



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**

**Producción de la proteína humana PD-L1 mediante tecnología del ADN recombinante**

Maricela Zuluaga Ramírez

Trabajo de grado presentado para optar al título de Química

Asesor

Edwin Bairon Patiño González Doctor (PhD) en Fisiología Química

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Química

Medellín, Antioquia, Colombia

2025



---

Cita

(Zuluaga Ramírez, 2025)

---

Referencia

Zuluaga Ramírez, M. (2025). *Producción de la proteína humana PD-L1 mediante tecnología del ADN recombinante* [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Estilo APA 7 (2020)



Grupo de Investigación. Bioquímica Estructural de Macromoléculas

**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

## **Dedicatoria**

A mis padres Martha y Eduardo por su incesante apoyo, por su amor y comprensión a lo largo de este trayecto.

A mis hermanos Joan y Elkin por sus palabras de aliento, por llenar con su sentido de humor la incertidumbre y por siempre recordarme que soy una mujer fuerte.

A mis sobrinos Antonia, Dalton y Cataleya por ser inspiración constante y motivación profunda con sus gestos de amor espontáneos y genuinos.

Y a mis entrañables amigos Xiomara, Alejandra y Santiago, por ser mis cómplices y maestros, su amistad es el lugar más comfortable para enfrentar las adversidades y para celebrar las alegrías. Este logro es tan de ustedes como mío porque con su compañía y amor, transitar este camino fue más llevadero, gracias por creer en mí incluso cuando yo no podía hacerlo. Les estoy infinitamente agradecida.

## **Agradecimientos**

Agradezco profundamente al Profesor Edwin Patiño, asesor de este trabajo y tutor académico, por su invaluable disposición para compartir sus conocimientos y guiar las labores experimentales.

Al Grupo de Bioquímica Estructural de Macromoléculas por haberme acogido y permitirme crecer académicamente, con mención especial a David Pérez por su valiosa orientación tanto teórica como experimental.

A los colaboradores clave del proyecto vinculado a este trabajo, Dr. Neil Aldrin Vásquez y MSc. Diego Pulgarín (Universidad Nacional Sede Medellín), así como al Dr. Jorge Eduardo Duque (Centro Oncológico de Antioquia y director de la empresa EXOSOMAS S.A.S).

Finalmente, al Instituto de Química por facilitar los recursos físicos y humanos que hicieron posible mi formación como profesional.

**Tabla de contenido**

Resumen..... 7

Abstract..... 8

1 Planteamiento del problema ..... 9

2 Justificación..... 10

3 Objetivos ..... 11

    3.1 Objetivo general ..... 11

    3.2 Objetivos específicos ..... 11

4 Marco teórico ..... 12

    4.1.    Cáncer..... 12

        4.1.1.    Checkpoint PD-L1/PD-1 ..... 12

        4.1.2.    PD-L1 como biomarcador en cáncer..... 13

        4.1.3    Proteína humana PD-L1 ..... 14

    4.2.    Producción de proteínas recombinantes en *E. coli* ..... 15

        4.2.1.    Fundamentos de la Expresión Recombinante ..... 15

        4.2.2.    Vectores de Expresión..... 16

        4.2.3.    Cuerpos de Inclusión ..... 17

    4.3.    Purificación y Caracterización de proteína recombinante..... 18

        4.3.1.    Técnicas de Purificación..... 18

        4.3.2.    Renaturalización de la Proteína..... 19

        4.3.3.    Caracterización de la proteína: SDS-PAGE ..... 20

    4.4.    Evaluación de la identidad de la proteína..... 21

        4.4.1.    Ensayos de Interacción proteína/anticuerpo: Western Blot..... 21

5 Metodología ..... 22

6 Resultados y Discusión..... 26

7 Conclusiones ..... 32

Referencias..... 33

**Lista de figuras**

**Figura 1** Estructura terciaria proteína PD-L1-DEC (monomérica)..... 14

**Figura 2** Mapa del vector bacteriano para expresión pET-28a. .... 17

**Figura 3** Esquema representativo de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (Ni<sup>2+</sup>). 19

**Figura 4** Esquema representativo de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato.  
..... 21

**Figura 5** Selección de transformantes en Agar LB + Kanamicina + Cloranfenicol..... 26

**Figura 6** Análisis por SDS-PAGE 12% de la expresión de PD-L1 recombinante en E. coli  
Rosetta (DE3). .... 27

**Figura 7** Cromatograma de purificación por IMAC en condiciones desnaturizantes (GuHCl  
6M). .... 28

**Figura 8** Análisis por SDS-PAGE 12% de las fracciones de cromatografía en condiciones  
desnaturizantes. .... 29

**Figura 9** Análisis en condiciones de renaturalización de la proteína. .... 30

**Figura 10** Detección de PD-L1 por Western Blot..... 31

---

### Siglas, acrónimos y abreviaturas

<b><math>\beta</math>-ME</b>	$\beta$ -Mercaptoetanol
<b>CI</b>	Cuerpos de inclusión
<b>DEC</b>	Dominio extracelular
<b>GuHCl</b>	Clorhidrato de guanidina
<b>IHC</b>	Inmunohistoquímica
<b>IMAC</b>	Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado
<b>IPTG</b>	Isopropilo $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>PD-1</b>	Proteína de muerte celular programada 1
<b>PD-L1</b>	Proteína Ligando de muerte celular programada 1
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
<b>TME</b>	Microambiente tumoral (Siglas en inglés)
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonia

## Resumen

Obtener reactivos biológicos mediante su producción *in home* representa una ventaja importante en el estudio de enfermedades con escenarios multicomponentes como lo es el cáncer, dado a que el suministro extranjero representa una inversión desmedida para un laboratorio de ciencias básicas de un país en desarrollo, en términos de costo, cantidad y disponibilidad. Por ello, se realiza la expresión del dominio extracelular (DEC) de la proteína humana PD-L1 (ligando de muerte programada 1) empleando tecnología del ADN recombinante, su purificación usando cromatografía de afinidad y su respectiva caracterización a través de técnicas analíticas y de fácil acceso como el SDS-PAGE y el Western Blot. Obteniendo como resultado la producción de proteína recombinante humana PD-L1-DEC con un rendimiento del 7.8% al obtener 7.8 mg de proteína, con un alto grado de pureza asociada a una única banda bien diferenciada en los geles de poliacrilamida y la verificación de su identidad mediante el reconocimiento de esta por un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 comercial. A través de este proceso metodológicamente viable se obtiene PD-L1 recombinante funcional para su aplicación en experimentos de interés biomédico.

*Palabras clave:* Proteínas recombinantes, PD-L1, cáncer, puntos de control inmunológico, biomarcadores, biotecnología, *E. coli*.

---

### Abstract

Obtaining biological reagents through in-house production represents a significant advantage in the study of diseases with multicomponent scenarios, such as cancer. This is because foreign supply represents a disproportionate investment for a basic science laboratory in a developing country, in terms of cost, quantity, and availability. Therefore, the expression of the extracellular domain (ECD) of the human PD-L1 protein (Programmed Death Ligand 1) was performed using recombinant DNA technology, its purification using affinity chromatography, and its respective characterization through accessible analytical techniques such as SDS-PAGE and Western Blot. The result was the production of recombinant human PD-L1 ECD protein with a yield of 7.8% (obtaining 7.8 mg of protein), displaying a high degree of purity associated with a single well-differentiated band on polyacrylamide gels. Its functionality was verified through recognition by a commercial anti-PD-L1 monoclonal antibody. Through this methodologically viable process, functional recombinant PD-L1 is obtained for application in biomedical experiments of interest.

*Keywords:* Recombinant proteins, PD-L1, cancer, immune checkpoints, biomarkers, biotechnology, *E. coli*.

## 1 Planteamiento del problema

La regulación positiva de moléculas en las células cancerígenas tiene un potencial uso en el diagnóstico temprano de la enfermedad. Moléculas como la proteína PD-L1 que son puntos de control inmunitario presentes en las interacciones de las células cancerosas con algunas células del sistema inmunológico sirven para plantear otros métodos de detección para diagnóstico.

Por esto, es indispensable la producción *in home* de diferentes tipos de proteínas y sus respectivos anticuerpos, evitando la dependencia del suministro extranjero con las dificultades de envío y altos costos asociados, siendo necesario entonces establecer la ruta para producción de estos reactivos biológicos que estén en el alcance metodológico de los laboratorios de ciencias básicas.

## **2 Justificación**

La detección de proteínas que se expresan en células cancerígenas nos permite realizar un diagnóstico o seguimiento de la enfermedad. Sin embargo, estudiar el cáncer desde esa perspectiva bioquímica a escala de laboratorio de ciencias básicas implica un recurso económico considerable comparada con otras áreas del conocimiento por la inversión en diferentes tipos de reactivos biológicos que permitan hacer una evaluación completa del modelo que se esté estudiando.

