



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular

**Desarrollo de un anticuerpo de afinidad mejorada contra  
el antígeno HspX con potencial diagnóstico para  
tuberculosis**

Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular

Bryan Alexander Mangui Catota  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2025

Profesor Guía: Frank Camacho  
Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. La tesis fue financiada por ANID BECAS/DOCTORADO NACIONAL 21211186.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Frank Camacho  
Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Ernesto Moreno  
Profesor Co-guía de Tesis  
Universidad de Medellín, Colombia

---

Dr. Oliberto Sánchez  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. David Ramírez  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Pedro Valiente  
Universidad de Toronto, Canadá  
Evaluador externo

---

Dra. Raquel Montesinos  
Directora del Programa Doctorado en Biotecnología Molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Fisiopatología de la Tuberculosis</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Situación epidemiológica global, regional y local</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Diagnóstico de la tuberculosis</b> .....	<b>20</b>
3.1. Métodos serológicos para el diagnóstico de la tuberculosis .....	24
3.1.1. Un nuevo enfoque: detección de antígenos .....	26
<b>4. Anticuerpos: un componente clave para el desarrollo de pruebas serológicas</b> .....	<b>29</b>
4.1. Estructura de un anticuerpo .....	30
4.2. Maduración <i>in-vitro</i> de anticuerpos .....	31
4.2.1. Mutaciones puntuales .....	32
4.2.2. Chain shuffling .....	33
4.2.3. CDR walking .....	34
4.2.4. Mutagénesis por saturación .....	35
4.2.5. Mutagénesis sitio dirigida empleando TPDF .....	35
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
<b>1. Hipótesis</b> .....	<b>40</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>41</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>1. Materiales</b> .....	<b>42</b>
1.1. Cepas bacterianas .....	42
1.2. Bacteriófago.....	42
1.3. Oligonucleótidos .....	43
1.4. Plásmidos .....	44
1.5. Medios de cultivo .....	44
1.6. Antibióticos .....	45
1.7. Líneas celulares.....	45
1.8. Reactivos y soluciones de cultivo celular.....	45
1.9. Proteínas .....	46
<b>1.10. Reactivos y soluciones generales.</b> .....	<b>46</b>
1.10.1. Soluciones para extracción y purificación de ADN plasmidial.....	46
1.10.2. Electroforesis de ADN. ....	47
1.10.3. Electroforesis de proteínas. ....	47

1.10.4.	Western blot.....	48
1.10.5.	Cromatografía.....	48
1.10.6.	Selección por TPDF.....	48
1.10.7.	Inmunoensayos.....	49
1.10.8.	Kits comerciales.....	49
1.10.9.	Equipos.....	49
<b>2.</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>51</b>
<b>2.1.</b>	<b>Técnicas generales de análisis y manipulación de ADN.....</b>	<b>51</b>
2.1.1.	Electroforesis en gel de agarosa.....	51
2.1.2.	Purificación de ADN escala mini preparativa.....	51
2.1.3.	Purificación de ADN desde gel de agarosa.....	51
2.1.4.	Digestión analítica de ADN plasmídico.....	52
<b>2.2.</b>	<b>Técnicas generales de análisis y manipulación de proteínas.....</b>	<b>52</b>
2.2.1.	Preparación de geles de poliacrilamida.....	52
2.2.2.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).....	52
2.2.3.	Western Blot.....	53
2.2.4.	Concentración y diafiltración de muestras de proteínas.....	53
2.2.5.	Cuantificación de proteínas totales.....	54
<b>2.4.</b>	<b>Obtención de HspX recombinante.....</b>	<b>55</b>
2.4.1.	Producción de HspX recombinante.....	55
2.4.2.	Purificación de HspX recombinante.....	55
<b>2.5.</b>	<b>Obtención del anticuerpo monoclonal Tb HspX.....</b>	<b>56</b>
2.5.1.	Producción del anticuerpo.....	56
<b>2.6.</b>	<b>Producción del fragmento scFv HspX.....</b>	<b>56</b>
<b>2.7.</b>	<b>Mutagénesis sitio-dirigida utilizando TPDF.....</b>	<b>57</b>
2.7.1.	Procedimientos generales.....	57
2.7.1.1.	Producción del fago filamentoso KM13.....	57
2.7.1.2.	Precipitación de fagos.....	58
2.7.1.3.	Determinación del título viral.....	58
2.7.2.	Diseño y construcción de las bibliotecas de mutantes scFv HspX.....	59
2.7.2.1.	Diversificación de las regiones CDR.....	59
2.7.2.2.	Obtención de ADN de simple cadena uridinado (dU-ssDNA).....	60
2.7.2.3.	Síntesis del heterodúplex de doble cadena.....	60
2.7.2.4.	Preparación de bacterias <i>E. coli</i> TG1-KM13.....	62
2.7.2.5.	Generación de las bibliotecas de mutantes scFv HspX.....	62
2.7.3.	Selección de mutantes scFv HspX con afinidad mejorada.....	63
2.7.3.1.	Identificación de mutantes scFv HspX con afinidad mejorada.....	65
2.7.3.2.	Estimación de la afinidad mediante ELISA.....	66
2.7.4.	Mapeo de epítomos del antígeno HspX.....	67
<b>2.8.</b>	<b>Análisis de secuenciación de nueva generación.....</b>	<b>69</b>
<b>2.9.</b>	<b>Análisis matemáticos y estadísticos.....</b>	<b>70</b>
<b>2.10.</b>	<b>Creación y análisis de imágenes.....</b>	<b>70</b>

<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>Objetivo Específico 1: Obtener y caracterizar un fragmento scFv a partir del anticuerpo Tb HspX. ....</b>	<b>71</b>
1.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante HspX .....	71
1.2. Producción del anticuerpo monoclonal Tb HspX.....	74
1.3. Generación del fragmento scFv HspX .....	75
<b>Objetivo específico 2. Generar una biblioteca de mutantes de fragmentos scFv mediante la técnica de presentación de proteínas sobre fagos filamentosos.....</b>	<b>78</b>
2.1. Modelamiento informático del fragmento scFv .....	78
2.2. Diversificación de las regiones CDR del fragmento scFv HspX. ....	84
<b>Objetivo específico 3: Obtener un fragmento scFv de afinidad mejorada por el antígeno HspX de Mycobacterium tuberculosis. ....</b>	<b>87</b>
3.1. Selección de anticuerpos con afinidad mejorada. ....	87
3.2. Análisis de secuenciación profunda post-selección. ....	92
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>98</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>107</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>109</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes .....	52
Tabla 2. Fosforilación de oligonucleótidos mutagénicos. ....	61
Tabla 3. Hibridación del oligonucleótido mutagénico.....	61
Tabla 4. Síntesis del heterodúplex CCC-dsDNA. ....	62
Tabla 5. Medición de la afinidad de las variantes scFv.....	91
Tabla 6. Resumen estadístico del ajuste del modelo. ....	92
Tabla 7. Resumen de los datos de secuenciación profunda de las bibliotecas post-selección.....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patogénesis de la tuberculosis. ....	14
Figura 2. Representación esquemática del granuloma. ....	17
Figura 3. Estructura de un anticuerpo. ....	31
Figura 4. Proceso de selección utilizando TPDF. ....	38
Figura 5. Análisis de restricción del vector pET15b HSPX. ....	72
Figura 6. Expresión de HspX recombinante. ....	73
Figura 7. Purificación de HspX recombinante. ....	73
Figura 8. Análisis de pureza de HspX recombinante. ....	74
Figura 9. Purificación del anticuerpo Tb HspX. ....	75
Figura 10. Análisis de restricción del plásmido pHEN-1 scFv HspX. ....	76
Figura 11. Unión específica del bacteriófago scFv HspX. ....	77
Figura 12. Expresión recombinante del fragmento scFv HspX. ....	77
Figura 13. Modelación del anticuerpo scFv HspX. ....	79
Figura 14. Evaluación de la calidad estructural del modelo scFv predicho por AlphaFold2. .....	81
Figura 15. Modelación del antígeno HspX de MTB. ....	82
Figura 16. Mapeo de epítomos del antígeno HspX de M. tuberculosis. ....	83
Figura 17. Visualización estructural de residuos aminoácidos para el diseño de bibliotecas. .....	85
Figura 18. Distribución de frecuencias de mutaciones en una biblioteca construida con mutagénesis parsimoniosa. ....	86
Figura 19. Selección de variantes del anticuerpo scFv HspX de afinidad mejorada. ....	88
Figura 20. High-throughput ELISA para estimar las afinidades de las variantes scFv. ....	89
Figura 21. Estimación de las afinidad de las variantes scFv HspX. ....	90
Figura 22. Análisis de secuenciación profunda post-selección. ....	95
Figura 23. Mapa de calor de los valores Z-score de los aminoácidos. ....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

BCA: ácido bicinconínico.

BSA: albúmina de suero bovino.

CDR: Complementary determinant region.

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

Fab: *antigen binding fragment*.

FDA: *Food Drug Administration*.

HspX: Heat shock protein X.

IC50: concentración inhibitoria del 50%.

IFL: inmunoensayo de flujo lateral.

IMAC: Cromatografía de Afinidad a Iones Metálicos.

KD: Constante de disociación.

LB: Medio Luria Bertani.

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPD: o-Fenilendiamina.

p/v: peso/volumen.

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

PEG: Polietilenglicol.

PM: mutagénesis parsimoniosa.

PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo.

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones.

PSA: Persulfato de Amonio.

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

scFv: *single chain variable fragment*.

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio.

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*.

TB: tuberculosis.

TBS: Tampón Tris Salino.

TPFF: Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos.

TST: *tuberculin skin test*.

VH: variable heavy chain (cadena variable pesada).

VHH: *heavy chain antibody*.

VL: variable light chain (cadena variable ligera).

v/v: volumen/volumen.

## RESUMEN

La tuberculosis es la segunda causa de muerte debido a enfermedades infecciosas a nivel mundial. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en promedio cada año se reportan 10 millones de nuevos casos y 1.3 millones de decesos. La creciente carga sanitaria mundial de la tuberculosis se ve agravada por el alarmante incremento del número de personas infectadas con VIH y de cepas multirresistentes a antibióticos. El mejor pronóstico de la tuberculosis se obtiene con el diagnóstico temprano de la infección, no obstante, los métodos diagnósticos habitualmente empleados (microscópicos, microbiológicos y moleculares) presentan importantes limitaciones: sensibilidad y especificidad variables, diagnóstico subóptimo y, un gran consumo de tiempo y recursos.

En el presente trabajo se mejoró la afinidad de un anticuerpo dirigido contra el antígeno HspX derivado de MTB mediante mutagénesis parsimoniosa. Para ello, se seleccionaron posiciones candidatas a mutagénesis de las regiones CDR basándose en el modelado estructural del anticuerpo. Se introdujeron mutaciones en dieciocho posiciones dentro de cada CDR objetivo utilizando la estrategia de mutagénesis parsimoniosa. Posteriormente, se generaron bibliotecas de variantes scFv mediante el método de Kunkel. Tras varias rondas de selección, se analizaron las potenciales variantes con afinidad mejorada, evaluando sus secuencias de CDR y sustituciones de aminoácidos. Este enfoque permitió identificar ocho variantes que aumentaron la afinidad del anticuerpo. La variante más prometedora exhibió un valor IC<sub>50</sub> de 38 nM y tenía dos sustituciones: Lys<sup>50</sup> y Glu<sup>50</sup>, dentro del CDR-H2, que reflejaron un aumento de 28,14 veces en la afinidad de unión con respecto al anticuerpo original.

Estos hallazgos brindan información valiosa sobre la ingeniería de anticuerpos y podrían contribuir al desarrollo de ensayos diagnósticos más sensibles y confiables para la tuberculosis.

## ABSTRACT

Tuberculosis is the second leading cause of death due to infectious diseases worldwide. According to the World Health Organization (WHO), an average of 10 million new cases and 1.3 million deaths are reported each year. The global health burden of TB is further exacerbated by the rising number of HIV-infected individuals and the increasing prevalence of multidrug-resistant (*M. tuberculosis*) strains. Early diagnosis is crucial for improving TB prognosis; however, conventional diagnostic methods—including microscopic, microbiological, and molecular techniques—have significant limitations, such as variable sensitivity and specificity, suboptimal diagnostic accuracy, and high time and resource demands.

In the present work, the affinity of an antibody targeting *Mycobacterium tuberculosis*-derived HspX antigen was improved by parsimonious mutagenesis. Candidate positions for mutagenesis within the complementarity-determining regions (CDRs) were identified based on structural modeling of the antibody. Mutations were introduced at eighteen positions within each target CDR using the parsimonious mutagenesis approach, followed by the generation of scFv variant libraries via the Kunkel method. After multiple rounds of selection, potential variants with improved affinity were analyzed by evaluating their CDR sequences and amino acid substitutions. This approach allowed the identification of eight variants with increased binding affinity. The most promising variant exhibited an IC<sub>50</sub> value of 38 nM and contained two key substitutions: Lys<sup>50</sup> and Glu<sup>50</sup>, within CDR-H2, resulting in a 28.14-fold increase in binding affinity compared to the original antibody.

