Pdcd1* y *Pdl1*, fue escindida del gel con un bisturí estéril (Ambiderm) para su purificación empleando el kit comercial *Agarose Gel Extraction Kit* (Jena Bioscience), cada muestra obtenida fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro tipo nanodrop (Thermo Fisher) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, con algunas modificaciones. Las muestras fueron secuenciadas en la unidad de servicio LANBAMA del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) con el método de didesoxinucleótidos marcados, empleando un Termociclador Verity (Applied Biosystems), y los secuenciadores automatizados series 3500 y 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias experimentales obtenidas se compararon con las secuencias registradas en las bases de datos con el programa BLAST de NCBI. Finalmente, las secuencias obtenidas fueron registradas en el GenBank.

## OBTENCIÓN DEL DNA RECOMBINANTE

Una vez verificada la identidad de cada uno de los productos de PCR de cada fragmento genético *IgV* de interés, así como el vector de clonación y expresión pcDNA6/V5-HIS A (gentilmente donado por el Dr. Vianney Ortiz del CINVESTAV-IPN), fueron individualmente sometidos a digestiones enzimáticas empleando las enzimas BamHI (New England Biolabs), y XbaI (New England Biolabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se incubó durante 2 h a 37 °C, y fue detenida mediante inactivación enzimática de la muestra a 80 °C durante 20 minutos. Cada producto digerido fue coincubado por separado con alícuotas del plásmido también digerido, para realizar una reacción de ligación empleando la enzima T4 ligasa (New England Biolabs), disuelta en su amortiguador específico, para obtener el DNA recombinante (rDNA) como construcciones plasmídicas modificadas, denominadas como pD1 y pDL1.

## TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Para la transformación bacteriana, se realizó un protocolo para la producción de bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* BL21-(DE3), para ello se siguió la metodología estándar descrita previamente (Chang *et al.*, 2017). Brevemente, se realizó un cultivo en medio de infusión cerebro y corazón o BHI (BD) y se incubó a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se transfirió a tubos Falcon (Falcon) estériles de 15 mL y se incubaron en hielo para ser tratadas con soluciones de cloruro de magnesio y cloruro de calcio (Mg-CaCl<sub>2</sub>) (Chang *et al.*, 2017). A las bacterias competentes se les añadió individualmente una alícuota de las construcciones pD1 o pDL1, se incubaron en hielo por 30 min., los tubos fueron transferidos a baño María (Labnet) a 42 °C durante 1.5 min. e inmediatamente después fueron colocados en hielo.

Posteriormente, a cada tubo se le agregó medio SOB (del inglés *Super Optimal Broth*) sin antibiótico en condiciones de esterilidad y se incubaron a 37 °C durante 45 min. Finalmente, una alícuota fue sembrada con asa de distribución en placas Petri (Nunc) con agar SOB o BHI suplementado con 100 mg/mL de ampicilina (Gibco) (SOB-amp o BHI-amp), e incubadas a 37 °C toda la noche para el aislamiento y selección de colonias transformantes.

## EVALUACIÓN DE TRANSFORMANTES

Las bacterias transformantes fueron evaluadas mediante el método de PCR, para ello las colonias desarrolladas en el agar BHI-amp (o SOB-amp)

fueron seleccionadas al azar y transferidas a tubos Falcon de 15 mL conteniendo 5 mL de medio BHI-amp (o SOB-amp) y cultivadas a 37 °C toda la noche. El rDNA fue extraído utilizando el método de lisis alcalina (Birboim & Doly, 1979) y fueron visualizados en gel de agarosa al 1 % p/v. El rDNA obtenido fue utilizado como templado para una PCR confirmatoria empleando los iniciadores específicos para amplificar al *IgV* de PD-1 o el *IgV* de PD-L1. Los amplicones fueron analizados en un gel de agarosa al 2 % p/v.