En este sentido, la producción de proteínas recombinantes es una herramienta que facilita la adquisición de los reactivos biológicos para el trabajo de investigación, en términos de costo, cantidad y disponibilidad.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología accesible para la producción de proteína recombinante humana PD-L1 funcional en *E. coli*, asegurando su disponibilidad como reactivo biológico de relevancia biomédica.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Lograr la expresión de la proteína recombinante humana PD-L1 en el sistema *E. coli* Rosetta (DE3) mediante transformación bacteriana con un vector de expresión clonado con el gen PD-L1.
- Producir la proteína de interés con pureza elevada, empleando cromatografía IMAC y evaluando la pureza mediante análisis SDS-PAGE.
- Evaluar la unión específica al anticuerpo anti-PD-L1 comercial mediante Western Blot para comprobar su identidad.

## 4 Marco teórico

### 4.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética la cual a pesar de los continuos esfuerzos por estudiarla para encontrar alternativas terapéuticas cada vez más específicas y eficaces, continúa representando un desafío biomédico al encontrarse entre las dos primeras causas de muerte en el mundo. En esta enfermedad células malignas adquieren capacidades como proliferación descontrolada, evasión inmunológica y resistencia a las terapias (Arafat Hossain 2024).

Avances recientes destacan que la progresión tumoral depende críticamente de un microambiente tumoral (sigla en inglés: TME), un ecosistema dinámico que interactúa con las células cancerosas y que está directamente involucrado con la progresión tumoral, la metástasis y la respuesta terapéutica. El TME está compuesto por elementos celulares (células inmunitarias, fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y componentes del sistema nervioso) y no celulares (matriz extracelular, citoquinas, factores de crecimiento y metabolitos).

Una de las características que se le atribuye al microambiente tumoral es que facilita la evasión inmunológica al generar un estado inmunosupresor en el que se regula de manera negativa la respuesta antitumoral haciendo uso de los puntos de control inmunológicos (checkpoints), donde las células tumorales se apropian de vías biológicas para inhibir la acción los linfocitos T citotóxicos. Por ello, la desregulación del TME no solo sostiene la supervivencia del tumor, sino que también determina la eficacia de terapias dirigidas, como los inhibidores de puntos de control inmunológicos, cuyo éxito depende de revertir estas señales que suprimen el sistema inmune (Swanton et al. 2024).

#### 4.1.1. Checkpoint PD-L1/PD-1

La proteína PD-L1 que se expresa en células del sistema inmunológico, se une a PD-1, proteína receptora en linfocitos T activados, transmitiendo señales inhibitoras que suprimen la proliferación, supervivencia y función efectora de los linfocitos T. Esta interacción constituye un punto de control inmunológico conocido como checkpoint clave en la tolerancia inmunológica mediante vías inhibitorias para minimizar los daños tisulares colaterales de las propias células inmunitarias manteniendo la homeostasis inmunitaria y, por lo tanto, previniendo la autoinmunidad en el cuerpo (Kumari, Brahma, and Maruthi 2023).

En el cáncer, cuando se inhibe la acción del linfocito T a través de su molécula de punto de control inmunitario PD-1, tras unirse al ligando PD-L1 expresado en la superficie de las células malignas, se produce una alteración en este punto de control que promueve la progresión del cáncer y evita su erradicación por el sistema inmune (Arafat Hossain 2024).

Clínicamente, los inhibidores de PD-1/PD-L1 (como nivolumab o pembrolizumab) han demostrado eficacia en múltiples neoplasias (melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma de Hodgkin, entre otros), induciendo remisiones duraderas. Sin embargo, la respuesta es heterogénea y la expresión de PD-L1, que se encuentra regulada por alteraciones genómicas, señales inflamatorias, oncogénicas y microARNs, solo predice parcialmente la eficacia terapéutica (Sun, Mezzadra, and Schumacher 2018).

#### **4.1.2. PD-L1 como biomarcador en cáncer**

PD-L1 (ligando de muerte programada 1) surge como un biomarcador predictivo clave en inmunoterapia oncológica debido a su papel central en el mecanismo de escape inmunitario de los tumores. Funciona como un biomarcador tisular cuya expresión en células tumorales o células inmunitarias del microambiente tumoral se asocia con una mayor probabilidad de respuesta a inhibidores del eje PD-1/PD-L1. Esto se debe a que PD-L1, al unirse a su receptor PD-1 en linfocitos T activados, transmite señales inhibitorias que suprimen la actividad antitumoral de estas células. Por tanto, una sobreexpresión de PD-L1, detectada mediante inmunohistoquímica (IHC), indica que el tumor está utilizando esta vía para evadir el sistema inmunitario, haciendo posible que su bloqueo terapéutico restaure la respuesta inmunológica (Patel and Kurzrock 2015).

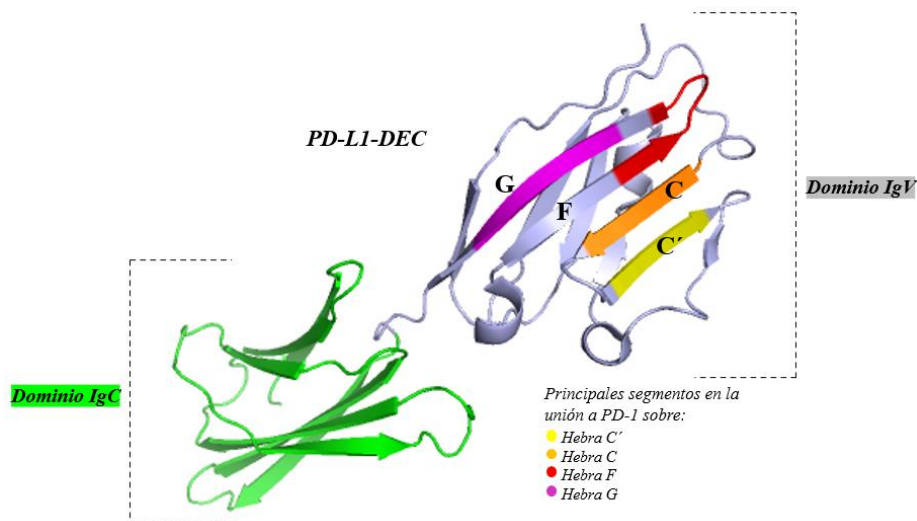
Se ha encontrado una alta expresión de PD-L1 en tipos de cáncer como cáncer de seno, el tímico, Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células de Merkel, cáncer renal, cáncer de cuello uterino y de ovario, entre otros (Yarchoan et al. 2019).

PD-L1 se consolida como el principal biomarcador predictivo para la selección de pacientes candidatos a inhibidores de puntos de control inmunitario anti-PD-1/PD-L1, siendo biomarcador más validado clínicamente, especialmente en cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma urotelial y cáncer de mama triple negativo (Doroshov et al. 2021).

### 4.1.3 Proteína humana PD-L1

La proteína PD-L1 es una glicoproteína transmembrana de la familia B7 de moléculas coinhibidoras de células T y grupo de diferenciación 274 (CD274) que desempeña un papel central en la supresión de la respuesta inmunitaria adaptativa. Su estructura tridimensional está organizada en tres dominios principales: un dominio extracelular N-terminal de tipo Ig variable (IgV), un dominio extracelular C-terminal de tipo Ig constante (IgC), un segmento transmembrana  $\alpha$ -hélice y una corta cola sin estructuras funcionales definidas. El dominio IgV (aminoácidos 18-134), representado en la **Figura 1**, es el responsable de la interacción con PD-1 y presenta un plegamiento  $\beta$ -sándwich clásico, con láminas frontales (GFCC') y traseras (ABED). la interacción receptor-ligando está mediada en su mayor parte por residuos de cadenas C'CFG tanto en PD-1 como en PD-L1. Los contactos proteína-proteína involucran tanto interacciones hidrofóbicas como interacciones polares. El dominio IgC, aunque no participa directamente en la unión a PD-1, estabiliza la conformación global mediante interacciones hidrofóbicas con el dominio IgV (Zak et al. 2015). La región transmembrana (aminoácidos 239-260) está compuesta por una hélice  $\alpha$  con regiones tanto hidrofílica como hidrofóbica que ancla la proteína a la membrana celular, mientras que el dominio intracelular (aminoácidos 261-290 aa) no posee de estructuras de señalización relevantes, lo que sugiere que su función principal es puramente estructural (Kythreotou et al. 2018).

**Figura 1** Estructura terciaria proteína PD-L1-DEC (monomérica).  
Obtenida mediante difracción de rayos X con una resolución de 2.64 Å (Lin et al. 2008).



Nota: Editada en PyMOL.

## **4.2. Producción de proteínas recombinantes en *E. coli***

La síntesis de proteínas es un proceso de alta complejidad llevado a cabo por los ribosomas celulares en cuestión de minutos. Sin embargo, reproducirlas sintéticamente en un laboratorio implica un gran desafío al considerar las variables y procedimientos implicados en la unión de más de 100 aminoácidos para obtener un polipéptido correctamente plegado y funcional.

Es aquí donde la biotecnología, a través del bioprocesamiento, es una herramienta bastante útil en la síntesis de proteínas utilizadas en la industria, vacunas y productos terapéuticos, las cuales adquieren una enorme importancia en la detección, protección y tratamiento de enfermedades, entre muchas más aplicaciones.