These findings provide valuable insights into antibody engineering and may contribute to the development of more sensitive and reliable diagnostic assays for tuberculosis.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Fisiopatología de la Tuberculosis

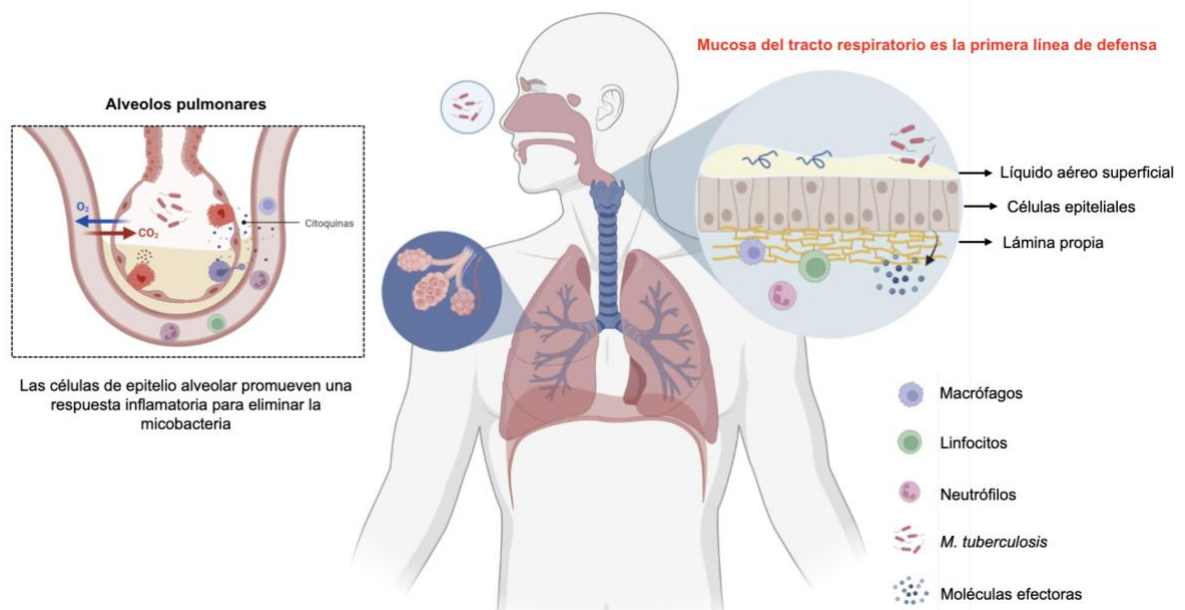
La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que afecta comúnmente a los pulmones (tuberculosis pulmonar); no obstante, en ciertas ocasiones, la micobacteria puede diseminarse a través del torrente sanguíneo y afectar distintos órganos como los riñones, el hígado, el corazón, el cerebro, entre otros (tuberculosis extrapulmonar) (Hasnain et al., 2019). MTB es una bacteria grampositiva de crecimiento lento con un tiempo de duplicación de 12-24 horas en condiciones óptimas. A diferencia de la mayoría de las bacterias grampositivas, MTB posee una membrana externa (similar a las bacterias gramnegativas) que consiste en una bicapa lipídica asimétrica formada por ácidos micólicos, glicolípidos y componentes cerosos. La membrana externa e interna forman un espacio periplásmico que contiene una fina capa de peptidoglicanos unidos mediante enlace covalente al arabinogalactano y lipoarabinomanano (Hasnain et al., 2019; Sakamoto, 2012). Esta particular estructura proporciona una barrera impermeable a los compuestos nocivos y fármacos, resistencia a la desecación y desempeña un papel fundamental en la virulencia. MTB es particularmente eficaz para evadir la respuesta inmune del hospedero, siendo una de las razones de su prevalencia a lo largo de los años y su difícil erradicación (Delogu et al., 2013).

La principal ruta de entrada del patógeno son las vías aéreas superiores. Cuando MTB es inhalado por la nariz o boca, se desplaza a través de la tráquea, bronquios y bronquiolos, hasta alcanzar los alvéolos pulmonares (Figura 1). A lo largo del trayecto, la mucosa respiratoria es la primera línea de defensa contra el patógeno. La mucosa está conformada por una capa de células epiteliales que forman una barrera que previene la entrada de la micobacteria, una capa de tejido conectivo que contiene células inmunes (linfocitos, neutrófilos, macrófagos)

denominada lámina propia y, una capa de una sustancia compleja constituida por moco, inmunoglobulinas A y una variedad de moléculas asociadas a la inmunidad innata conocida como líquido aéreo superficial (ALS por sus siglas en inglés) (Nicod, 2005). Las células epiteliales reconocen los distintos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en MTB a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Esta interacción promueve la secreción de citoquinas y moléculas efectoras que reclutan y activan a las células fagocíticas (Li et al., 2012). Adicionalmente, las células epiteliales regulan la composición del ALS mediante la secreción de péptidos antimicrobianos, tales como la  $\beta$ -defensina 2 y catelicidina (LL-37) (Harriff et al., 2014; Rivas-Santiago et al., 2008; Rivas-Santiago et al., 2005). Si la mucosa respiratoria falla en la contención y eliminación de MTB, esta se alberga en los alvéolos pulmonares. Los alvéolos están constituidos por un fino revestimiento de células epiteliales de tipo I y II, así como por otras células inmunes como macrófagos alveolares, células dendríticas y neutrófilos (Nicod, 2005). Las células tipo II secretan el líquido surfactante pulmonar que contiene péptidos antimicrobianos, enzimas hidrolasas, colectinas, entre otros, que regulan el tráfico intracelular de MTB, promueven la fagocitosis e inducen una respuesta inflamatoria frente a la infección (Arcos et al., 2011; Ferguson et al., 2002; Gaynor et al., 1995; Rivas-Santiago et al., 2005).

Los macrófagos alveolares poseen una extensa maquinaria para eliminar patógenos microbianos. Estas células fagocíticas están equipadas con una gama completa de receptores tipo Toll (TLR) y otros PRRs que inducen una respuesta inflamatoria contra la micobacteria (Nicod, 2005). La estimulación de estos receptores promueve la activación del macrófago que deriva en el aumento de la actividad microbicida a través de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de los componentes del complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) (Forman & Torres, 2002). Adicionalmente, el macrófago activado potencia su maquinaria de presentación,

convirtiéndose en una potente célula presentadora de antígenos. Las principales funciones del macrófago dependen de la actividad del fagosoma (Nicod, 2005).



**Figura 1. Patogénesis de la tuberculosis.**

La principal ruta de entrada del patógeno son las vías aéreas superiores. Cuando la micobacteria es inhalada por la nariz o boca, se desplaza a través de la tráquea, bronquios y bronquiolos, hasta alcanzar los alvéolos pulmonares. La mucosa respiratoria es la primera línea de defensa contra el patógeno y está conformada por una capa de células epiteliales que forman una barrera que previene la entrada de la micobacteria, una capa de tejido conectivo que contiene células inmunes (lámina propia) y, una capa de una sustancia compleja constituida por moco, inmunoglobulinas A y una variedad de moléculas asociadas a la inmunidad innata conocida (líquido aéreo superficial). Si la mucosa respiratoria falla en la contención y eliminación del patógeno, esta se alberga en los alvéolos pulmonares. Los macrófagos alveolares son los principales responsables de la eliminación del patógeno. Estas células fagocíticas están equipadas con una gama completa de receptores que inducen una respuesta inflamatoria contra la micobacteria. Figura creada en Biorender.

El fagosoma es un compartimento que encierra las partículas fagocitadas y actúa como sitio para la degradación de material particulado (principalmente cuerpos apoptóticos), eliminación de bacterias y generación de péptidos para el proceso de presentación de antígenos. Para la gran mayoría de microorganismos

patógenos, la internalización y exposición al entorno del fagosoma es suficiente para provocar su eliminación, no obstante, MTB ha desarrollado mecanismos que le permiten residir en el fagosoma, evitando su maduración y acidificación, y restringiendo el suministro de enzimas hidrolasas y péptidos antimicrobianos hacia el compartimiento (Abramovitch et al., 2011; Sullivan et al., 2012).

Cuando la micobacteria comienza a replicarse activamente en los macrófagos alveolares se difunde a las células cercanas alcanzando en pocas semanas de crecimiento una alta carga bacteriana. A partir de entonces, las células dendríticas maduran y presentan antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I y MHC-II) a los linfocitos T localizados en los ganglios linfáticos circundantes, estimulando así la respuesta inmune adaptativa. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos peptídicos derivados del fagosoma de células infectadas y son claves para el control inicial de la infección. La respuesta TCD4<sup>+</sup> involucra la diferenciación de los linfocitos hacia el subtipo TH1, y por consiguiente, la producción de citocinas proinflamatorias, IFN- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que reclutan una variedad de células inflamatorias y estimulan la actividad antimicrobiana de los macrófagos. El rol de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ha sido ampliamente evidenciado en pacientes con VIH infectados con MTB, quienes presentan altas tasas de mortalidad y reincidencia de la enfermedad (Bell & Noursadeghi, 2018; Jasenosky et al., 2015).

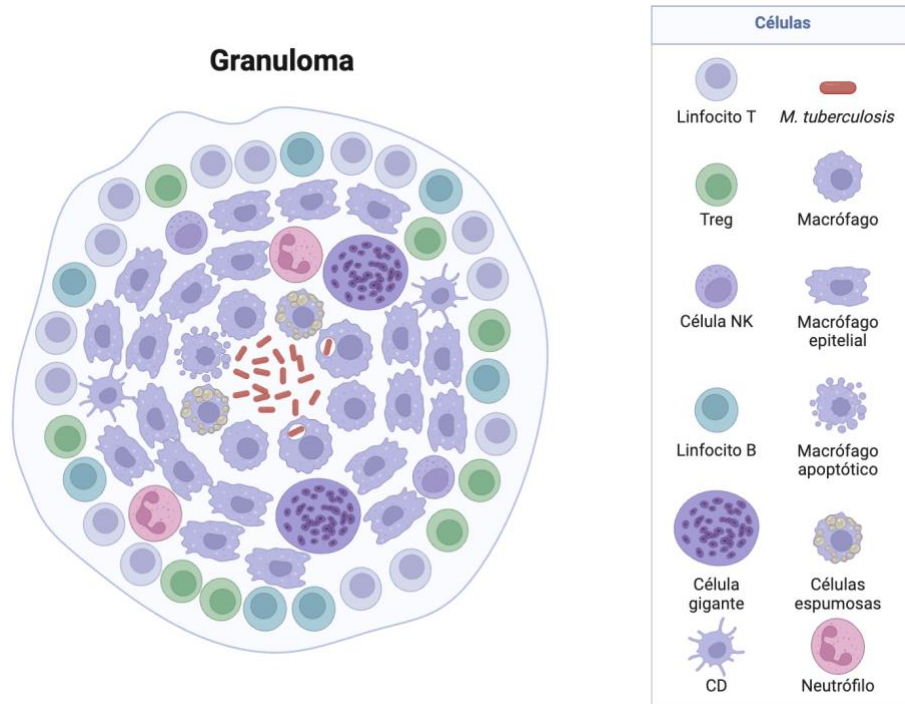
A diferencia de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la contribución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> al control de la infección parece ser mínima. Estudios en modelos murinos han evidenciado una deficiente protección asociada a los linfocitos CD8<sup>+</sup>. Tras la inmunización con el péptido TB10.3, un antígeno inmunodominante frecuentemente identificado en paciente infectados con MTB, se obtuvo una respuesta robusta de linfocitos CD8<sup>+</sup>, sin embargo, al ser desafiados contra la infección, los ratones no estaban protegidos (Lindenstrøm et al., 2014). De manera similar, la inmunización con el péptido TB10.4 estimuló el desarrollo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria

específicos, no obstante, los linfocitos exhibían un reconocimiento deficiente de los macrófagos infectados, en consecuencia, los ratones no estaban protegidos frente al desafío contra MTB. Sorpresivamente, los macrófagos infectados con MTB inactivada por radiación fueron reconocidos por los linfocitos T CD8+ específicos para TB10.4, sugiriendo la posibilidad de que la micobacteria activa inhibe la presentación de antígenos por la vía MHC-I (Yang et al., 2018).

Con respecto a la inmunidad humoral, las células B pueden actuar como células presentadoras de antígenos, modular las respuestas de las células T y generar anticuerpos capaces de neutralizar MTB. Agregados de células B en pulmones infectados con MTB se han correlacionado con la reducción de la carga bacteriana y una mejoría en el progreso de la enfermedad (Dutt et al., 2022; Phuah et al., 2012). Estudios han demostrado que los anticuerpos aumentan la captación por parte de los macrófagos y la eliminación intracelular de la micobacteria a través de vías mediadas por receptores Fc (Lu et al., 2016; Zimmermann et al., 2016). Además, los anticuerpos IgA e IgG específicos contra MTB contribuye a la inmunidad de las mucosas y a la eliminación de la micobacteria en modelos experimentales (Ishida et al., 2024).

Tras el desarrollo de la inmunidad adaptativa, se establece un mecanismo complejo y bien coordinado entre la inmunidad innata y adaptativa que confina a MTB dentro un granuloma. Los granulomas se definen como agregados de células inmunitarias que producen diversas citoquinas para limitar la propagación de la micobacteria (de Martino et al., 2014; Reece & Kaufmann, 2012). La formación del granuloma comienza cuando los macrófagos infectados producen citoquinas que conducen a la activación de linfocitos T CD4+, que a su vez producen citoquinas proinflamatorias, como INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Loxton, 2019). Este mecanismo se desarrolla en al menos el 90% de los sujetos infectados y conduce hacia la fase latente de la enfermedad. Durante la TB latente, que se describiría mejor como fase de no replicación-persistencia, el sujeto suele ser positivo a la prueba cutánea de la

tuberculina y al IGRA. La TB latente se vuelve activa cuando se desarrolla un estado de inmunodepresión. En esta fase, el sujeto puede llegar a ser capaz de transmitir la infección porque el granuloma se abre en la luz bronquial y la micobacteria es expulsada al toser (Jasmer et al., 2002; Russell, 2007).