## EXPRESIÓN DE RECOMBINANTES

La expresión proteica recombinante de los dominios *IgV* de PD-1 y PD-L1 se realizó mediante un ensayo de expresión piloto, para ello se transfirieron individualmente alícuotas tipo asada de algunas de las colonias aisladas de los cultivos de transformantes (*E. coli* BL21-DE3) positivas para PD-1 o PD-L1 desarrolladas en placas Petri con agar SOB-amp, a tubos Falcon de 15 mL conteniendo 5 mL de medio SOB-amp e incubadas durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente 50 mL del cultivo, fueron subcultivados en 50 mL de medio SOB-amp a 37 °C en agitación orbital a 150 rpm. El desarrollo bacteriano se monitoreó espectrofotométricamente hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm, para inmediatamente inducir la expresión de las proteínas recombinantes con la adición de 1 mM de Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich). Se recolectó 1 mL del cultivo cada hora, a lo largo de 7 horas, y su biomasa fue aislada por centrifugación a 5000 x *g* durante 10 min., en tubos tipo Eppendorf estériles de 1.5 mL (López-López *et al.*, 2018; López-Moreno *et al.*, 2003). Las biomásas se resuspendieron en 50 mL de amortiguador de corrida de Laemmli o TGS (compuesto por Tris 25 mM, Glicina 190 mM, y SDS 3.5 mM), y fueron lisadas por choque térmico sometiéndolas a 3 ciclos de congelación y ebullición. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 x *g* durante 1 min., y los sobrenadantes obtenidos fueron transferidos a nuevos tubos Eppendorf de 1.5 mL. Los sobrenadantes fueron mezclados con 10 mL de amortiguador de muestra de Laemmli 5X (compuesto por Tris-HCl 312.5 mM pH 6.8, SDS 10 % p/v, glicerol 25 %, azul de bromofenol 0.5 % p/v, y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 % v/v) e incubados en agua destilada en ebullición (~100 °C) durante 5 min., posteriormente una alícuota de 15 mL de cada muestra fueron analizadas en geles de poliacrilamida (del inglés SDS-PAGE) al 15 % teñido con azul brillante de Coomassie R-250 (López-López *et al.*, 2018; López-Moreno *et al.*, 2003), para evidenciar la presencia de los dominios recombinantes *IgV* de PD-1

y PD-L1, a fin de determinar el tiempo óptimo para la expresión recombinante.