De manera específica, la bacteria *E. coli* se utiliza para la producción de productos farmacéuticos, nutracéuticos e intermediarios de alto valor, al igual que para la expresión de proteínas terapéuticas, anticuerpos, enzimas y proteínas complejas. Esto se logra por medio del aprovechamiento de su capacidad para producir proteínas heterólogas en grandes cantidades, su biología celular bien estudiada y conocida, fácil manejo a través de uso de medios de cultivo simples y de bajo costo. Además, su proceso de fermentación es sencillo y rápido, producto libre de virus y con altos rendimientos resultando una producción rentable (Tripathi 2016).

### **4.2.1. Fundamentos de la Expresión Recombinante**

La expresión de proteínas recombinantes abarca desde la clonación del gen interés en un vector de expresión, su transformación en un hospedador, la inducción de la expresión del gen de interés para obtención de la proteína recombinante y la purificación de esta para su uso posterior.

Para cualquier producción de proteínas recombinantes, la selección de la cepa es una consideración importante ante la variedad de hospedadores disponibles y sus características particulares. Al momento de expresar proteínas heterólogas en *E. coli* se deben tener presentes las diferencias significativas en el uso de codones entre organismos que pueden generar desplazamientos del marco de lectura de la traducción, terminación prematura de la traducción y mala incorporación de aminoácidos, reduciendo la calidad e impidiendo el buen rendimiento de expresión de la proteína interés. En relación a otras cepas usadas para la expresión, el uso de la cepa Rosetta (DE3) exhibe una ventaja significativa para la expresión de fragmentos de proteína humana, compensando los ARNt para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA, comúnmente utilizados por eucariotas, pero raramente utilizados en *E. coli* (Tegel et al. 2010).

#### 4.2.2. *Vectores de Expresión*

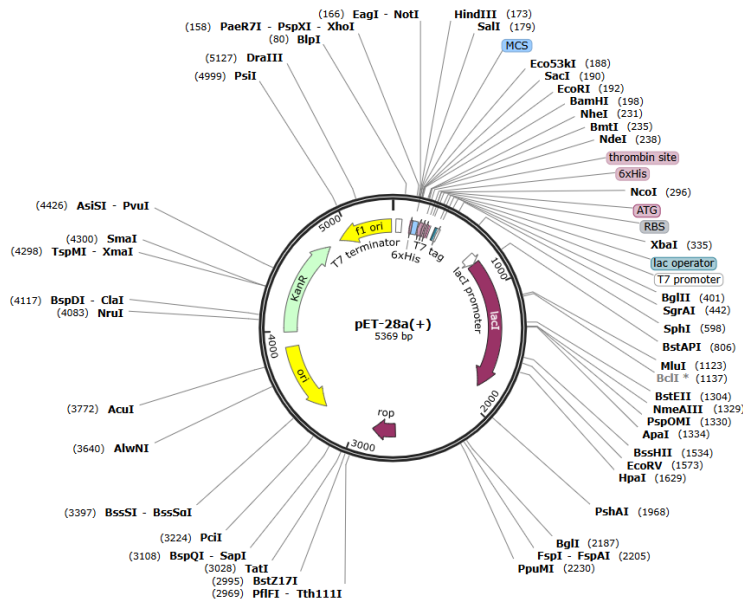
Un vector es un portador de ADN foráneo a una célula huésped, replicándose en esta de forma independiente a su cromosoma. En la naturaleza el proceso de intercambio genético está mediado por dos tipos de vectores que a su vez han sido aprovechados por la ingeniería genética: los plásmidos que son moléculas de ADN pequeñas generalmente circulares, comunes en bacterias y que han sido adaptadas en la biología molecular para su uso como vectores tanto células eucariotas como en sistemas bacterianos; y los virus que suelen ser de mayor tamaño que los plásmidos debido a su estructura más compleja en la que el ADN viral se encuentra encapsulado en una estructura proteica conocida como cápside la cual no solo lo protege, sino que también proporciona un mecanismo eficiente para entregar el ADN viral a la célula huésped (Vectors 2013).

Los vectores se pueden clasificar en diferentes grupos según el propósito del proceso y el tipo de huésped a utilizar, entre ellos se tienen vectores de clonación, de expresión, entre otros, encontrándose dentro de estos últimos, distintos grados de complejidad dependiendo de si se va a realizar la expresión en células procariontas o eucariotas, además, la combinación de la estructura del vector, el promotor, el terminador y el marcador de resistencia a los antibióticos variará en función de las características de la clase de proteína que se vaya a expresar (Cossar and Arrowsmith 2012).

La mayoría de los vectores de *E. coli* se derivan de pBR322 o de la serie pUC, lo que proporciona un número razonable de copias por célula y una buena estabilidad (Cossar and Arrowsmith 2012). En la actualidad, los sistemas de expresión comunes, como los vectores de la serie pET utilizan el promotor T7 y constituyen un sistema muy utilizado en los laboratorios. Entre ellos, el vector pET-28a representado en la **Figura 2**, es uno de los más usados para la expresión de proteínas, contiene junto con el promotor T7, una secuencia de operador lac adyacente para la inducción con IPTG (*isopropilo β-D-1-tiogalactopiranosido*). Además, posee una etiqueta de polihistidina (His 6) para facilitar la purificación del polipéptido y un marcador de resistencia a kanamicina que funciona como mecanismo de selección (Rosano and Ceccarelli 2014).

**Figura 2** Mapa del vector bacteriano para expresión pET-28a.

Se evidencian en él la región promotora T7 para iniciar la transcripción, la secuencia de operadores para controlar la transcripción, los múltiples sitios de clonación, la secuencia de terminación y la secuencia de resistencia a kanamicina como marcador de selección.



Nota: Fuente SnapGene/Novagen (LLC n.d.).

### 4.2.3. Cuerpos de Inclusión

Los cuerpos de inclusión son agregados proteicos densos (1.3–1.4 g.ml<sup>-1</sup>) e insolubles que se depositan de forma constante en el citoplasma o el periplasma celular (Kumar 2011).

La expresión de alto nivel de proteínas heterólogas en *E. coli* suele resultar en la agregación de las moléculas de proteína expresadas formando cuerpos de inclusión debido a la rápida producción de polipéptidos que es facilitada por los promotores fuertes de origen viral como el promotor T7, y la ausencia de compartimentos distintos dentro del citoplasma de *E. coli*. La generación de cuerpos de inclusión puede ser ventajosa ya que evita su degradación por proteasas. Luego, la proteína se somete a un proceso de renaturalización *in vitro* para lo que se requiere un procesamiento exhaustivo que incluya concentración de las bacterias del cultivo y lisis celular por ultrasonido. Seguido de esto, los cuerpos de inclusión son recuperados como un precipitado después de centrifugar y son solubilizados utilizando altas concentraciones de sales caotrópicas como urea y clorhidrato de guanidina (*GuHCl*). Consecutivamente, la renaturalización y finalmente la purificación para obtener las proteínas que recuperaron su actividad funcional (Singh et al. 2015).

### 4.3. Purificación y Caracterización de proteína recombinante

#### 4.3.1. Técnicas de Purificación

La purificación es un paso importante en el bio-procesamiento de proteínas recombinantes para alcanzar el nivel de pureza deseado que estará relacionado con la aplicación final de la misma. A pesar de los mecanismos usados para aislar la proteína de los demás componentes del cultivo bacteriano, se debe garantizar la completa extracción de estos contaminantes y además un proceso de purificación que sea selectivo a la proteína interés, puesto que como es de esperarse, las bacterias sintetizan las proteínas necesarias para su funcionamiento de manera sincrónica con la proteína heteróloga.

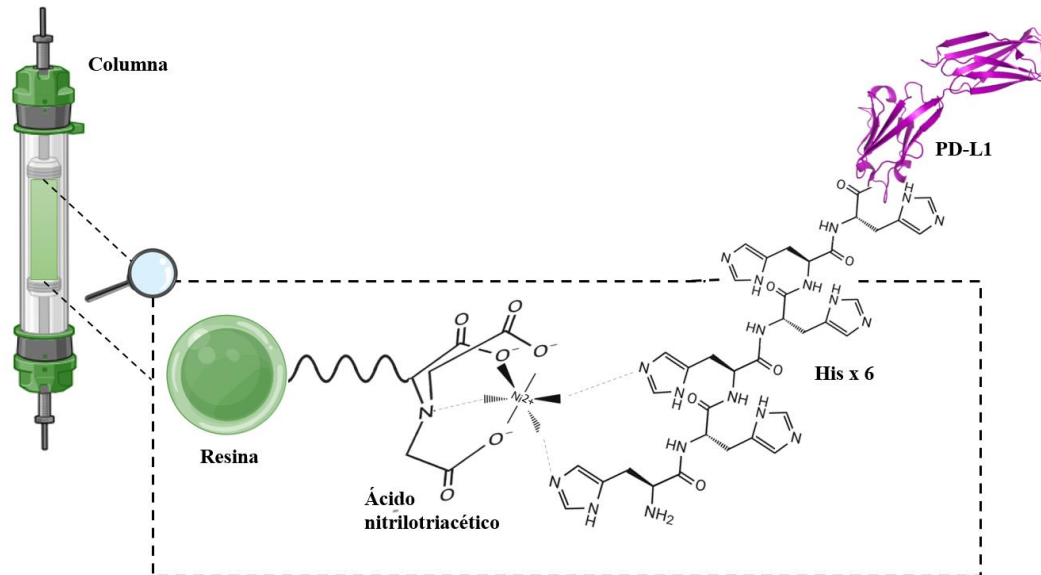
##### 4.3.1.1. Cromatografía de afinidad

La cromatografía es un método físico reconocido por su capacidad de separar mezclas complejas. La estrategia basada en la afinidad se ha utilizado para la purificación fácil de proteínas recombinantes mediante el uso de etiquetas de fusión, es decir, secuencias de aminoácidos adicionales en las proteínas recombinantes y que tienen afinidades selectivas y altas para un ligando ya sea químico o biológico, que se encuentra inmovilizado en una columna de cromatografía. En particular, la etiqueta de histidina (His) se ha utilizado con frecuencia en mezclas de bioprocesos ofreciendo una pureza de ~90% o mayor (Saraswat et al. 2013).