**Figura 2. Representación esquemática del granuloma.**

Un granuloma es una estructura organizada del sistema inmunológico que se forma en los tejidos infectados para contener y controlar la propagación de *M. tuberculosis*. Se desarrolla como una respuesta del sistema inmune a la bacteria, encapsulándola para evitar que se disemine por el organismo. Entre las células que conforman el granuloma están: macrófagos activados, células gigantes multinucleadas, linfocitos, células espumosas, entre otras células inmunes. Figura creada en Biorender.

## 2. Situación epidemiológica global, regional y local

La tuberculosis es la segunda causa muerte por enfermedades infecciosas a nivel mundial. En promedio, cada año se reportan 10.8 millones de nuevos casos y 1.25 millones de decesos. La creciente carga sanitaria mundial de la tuberculosis se ve agravada por el alarmante aumento del número de personas infectadas con

VIH y la aparición de cepas multirresistentes a antibióticos ((OMS), 2024). El mejor pronóstico para la tuberculosis se obtiene con el diagnóstico temprano de la infección y el tratamiento inmediato adecuado, sin embargo, los métodos de diagnóstico comúnmente empleados presentan varias limitaciones: sensibilidad y especificidad variables, un diagnóstico subóptimo y, un gran consumo de recursos y tiempo. De igual manera, los pacientes que han superado el tratamiento tienen un alto riesgo de contraer nuevamente la infección, lo que acentúa la necesidad de desarrollar tratamientos más eficaces ((OMS), 2024; Rabahi et al., 2017). Por otra parte, la vacuna BCG, la única vacuna contra la tuberculosis autorizada para su uso a nivel mundial falla en prevenir la forma más común de la enfermedad: la tuberculosis pulmonar. Este hecho resalta la urgencia de la invención de nuevas herramientas para la producción de candidatos vacunales (Schragger et al., 2020).

Frente a esta problemática, en el año 2015, la Organización Mundial de la Salud presentó el programa *End TB Strategy* que buscaba cumplir con tres objetivos para el año 2025: reducir el número de muertes por tuberculosis en un 75%, reducir la tasa de incidencia de tuberculosis en un 50% y alcanzar un porcentaje del 0% de familias afectadas por tuberculosis que enfrentan costos catastróficos debidos a la enfermedad ((OMS), 2016). La estrategia se sustentaba en tres pilares estratégicos: i) atención y prevención, ii) políticas audaces y sistemas de apoyo y, iii) la intensificación de la investigación y la innovación; no obstante, con base a los últimos reportes de la enfermedad, la situación es desalentadora. En 2023, la región de las Américas mostró la cifra de casos más alta desde que la OMS tiene registros de la región. En promedio, se reportaron 342,000 casos, lo que significó un incremento de 6.6% en comparación con el año previo y al comparar con la tasa del 2015 (línea de base estrategia Fin a la TB), el incremento fue del 20%. El 80% de los casos se concentran en ocho países, con tasas que van entre los 58 y 173 casos por 100,000 habitantes. Los decesos disminuyeron un 5.4% comparado al año previo; no obstante, al comparar con la línea de base del 2015, se produjo un incremento del 44%. Los datos indican que a este ritmo no se logrará

dar cumplimiento a los objetivos para 2025 ((OPS), 2024). Del mismo modo, la pandemia ocasionada por el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV2) tuvo un impacto negativo en el control de la tuberculosis. Durante la infección por MTB, las citocinas limitan la propagación y crecimiento de la bacteria, derivando hacia un estado latente, en consecuencia, una posterior infección por SARS-CoV2 podría provocar la reactivación de MTB. Por otra parte, la coinfección entre SARS-CoV2 y MTB podría aumentar la severidad y mortalidad de la enfermedad. No menos importante, las similitudes de la sintomatología clínica, tales como: tos, fiebre, dificultad respiratoria, lesiones pulmonares, entorpecen el diagnóstico de la tuberculosis, favoreciendo su propagación (Ahmad, 2011; Gao et al., 2021; Guan et al., 2020; Visca et al., 2021).

Dentro de este panorama, Chile se presenta como un país de baja prevalencia de la tuberculosis, en gran parte, gracias a la planificación implementada en la Estrategia Nacional de Salud y a las labores realizadas por el Programa de Control y Eliminación de la tuberculosis del Ministerio de Salud (PROCET) (Herrera & Farga, 2015). El PROCET tenía como meta disminuir la tasa de incidencia a 5 por cada 100000 habitantes y, de esta manera, eliminar la tuberculosis como problema de salud pública para el año 2020; sin embargo, a pesar de los avances logrados, estos resultaron ser insuficientes para dar cumplimiento a las metas planteadas. Según el último informe del ministerio de Salud, en el año 2021, la tasa de incidencia de tuberculosis fue de 13,3 casos por 100000 habitantes, lo cual representó un aumento de 7,3% respecto al año anterior. Es importante destacar que en el contexto de la pandemia COVID-19 se produjo una marcada disminución de las actividades de pesquisa de tuberculosis, lo cual ha repercutió directamente en el número de casos diagnosticados (Escobar & Peña, 2022).

Entre los distintos casos de tuberculosis, la tuberculosis pulmonar con bacteriología positiva tiene especial relevancia dado que se trata de personas

infectadas con alta probabilidad de transmitir la enfermedad. Durante la última década, la evolución de la tasa de incidencia de tuberculosis pulmonar con bacteriología positiva ha mostrado una tendencia al aumento, llegando a un máximo de 11.6 casos por 100000 habitantes en el año 2019. Inesperadamente, para el 2020, la tasa de incidencia disminuyó drásticamente a 9 por 100000 habitantes motivo de la pandemia mundial. No obstante, este hecho solo es un indicador de la disminución severa de las actividades de localización de casos, reflejada en una caída del 70% en el número de muestras procesadas para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. En el año 2021, el 79,4% de los casos de tuberculosis corresponden a formas pulmonares y 20,6% a extrapulmonares. Esto representa un aumento de 0,9 puntos en la tasa de incidencia de casos pulmonares con respecto al año anterior (Escobar & Peña, 2022; Kim et al., 2024).

El aumento en la incidencia de tuberculosis pulmonar evidencia la persistencia de las fuentes de infección en las distintas comunas del país. En enero de 2022 entró en vigor la nueva norma técnica del PROCET, la cual refuerza estrategias dirigidas a mejorar focalización de la pesquisa de tuberculosis pulmonar mediante el uso de pruebas diagnósticas de mayor rendimiento (Escobar & Peña, 2023).

### **3. Diagnóstico de la tuberculosis**

La situación epidemiológica evidencia la necesidad de fomentar estrategias dirigidas a detectar oportunamente los casos de tuberculosis en las distintas regiones del país. El principal reto consiste en innovar los métodos diagnósticos y que estos se encuentren disponibles en los centros de atención de nivel primario (Escobar & Peña, 2023). En la práctica clínica, el diagnóstico de la tuberculosis representa un desafío, y en ocasiones, esta suele confundirse con otras infecciones del tracto respiratorio como la neumonía, retrasando así la detección de la bacteria y por ende el tratamiento oportuno. Al presente, se han desarrollado diversos métodos de diagnóstico basados en técnicas microbiológicas, bioquímicas,

químicas y moleculares que han facilitado la detección de MTB y el reconocimiento de pacientes infectados, no obstante, estos presentan ciertas limitaciones durante su utilización en la práctica rutinaria (Lange & Mori, 2010; Small & Pai, 2010).

El método primario para la detección de MTB es la microscopía directa de frotis de esputo. La tinción mediante el método de Ziehl-Neelsen permite la identificación de MTB como bacilos largos, curvados y en cadena, y su diferenciación de micobacterias no tuberculosas. La técnica es rápida, simple, de bajo costo y proporciona resultados en pocas horas; no obstante, la sensibilidad es baja, en extremo variable (20-60%) y su rendimiento depende de la carga bacteriana y las condiciones de operación. Adicionalmente, la sensibilidad de la técnica es aún menor en pacientes menores a 12 años e inmunocomprometidos (Caulfield & Wengenack, 2016; Singhal & Myneedu, 2015). Por estos motivos, el cultivo de la micobacteria es necesario para la confirmación del diagnóstico inicial. El cultivo bacteriano es el método *gold standard* para la identificación de MTB. Generalmente, el cultivo se realiza en medio sólido de Lowenstein-Jensen (L-J) constituido por proteína de huevo, harina de patata, sales y glicerol. El cultivo en medio L-J permite el crecimiento selectivo de MTB y provee resultados entre 4 a 8 semanas; no obstante, en el 10 a 20% de los casos identificados como positivos mediante microscopía, la micobacteria no puede ser cultivada (Andersen et al., 2000; Caulfield & Wengenack, 2016). De igual modo, el tiempo de espera requerido para la confirmación del diagnóstico retrasa la aplicación del tratamiento adecuado. Con la finalidad de mejorar el rendimiento del método y disminuir el tiempo de cultivo se han desarrollado sistemas automatizados utilizando medios líquidos. Al presente, existen tres sistemas comerciales aprobados por la FDA: BACTEC MGIT 960, VersaTREK y MB/BacT Alert 3D (Adler et al., 2005; Cruciani et al., 2004; Falconi et al., 2008). La utilización de un medio líquido disminuye significativamente el tiempo de cultivo (2-4 semanas) e incrementa el rendimiento debido al gran número de muestras que pueden ser procesadas simultáneamente. A pesar de esto, la probabilidad de contaminación es mayor cuando se emplea medio líquido,

por ende, se requiere de personal capacitado y laboratorios con la infraestructura adecuada, además, el elevado coste de los equipos requeridos limita su aplicación (Martínez et al., 2014; Rodrigues et al., 2009; Yuksel et al., 2011).

La implementación de técnicas moleculares para la detección de MTB representa un gran avance en el diagnóstico. En la actualidad, existen varias tecnologías aplicadas en laboratorios de diagnóstico clínico, tales como: amplificación de ácidos nucleicos (Barrett et al., 2002; Chen et al., 2015; Lee et al., 2013), hibridación de sondas (Morgan et al., 2005; Tortoli et al., 2010), genotipado (Raveendran et al., 2012) y espectroscopia de masas (Buckwalter et al., 2016; Khéchine et al., 2011). Las técnicas moleculares presentan varios beneficios frente a los métodos convencionales: menor tiempo de detección, alta sensibilidad y especificidad (los valores oscilan entre 85-100% y 95-100%, respectivamente) y rápida identificación de mutaciones de MTB asociadas a la resistencia a fármacos de primera línea (rifampicina, isoniazida, etambutol, pirazinamida) (Drobniewski et al., 2003; Morgan et al., 2005; Raveendran et al., 2012). A pesar de las evidentes ventajas, las técnicas moleculares presentan ciertas limitaciones. Algunas tecnologías no han sido aprobadas por la FDA; hoy en día, solamente 8 ensayos basados en la amplificación e hibridación de ácidos nucleicos son reconocidos por este organismo. Por otra parte, estas tecnologías resultan ser de gran utilidad para los casos positivos identificados mediante microscopía donde se requiere la confirmación del diagnóstico; mientras que, en los casos negativos, la sensibilidad del ensayo disminuye y solo se sugiere su utilización cuando la sospecha de infección por tuberculosis es alta basada en la historia clínica del paciente (FDA, 2021; Ginocchio, 2011). No menos importante, la mayoría de estas tecnologías han sido desarrolladas para su empleo en clínicas y laboratorios especializados, lo que implica un costo elevado y, por ende, dificulta su empleo para el diagnóstico temprano de la tuberculosis en establecimientos de atención primaria (Singh et al., 2019).

La prueba cutánea de tuberculina (TST por sus siglas en inglés), desarrollada por Mantoux en 1930, es una de las pruebas más antiguas empleada en el diagnóstico clínico, en particular, para la identificación de pacientes con LTBI (Robin et al., 1993). La TST se basa en la respuesta inmunitaria mediada por células frente a la inoculación intradérmica de tuberculina PPD, una mezcla cruda de más de 200 proteínas de MTB. A pesar de su amplia utilización, la TST posee una baja especificidad (falsos positivos debido a la vacunación previa con BCG o a la exposición previa a micobacterias ambientales) y una baja sensibilidad (falsos negativos sobre todo en niños e individuos inmunodeprimidos) (Brock et al., 2004). Además, la TST no diferencia entre la fase activa y latente de la enfermedad, por lo que se precisa de estudios microbiológicos, radiológicos y moleculares adicionales para establecer el diagnóstico (Shingadia & Novelli, 2008; Tissot et al., 2005). Posteriormente, se desarrolló el ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA por sus siglas en inglés) que consiste en la detección de la respuesta inmune celular, específicamente de células T frente a antígenos de MTB: ESAT-6, CFP-10 y TB-7.7, que están ausentes en gran parte de micobacterias no tuberculosas y el bacilo de Calmette-Guérin (Diel et al., 2009). El ensayo ha sido utilizado como una alternativa factible a la tradicional prueba de tuberculina, principalmente en países desarrollados, siendo especialmente útil para el diagnóstico de la infección latente, pero con limitada precisión en la identificación de la infección activa (tuberculosis pulmonar) (Lee, 2015; Pinto et al., 2011). La especificidad del ensayo es muy baja en pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar debido a la variabilidad en la cobertura poblacional de los antígenos de MTB, por este motivo, no resulta apropiado su empleo en países pobres y en vías de desarrollo, donde la prevalencia de la enfermedad es elevada (Pai et al., 2006). Con respecto a los aspectos operacionales, los costes de reactivos son altos, y en general, para su ejecución se requiere de laboratorios con infraestructura adecuada y personal capacitado, restringiendo su implementación en centros de atención con recursos limitados (Chen et al., 2011; Sester et al., 2010).