### MODELADO 3D

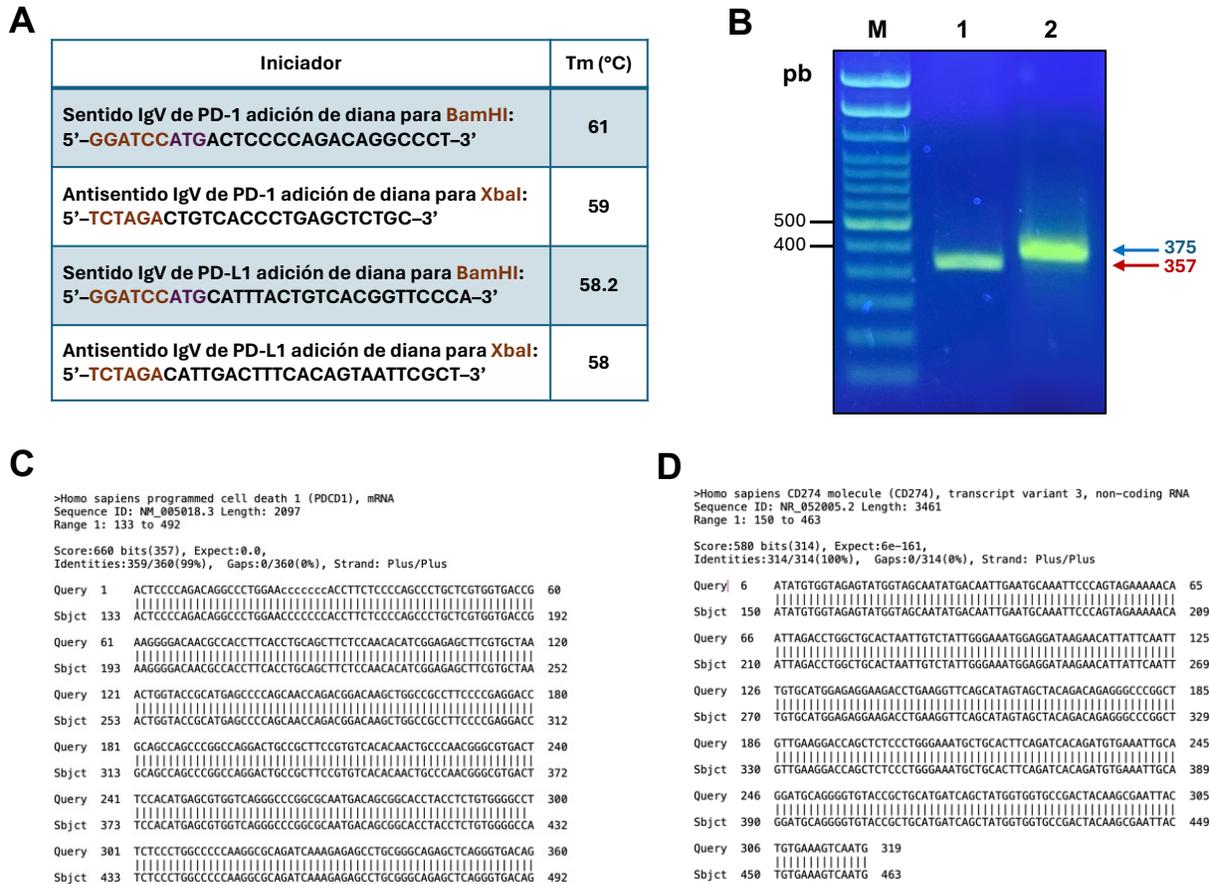
Con las traducciones *in silico* de las secuencias genéticas experimentales, se ingresaron al portal Phyre<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) para la predicción de un modelo 3D para cada uno de los dominios IgV de PD-1 y PD-L1, los resultados obtenidos fueron visualizados empleando el software Chimera 1.17.3, como fue reportado previamente (López-López *et al.*, 2018).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis *in silico* de cada una de las secuencias IgV de PD-1 y PD-L1 permitió el diseño de los iniciadores específicos que fueron sintetizados (Figura 1A), con ellos se estandarizaron las condiciones experimentales para una PCR punto final, con la que se clonaron cada uno de dichos fragmentos IgV, una temperatura de alineamiento de 63 °C para el IgV de PD-1 y 52 °C para el IgV de PD-L1 (Figura 1A). Los productos obtenidos se pusieron en evidencia electroforéticamente en geles de agarosa, observando una banda con un tamaño de 375 pares de bases (pb) para el IgV de PD-1, y una banda de 357 pb para PD-L1 (Figura 1B), consistente con lo esperado. Cada una de esas bandas fueron aisladas y secuenciadas, las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de referencia presentes en las bases de datos, mostrando una identidad del 99 % para el IgV de *Pdcd1* (Figura 1C), variando en la posición 300 donde hay un cambio de T por A en la secuencia de referencia NM\_005018.3 (Figura 1C). Esta diferencia entre la secuencia

de referencia y la secuencia experimental puede deberse a los polimorfismos naturales presentados por cada ser humano, dado que la secuencia experimental obtenida aquí para el IgV de PD-1, fue clonada desde el gDNA de un donador sano. Por otro lado, al realizar el análisis de homología *in silico*, para la secuencia experimental obtenida de la PCR del fragmento IgV de *Pdl1*, se obtuvo un 100 % de identidad con la secuencia genética de referencia NR\_052005.2 (Figura 1D). Esta identidad pudo deberse a que el IgV de PD-L1 provenía de un cultivo celular homogéneo de la línea tumoral de cáncer de mama MCF-7 (Cabanillas-Bojórquez *et al.*, 2023). Estos resultados confirman que las secuencias clonadas *in vitro* corresponden a los fragmentos IgV consistentes con los exones 2 del gen *Pdcd1* y el exón 3 del gen *Pdl1* y concuerdan con lo reportado en la literatura para estas moléculas (Shi *et al.*, 2013).

Colonias típicas de *E. coli* BL21 transformadas con las construcciones plasmídicas pD1 y pDL1 fueron obtenidas de los cultivos en placas de agar SOB-amp se muestran en la Figura 2A, consistentes con otros reportes similares donde emplearon esa misma cepa bacteriana (López-López *et al.*, 2018; López-Moreno *et al.*, 2003). Las bacterias transformadas fueron seleccionadas por su capacidad de sobrevivir en medio suplementado con ampicilina, por la presencia de este gen de resistencia en nuestro vector de expresión. Debido a que existe la posibilidad de que las bacterias sean transformadas con el vector sin los fragmentos de interés, fue necesario emplear una PCR para determinar la presencia de cada uno de los fragmentos deseados. Algunas de esas colonias fueron verificadas, evidenciando la presencia de las bandas de 375 pb para el IgV de PD-1, y de 357 pb para el IgV de PD-L1 (Figura 2B) la portación de los genes de interés, similar a lo descrito por otros