La etiqueta de histidina está compuesta por una secuencia de seis o más residuos de histidina que se añaden al carboxilo terminal (-COOH) o al amino terminal (-NH<sub>2</sub>) de la proteína recombinante de interés y exhibe una alta afinidad hacia iones metálicos como níquel (Ni). La cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) representada en la

**Figura 3**, utiliza una matriz que tiene un grupo quelante de metales disponible para la unión del metal, y los sitios de coordinación restantes en el metal se unen a los residuos de His unidos a la proteína recombinante, lo que permite su purificación mediante elución con un quelante de metales como el imidazol (İncir and Kaplan 2024).

**Figura 3** Esquema representativo de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado ( $Ni^{2+}$ ).



#### 4.3.2. Renaturalización de la Proteína

Para obtener proteínas biológicamente activas, es necesario eliminar el agente caotrópico (ej., urea o clorhidrato de guanidina) para alcanzar su estado nativo, proceso conocido como renaturalización. Con este fin, las proteínas solubilizadas se pliegan a su estado original valiéndose de la eliminación de los agentes desnaturizantes usados a lo largo del bioprocesamiento. Este proceso expone las proteínas desnaturizadas en altas concentraciones de agentes caotrópicos a un tampón de renaturalización, el cuál va reduciendo gradualmente la concentración del desnaturizante. A medida que disminuye el desnaturizante, aumenta la velocidad de plegamiento hacia estructuras nativas, pero también se incrementa el riesgo de agregación, especialmente si el plegamiento es lento y las concentraciones moderadas-bajas no mantienen solubles los intermediarios desplegados. Para optimizar el proceso, se emplean variantes como la diálisis escalonada que consiste en equilibrios sucesivos en concentraciones cada vez menores de desnaturizante. (Tsumoto et al. 2003).

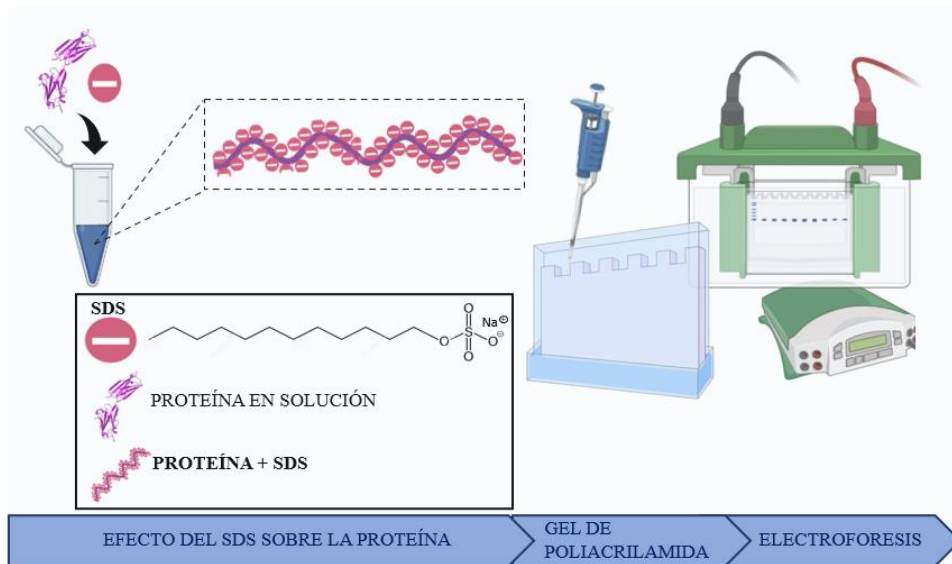
Para que la renaturalización sea más eficiente, se utiliza un sistema REDOX, que es una combinación de tioles reducidos y oxidados (ej., glutatión) para promover el intercambio de disulfuro de modo que los residuos de cisteína se encuentren en la proximidad correcta entre sí y se favorezca la correcta formación de estructuras secundarias y terciarias de la proteína (Thomson et al. 2012).

#### **4.3.3. Caracterización de la proteína: SDS-PAGE**

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) esquematizado en la **Figura 5**, es una técnica empleada para la separación de proteínas según su movilidad bajo una corriente eléctrica, determinada por su peso molecular. A través de la adición del detergente *SDS* se eliminan estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, manteniéndolas como cadenas polipeptídicas lineales, disposición requerida para su movilidad a través del gel. El *SDS* recubre las proteínas de manera proporcional a su peso molecular, otorgándoles una carga negativa uniforme. El sistema de gel más utilizado para separar un amplio rango de proteínas mediante SDS-PAGE es el sistema de Laemmli, que emplea geles de tris-glicina compuestos por un gel de apilamiento que concentra las proteínas en bandas estrechas al inicio de la electroforesis y un gel de separación con porcentajes variables de acrilamida para separar proteínas por peso molecular (Manns 2011).

El SDS-PAGE en geles al 12% se realiza bajo condiciones reductoras usando  $\beta$ -mercaptoetanol, para asegurar la disociación de enlaces disulfuro correspondientes a las cistinas presentes en las proteínas, además de un calentamiento previo a 95°C asegurando la desnaturalización completa. La migración de las proteínas se compara con un marcador de peso molecular estandarizado para dicho fin. Para la detección de las bandas se realiza mediante interacciones iónicas entre los grupos de ácido sulfónico cargados negativamente del colorante Coomassie Brilliant Blue y los aminoácidos básicos cargados positivamente, con un límite de detección de 10 ng.

**Figura 4** Esquema representativo de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato.



#### 4.4. Evaluación de la identidad de la proteína

##### 4.4.1. Ensayos de Interacción proteína/anticuerpo: Western Blot

El Western Blot es una técnica que permite la separación de proteínas mediante electroforesis en gel, su transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno que posteriormente se incuba con albúmina sérica bovina (BSA) para bloquear interacciones inespecíficas y la inmunodetección selectiva de un antígeno inmovilizado haciendo uso de un anticuerpo primario, que se une a una región específica de la proteína diana para detectar su presencia en la membrana y un anticuerpo secundario se conjuga con un componente utilizado para el análisis, enzimas como la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina que catalizan la reacción química para generar una señal colorimétrica o quimioluminiscente. Este es un método importante para el análisis de proteínas que depende de la especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno y es de gran utilidad para realizar la identificación indirecta de proteínas específicas (Gavini and Parameshwaran 2025).

## 5 Metodología

### 1. Diseño del vector de expresión pET28a/PD-L1

El ectodominio de la proteína PD-L1 (PD-L1-DEC), compuesto por 220 residuos de aminoácidos (UniProt ID: Q9NZQ7), fue seleccionado para llevar a cabo la expresión recombinante. La secuencia correspondiente a este dominio se verificó mediante ExPASy – ProtParam, confirmando la ausencia de dominios transmembrana (TM) y citoplasmáticos (CD) en el constructo. El gen que codifica PD-L1-ECD se clonó en el marco de lectura del vector de expresión pET28a por la empresa Biomatik. El constructo final incluye codón de iniciación de Metionina (M) en posición N-terminal, etiqueta de afinidad His-tag (6xHis) en posición N-terminal, sitio de escisión proteolítica con una secuencia específica para trombina y dominio funcional: PD-L1-DEC (residuos 19-238).

La secuencia aminoacídica completa del polipéptido recombinante es:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGSHMFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEK  
QLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVK  
LQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAE  
VIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVI  
PELPLAHPNER.