Dentro de este contexto, los principales métodos utilizados en Chile para la detección de MTB son la microscopía de frotis de esputo y el cultivo bacteriano. Para el cultivo se utiliza la técnica de Petroff modificada en conjunto con la siembra en medio a base de proteína de huevo. La resistencia a fármacos de primera línea se evalúa mediante la tecnología de hibridación en tiras con sondas LPAs (Escobar Salinas, 2021). Otros métodos complementarios, como la amplificación de ácidos nucleicos, secuenciación genómica y genotipificación son utilizados para casos clínicos individuales especiales, por lo tanto, si bien la adquisición de estas tecnologías es promovida por el PROCET, deben ser financiadas por el servicio de salud correspondiente. De momento, la incidencia de la tuberculosis pulmonar en Chile está en aumento como consecuencia del deterioro de las actividades enfocadas al diagnóstico temprano de casos en los centros de atención de nivel primario (Kim et al., 2024). Este hecho evidencia las limitaciones de los métodos utilizados y expone la imperante necesidad del desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico.

### **3.1. Métodos serológicos para el diagnóstico de la tuberculosis**

Durante los últimos años, el interés por el desarrollo de una prueba diagnóstica basada en técnicas serológicas se ha intensificado (Burbelo et al., 2015; Shete et al., 2017; Sun et al., 2021). Las pruebas serológicas se presentan como una alternativa atractiva puesto que son rápidas, de bajos costos de producción en comparación con las técnicas moleculares y, no requieren de personal capacitado o infraestructura especializada para su ejecución (Vainionpää et al., 2015). Estas características son deseables para su uso en establecimientos de salud de nivel primario, donde en ocasiones, los recursos para el diagnóstico son limitados. Al presente, existen varias pruebas serológicas comerciales, sin embargo, ninguna directriz internacional recomienda su empleo para la detección de MTB, incluso la Organización Mundial de la Salud desestima su utilización (Grenier et al., 2012). Distintas revisiones sistemáticas focalizadas en la precisión

diagnóstica de las pruebas serológicas comerciales señalan que los datos publicados generan estimaciones inconsistentes e imprecisas de la sensibilidad y la especificidad. Los estudios mostraron una considerable heterogeneidad con valores de sensibilidad que oscilaban del 0% al 100% y valores de especificidad entre 31% y 100%. Asimismo, cuando el análisis se restringió a los estudios realizados en países de ingresos bajos y medios, la sensibilidad (del 16% al 91%) y la especificidad (del 31% al 100%) fueron en extremo variables (Dinnes et al., 2007; Steingart et al., 2009; Steingart et al., 2011; Karen R. Steingart et al., 2007; Karen R Steingart et al., 2007; Steingart et al., 2012).

Basándose en estos estudios, la OMS declaró que la evidencia existente es insuficiente para asegurar que las pruebas serológicas disponibles actualmente optimicen el diagnóstico de tuberculosis. Asimismo, el organismo advirtió que las altas proporciones de resultados falsos positivos y falsos negativos atentan contra la seguridad del paciente, por ende, los riesgos superan en gran medida cualquier posible beneficio ((OMS), 2011). Pese a esto, en muchas partes del mundo estas pruebas son ampliamente comercializadas. De acuerdo con un estudio reciente, las pruebas serológicas son utilizadas en países con alta incidencia de tuberculosis como Afganistán, Bangladesh, Brasil, Cambodia, China, Etiopía, India, Indonesia, Kenia, Pakistán, Rusia, Filipinas, Sudáfrica, entre otros (Grenier et al., 2012). En ninguno de estos países existen políticas que regulen su comercialización y son utilizadas principalmente en el sector privado como fundamento para iniciar el tratamiento de la tuberculosis. En particular, India es el país que mayor cantidad de pruebas serológicas realiza con un promedio de 1.5 millones anuales. El inmunoensayo enzimático Pathozyme® Myco IgG, IgA e IgM desarrollado por *Omega Diagnostics* es empleado comúnmente en la India, no obstante, se ha demostrado que su rendimiento para el diagnóstico de la tuberculosis es deficiente. Los valores de sensibilidad del ensayo para IgM, IgA e IgG están por debajo del 50% (IgM 48.7%, IgA 25.7%, IgG 24.4%) mientras que el valor máximo de especificidad apenas alcanza el 80% (IgM 71.5%, IgA 80.5%, IgG 76.6%) (Singh et

al., 2012). Otras pruebas empleadas son *MycoDot* (*Mossman Associates, Millford, MA, EE.UU.*), ICT TB (*ICT Diagnostics, Sydney, NSW, Australia*), SD Rapid TB (*SD Bio Standard Diagnostics, Gurgaon, India*), TB IgG, IgM, IgA (*J. Mitra & Co., Delhi, India*), y Anda TB (*Anda Biologicals, Estrasburgo, Francia*) (Dowdy et al., 2011; Grenier et al., 2012; Singh & Katoch, 2011; Steingart et al., 2012). A pesar de estas limitaciones, las pruebas serológicas seguirán siendo una alternativa atractiva para el diagnóstico de la tuberculosis.

### **3.1.1. Un nuevo enfoque: detección de antígenos**

En los últimos años, numerosas investigaciones se han enfocado en identificar nuevos antígenos que permitan diseñar ensayos con la sensibilidad y especificidad adecuadas para el diagnóstico. Brus *et al* identificó cuatro antígenos derivados de enzimas lipolíticas: LipY, Rv0183, Rv1984c y Rv3452, que mostraron altos niveles de especificidad (rango: 93,9-97.5%) y de sensibilidad (rango: 73.4-90.5%) al ser empleados en un ensayo ELISA (Brust et al., 2011). De manera similar, Jones *et al* utilizó una combinación de antígenos sintéticos derivados de lípidos naturales provenientes de MTB que contenían cadenas de ácidos micólicos (principalmente mono y dimicolatos). Utilizando un solo antígeno, la sensibilidad y especificidad del ensayo fueron del 85% y 88% respectivamente; esto aumentó al 96% y 95% mediante una combinación estadística de los resultados con siete antígenos. Paralelamente, en un estudio ciego para evaluar su valor diagnóstico, la sensibilidad y especificidad fueron del 87% y 83% empleando un solo antígeno (Jones et al., 2017). En un estudio reciente, Ireton *et al* identificó que el 90% de pacientes con tuberculosis pulmonar generaba anticuerpos contra 6 proteínas de MTB: Rv0831, Rv2031, Rv2032, Rv2875, Rv0934, and Rv3874 (Ireton et al., 2010). En especial, RV2031 (o conocida también como HspX) pertenece a la familia de proteínas DosR que regulan el estado de latencia de MTB durante la infección.

HspX es una chaperona independiente de ATP que forma un complejo oligómero y desempeña una función protectora al impedir la agregación de

proteínas desnaturalizadas, además, HspX también contribuye en el plegamiento de proteínas junto con otras chaperonas. Estas funciones son importantes para la supervivencia de MTB dentro de los macrófagos durante el proceso infeccioso. La expresión de HspX aumenta significativamente durante la transición hacia la fase estacionaria de crecimiento y representa uno de los principales antígenos sintetizados al final de la fase logarítmica (Kumari et al., 2017; Sherman et al., 2001; Siddiqui et al., 2011; Stewart et al., 2005). HspX ha mostrado un alto potencial inmunogénico y augura ser un candidato propicio para la detección de MTB, además de un prometedor candidato vacunal (Lew et al., 2020; Sergeeva et al., 2021; Yousefi-Avarvand et al., 2018; Yuan et al., 2015). La presencia del antígeno HspX durante el proceso infeccioso de MTB es un marcador clave de la enfermedad. Varios epítomos de la proteína HspX provocan una potente activación de las células T y B específicas en modelos animales (Garton et al., 2008; Lew et al., 2020). Trilling *et al* identificaron un repertorio de anticuerpos monoclonales mediante la inmunización de llamas con lisados bacterianos de MTB inactivada. Los anticuerpos obtenidos fueron específicos para MTB y reconocían exclusivamente la proteína HspX, constatando su inmunodominancia frente a otros antígenos de MTB (Trilling et al., 2011). Posteriormente, Srivastava *et al* determinó la afinidad del repertorio por HspX mediante resonancia de plasmones superficiales. Dentro del repertorio, dos anticuerpos exhibieron una mayor constante de asociación: BF-10,  $K_d = 4 \times 10^{-8}$  M y A-23,  $K_d = 2,4 \times 10^{-9}$  M (Srivastava et al., 2013). Por otra parte, Peláez *et al* diseñaron un inmunoensayo basado en un biosensor para la detección directa y cuantificación de HspX. El método se fundamentaba en el uso de anticuerpos monoclonales altamente específicos. El dispositivo mostró un límite de detección de 0.63 ng/mL y un límite de cuantificación de 2,12 ng/mL. El análisis de muestras de esputo reveló diferencias significativas en la concentración de HspX en pacientes con tuberculosis en su fase activa (con niveles de concentración entre 116-175 ng/mL) en comparación con los pacientes no infectados (valores por debajo del límite de detección del ensayo) (Peláez et al., 2020). Recientemente, se

ha propuesto la detección de HspX a partir de exosomas sanguíneos como potencial biomarcador para el diagnóstico (Huang et al., 2021).

Dentro de las pruebas serológicas, el inmunoensayo de flujo lateral (IFL) es ampliamente utilizado en distintos campos debido a su simplicidad, rapidez y practicidad. Al presente, se han desarrollado un gran número de IFL aplicados a la detección de bacterias patógenas y virus, tales como: *E. coli* O157:H7, Hepatitis B, VIH, *Brucella*, *Vibrio anguillarum*, entre otros; incluso de moléculas de naturaleza biológica o química (Corstjens et al., 2011; Liu et al., 2015; Parpia et al., 2010; Shen et al., 2015; Xia et al., 2013; Zhang et al., 2014; Zhao et al., 2014). Para el diagnóstico de la tuberculosis, el IFL se presenta como una prometedora herramienta para la detección *in-situ*, rápida, de bajo costo, que no requiere de instrumentación sofisticada, de manera que su implementación resultaría rentable en establecimientos de salud con recursos limitados. Distintos grupos de investigación han desarrollado pruebas serológicas para la identificación de MTB basados en antígenos distintos a HspX. El kit SD *Bioline* TB Ag MPT64 permite la identificación de la proteína MPT64 en cultivos líquidos de la micobacteria. El ensayo ha demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad, no obstante, se han reportado casos de falsos positivos frente a *Mycobacterium marinum* y *Staphylococcus aureus*, además de falsos negativos en mutantes de la proteína MPT64. Del mismo modo, el cultivo líquido de la micobacteria como paso previo a la detección presenta una limitación para su aplicación (Chikamatsu et al., 2014; Oriquiriza et al., 2017). Otros antígenos: MTB38, CFP10, ESAT6, han mostrado resultados promisorios para la detección de MTB, sin embargo, requieren de investigaciones posteriores para comprobar su sensibilidad y especificidad con muestras de pacientes que reflejen adecuadamente la infección por tuberculosis (Ariffin et al., 2020; Mdluli et al., 2014). Actualmente, solo una prueba IFL basa en la detección del antígeno lipoarabinomano (LAM) en orina ha sido aprobada por la OMS para el diagnóstico de la tuberculosis en su fase activa. La prueba tiene una sensibilidad subóptima para el diagnóstico en pacientes no

inmunocomprometidos, no obstante, ha mostrado una mayor sensibilidad en pacientes coinfectados con VIH, siendo más alta en pacientes con recuentos bajos de linfocitos CD4+.

#### **4. Anticuerpos: un componente clave para el desarrollo de pruebas serológicas**

El desarrollo de una prueba serológica requiere de anticuerpos altamente específicos y con una alta afinidad por el antígeno de interés. Un anticuerpo específico garantiza la ausencia de reacciones cruzadas con antígenos diferentes al objetivo, productos metabólicos estrechamente relacionados o proteínas homólogas. Por otra parte, la afinidad de un anticuerpo determina la concentración más baja del antígeno que puede ser detectada (límite de detección), por ende, afecta directamente a la sensibilidad del ensayo. Habitualmente, la utilización de anticuerpos monoclonales permite desarrollar pruebas diagnósticas con un rango de detección entre 0.01 ng – 0.1 ng. Esta fluctuación depende principalmente de las características particulares de la interacción anticuerpo-antígeno (Brown, 2009).