**Figura 1. Clonación y secuenciación de los IgV de PD-1 y PD-L1.** **A)** Secuencias de iniciadores específicos para cada IgV, con la adición de las dianas para las enzimas de restricción en 5' BamHI, y en 3' XbaI, así como la adición de un codón de iniciación y las temperaturas de fusión. **B)** Productos de PCR correspondientes a los IgV purificados previo a la secuenciación genética. Línea M, marcador de 100 pb; línea 1, IgV de PD-L1; línea 2, IgV de PD-1. **C)** y **D)** Alineamientos de las secuencias IgV de PD-1 y del IgV de PD-L1, respectivamente. Los detalles de las secuencias IgV experimentales obtenidas aquí, se observan como "Query" en las figuras correspondientes.

autores en la literatura (Kalim *et al.*, 2017; Zhansaya *et al.*, 2020). Con ello fue posible demostrar que las colonias seleccionadas contenían los insertos de interés y que podrían ser utilizadas para inducir la expresión recombinante de los dominios IgV tanto de PD-1 como de PD-L1.

Las secuencias genéticas experimentales permitieron realizar una traducción *in silico* para comparar cada una con las secuencias aminoacídicas de referencia, una estrategia que ha sido empleada previamente por otros autores (López-López *et al.*, 2018), dicho análisis permitió observar que ambas secuencias experimentales obtenidas aquí, son idénticas al 100 % en secuencias de aminoácidos, como lo muestran los resultados observados en la Figura 2C y 2D, donde la diferencia genética del 1 % para el IgV de PD-1 no tuvo impacto en la secuencia de aminoácidos, y confirmando lo esperado para el IgV de PD-L1 dada la identidad total. Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura (Kalim *et al.*, 2017; Zhansaya *et al.*, 2020).