### 2. Expresión de PD-L1 Humana

Células de *E. coli* Rosetta (DE3) químicamente competentes fueron transformadas con el vector pET28a/PD-L1 mediante choque térmico. Los transformantes crecieron sobre agar Luria Bertani (LB): 10 g NaCl, 10 g triptona y 5 g de extracto de levadura por cada litro de medio, pH: 7.3. Una unidad formadora de colonia (UFC) fue tomada y cultivada en medio LB líquido. El cultivo preparativo suplementado con kanamicina 50 µg/ml y cloranfenicol 50 µg/ml fue preparado a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD<sub>600</sub>) de ~0.5 a 600 nm, momento en el que tuvo lugar la expresión de la proteína por parte de las células transformadas con el vector de expresión pET28a/PD-L1 a través de la inducción con IPTG a una concentración final de 1 mM durante 3 horas a las mismas condiciones de temperatura y agitación. Finalmente, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 6500 rpm por 10 min. a 4°C y resuspendidas en 10 volúmenes de tampón de lisis sacarosa-tris-EDTA (STE): 0.375 M sacarosa, 50 mM Tris-

HCl y 1 mM EDTA, pH: 8.0. Las células fueron lisadas por ultrasonido con una frecuencia de 20 kHz, una amplitud de 40% y con una punta de titanio de 3/8 (Sonics, VCX 750), durante 5 min. en baño de hielo. La mezcla fue centrifugada a 12000 rpm por 30 min. a 4°C para separar la fracción soluble (sobrenadante) de la insoluble (Cuerpos de Inclusión, CI). Los CI fueron lavados dos veces con tampón STE. La proteína acumulada en los CI fue solubilizada con 10 volúmenes de tampón de solubilización (Acetato de sodio 50 mM, Cloruro de Guanidino (GuHCl) 6 M y  $\beta$ -mercaptoetanol, pH: 5.0). Luego, fue incubada por 12 h con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión fue centrifugada a 10000 rpm por 30 min. a 4°C. La concentración de la proteína se determinó por OD<sub>280</sub> utilizando el coeficiente de extinción (0.937 mg/ml). La proteína se concentró a 20 mg/ml en una celda con agitación (Millipore) utilizando membranas YM3 con un tamaño de poro de 3000 Da (MWCO 3000).

### 3. Purificación y renaturalización de la proteína PD-L1

La proteína PD-L1 extraída de los cuerpos de inclusión y concentrada a 20 mg/ml en presencia de *GuHCl* 6 M se cargó en una columna de *Ni* (Profinity, Bio-Rad) preequilibrada con acetato de sodio 50mM y *GuHCl* 6 M a pH: 5.0, el tampón de lavado de la columna compuesto por una solución de acetato de sodio 50 mM, *GuHCl* 6 M e Imidazol 10 mM. La proteína unida a la columna se eluyó con el tampón de acetato de sodio 50 mM, *GuHCl* 6 M e imidazol 250 mM. Se tomaron fracciones de 5 ml, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE teñido con azul de coomassie. Las fracciones que se visualizaron con mayor cantidad de proteína en el SDS-PAGE se mezclaron. Para la renaturalización, la proteína PD-L1 se llevó a una concentración 1.0 mg/ml en tampón de renaturalización (*Tris-HCl* 50 mM, *NaCl* 100 mM, urea 2.0, *GSH* 0.1 mM (glutati6n reducido) y *GSSH* 0.01 mM (glutati6n oxidado), pH: 8.0). La soluci6n fue puesta en una membrana SpectraPor 3 de 3500 Da por 12 h a 4°C. La prote6na empacada se dializ6 en 10 veces el volumen de soluci6n en el que se diluy6, en el tamp6n de renaturalizaci6n con un cambio en la molaridad de la urea a 1.0 M. Para continuar con este proceso, la concentraci6n de urea se redujo intercambiando cada 24h el 50% del tamp6n de di6lisis con una soluci6n de tris 50 mM, pH: 8.0. Despu6s de 4 d6as de di6lisis, la soluci6n con la prote6na se concentr6 en un Amicon con celda de agitaci6n. La prote6na concentrada fue cargada en una columna de *Ni* (Nuvia, Bio-Rad) preequilibrada con *Tris-HCl* 50 mM, *NaCl* 100 mM a pH: 8.0, el tamp6n de lavado de la columna se us6 un tamp6n con *Tris-HCl* 50 mM, *NaCl* 100 mM e Imidazol 10 mM a pH: 8.0. La prote6na

PD-L1 unida a la columna se eluyó agregando al tampón imidazol 250 mM. Se colectaron fracciones de 1.0 ml, las fracciones se resuspendieron en tampón sin agente reductor y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones que mostraron solo una banda correspondiente a la proteína PD-L1 fueron mezcladas y concentradas por ultracentrifugación hasta 1.3 mg/ml.

#### 4. Caracterización de la proteína

Para detectar la proteína PD-L1 recombinante en diferentes etapas del proceso se usó SDS-PAGE, se tomaron alícuotas de 1 ml del medio con la proteína, se centrifugaron a 10000 rpm por 1 min., los pellets obtenidos fueron resuspendidos con tampón de carga reductor en una proporción 1:1, en cuanto a las alícuotas tomadas de las fracciones obtenidas de la cromatografía en condiciones desnaturizantes, fueron tratadas con ácido tricloroacético para precipitar la proteína. En el paso por seguir, las muestras eran completamente desnaturizadas por ebullición a 95°C durante 10 min. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% y separadas en la cámara de electroforesis (Bio-Rad), utilizando un voltaje constante de 300 V hasta que el frente de tinción recorrió por completo el gel.

La evaluación de la identidad de la proteína PD-L1 recombinante se realizó mediante la técnica de Western Blot, en la cual inicialmente se hizo una electroforesis con diferentes concentraciones de la proteína PD-L1 recombinante (28, 18, 15, 12.5, 6.2 µg/pozo), en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%. Las proteínas separadas fueron transferidas electroforéticamente desde el gel a una membrana de PVDF de 0.2 µm (Bio-Rad) utilizando un sistema de transferencia Semi-Dry (Bio-Rad). La transferencia se realizó a 22 V durante 2 horas en tampón de transferencia (Tris 48 mM, Glicina 39 mM y metanol 10%). Seguido de esto, para prevenir la unión inespecífica de anticuerpos, la membrana fue incubada con una solución de bloqueo TBS-T (Tris-Buffered Saline con 0.1% Tween-20) suplementado con 5% de leche descremada en polvo, bajo agitación constante a temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana bloqueada fue incubada con el anticuerpo primario específico contra PD-L1 (Anti-PD-L1 monoclonal de ratón (Invitrogen), diluido 1:1000 en solución de bloqueo) bajo agitación suave a 4°C durante toda la noche. Tras la incubación con el anticuerpo primario, la membrana fue lavada exhaustivamente con TBS-T (3 lavados de 5 minutos cada uno) bajo agitación constante para eliminar el anticuerpo no unido.

Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario de cabra Anti-ratón IgG1 conjugado con HRP (Invitrogen), diluido 1:5000 en solución bloqueante, bajo agitación

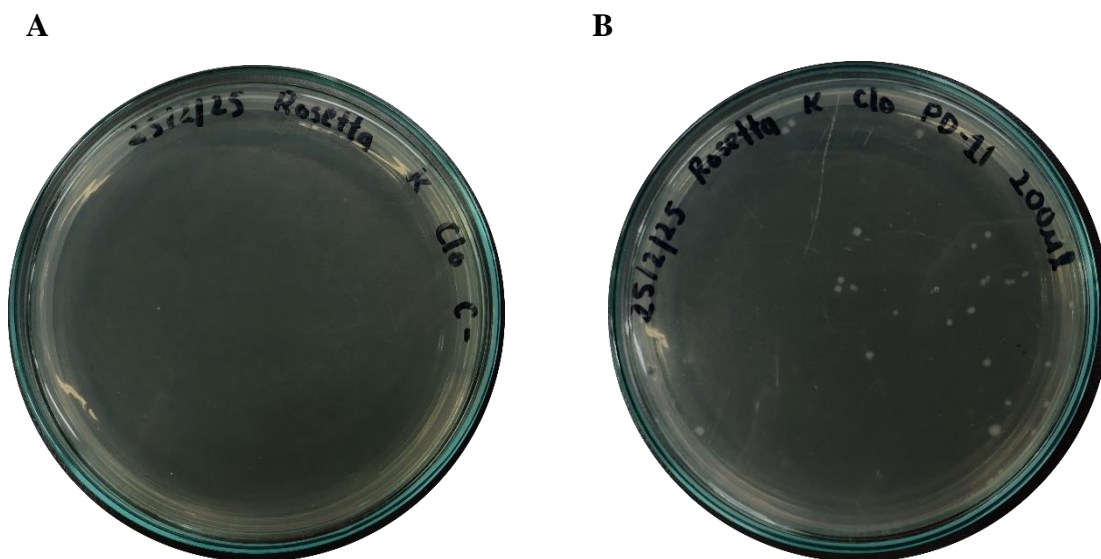
suave a temperatura ambiente durante 1 hora, para después proceder de nuevo con los lavados. Finalmente, la señal específica de PD-L1 fue detectada utilizando un sustrato colorimétrico para HRP (1-step ultra TMB-Blotting, ThermoFisher), la membrana fue cubierta con la mezcla del sustrato hasta obtener un precipitado azul oscuro sobre las bandas con presencia de PD-L1.