Amiruddin *et al* diseñó un prototipo de inmunoensayo de flujo lateral (IFL) para la detección de HspX. El prototipo utilizaba un anticuerpo monoclonal murino para la captura del antígeno y un conjugado del mismo anticuerpo con nanopartículas de oro (AuNP) para la detección. La sensibilidad analítica mostró que el prototipo era capaz de detectar hasta 125 ng/mL de antígeno purificado, no obstante, se requieren evaluaciones adicionales con cultivos microbiológicos y muestras clínicas de diferentes fluidos corporales como orina, esputo y suero para determinar su viabilidad para la aplicación clínica (Mohd Amiruddin et al., 2020). Por otro lado, el análisis de muestras de esputo utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a aptámeros (ALISA) para la identificación de pacientes con tuberculosis en su fase activa reveló que la concentración de HspX está en un rango de 13 pM (~0,01 ng/mL) a 648 nM (~500 ng/mL) (Lavania et al., 2018). De manera similar, el análisis de muestra serológicas utilizando un sistema Luminex xMAP® bead-

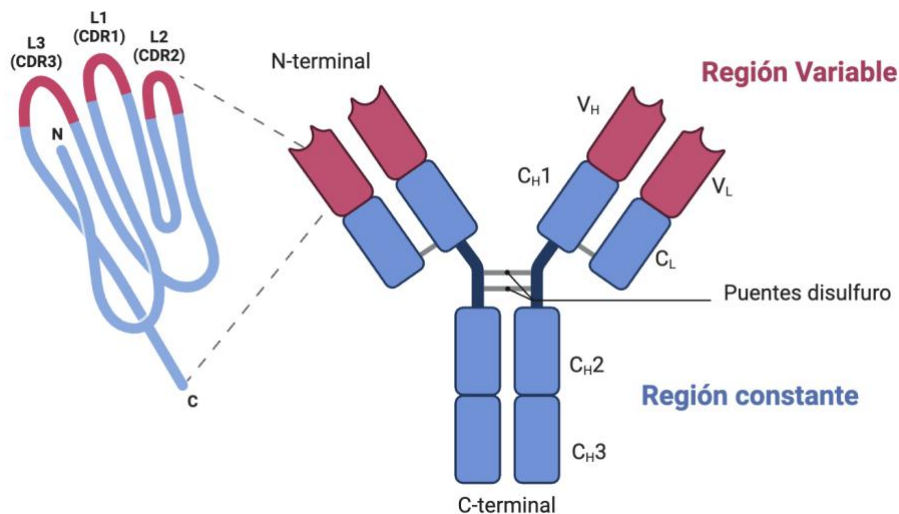
capture ELISA indicó que la concentración promedio de HspX es de 860 pg/mL en pacientes con LTBI y 40 pg/mL en pacientes con tuberculosis en su fase activa (Castro-Garza et al., 2017). La evidencia científica respalda su valor diagnóstico y potencial uso en la práctica clínica. Además, los bajos niveles de concentración de HspX (pg/mL) en muestras biológicas hace necesario el uso de anticuerpos de alta afinidad para el diagnóstico.

#### **4.1. Estructura de un anticuerpo**

Los anticuerpos son glicoproteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La estructura de un anticuerpo consiste en dos cadenas polipeptídicas pesadas y dos cadenas ligeras que poseen un dominio amino terminal variable (NH<sub>2</sub>) y un dominio carboxilo constante (COOH). Los dominios variables son los responsables del reconocimiento del antígeno mientras que los dominios constantes determinan sus funciones efectoras. El dominio variable puede ser fraccionado en tres regiones de secuencias aminoacídicas hipervariables denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) y cuatro regiones con secuencias aminoacídicas relativamente constantes nombradas regiones *framework* (Abbas, 2012).

El sitio de unión al antígeno (parátipo) está conformado por los aminoácidos procedentes de los tres CDR de la cadena pesada y los tres CDR de la cadena ligera que debido a su alta variabilidad permiten que los anticuerpos puedan reconocer una gran variedad de antígenos. Estructuralmente, el plegado de los dominios variables conecta las regiones hipervariables, formando así el parátipo, que se apoya en una estructura formado por láminas beta que son los elementos básicos de los dominios característicos de las inmunoglobulinas (Stave & Lindpaintner, 2013). El análisis tridimensional del parátipo ha reflejado que solamente el 20-33% de los residuos aminoacídicos que conforman los CDRs intervienen activamente en el reconocimiento de antígeno, especialmente los residuos de las regiones CDR3 (Padlan et al., 1995; Peng et al., 2014). Además, se

ha demostrado que cinco de las seis regiones hipervariables adoptan un número limitado de conformaciones y, solamente, la región CDR3 de la cadena pesada muestra una marcada variabilidad conformacional (Mitchell & Colwell, 2018; Stave & Lindpaintner, 2013). Por otra parte, se ha observado que el parátopo está enriquecido en residuos aromáticos como: fenilalanina, triptófano y tirosina, siendo este último el más importante (Robin et al., 2014; Weitzner et al., 2015).



**Figura 3. Estructura de un anticuerpo.**

La estructura de un anticuerpo consiste en dos cadenas polipeptídicas pesadas (V<sub>H</sub>) y dos cadenas ligeras (V<sub>L</sub>) que poseen un dominio amino terminal variable y un dominio carboxilo constante. Dentro del dominio variable se encuentran tres regiones de secuencias aminoacídicas hipervariables denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) que son los responsables del reconocimiento del antígeno. Figura creada en Biorender.

#### 4.2. Maduración *in-vitro* de anticuerpos

Durante la respuesta inmune adaptativa, los anticuerpos son sometidos a un proceso conocido como maduración de la afinidad, en el cual sus regiones variables experimentan un mecanismo conocido como hipermutación somática (HSM) y se

seleccionan en función de su interacción con un antígeno específico. Este proceso permite distinguir entre anticuerpos de alta y baja afinidad mediante selección clonal, favoreciendo aquellas inmunoglobulinas que exhiben una menor tasa de disociación (Gitlin et al., 2014; Jacobs & Bross, 2001). Sucesivas rondas de inmunización dan lugar a anticuerpos con afinidades que oscilan entre niveles micromolar y nanomolar (Batista & Neuberger, 1998; Poulsen et al., 2011). Sin embargo, ciertas aplicaciones requieren anticuerpos con afinidades aún mayores. La maduración *in-vitro* busca replicar este proceso mediante la generación de bibliotecas de anticuerpos con diversidad en sus secuencias y la posterior selección de clones con mejores características, como mayor afinidad o estabilidad estructural (Li et al., 2023; Tabasinezhad et al., 2019). La combinación de metodologías para la expresión heteróloga de proteínas, que permiten la producción de fragmentos funcionales de anticuerpos, con técnicas de mutagénesis, posibilita el desarrollo de anticuerpos personalizados. No obstante, dada la naturaleza aleatoria de este enfoque, la mutagénesis *in-vitro* puede introducir cambios que pueden afectar la estabilidad del anticuerpo, lo que representa un desafío que debe ser abordado (Teixeira et al., 2022).

#### **4.2.1. Mutaciones puntuales**

Este enfoque busca introducir mutaciones aleatorias en un número reducido de aminoácidos de manera progresiva en cada nueva variante generada durante el proceso de mutagénesis del anticuerpo. La tasa de mutación debe ser suficientemente alta para generar distintas alternativas estructurales, pero sin excederse, para evitar análisis complejos de clones en los que mutaciones con efectos positivos y negativos puedan compensarse entre sí (Julian et al., 2017). Las mutaciones suelen limitarse a las regiones CDR, ya que estas secuencias contribuyen a la conformación de la mayoría de los paratopos, en lugar de distribuirse a lo largo de toda la secuencia del anticuerpo con el riesgo de afectar su estabilidad (Mondon et al., 2007; Peng et al., 2022). No obstante, se ha demostrado

experimentalmente que ciertas mutaciones en regiones estructurales pueden resultar beneficiosas. Por ejemplo, la incorporación progresivamente de mutaciones puntuales aleatorias en las cadenas VH y VL aumentó 250 veces la afinidad de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) por el estradiol-17 $\beta$  con respecto al anticuerpo parental ( $K_a$ :  $1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) (Oyama et al., 2013). De manera similar, la afinidad del anticuerpo AFB1 se incrementó más de 20 veces combinando mutaciones puntuales en las regiones *framework* FR2, FR4 y en el CDR3 de la cadena VH (Pang et al., 2022).

Dado que la región CDR3 suele ser el principal objetivo de mutagénesis durante el proceso de maduración de la afinidad, esta estrategia sigue reduciendo drásticamente el número de variantes potenciales y la carga de trabajo posterior, a pesar de que su secuencia es normalmente larga (Douthwaite et al., 2015; Yan et al., 2014). Además, existe una tendencia a focalizar las mutaciones en los “puntos calientes de unión” del anticuerpo, donde los métodos computacionales han resultado útiles en su identificación (Kiguchi et al., 2021; Myung et al., 2020).

#### **4.2.2. Chain shuffling**

Este método es utilizado para diversificar ligandos recombinantes derivados de anticuerpos convencionales. Una de las dos cadenas del anticuerpo se sustituye por una biblioteca de variantes, mientras que la otra se mantiene constante. Esta estrategia ha sido empleada para generar anticuerpo de alta afinidad a partir de material genético obtenido de animales inmunizados con un antígeno específico y ha demostrado su eficacia en la optimización de fragmentos scFv como de fragmentos Fab. La aplicación de esta técnica ha permitido aislar mutantes de fragmentos scFv contra las Arginasa 2 que exhibían un aumento de 58 veces en su afinidad. De manera similar, un fragmento Fab mostró una afinidad 8 veces mayor por la cobratoxina en comparación con el fragmento parental.

Otra técnica relacionada es el DNA *shuffling*, que implica la generación de bibliotecas de fragmentos de ADN aleatorios a partir de fragmentos de secuencias

de anticuerpos previamente seleccionadas que luego se reensamblan en secuencias completas (Liu et al., 2012; Stemmer, 1994). Aunque esta técnica no se utiliza habitualmente para la maduración de la afinidad de anticuerpos, su combinación con el *chain shuffling* ha resultado efectiva, ya que introduce mutaciones distribuidas uniformemente a lo largo de toda la secuencia del anticuerpo (Bowers et al., 2014; Thom et al., 2006). Harmsen *et al* utilizó esta estrategia para mejorar las características de un fragmento de anticuerpo de dominio único (VHH) de llama, obteniendo un mutante con una estabilidad 3 veces mayor y una afinidad 10 veces superior (Harmsen et al., 2006). Este mismo enfoque permitió la generación de un mutante scFv contra el SARS-COV con una constante de disociación 270 veces inferior al parental y, mejorar significativamente la afinidad de un anticuerpo IgM contra el péptido liberado de pro-grastina (Fermér et al., 2004; Rani et al., 2012).

#### **4.2.3. CDR walking**

Es un método iterativo para introducir mutaciones de manera exclusiva en las regiones CDR del anticuerpo. Generalmente, se generan y combinan diferentes sub-bibliotecas antes de someterlas a un proceso de selección. A continuación, el mejor anticuerpo obtenido tras la maduración de una región CDR se utiliza como referencia para la optimización de las demás regiones (Barderas et al., 2008; Wark & Hudson, 2006). La modificación del CDR-H1 y CDR-H2 tras un paso preliminar de mutagénesis del CDR-H3 permitió mejorar 167 veces la afinidad del anticuerpo neutralizante BAK1 (Thom et al., 2006). Este método resulta más rápido y eficiente cuando la optimización se realiza en paralelo en ambos dominios del fragmento scFv. Steid *et al* aplicaron esta estrategia diversificando simultáneamente el CDR-L3 y CDR-H2 para obtener un mutante con una afinidad 5000 veces superior en comparación con el fragmento Fab parental (Steidl et al., 2008). De manera similar, esta aproximación consiguió aumentar 420 veces la afinidad de un fragmento Fab por la proteína de la envoltura del VIH-1 gp120 (Yang et al., 1995).

#### 4.2.4. Mutagénesis por saturación

La mutagénesis por saturación es un enfoque semirracional que implica la mutación sistemática de todos los aminoácidos de una región corta de un gen. La técnica consiste en sustituir un codón o conjuntos de codones por todos los aminoácidos posibles, con el fin de explorar exhaustivamente todas las posibles variantes. Entre las metodologías más utilizadas para ejecutar esta técnica se encuentran la mutagénesis en casete (Forloni et al., 2019), la amplificación por PCR (Dong et al., 2020), *gene splicing* por extensión solapada (Doucet et al., 2004) y la amplificación mutagénica de plásmidos (Geddie & Matsumura, 2004). Puede considerarse una extensión del enfoque de mutaciones puntuales utilizado cuando se dispone información previa de los aminoácidos con potencial mutagénico. Sin embargo, dado que esta información puede ser imprecisa, la mutagénesis por saturación puede proporcionar resultados engañosos (Bhasin & Varadarajan, 2021).

Este método es más adecuado para una secuencia *target* corta, ya que cuando se aplica a más regiones simultáneamente genera un número exponencial de variantes, lo que dificulta la realización de los análisis experimentales posteriores. Este inconveniente puede reducirse utilizando herramientas bioinformáticas para eliminar clones claramente defectuosos de las bibliotecas de mutantes (Bhasin & Varadarajan, 2021; Gray et al., 2017). La mutagénesis por saturación ha demostrado su eficacia en la optimización de anticuerpos. Por ejemplo, se logró reducir la susceptibilidad a la degradación proteolítica en un anticuerpo inhibidor de MMP-14, y se incrementó 10 veces la afinidad de un nanoanticuerpo dirigido contra la toxina A de *Clostridium difficile* (Lee et al., 2019; Lowden et al., 2022).