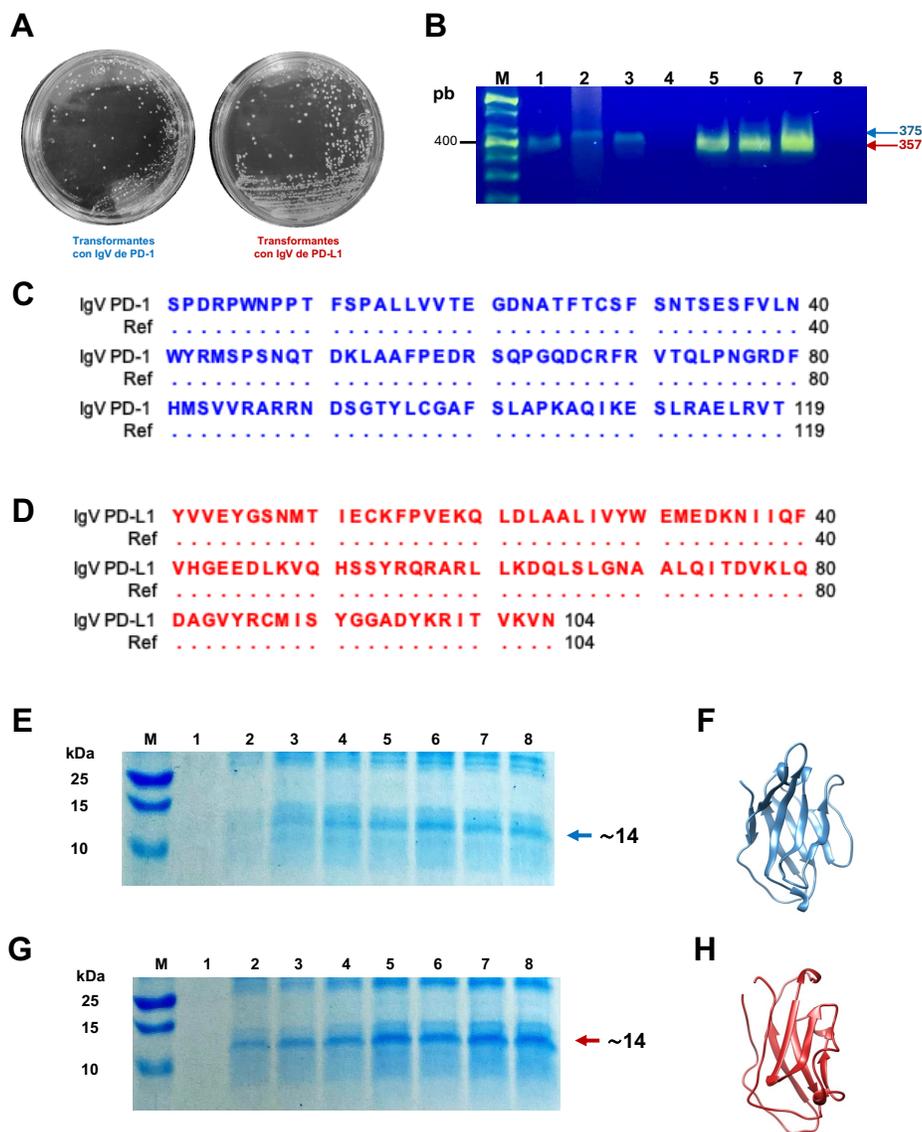
Posterior a la expresión recombinante el análisis de SDS-PAGE al 15 % para el IgV de PD-1, se logró observar una banda que aumentaba su intensidad de expresión a lo largo del tiempo, con un peso molecular aproximado de 14 kDa, tamaño que corresponde a lo estimado para el dominio IgV de PD-1 (Figura 2E). Asimismo, se logró determinar que la hora óptima de inducción de la proteína fue a las 4 horas post-inducción (Figura 2G). Los resultados observados son consistentes a lo reportado por Zhansaya y colaboradores (2020) (Zhansaya *et al.*, 2020), quienes al expresar el dominio extracelular completo de la proteína PD-1 de ser humano, obtuvieron una hora óptima de inducción de 4 horas post-inducción, y una banda de 22 kDa, estas diferencias de peso molecular, se debe a que ellos produjeron todo el dominio extracelular de la proteína, y nosotros solo el dominio IgV. Por otro lado, en la expresión recombinante de PD-L1 también se obtuvo una banda que aumentaba su intensidad de expresión a lo largo del tiempo, con un peso molecular aproximado de 14 kDa, consistente con el peso molecular esperado para un dominio IgV (Figura 2G) (Fantacuzzi *et al.*, 2024; Kalim *et al.*, 2017; Zak *et al.*, 2015; Zhansaya *et al.*, 2020). Asimismo, se determinó que la hora óptima de inducción fueron a las 4 h post-inducción. Lo observado es similar a lo reportado por (Kalim *et al.*, 2017), quienes al expresar el dominio completo extracelular de PD-L1 obtuvieron una banda de 30 kDa y una hora óptima de expresión a las 5 h post inducción (Kalim *et al.*,

2017). También en este caso, las diferencias en peso molecular se deben a que ese grupo de investigación realizó la clonación del gen del dominio extracelular completo de PD-L1, mismo que contiene además de un dominio IgV, un dominio adicional constante tipo inmunoglobulina (IgC) (Fantacuzzi *et al.*, 2024; Kalim *et al.*, 2017; Zak *et al.*, 2015).

El análisis 3D de los dominios IgV de PD-1 y PD-L1 mostraron estructuras típicas de dominios variables tipo inmunoglobulina con hojas beta antiparalelas en un acomodo tridimensional tipo sándwich (Odales *et al.*, 2020). La base de datos disponibles en el portal Phyre 2.0 muestra que nuestras secuencias generan con sus algoritmos, estructuras tridimensionales consistentes con las proteínas PD-1 y PD-L1 obtenidas de los análisis cristalográficos disponibles en la base de datos PDBe (del inglés Protein Data Bank in Europe) 3rrq para PD-1, y 7xad para PD-L1, confirmando que la clonación y expresión recombinante reportada aquí, fue exitosa, para cada uno de los dominios IgV. Adicionalmente, estas estructuras son consistentes con las reportadas en la literatura (Fantacuzzi *et al.*, 2024; Zak *et al.*, 2015), donde se detalla mediante el análisis cristalográfico de estas proteínas PD-1 y PD-L1 humanas, fortaleciendo nuestros resultados y permitiendo avanzar en la generación de un MAb o el diseño de un inmunoterapéutico útil para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, donde se ha demostrado que bloquear este punto de control, favorece positivamente el tratamiento de los pacientes con cáncer, al potenciar una respuesta adaptativa celular mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor (Borst *et al.*, 2021; Brahmer *et al.*, 2012; Hirano *et al.*, 2005; Muenst *et al.*, 2015; Pecorino, 2012; Shi *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016; Zhang & Zhang, 2020).