## 6 Resultados y Discusión

El gen que codifica el dominio extracelular de PD-L1 (PD-L1-ECD) clonado en el vector de expresión pET28a (Novagen) se transformó en las bacterias *E. coli* Rosetta (DE3) mediante choque térmico. La eficiencia de la transformación se confirmó a través del mecanismo de selección con kanamicina (50 µg/ml) donde solo las bacterias transformadas con el plásmido lograron establecer UFC (**Figura 5B**) y, como control negativo, las bacterias sin el plásmido no mostraron crecimiento de colonias (**Figura 5A**).

**Figura 5** Selección de transformantes en Agar LB + Kanamicina + Cloranfenicol.

**A)** Control negativo: bacterias *E. coli* sin plásmido pET28a. **B)** Bacterias *E. coli* transformadas con pET28a. Se observan colonias bacterianas (unidades formadoras de colonias).



La exitosa transformación permitió proceder a la expresión de la proteína recombinante en la cuál 10 litros de cultivo en fase exponencial ( $OD_{600}$ :0.5) se sometieron a inducción durante 3 horas con IPTG 1 mM. El análisis por SDS-PAGE (**Figura 6**) reveló acumulación de la proteína heteróloga en cuerpos de inclusión, teniéndose que en los carriles 1-4 de muestras temporales del cultivo (0-3 h) no se aprecian bandas dominantes al igual que en los carriles 5-6, en los que las muestras de los sobrenadantes pos-lisis celular, solo muestran bandas difusas pertenecientes a proteínas bacterianas. Estas 6 muestras fueron solubilizadas en tampón SDS +  $\beta$ -ME. Siendo

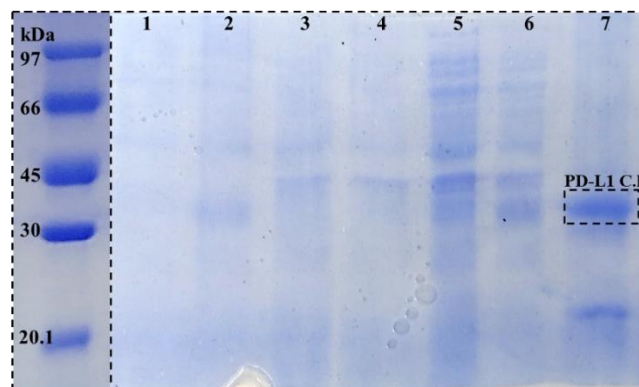
entonces el carril 7, fracción correspondiente a los cuerpos de inclusión solubilizados (*GuHCl 6M*), donde se aprecia una banda bien definida alrededor de 30 kDa, equivalente a la esperada para la proteína recombinante PD-L1-DEC.

La ausencia de bandas en el gel de poliacrilamida pertenecientes al proceso de inducción puede estar relacionada con el grado de solubilización de los CI en presencia de desnaturalizantes, proceso estrechamente vinculado a la conformación de las cadenas polipeptídicas asociadas, variando desde un estado similar al nativo, que se desagrega al cambiar el tampón, hasta moléculas mal plegadas o tan compactadas que se disocian solo en condiciones de desnaturalización muy rigurosas (Bowden, Paredes, and Georgiou 1991). En ese sentido y considerando la preparación de las muestras sembradas en los carriles, difieren en que solo en el carril 7 (banda definida) las condiciones desnaturalizantes son lo suficientemente rigurosas para liberar la proteína recombinante y visualizarse en el gel.

Tras la fermentación de 10 litros de cultivo de *E. coli*, la fracción insoluble mostró un rendimiento de 4 g de cuerpos de inclusión húmedos, obtenidos mediante centrifugación y lisis bacteriana por sonicación. Posteriormente los CI fueron solubilizados en 40 ml de tampón desnaturalizante.

**Figura 6** Análisis por SDS-PAGE 12% de la expresión de PD-L1 recombinante en *E. coli* Rosetta (DE3).

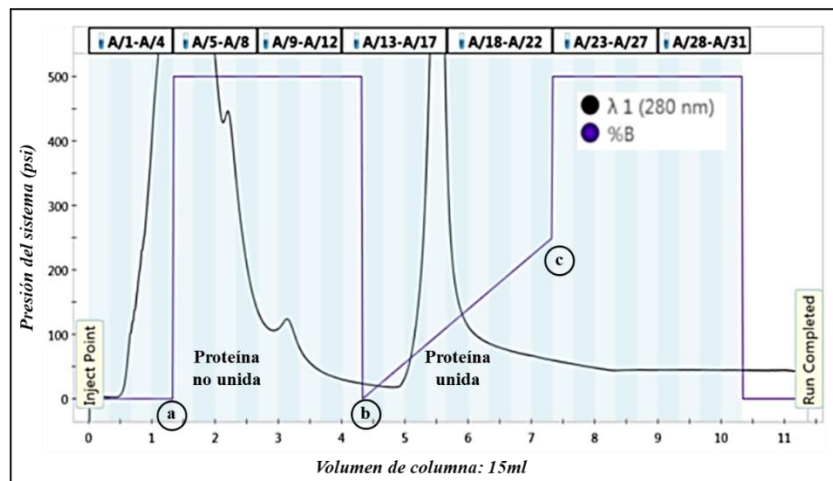
Pozos 1-4: Muestras totales recolectadas a 0, 1, 2 y 3 horas post-inducción con 1 mM IPTG, pozos 5-6: Sobrenadantes de lisados celulares tras el primer y segundo lavado de cuerpos de inclusión (CI), pozo 7: CI solubilizados en Tampón desnaturalizante (*GuHCl 6M*). Proteínas teñidas con Coomassie Brilliant Blue. Recuadro indica la banda esperada de PD-L1.



Al confirmarse la acumulación de PD-L1 recombinante en los cuerpos de inclusión, se purificó mediante IMAC en condiciones desnaturalizantes (*GuHCl* 6 M), utilizando su etiqueta 6xHis N-terminal. El cromatograma (**Figura 7**) muestra un primer pico durante el lavado (tampón a: acetato de sodio 50 mM, *GuHCl* 6 M, imidazol 10 mM), equivalente a proteínas no unidas o unidas de manera débil a la columna y un segundo pico definido durante la elución con tampón b (imidazol 250 mM), donde la competencia por sitios metálicos liberó PD-L1, recolectándose en fracciones de 5 mL.

**Figura 7** Cromatograma de purificación por IMAC en condiciones desnaturalizantes (*GuHCl* 6M).

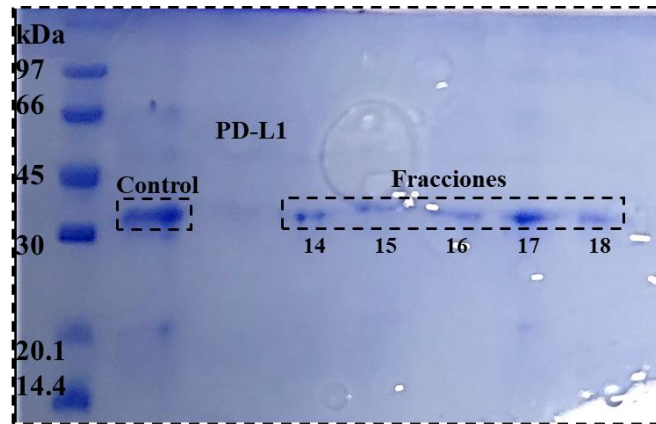
Monitoreado mediante UV-Vis a 280nm y %Tampón B: a) lavado: acetato de sodio 50 mM, *GuHCl* 6 M e Imidazol 10 mM, b) elución: acetato de sodio 50 mM, *GuHCl* 6 M y el imidazol 250 mM en gradiente de 0 a 50% B y c) elución final: acetato de sodio 50 mM, *GuHCl* 6 M y el imidazol 250 mM.



La verificación mediante SDS-PAGE 12% (condiciones reductoras) de las fracciones de elución (14 a 18) identificó bandas dominantes a ~30 kDa (**Figura 8**), consistentes con el peso molecular esperado para PD-L1-DEC. Como control, se incluyó la muestra pre-cromatografía (carril 1), la cual exhibió múltiples bandas contaminantes. En contraste, las fracciones pos-cromatográficas mostraron perfiles de banda mucho más simplificados, confirmando la eliminación eficiente de proteínas no específicas y un aislamiento exitoso de la proteína de interés.

**Figura 8** Análisis por SDS-PAGE 12% de las fracciones de cromatografía en condiciones desnaturalizantes.

Control: CI solubilizados en Tampón desnaturalizante (GuHCl 6M), fracciones 14-18: Pico a 280nm en el cromatograma en la sesión de elución correspondiente a la proteína unida a la columna. Proteínas teñidas con Coomassie Brilliant Blue.



La proteína obtenida mediante cromatografía en condiciones desnaturalizantes fue renaturalizada en un proceso secuencial de sustitución de agentes caotrópicos inicialmente se reemplazó GuHCl 6 M por urea 2 M, de diálisis escalonada con reducciones del 50% en la concentración de urea cada 24 horas. Este riguroso proceso evitó eficientemente la precipitación proteica. Finalmente, PD-L1 en su conformación nativa se purificó con IMAC utilizando tampón *Tris-HCl/NaCl*, con elución mediada por imidazol (**Figura 9A**), colección de las fracciones y su respectiva ultracentrifugación hasta obtener una concentración de 1.3 mg/ml de proteína. En la tabla 1 se presentan los rendimientos por etapa de producción del proceso.

El análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras de la proteína plegada retenida en la columna reveló un patrón de migración más rápido que en condiciones desnaturalizantes, con una banda principal situada a ~28 kDa (**Figura 9B**). Esta movilidad electroforética incrementada coincide con el peso molecular esperado de proteína recombinante PD-L1-DEC sintetizada en este trabajo (27.9 kDa). Este cambio en el patrón de migración podría aludirse a la presencia de  $\beta$ -ME en las muestras de proteína desnaturalizada, el agente reductor forma aductos con los grupos tiol de la proteína recombinante tras romper los puentes disulfuro presentes entre estos, cambiando su peso molecular (Begg and Speicher 1999). Adicional a ello, las condiciones desnaturalizantes

permiten un despliegue completo de la proteína y mayor unión de SDS, aumentando el peso molecular aparente, uniones que en la estructura compacta nativa se ven más limitadas.

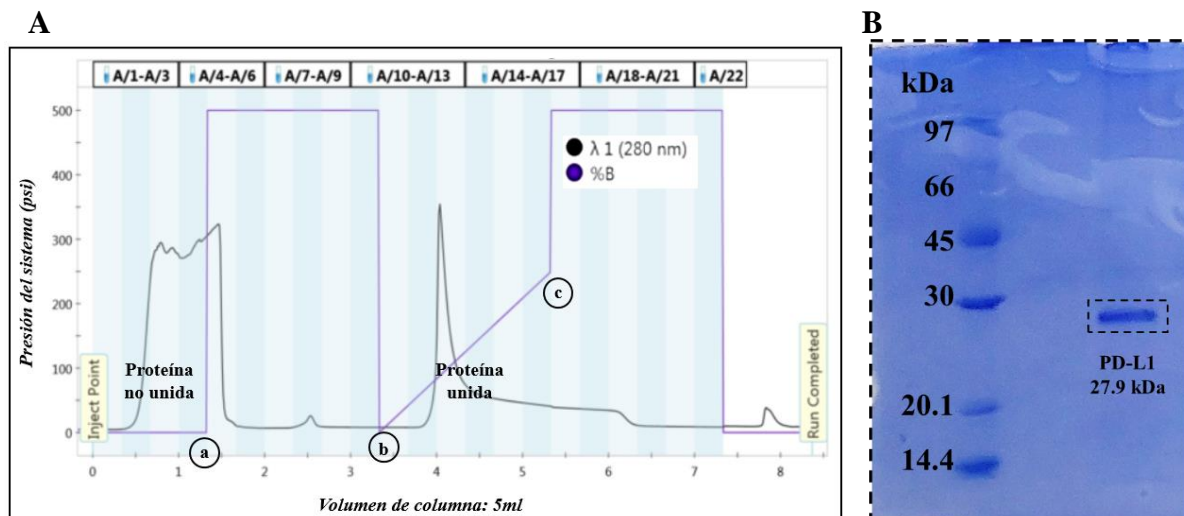
La validación del éxito en la purificación de la proteína recombinante a través de SDS-PAGE utiliza rutinariamente un criterio simple de pureza, a saber, la incapacidad de detectar más de una sola banda de proteína (Mohan 1992), tal y como se presenta en la **Figura 9B**, una única banda bien definida destacando, además, que la etiqueta 6xHis utilizada para la purificación por IMAC ha demostrado una pureza de ~90% o mayor en bioprocesos (Saraswat et al. 2013).

**Tabla 1.** Rendimientos por etapa en la producción de PD-L1 recombinante.

<i>Etapa</i>	<i>Cantidad Total</i>
<i>Cultivo bacteriano</i>	<b>10 L</b>
<i>Curpos de Inclusión (CI)</i>	<b>4 g</b>
<i>Proteína desnaturalizada</i>	<b>100 mg</b>
<i>Proteína renaturalizada</i>	<b>7.8 mg</b>

**Figura 9** Análisis en condiciones de renaturalización de la proteína.

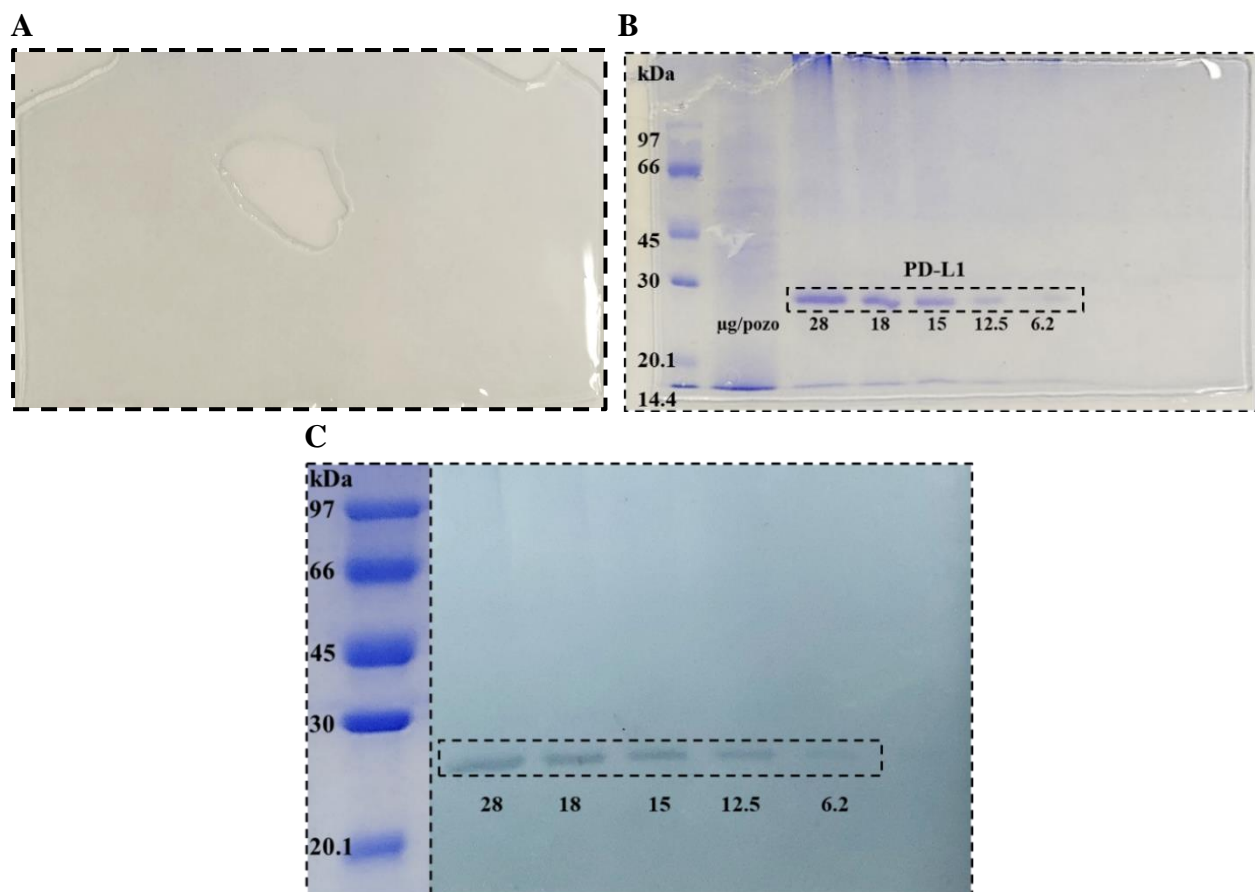
**A)** Cromatograma de purificación por IMAC en condiciones de renaturalización. Monitoreado mediante UV-Vis a 280nm y %Tampón B: a) lavado: Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM e Imidazol 10 mM pH: 8.0, b) elución: Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM e Imidazol 250 mM pH: 8.0 en gradiente 0 a 50% B y c) elución final: Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM e Imidazol 250 mM pH: 8.0. **B)** Análisis por SDS-PAGE 12% condiciones no reductoras de las fracciones de cromatografía de la proteína renaturalizada. Fracción 13: Pico a 280nm en el cromatograma en la sesión de elución correspondiente a la proteína unida a la columna. Proteínas teñidas con Coomassie Brilliant Blue.



Para evaluar la identidad de PD-L1 recombinante, se realizó un ensayo de unión a anticuerpo específico anti-PD-L1 mediante Western Blot. Se utilizaron geles por duplicado de poliacrilamida al 10% con concentraciones seriadas de proteína (**Figura 10B**). El gel de transferencia se tiñó con Coomassie Brilliant Blue (**Figura 10A**), mostrando ausencia de bandas luego de ser desteñido, lo que confirmó una transferencia eficiente a la membrana PVDF de la incubación con anticuerpo primario anti-PD-L1 y secundario anti-ratón-IgG1 conjugado a HRP, la reacción enzimática con TMB produjo un precipitado en bandas específicas de ~28 kDa (**Figura 10C**), demostrando la capacidad de unión de la proteína a su ligando inmunológico.