#### 4.2.5. Mutagénesis sitio dirigida empleando TPFF

La mutagénesis sitio dirigida es una de las estrategias más utilizadas para el análisis funcional y estructural de modificaciones específicas en proteínas (Dubey

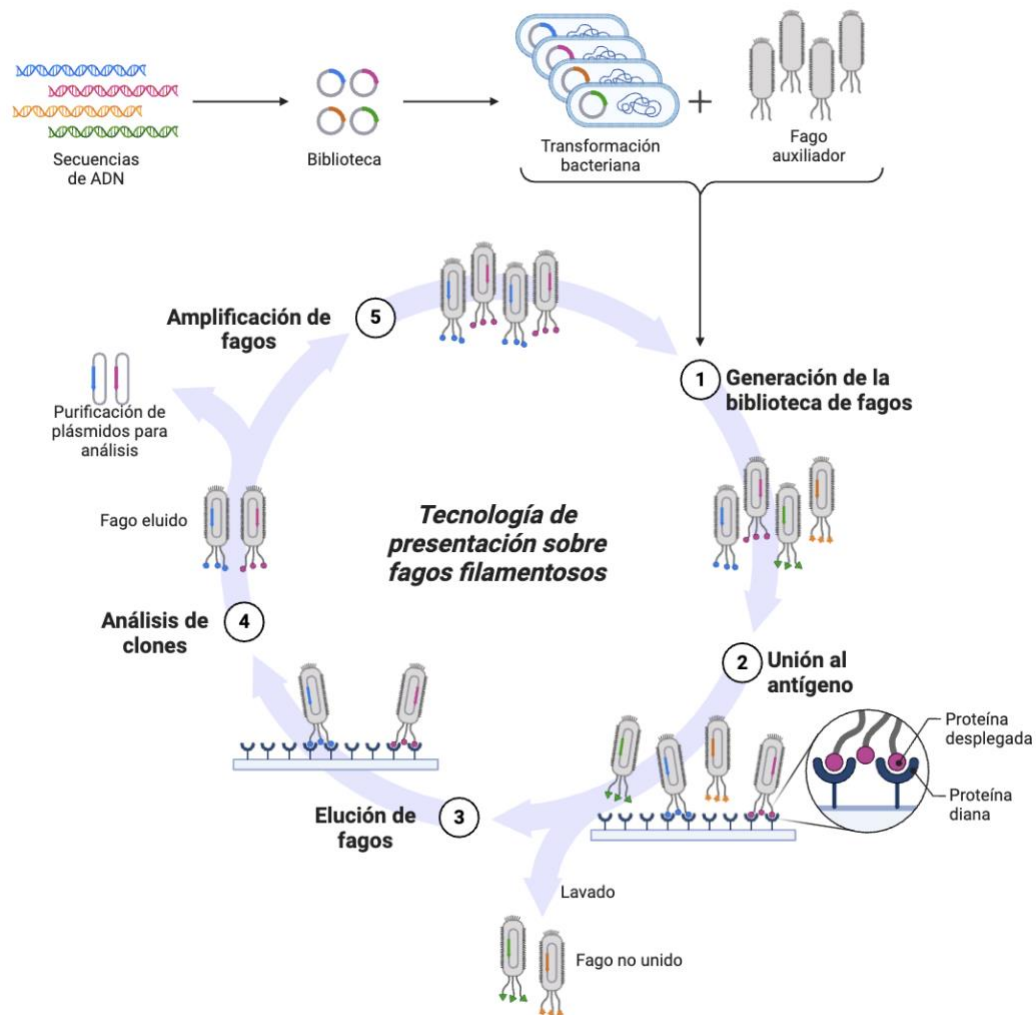
et al., 2019). Entre las diversas técnicas disponibles para su ejecución destaca Los métodos basados en la utilización de fagos filamentosos. La TPDF es una técnica de selección *in vitro* que permite aislar rápidamente proteínas con las propiedades deseadas, como una mayor afinidad, especificidad, estabilidad o una nueva actividad enzimática. La TPDF consiste en manipular genéticamente los bacteriófagos para que puedan expresar péptidos o anticuerpos en su superficie (Smith & Petrenko, 1997). Su principal ventaja se basa en la vinculación fenotipo a genotipo de la proteína de interés que se expresa en la superficie del bacteriófago con el ADN codificador empaquetado dentro de la partícula de fago, lo que permite el enriquecimiento selectivo de la proteína de interés. Al tratarse de un método *in vitro*, las condiciones de selección de unión pueden controlarse estrictamente. Además, debido a su rapidez y facilidad de uso, la TPDF es una excelente plataforma para la ingeniería de anticuerpos o proteínas con propiedades mejoradas (Frei & Lai, 2016; Marintcheva, 2018).

En un protocolo estándar, una gran variedad de moléculas de anticuerpos mutadas artificialmente es expresada como fragmentos scFv o como fragmentos Fab fusionados a la proteína de cubierta del fago filamentosos. El elevado número de fagos producidos por la infección de *E. coli* es analizado sobre el antígeno de interés inmovilizado en fase sólida para seleccionar los fagos que despliegan los anticuerpos de mayor afinidad (Chowdhury & Pastan, 1999; Li et al., 2014). Dado que los genes que codifican los anticuerpos de mayor afinidad están empaquetados en los fagos seleccionados, estos pueden clonarse fácilmente y el fragmento de anticuerpo puede expresarse en mayor cantidad (Hentrich et al., 2018). La diversificación de los genes del anticuerpo puede lograrse mediante mutagénesis aleatoria en las cadenas VH y VL utilizando PCR propensa a errores o cepas bacterianas con alta de tasa de mutación (Irving et al., 1996; Low et al., 1996; Martineau, 2002). No obstante, ciertas mutaciones disruptivas en las regiones *framework* pueden afectar significativamente la afinidad y estabilidad del anticuerpo. Para mitigar este problema, es más eficaz dirigir las modificaciones

hacia las regiones CDR, donde se concentra la mayor parte de la interacción con el antígeno. A pesar de esto, la mutagénesis de saturación, capaz de generar todas las combinaciones posibles de los veinte aminoácidos naturales en más de ocho posiciones, suele requerir bibliotecas que superan  $1 \times 10^{12}$  variantes, lo que resulta inviable debido a las limitaciones en la eficiencia de transformación (Chen et al., 1999; Nur et al., 2024).

Los datos de cristalografía de rayos X, junto con cálculos energéticos, sugieren que sólo una pequeña fracción de la superficie de contacto entre el anticuerpo y el antígeno contribuye significativamente a la afinidad (Webster et al., 1994). En muchos casos, la superficie de interacción incluye contactos repulsivos que pueden incurrir en costes energéticos de varias kcal. Por lo tanto, la afinidad de los anticuerpos podría mejorarse sustituyendo los contactos de baja afinidad o repulsivos por interacciones de alta afinidad, preservado al mismo tiempo los contactos esenciales responsables de la mayor parte de la energía de unión (Chiu et al., 2019; Padlan et al., 1989; Sheriff et al., 1987).

La mutagénesis parsimoniosa (PM) es un método asistido por computador diseñado para explorar exhaustivamente las tres regiones CDR de una cadena variable y generar variantes con características mejoradas dentro de un tamaño de biblioteca manejable. Para su construcción, estas bibliotecas utilizan codones dopados de baja redundancia en combinación con mezclas de nucleótidos sesgadas. Estas mezclas son cuidadosamente diseñadas para potenciar la presencia de sitios combinatorios con proporciones determinadas de aminoácidos alternativos seleccionados. Este enfoque permite sondear sistemáticamente la superficie del antígeno, introduciendo variaciones en uno o pocos aminoácidos a la vez y utilizando una amplia gama de cadenas laterales para descubrir e identificar nuevos sitios de unión de alta afinidad (Balint & Larrick, 1993; Schier et al., 1996).



**Figura 4. Proceso de selección utilizando TPF.**

La figura muestra las diferentes etapas del proceso de selección. La biblioteca de fagos se genera a partir de la transformación bacteriana con una genoteca. Posteriormente, la biblioteca se incuba con el antígeno o *target* de interés y se realizan múltiples lavados en condiciones astringentes para eliminar los fagos no unidos y descartar uniones débiles. Los fagos retenidos se eluyen para su posterior análisis mediante secuenciación de ADN. Figura creada en Biorender.

Distintos protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido desarrollados y optimizados para conseguir una mutagénesis eficaz de la secuencia de ADN objetivo. La técnica desarrollada por Thomas Kunkel permite generar mutaciones mediante la hibridación de un oligonucleótido

mutagénico en la región deseada de una plantilla de ADN monocatenario que contiene uracilo. La técnica de Kunkel se emplea de forma rutinaria para la construcción de péptidos sintéticos, proteínas y bibliotecas de anticuerpos (Handa & Varshney, 1998; Kunkel et al., 1991). Con respecto a este último, la técnica permite generar simultáneamente múltiples mutaciones en las regiones CDR de un anticuerpo. Durante la construcción de una biblioteca de anticuerpos, se sintetizan oligonucleótidos degenerados para introducir un gran número de variantes en regiones específicas de los CDR (Liu et al., 2020).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **1. Hipótesis**

Las mutaciones en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) incrementan la afinidad de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado del anticuerpo murino Tb HspX por el antígeno HspX de *Mycobacterium tuberculosis*.

## **2. Objetivos**

### **Objetivo general:**

Incrementar la afinidad del fragmento scFv derivado del anticuerpo Tb HspX contra el antígeno HspX mediante técnicas de evolución dirigida.

### **Objetivos específicos:**

1. Obtener y caracterizar un fragmento scFv a partir del anticuerpo Tb HspX.
2. Generar una biblioteca de mutantes de fragmentos scFv mediante la técnica de presentación de proteínas sobre fagos filamentosos.
3. Obtener un fragmento scFv de afinidad mejorada por el antígeno HspX de *Mycobacterium tuberculosis*.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Materiales

##### 1.1. Cepas bacterianas

- *Escherichia coli*, cepa Top10 (Life Technologies, EE.UU.): F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK  $\lambda$ - rpsL(StrR) endA1 nupG. Cepa bacteriana utilizada para la amplificación de plásmidos.
- *Escherichia coli*, cepa TG1 (Lucigen, EE.UU.): [F' traD36 proAB lacIqZ  $\Delta$ M15] supE thi-1  $\Delta$ (lac-proAB)  $\Delta$ (mcrB-hsdSM)5(rK-mK-). Cepa bacteriana utilizada para la amplificación y titulación de fagos y, la generación de bibliotecas de anticuerpos expuestos en la superficie de fagos.
- *Escherichia coli*, cepa CJ236 (Lucigen, EE.UU.): [F' Tra+ Pil+ (CamR)] ung-1 relA1 dut-1 thi-1 spoT1 mcrA. Cepa bacteriana utilizada para obtener ADN uridinado.
- *Escherichia coli*, cepa BL21 (DE3) F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-)  $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]<sub>K-12</sub> ( $\lambda$ S) pLysS[T7p20 ori<sub>p15A</sub>] (Cm<sup>R</sup>). Cepa bacteriana utilizada para la producción de proteínas recombinantes.

##### 1.2. Bacteriófago

- Fago auxiliador KM13 (Source BioScience, Inglaterra): es un fago derivado de M13 el cual lleva la mutación Met40Ile en gII, con el origen de replicación de P15A y el gen de resistencia a kanamicina de Tn903 insertados dentro del origen de replicación de M13. El fago auxiliador proporciona todas las funciones del bacteriófago necesarias para la síntesis del ADN circular de simple cadena y para el ensamblaje de nuevas partículas de fagos que presentan proteínas híbridas.

### 1.3. Oligonucleótidos

La síntesis de oligonucleótidos diseñados fue subcontratada a la empresa GenScript (Korea).

- Biblioteca Vk-Lib1: oligonucleótidos mutagénicos para la construcción de la biblioteca de variantes del fragmento de anticuerpo scFv HspX para las regiones CDR1 y CDR3 de la cadena ligera.

**L1:** 5'- TTT TTG TTG ATA CCA ATG CAT **314 321** CAC **321** GCT GTT GGC GCT GCA GGT C -3'

**L3:** 5'- CC GCC GAA GGT GTA TTT **321 321** CCA TTG CTG GCA GTA GTA GG -3'

- Biblioteca VH-Lib2: oligonucleótidos mutagénicos para la construcción de la biblioteca de variantes del fragmento de anticuerpo scFv HspX para las regiones CDR1 y CDR3 de la cadena pesada.

**H1:** 5'- CGC TGC TTA ACC CAA TG AAT **314** CGT **312 611**GAT GTT GAA GCC CGA CGC GG -3'

**H3:** 5'- CTG ACC CCA GTA GAC AAA ACC **615 625 644 341** ACC GCT ACG GGT GCA GTA AT -3'

- Biblioteca VH-Lib3: oligonucleótido mutagénico para la Construcción de biblioteca de variantes del fragmento de anticuerpo scFv HspX para la región CDR2 de la cadena pesada.

**H2:** 5'- ATC CTG GAT ATT CGG GTC GTA **611** GGT **311** GCC **311 652** TGG **312** AAT **621** ACC AAT CCA CTC CAG ACC TT -3'

Las mezclas de nucleótidos se codificaron mediante números. **1** = T:0,91, C:0,03, A:0,03, G:0,03; **2** = T:0,03, C:0,91, A:0,03, G:0,03; **3** = A:0,91, C:0,09; **4** =

A:0,91, C:0,03, T:0,03, G :0,03; **5** = T:0,03, G:0,91, A:0,03, C:0,03; **6** = A:0,09, C:0,91. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por GenScript (Piscataway, NJ).