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible concluir que se logró la clonación y expresión recombinante de los dominios extracelulares IgV tanto de PD-1 y PD-L1, y que tanto su secuencia genética como su estructura 3D confirman estos datos. Asimismo, nuestros resultados establecen las bases moleculares que permitirán disponer de una fuente antigénica cuasi-inagotable de estas proteínas IgV, un aspecto biomédico crítico para la posterior producción de un MAb, o un MAb humanizado (o zumab) u otro inmunoterapéutico, algo que aún no



**Figura 2. Producción recombinante de los IgV de PD-1 y PD-L1.** **A)** Fotografías representativas de las colonias de *E. coli* BL21 transformadas con pD1 o pDL1, cultivadas en agar SOB-amp. En la imagen izquierda, las transformantes de IgV de PD-1 (texto azul), en la imagen derecha, las transformantes de IgV de PD-L1 (texto rojo). **B)** Confirmación de la presencia de los IgV en el DNA plasmídico (pDNA) aislado de las bacterias transformantes, observadas en un gel de agarosa al 2 % p/v teñido con SybrGold. Línea M, Marcador de 100 pb; líneas 1, 2 y 3 colonias portadoras del IgV de PD-1; línea 4, plásmido vacío como control negativo; líneas 5, 6 y 7, colonias portadoras del IgV de PD-L1, línea 8, plásmido vacío como control negativo. **C)** y **D)** comparativa de las secuencias aminoácidas derivadas de la secuenciación genética de los IgV de PD-1 (texto en color azul) y PD-L1 (texto en color rojo), con las secuencias de referencia correspondiente. **E)** y **G)** Cinética de expresión recombinante de cada IgV. Línea M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein; líneas 1 a la 8 tiempo en horas post-inducción desde 0 a 7. En cada caso, se señala la banda de incremento de aproximadamente 14 kDa, correspondiente a cada IgV, **E)** PD-1 y **G)** PD-L1. **F)** Modelo *in silico* 3D del IgV de PD-1, predicho de la secuencia mostrada en **C)**, empleando la plataforma Phyre<sup>2</sup> y visualizado en el software Chimera 1.17.3. **H)** Modelo *in silico* 3D del IgV de PD-L1, predicho de la secuencia mostrada en **D)**, empleando la plataforma Phyre<sup>2</sup> y visualizado en el software Chimera 1.17.3.

se logra en México, lo que, de concretarse, beneficiará a miles de pacientes con cáncer de nuestro país.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONAHCYT CB-2014-240185, y al LBM-FCQB por el por el financiamiento de este proyecto.

#### DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

#### APROBACIÓN DE COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA

No aplica

#### REFERENCIAS

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. In *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692-4693.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523.
- Borst, J., Busselaar, J., Bosma, D. M. T., & Ossendorp, F. (2021). Mechanism of action of PD-1 receptor/ligand targeted cancer immunotherapy. In *European Journal of Immunology*, 51(8), 1911–1920. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/eji.202048994>
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q. M., Hwu, W.-J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H. C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T. M., Alaparthi, S., Grosso, J. F., ... Wigginton, J. M. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455–2465. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1200694>
- Cabanillas-Bojórquez, L. A., Montes-Ávila, J., Vega-García, M. O., López-Moreno, H. S., Castillo-López, R. I., & Gutiérrez-Dorado, R. (2023). Effect of Optimized Chitosan Coating Obtained by Lactic Fermentation Chemical Treatment of Shrimp Waste on the Post-Harvest Behavior of Fresh-Cut Papaya (*Carica papaya* L.). *Fermentation*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation9030220>
- Chan, L. C., Li, C. W., Xia, W., Hsu, J. M., Lee, H. H., Cha, J. H., Wang, H. L., Yang, W. H., Yen, E. Y., Chang, W. C., Zha, Z., Lim, S. O., Lai, Y. J., Liu, C., Liu, J., Dong, Q., Yang, Y., Sun, L., Wei, Y., ... Hung, M. C. (2019). IL-6/JAK1 pathway drives PD-L1 Y112 phosphorylation to promote cancer immune evasion. *Journal of Clinical Investigation*, 129(8), 3324–3338. <https://doi.org/10.1172/JCI126022>
- Chang, A. Y., Chau, V. W., Landas, J. A., & Yvonne. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1(22-25). Disponible en: <https://static.igem.org/mediawiki/2018/d/d2/T-NYMU-Taipei-protocol-competent-cell.pdf>
- Chen, J., Jiang, C. C., Jin, L., & Zhang, X. D. (2016). Regulation of PD-L1: A novel role of pro-survival signalling in cancer. In *Annals of Oncology*, 27(3), 409–416. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv615>
- Fantacuzzi, M., Paciotti, R., & Agamennone, M. (2024). A Comprehensive Computational Insight into the PD-L1 Binding to PD-1 and Small Molecules. *Pharmaceuticals*, 17(3), 316. <https://doi.org/10.3390/ph17030316>
- Hamanishi, J., Mandai, M., Matsumura, N., Abiko, K., Baba, T., & Konishi, I. (2016). PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. In *International Journal of Clinical Oncology*, 21(3) Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-0959-z>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H., Wang, S., Ichikawa, M., Rietz, C., Flies, D. B., Lau, J. S., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Research*, 65(3), 1089–1096. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.1089.65.3>
- Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K., & Honjo, T. (2017). Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. In *Journal of Biomedical Science*, 24(1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0329-9>

- Kalim, M., Chen, J., Wang, S., Lin, C., Ullah, S., Liang, K., Ding, Q., Chen, S., & Zhan, J. (2017). Construction of high level prokaryotic expression and purification system of PD-L1 extracellular domain by using *Escherichia coli* host cell machinery. *Immunology Letters*, 190, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.06.004>
- López-López, K., Apodaca-Medina, A. I., León-Sicairos, C. R., Murúa-López, C. C., Ortiz-Navarrete, V. F., Chávez-Ontiveros, J., Beltrán-López, E., & López-Moreno, H. S. (2018). Cloning and recombinant expression of elongation factor-1 $\alpha$  of *Leishmania mexicana*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(12), 709–712. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2347>
- López-Moreno, H. S., Correa, D., Laclette, J. P., & Ortiz-Navarrete, V. F. (2003). Identification of CD4+ T cell epitopes of *Taenia solium* paramyosin. In *Parasite Immunology*, 25(10):513-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2003.00658.x>
- Muenst, S., Soysal, S. D., Tzankov, A., & Hoeller, S. (2015). The PD-1/PD-L1 pathway: Biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 19, Issue 2, pp. 201–211). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.980235>
- Odales, J., Guzman Valle, J., Martínez-Cortés, F., & Manoutcharian, K. (2020). Immunogenic properties of immunoglobulin superfamily members within complex biological networks. *Cellular Immunology*, 358, 104235. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104235>
- Pecorino, L. (2012). *Molecular Biology of Cancer*. 3<sup>th</sup> edition, Oxford University Press, United Kingdom.
- Shi, L., Chen, S., Yang, L., & Li, Y. (2013). The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-74>
- Su, S., Hu, B., Shao, J., Shen, B., Du, J., Du, Y., Zhou, J., Yu, L., Zhang, L., Chen, F., Sha, H., Cheng, L., Meng, F., Zou, Z., Huang, X., & Liu, B. (2016). CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep20070>
- Wellenstein, M. D., & de Visser, K. E. (2018). Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. In *Immunity*, 48(3), 399–416. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.004>
- Yang, H., Zhou, X., Sun, L., & Mao, Y. (2019). Correlation between PD-L2 expression and clinical outcome in solid cancer patients: A meta-analysis. *Frontiers in Oncology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00047>
- Zak, K. M., Kitel, R., Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2015). Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure*, 23(12), 2341–2348. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.010>
- Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. In *Cellular and Molecular Immunology*, 17(8), 807–821. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
- Zhansaya, A., Kanatbek, M., Kanat, T., Bakhytkali, I., Darkhan, K., Arman, K., Pavel, T., Kasym, M., & Yerlan, R. (2020). Recombinant Expression and Purification of Extracellular Domain of the Programmed Cell Death Protein Receptor. In *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 8(4). www.RBMB.net