**Figura 10** Detección de PD-L1 por Western Blot.

**A)** SDS-PAGE 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue (gel duplicado transferido). Recuadro: PD-L1 recombinante en concentraciones decrecientes (28, 18, 15, 12.5, 6.2  $\mu$ g). **B)** SDS-PAGE 10% duplicado no transferido (control de transferencia, teñido con Coomassie). **C)** Membrana PVDF revelada con anticuerpo primario Anti-PD-L1 monoclonal de ratón (1:1000) y secundario Anti-ratón IgG1 (1:5000) conjugado con HRP, detectado por método colorimétrico con TMB.



## 7 Conclusiones

Este trabajo presenta una metodología accesible y eficiente para la producción de PD-L1 humana recombinante a través de su expresión en *E. coli* con purificación por cromatografía de afinidad, logrando una alta pureza y un rendimiento de 7.8%, además de la verificación de su identidad mediante el reconocimiento con un anticuerpo anti-PD-L1 obtenido de manera comercial. La producción local de esta proteína elimina la dependencia de suministros internacionales, reduciendo costos y garantizando disponibilidad inmediata para investigación.

La relevancia biomédica de PD-L1 como regulador clave de los puntos de control inmunitario extiende su utilidad más allá de la oncología, incluyendo enfermedades autoinmunes e inflamatorias. La disponibilidad de este reactivo biológico producido *in situ* proporciona autonomía para la experimentación asociada a desarrollo de métodos para detección temprana, bloqueos inmunoterapéuticos y estudios de interacción.

## Referencias

- Arafat Hossain, Md. 2024. "A Comprehensive Review of Immune Checkpoint Inhibitors for Cancer Treatment." *International Immunopharmacology* 143:113365. doi:10.1016/j.intimp.2024.113365.
- Begg, G., and D. Speicher. 1999. "Mass Spectrometry Detection and Reduction of Disulfide Adducts between Reducing Agents and Recombinant Proteins with Highly Reactive Cysteines." *Journal of Biomolecular Techniques* : JBT 10(1):17–20.
- Bowden, Gregory A., Angel M. Paredes, and George Georgiou. 1991. "Structure and Morphology of Protein Inclusion Bodies in Escherichia Coli." *Bio/Technology* 9(8):725–30. doi:10.1038/nbt0891-725.
- Cossar, J. D., and C. H. Arrowsmith. 2012. "1.3 Efficient Strategies for Production of Eukaryotic Proteins." Pp. 4–33 in *Comprehensive Biophysics*, edited by E. H. Egelman. Amsterdam: Elsevier.
- Doroshov, Deborah Blythe, Sheena Bhalla, Mary Beth Beasley, Lynette M. Sholl, Keith M. Kerr, Sacha Gnjatic, Ignacio I. Wistuba, David L. Rimm, Ming Sound Tsao, and Fred R. Hirsch. 2021. "PD-L1 as a Biomarker of Response to Immune-Checkpoint Inhibitors." *Nature Reviews Clinical Oncology* 18(6):345–62. doi:10.1038/s41571-021-00473-5.
- Gavini, Kartheek, and Kodeeswaran Parameshwaran. 2025. "Western Blot." in *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*.
- İncir, İbrahim, and Özlem Kaplan. 2024. "Escherichia Coli as a Versatile Cell Factory: Advances and Challenges in Recombinant Protein Production." *Protein Expression and Purification* 219:106463. doi:10.1016/j.pep.2024.106463.
- Kumar, D. 2011. "Protein Refolding/Renaturation." Pp. 765–84 in *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier.
- Kumari, Neetu, Mettle Brahma, and Mulaka Maruthi. 2023. "Chapter 6 - Targeting Immune Checkpoints for Cancer Therapy." Pp. 95–134 in *Treatment Landscape of Targeted Therapies in Oncology*, edited by P. K. Maurya and V. Saini. Academic Press.
- Kythreotou, Anthousa, Abdul Siddique, Francesco A. Mauri, Mark Bower, and David J. Pinato. 2018. "Pd-L1." *Journal of Clinical Pathology* 71(3):189–94. doi:10.1136/jclinpath-2017-204853.
- Lin, David Yin-wei, Yoshimasa Tanaka, Masashi Iwasaki, Apostolos G. Gittis, Hua-Poo Su, Bunzo Mikami, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, Nagahiro Minato, and David N. Garboczi. 2008. "The PD-1/PD-L1 Complex Resembles the Antigen-Binding Fv Domains of

- Antibodies and T Cell Receptors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(8):3011–16. doi:10.1073/pnas.0712278105.
- LLC, GSL Biotech. n.d. “pET-28a(+) Sequence and Map.” Retrieved July 27, 2025. [https://www.snapgene.com/plasmids/pet\\_and\\_duet\\_vectors\\_\(novagen\)/pET-28a\(%2B\)](https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-28a(%2B)).
- Manns, Joanne M. 2011. “SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins.” *Current Protocols in Microbiology* 22(1). doi:10.1002/9780471729259.mca03ms22.
- Mohan, Sudesh B. 1992. “Determination of Purity and Yield.” Pp. 307–23 in *Practical Protein Chromatography*, edited by A. Kenney and S. Fowell. Totowa, NJ: Humana Press.
- Patel, Sandip Pravin, and Razelle Kurzrock. 2015. “PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy.” *Molecular Cancer Therapeutics* 14(4):847–56. doi:10.1158/1535-7163.mct-14-0983.
- Rosano, Germán L., and Eduardo A. Ceccarelli. 2014. “Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli*: Advances and Challenges.” *Frontiers in Microbiology* 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00172.
- Saraswat, Mayank, Luca Musante, Alessandra Ravidá, Brian Shortt, Barry Byrne, and Harry Holthofer. 2013. “Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends.” *BioMed Research International* 2013(1):312709. doi:10.1155/2013/312709.
- Singh, Anupam, Vaibhav Upadhyay, Arun Kumar Upadhyay, Surinder Mohan Singh, and Amulya Kumar Panda. 2015. “Protein Recovery from Inclusion Bodies of *Escherichia Coli* Using Mild Solubilization Process.” *Microbial Cell Factories* 14(1):41. doi:10.1186/s12934-015-0222-8.
- Sun, Chong, Riccardo Mezzadra, and Ton N. Schumacher. 2018. “Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint.” *Immunity* 48(3):434–52. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.014.
- Swanton, Charles, Elsa Bernard, Chris Abbosh, Fabrice André, Johan Auwerx, Allan Balmain, Dafna Bar-Sagi, René Bernards, Susan Bullman, James DeGregori, Catherine Elliott, Ayelet Erez, Gerard Evan, Mark A. Febbraio, Andrés Hidalgo, Mariam Jamal-Hanjani, Johanna A. Joyce, Matthew Kaiser, Katja Lamia, Jason W. Locasale, Sherene Loi, Ilaria Malanchi, Miriam Merad, Kathryn Musgrave, Ketan J. Patel, Sergio Quezada, Jennifer A. Wargo, Ashani Weeraratna, Eileen White, Frank Winkler, John N. Wood, Karen H. Vousden, and Douglas Hanahan. 2024. “Embracing Cancer Complexity: Hallmarks of Systemic Disease.” *Cell* 187(7):1589–1616. doi:10.1016/j.cell.2024.02.009.
- Tegel, Hanna, Samuel Tourle, Jenny Ottosson, and Anja Persson. 2010. “Increased Levels of Recombinant Human Proteins with the *Escherichia Coli* Strain Rosetta(DE3).” *Protein Expression and Purification* 69(2):159–67. doi:10.1016/j.pep.2009.08.017.

- Thomson, Christy A., Melanie Olson, Linda M. Jackson, and John W. Schrader. 2012. "A Simplified Method for the Efficient Refolding and Purification of Recombinant Human GM-CSF." *PLOS ONE* 7(11):e49891. doi:10.1371/journal.pone.0049891.
- Tripathi, Nagesh K. 2016. "Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia Coli*." *ChemBioEng Reviews* 3(3):116–33. doi:10.1002/cben.201600002.
- Tsumoto, Kouhei, Daisuke Ejima, Izumi Kumagai, and Tsutomu Arakawa. 2003. "Practical Considerations in Refolding Proteins from Inclusion Bodies." *Protein Expression and Purification* 28(1):1–8. doi:10.1016/s1046-5928(02)00641-1.
- Vectors. 2013. Pp. 277–80 in *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier.
- Yarchoan, Mark, Lee A. Albacker, Alexander C. Hopkins, Meagan Montesion, Karthikeyan Murugesan, Teena T. Vithayathil, Neeha Zaidi, Nilofer S. Azad, Daniel A. Laheru, Garrett M. Frampton, and Elizabeth M. Jaffee. 2019. "PD-L1 Expression and Tumor Mutational Burden Are Independent Biomarkers in Most Cancers." *JCI Insight* 4(6). doi:10.1172/jci.insight.126908.
- Zak, Krzysztof M., Radosław Kitel, Sara Przetocka, Przemysław Golik, Katarzyna Guzik, Bogdan Musielak, Alexander Dömling, Grzegorz Dubin, and Tad A. Holak. 2015. "Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1." *Structure* 23(12):2341–48. doi:10.1016/j.str.2015.09.010.