#### 1.4. Plásmidos

- pHEN-1-Tryp: es un fagémido diseñado para TPF y, permite la expresión de péptidos o proteínas foráneas fusionadas al extremo amino-terminal de la proteína PIII del bacteriófago M13. Además, entre los genes del péptido y la proteína PIII se encuentra una secuencia que codifica para un sitio de corte reconocido por la enzima tripsina. El vector contiene la secuencia del gen PIII precedido por la señal de secreción pelB bajo el control transcripcional del promotor *lacZ*. El fagémido contiene el origen de replicación f1 que permite su empaquetamiento en las partículas de fago que expresan péptidos foráneos.
- pET-15b: es un vector desarrollado para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* (Novagen, EE. UU.). El vector permite la expresión de la proteína de interés bajo el control del promotor de T7 ARN polimerasa. Además, contiene la secuencia codificante para una cola 6xHis® al extremo N-terminal de la proteína de interés.
- pET-22b: es un vector desarrollado para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*. El vector lleva una secuencia señal pelB N-terminal para una posible localización periplásmica, además de una secuencia His-Tag® C-terminal opcional.

#### 1.5. Medios de cultivo

Los componentes microbiológicos como triptona, extracto de levadura y agar fueron comprados a ThermoFisher Scientific (EE. UU.). Las sales y suplementos fueron adquiridos en la compañía Merck Millipore (EE. UU.).

- Medio LB: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl.

- Medio LB Agar: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar.
- Medio 2YT: 16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl.
- Medio TYE Agar: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 8 g/L NaCl, 15 g/L agar
- Medio Mínimo M9 Agar: 12,8 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g/L NaCl, 15 g/L agar, 4% glucosa, 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 ml de Vitamina B1 (1 mg/mL).

### **1.6. Antibióticos**

- Ampicilina (US Biological, EE. UU.).
- Kanamicina (Merck Millipore, EE. UU.).
- Cloranfenicol (Merck Millipore, EE. UU.).
- Estreptomicina (Merck Millipore, EE. UU.).

### **1.7. Líneas celulares**

Tb HspX (hibridoma de ratón). Fusión entre mieloma murino SP2 y linfocitos de ratón desarrollado en el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Universidad de Concepción.

### **1.8. Reactivos y soluciones de cultivo celular**

- Medio RPMI-1640 (Biological Industries, Israel).
- Suero Fetal Bovino (Biological Industries, Israel).
- Medio de crecimiento: RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) suero fetal bovino.
- Medio de congelación: RPMI-1640 suplementado con 20% (v/v) suero fetal bovino.
- Azul de Tripán: 5 g/L Azul de Tripán (Merck Millipore, EE. UU.), 8,5 g/L NaCl (Merck Millipore, EE. UU.).

## 1.9. Proteínas

- Endonucleasas de restricción y modificación: Las endonucleasas de restricción y las enzimas de modificación (T4 Ligasa, Fosfatasa Antártica y ADN Polimerasas) utilizadas en este trabajo fueron compradas a New England Biolabs (Inglaterra) y fueron utilizadas según las recomendaciones del fabricante.
- Anticuerpo monoclonal anti-6X HisTag producido en ratón (BioLegend, EE. UU.).
- Anticuerpo contra IgG de ratón conjugado a Alexa-Fluor 680 (Jackson ImmunoResearch, EE. UU.).
- Anticuerpo contra bacteriófago M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, de su nombre en inglés, *Horseradish peroxidase*) (SinoBiological, China).

## 1.10. Reactivos y soluciones generales.

### 1.10.1. Soluciones para extracción y purificación de ADN plasmidial.

- Solución I: 50 mM Glucosa (Merck Millipore, EE. UU.), 25 mM Tris-Cl pH 8.0 (PanReac AppliChem, Alemania), 10 mM EDTA pH 8.0 (PanReac AppliChem, Alemania), 0.1 mg/ml RNasa A (Macherey - Nagel, Alemania).
- Solución II: 0.2 M NaOH (Merck Millipore, EE. UU.), 1% (p/v) SDS (Merck Millipore, EE. UU.).
- Solución III: 5 M Acetato de potasio (Merck Millipore, EE. UU.), ácido acético glacial (Merck Millipore, EE. UU.).
- Isopropanol (Merck Millipore, EE. UU.)
- Etanol absoluto (PanReac AppliChem, Alemania).

### 1.10.2. Electroforesis de ADN.

- Tampón TAE: 40 mM Tris (PanReac AppliChem, Alemania), 1 mM EDTA (PanReac AppliChem, Alemania), 20 mM ácido acético (Merck Millipore, EE. UU.).
- Tampón de carga ADN 6x: 30% (v/v) Glicerol (PanReac AppliChem, Alemania) y 0.25% (p/v) Azul de bromofenol (Merck Millipore, EE. UU.).
- 1% Bromuro de etidio en agua (Merck Millipore, EE. UU.).
- Agarosa (Lonza Bioscience, EE. UU.).
- Marcador de peso molecular de ADN 1kb (New England BioLabs, Inglaterra).

### 1.10.3. Electroforesis de proteínas.

- 30% (p/v) Acrilamida (PanReac AppliChem, Alemania), 0.8% (p/v) Bisacrilamida (Merck Millipore, EE. UU.)
- 1.5 M Tris-HCl pH 8.8.
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8.
- 10% (p/v) SDS (Merck Millipore, EE. UU.).
- 10% (p/v) Persulfato de amonio (PanReac AppliChem, Alemania).
- TEMED (PanReac AppliChem, Alemania).
- Tampón de corrida: 25 mM Tris, 192 mM Glicina (PanReac AppliChem, Alemania), 0.1% (p/v) SDS (Merck Millipore, EE. UU.).
- Tampón de carga 6X con  $\beta$ -Mercaptoetanol (Condición denaturante y reductora): 10% (p/v) SDS, 0.6% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoetanol (PanReac AppliChem, Alemania), 0.012% (p/v) azul de bromofenol, 0.35 M Tris, 30% (v/v) glicerol.
- Tampón de carga 6X (Condición denaturante y no reductora): 10% (p/v) SDS, 0.012% (p/v) azul de bromofenol, 0.35 M Tris-Cl, 30% (v/v) Glicerol.
- Patrón de peso molecular AccuRuler RGB Plus (MaestroGen, EE. UU.)

- Solución de tinción Azul de Coomassie: 0.25% (p/v) Azul de Coomassie brillante R250 (Merck Millipore, EE. UU.), 10% (v/v) ácido acético (Merck Millipore, EE. UU.), 45% (v/v) Metanol (Merck Millipore, EE. UU.).
- Solución de destinción: 5% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético.

#### **1.10.4. Western blot.**

- Tampón de transferencia: 48 mM Tris, 39 mM Glicina (PanReac AppliChem, Alemania), 0.037% (p/v) SDS, 20% (v/v) Metanol.
- TBS: 3,0 g/L Tris, 8,0 g/L NaCl (PanReac AppliChem, Alemania), pH 7,6.
- Solución de bloqueo para membrana: 5% (p/v) leche descremada en TBS.
- Rojo Ponceau: 0.1% (p/v) Rojo Ponceau (Merck Millipore, EE. UU.) en 5% (v/v) ácido acético.
- TBS-T: TBS con 0.1% (v/v) Tween-20 (Merck Millipore, EE. UU.).
- Membrana Nitrocelulosa, Amersham Protran 0.2  $\mu$ m, 300 mm x 4 m (Cytiva, EE. UU.).

#### **1.10.5. Cromatografía**

- NiSO<sub>4</sub> (Merck Millipore, EE. UU.).
- Imidazol (Merck Millipore, EE. UU.).
- Chelating Sepharose Fast Flow (Cytiva, EE. UU.).
- rProtein A Sepharose Fast Flow (Cytiva, EE. UU.).

#### **1.10.6. Selección por TPF.**

- Tampón de recubrimiento: 2,93 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Merck Millipore, EE. UU.), 1,52 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck Millipore, EE. UU.).
- Tampón Fosfato Salino (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl (Merck Millipore, EE. UU.), 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PanReac AppliChem, Alemania), 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PanReac AppliChem, Alemania).
- Solución de bloqueo: BSA (PanReac AppliChem, Alemania) al 3% (p/v) diluida en PBS.

- Tampón PBT: PBS, 1% (p/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween 20.
- TEA: 0,1 M Trietilamina.
- Biblioteca de péptidos lineales: biblioteca de péptidos de 9 aminoácidos aleatorios fusionados al extremo amino-terminal de la proteína pIII utilizando como fagémido el vector pHEN-1-Tryp.

#### **1.10.7. Inmunoensayos.**

- Tampón de recubrimiento: 2,93 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1,52 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
- PBS-T: PBS con 0.1% (v/v) Tween-20.
- Tampón sustrato (peroxidasa): 29.4 g/L Citrato trisódico dihidratado (Merck Millipore, EE. UU.) pH 4,5 ajustado con HCl.
- Solución de revelado: mezcla de 5 mg de OPD (o-Fenilendiamina) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), 12.5 ml de tampón sustrato, 5 µl de 30% peróxido de hidrógeno (Merck Millipore, EE. UU.).
- Solución de parada: 2.5 M Ácido sulfúrico (Merck Millipore, EE. UU.).

#### **1.10.8. Kits comerciales.**

- E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II (Omega Bio-Tek, EE. UU.), kit utilizado para purificar ADN plasmidial desde bacterias.
- E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega-Biotek, EE. UU.), kit utilizado para purificar ADN plasmidial desde gel de agarosa.
- E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega-Biotek, EE. UU.), kit utilizado para purificar productos de PCR.
- E.Z.N.A.® M13 DNA Mini Kit (Omega-Biotek, EE. UU.).
- Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, EE. UU.), kit utilizado para la cuantificación de proteínas totales.

#### **1.10.9. Equipos.**

- Agitador magnético con placa calefactora MSH-20A (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).

- Agitador Orbital SHO-1D (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Bloque térmico MaXtable H10-Set (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Cabina de Flujo Laminar AVC-4D1 (ESCO Technologies, Inc., Singapur).
- Centrifuga Sorvall Legend Micro 21 (Thermo Fisher Scientific, Alemania).
- Centrifuga Sorvall RC6 plus (Thermo Fisher Scientific, Alemania).
- Electroporador Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, EE. UU.).
- Lector de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek, EE. UU.).
- Equipo de Trasferencia semi-húmeda Trans-Blot SD Cell (Bio-Rad, EE. UU.).
- Equipo foto-documentador Odyssey (LI-COR Biosciences, EE. UU.).
- Fuente de poder PowerPac™ Basic (Bio-Rad, Singapur).
- Fuente de poder EV 202 (Consort, Bélgica).
- Homogeneizador EmulsiFlex C5 (Avestin, Canadá).
- Incubador digital SWIG-50 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Incubador digital WIS-20 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Incubador de placas de pozo profundo TS-DW (BioSan, Letonia)
- Mezclador Vortex VM-10 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Sistema de Cromatografía ÄKTA™ Start (GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia).
- Transiluminador UV WUV-L10 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).

## **2. Métodos**

### **2.1. Técnicas generales de análisis y manipulación de ADN**

#### **2.1.1. Electroforesis en gel de agarosa**

Se prepararon geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE con bromuro de etidio a una concentración final de  $2 \times 10^{-5}$  (p/v). Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga para ADN previo a su carga en el gel. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante 100V durante 30 min. Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV.

#### **2.1.2. Purificación de ADN escala mini preparativa.**

Se inocularon colonias aisladas de bacterias transformadas en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Los inóculos se incubaron a 37 °C 250 rpm durante 16 horas. Los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 100 µL de solución I. Luego, se adicionaron 100 µL de solución II, se mezcló por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de solución III, se mezcló por inversión y se incubó 15 min en hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 g por 15 min. El sobrenadante se transvasó a un tubo nuevo. Se adicionó 240 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 g por 15 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 20 µL de agua Grado Biología Molecular. La presencia de ADN se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### **2.1.3. Purificación de ADN desde gel de agarosa.**

Para la extracción de ADN a partir de gel de agarosa se utilizó el kit comercial E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega-Biotek). Se procedió según las instrucciones del fabricante.

#### 2.1.4. Digestión analítica de ADN plasmídico

Con el objetivo de corroborar la identidad de los plásmidos se procedió a realizar análisis de restricción. La reacción se realizó en un volumen de 20  $\mu$ L que contenían entre 0.5 y 1  $\mu$ g de ADN, enzima de restricción a razón de 5U de enzima por cada  $\mu$ g de ADN y la solución tampón correspondiente (1X). Las reacciones de digestión se incubaron durante 2 horas a 37 °C (o temperatura indicada por el fabricante). La digestión se analizó mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa.

### 2.2. Técnicas generales de análisis y manipulación de proteínas

#### 2.2.1. Preparación de geles de poliacrilamida

Se prepararon geles denaturantes de poliacrilamida al 12% o 15% de 1,0 mm de grosor para todos los análisis realizados. Los geles de poliacrilamida se prepararon de acuerdo con la Tabla 1.

**Tabla 1. Preparación de geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes**

	Gel separador (1)		Gel concentrador (1)
	12%	15%	
Agua (mL)	2	1,4	1,3
Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0,8% (mL)	2,4	3	500
Tris HCl 1,5 M pH 8,0 (mL)	1,5	1,5	-
Tris HCl 0,5 M pH 6,5 (mL)	-	-	650
SDS 10% ( $\mu$ L)	60	60	25
PSA 10% ( $\mu$ L)	60	60	25
TEMED ( $\mu$ L)	5	5	4

#### 2.2.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).

Las muestras de proteínas se mezclaron con tampón de carga (6X) suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol y se incubaron a 95 °C durante 5 min en placa térmica. Las muestras denaturadas (25  $\mu$ L aproximadamente) junto con el patrón

de peso molecular se cargaron en los pocillos del gel de poliacrilamida. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante 110 V durante 120 min. Posteriormente, se tiñó el gel con solución de Azul de Coomassie durante 1 hora con agitación constante. El resultado fue digitalizado utilizando el equipo LI-COR ODYSSEY-Clx y el software Image Studio.

### **2.2.3. Western Blot**

Finaliza la corrida SDS-PAGE, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa utilizando una celda de transferencia semi-seca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) a intensidad de corriente constante (0.25 A), voltaje máximo 25 V durante 30 min. Terminada la transferencia, se bloqueó la membrana con una solución de leche descremada 5% (p/v) en TBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, la membrana se incubó con una solución de anticuerpo primario preparada con leche descremada al 2% (p/v) en TBS-T durante 3 horas a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces durante 10 min con TBS-T y se incubó con una solución de anticuerpo secundario (conjugado a fluorocromo) durante 1 hora. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T y fue analizada en el equipo ODYSSEY-Clx para la detección de fluorescencia y se digitalizó utilizando el software Image Studio.

### **2.2.4. Concentración y diafiltración de muestras de proteínas**

Las soluciones de proteínas purificadas fueron concentradas y diafiltradas utilizando tubos Amicon Ultra con membranas de tamaño de poro de 3 kDa, 10 kDa y 35 kDa en función del peso molecular de la proteína. La solución fue sometida a centrifugaciones sucesivas de 25-40 min a 3900 g a 4 °C, hasta obtener un volumen de solución de 1 mL. Posteriormente, se intercambió el tampón de la solución por PBS. La solución se diluyó en PBS (hasta alcanza un volumen total de 10 mL) y se centrifugó durante 25-40 min a 3900 g a 4 °C, hasta obtener un volumen de solución de 1 mL. Este procedimiento se repitió 3-8 veces. La muestra obtenida fue almacenada a -20°C o -80°C.

### **2.2.5. Cuantificación de proteínas totales**

La cuantificación de proteínas totales fue realizada utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) según el protocolo para microplacas descrito por el fabricante.

## **2.3. Cultivo celular**

### **2.3.1. Descongelación**

El ámpula que contenía las células de hibridoma Tb HspX se descongelaron en un baño termostático a 37 °C. Las células se resuspendieron en 10 mL de medio RPMI-1640 y se centrifugaron a 500 g durante 5 min. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 1 mL de medio de crecimiento (RPMI, SFB 10%). Las células se sembraron en un frasco de cultivo T-25 (Corning, EE.UU.) y se incubaron a 37 °C, en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% y con humedad relativa (HR) del 95%.

### **2.3.2. Propagación**

A partir de un cultivo a un 95% de confluencia celular, las células se desprendieron mediante esfuerzo mecánico y se centrifugaron a 500g durante 5 min. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en medio de crecimiento. Se realizó conteo celular para determinar la cantidad a sembrar en los frascos de cultivo. Las células se incubaron a 37 °C, en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% y con humedad relativa (HR) del 95%.

### **2.3.3. Congelación**

Las células se ajustaron a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/mL en medio de congelación (RPMI, SFB 20%, DMSO 20%), previamente enfriado a 2-4 °C. 1 mL de suspensión celular se dispuso en criotubos (Nalgene, EE.UU.) que se mantuvieron a -80 °C durante 24 horas, para su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido.

## **2.4. Obtención de HspX recombinante**

### **2.4.1. Producción de HspX recombinante**

Para la producción de la proteína recombinante se utilizó la cepa *E. coli* BL21-DE3. La transformación bacteriana con el plásmido pET-15b HspX se realizó mediante golpe térmico. La bacteria transformada se sembró en placas de agar LB suplementadas con ampicilina. A partir de una colonia aislada, se preparó un inóculo bacteriano (10 mL) que se diluyó en 500 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). El cultivo se incubó a 37 °C, 200 rpm hasta alcanzar un valor  $OD_{600}=0,6-0,8$ . La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición de IPTG (concentración final 0.5 mM) y posterior incubación a 37 °C, 200 rpm durante 5 horas. Finalizada la inducción, el cultivo se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet bacteriano se resuspendió en tampón de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, imidazol 50 mM, pH 8,0) suplementado con 1 mM inhibidor de proteasas PMSF (5 mL de tampón de lisis por cada gramo de peso húmedo de pellet). La ruptura celular se realizó utilizando un molino de bolas. Finalizado el proceso, el lisado bacteriano se incubó se centrifugó a 9000 rpm durante 30 min a 4 °C. El pellet representó la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) y el sobrenadante la fracción soluble.

### **2.4.2. Purificación de HspX recombinante**

Para la purificación de la proteína se utilizó una matriz IMAC Sepharosa High Performance. La matriz se equilibró con 10 volúmenes de columna ( $V_c$  = volumen de la matriz) de tampón de equilibrio: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, imidazol 50 mM, pH 8,0, a un flujo de 1,5 mL/min. La fracción soluble se diluyó en tampón de equilibrio (1:3) y se pasó a través de la matriz a un flujo de 1,5 mL/min. Posteriormente, se utilizó un gradiente de imidazol: 150 mM y 250 mM para el lavado de la matriz a un flujo de 1,5 mL/min. La proteína se eluyó con 350 mM de imidazol a un flujo de 1,5 mL/min. Seguidamente, se intercambió el tampón de la proteína eluida utilizando una matriz Desalting Sephadex G-25. La matriz se

equilibró con 10 Vc de buffer de intercambio PBS. a un flujo de 2 mL/min. La proteína eluida se pasó a través de la matriz a un flujo de 4 mL/min. La fracción que contenía la proteína en buffer de intercambio se recolectó conforme a los cambios en la conductancia observados en el cromatograma.

## **2.5. Obtención del anticuerpo monoclonal Tb HspX**

### **2.5.1. Producción del anticuerpo**

Las células de hibridoma Tb HspX fueron cultivadas en frascos de cultivo T-175 en medio de crecimiento. Una vez alcanzada una confluencia celular aproximada del 90%, el medio se descartó y las células se lavaron 3 veces con PBS. Se adicionó medio de crecimiento sin SFB y las células se incubaron durante 3 días. El medio se recolectó y centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se almacenó a -20 °C.

### **2.5.2. Purificación del anticuerpo**

Para la purificación del anticuerpo se utilizó una matriz rProtein A Sepharose Fast Flow. La matriz se equilibró con 10 volúmenes de columna (Vc = volumen de la matriz) de buffer de equilibrio PBS a un flujo de 3 mL/min. La muestra se diluyó en buffer de equilibrio (1:3) y se pasó a través de la matriz a un flujo de 3 mL/min. La proteína se eluyó con solución 0.1 M Glicina a un flujo de 3 mL/min. Seguidamente, se intercambió el buffer de la proteína eluida utilizando una matriz Desalting Sephadex G-25.

## **2.6. Producción del fragmento scFv HspX**

El gen que codifica para el fragmento scFv derivado del anticuerpo Tb HspX fue sintetizado por GenScript (Piscataway, NJ). El gen consiste en la cadena VH, un *linker* Glicina/Serina, la cadena VL, 6xHis-TAG y los sitios de restricción enzimática *Sall* y *NotI*. El fragmento scFv HspX fue clonado en el vector pET-22b. Para la producción del fragmento scFv se utilizó la cepa *E. coli* BL21-DE3. La transformación bacteriana con el plásmido pET-22b scFv HspX se realizó mediante

golpe térmico. La bacteria transformada se sembró en placas de agar LB suplementadas con ampicilina. A partir de una colonia aislada, se preparó un inóculo bacteriano (10 mL) que se diluyó en 500 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). El cultivo se incubó a 37 °C, 200 rpm hasta alcanzar un valor  $OD_{600}=0,6-0,8$ . La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición de IPTG (concentración final 0.5 mM) y posterior incubación a 37 °C, 200 rpm durante 5 horas. Finalizada la inducción, el cultivo se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet bacteriano se resuspendió en tampón de lisis suplementado con 1 mM inhibidor de proteasas PMSF (5 mL de tampón de lisis por cada gramo de peso húmedo de pellet). La ruptura celular se realizó utilizando un molino de bolas. Finalizado el proceso, el lisado bacteriano se incubó se centrifugó a 9000 rpm durante 30 min a 4 °C. El pellet representó la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) y el sobrenadante la fracción soluble.

## **2.7. Mutagénesis sitio-dirigida utilizando TPDF**

### **2.7.1. Procedimientos generales**

#### **2.7.1.1. Producción del fago filamentoso KM13**

Se preparó un inóculo bacteriano a partir de una colonia individual TG1 (previamente sembrada en una placa de medio mínimo M9) en 5 mL de medio 2YT. El inóculo se diluyó (1:50) en 5 mL de medio 2YT y se incubó a 37 °C, 150 rpm hasta alcanzar una  $OD_{600}$  de 0,5. Mientras tanto, se prepararon diluciones seriadas (factor de dilución 1:10) del stock de fago KM13 en 90 µL de medio 2YT. A cada dilución se adicionaron 90 µL del inóculo y se incubaron a 37 °C durante 45 min. Las diluciones se sembraron por separado en placas de medio TYE suplementadas con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Al día siguiente, se sembró una colonia individual en 5 mL de medio 2YT. El inóculo se incubó a 37 °C, 150 rpm hasta alcanzar una  $OD_{600} \sim 0,5$  y se diluyó con en 500 mL de medio 2YT suplementado con kanamicina (50 µg/mL), se incubó a 30 °C, 150

rpm durante 18-20 horas. Transcurrido el tiempo, El cultivo se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C durante 10 min. El pellet bacteriano se desechó y se almacenó el sobrenadante que contiene los fagos a 4 °C.

#### **2.7.1.2. Precipitación de fagos**

Se mezclaron 400 mL de sobrenadante de cultivo con 100 mL de solución PEG (20 % (p/v) PEG 6000, 2,5M NaCl). La solución se incubó a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, la solución se centrifugó a 10000 g a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se descartó y el pellet que contiene los fagos se resuspendió en 4 mL de PBS, se adicionó 1 mL de solución de PEG y se incubó en hielo durante 1 hora. La solución se centrifugó a 10000 g a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 800 µL de PBS, se adicionaron 200 µL de solución de glicerol (60 %) y los fagos se almacenaron a -80 °C.

#### **2.7.1.3. Determinación del título viral**

Se preparó un inóculo bacteriano a partir de una colonia TG1 (previamente sembrada en una placa de medio mínimo M9) en 5 mL de medio 2YT. El inóculo se diluyó en 5 mL de medio 2YT y se incubó a 37 °C hasta OD<sub>600</sub> de 0,5. Se prepararon diluciones seriadas (desde 10<sup>1</sup> hasta 10<sup>12</sup>) de fago en 90 µL de medio 2YT. A cada dilución se adicionaron 90 µL de inóculo preparado anteriormente y se incubaron a 37 °C durante 45 min. Las diluciones se sembraron por separado en placas de medio TYE suplementadas con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Se contaron las colonias formadas en cada una de las placas, descartando aquellas que presentaban crecimiento masivo. El título viral se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ufc}}{\text{ml}} = \frac{\text{n} \cdot \text{Fd} \cdot \text{V}_t}{\text{V}_p \cdot \text{V}_c}$$

Donde: **n** = número de colonias, **Fd** = factor de dilución ( $10^x$ ), **V<sub>t</sub>** = volumen total, **V<sub>p</sub>** = volumen de siembra en la placa (mL), **V<sub>c</sub>** = volumen de cultivo bacteriano (mL).

## **2.7.2. Diseño y construcción de las bibliotecas de mutantes scFv HspX**

### **2.7.2.1. Diversificación de las regiones CDR**

Las regiones CDR del fragmento scFv HspX se determinaron mediante el esquema de definición de Kabat. La estructura del fragmento scFv se predijo utilizando los programas bioinformáticos AlphaFold, ABodyBuilder y IgFold. Con base en las modelaciones se seleccionaron los aminoácidos candidatos para para la diversificación de las regiones CDR. El criterio de selección fue: los aminoácidos expuestos al solvente cuyas cadenas laterales no apunten hacia el interior del anticuerpo. Se seleccionaron 18 aminoácidos de cinco regiones CDR y se aplicó el método de mutagénesis parsimónica descrito por Balint & Larrick (1993) a cada aminoácido. Las mutaciones se distribuyeron en tres bibliotecas: Vk-Lib1 con mutaciones en las regiones CDR1 y CDR3 de la cadena variable ligera (VL), VH-Lib2 con mutaciones en las regiones CDR1 y CDR3 de la cadena variable pesada (VH) y VH-Lib3 con mutaciones en la región CDR2 de la cadena VH. La región CDR2 de la cadena VL se excluyó para la diversificación.

En cada posición, la diversidad se introdujo utilizando el codón degenerado NNK; donde N=A, T, G o C; K= T o G; con mezclas no equimolares. Se diseñaron oligonucleótidos mutagénicos que contenían las regiones CDR diversificadas y regiones solapadas para asegurar la unión del primer (Ver Sección 1.3). La construcción de las bibliotecas se realizó según lo especificado en la literatura (Tonikian et al., 2007) incluyendo modificaciones por lo que a continuación se detalla cada paso.

### **2.7.2.2. Obtención de ADN de simple cadena uridinado (dU-ssDNA)**

El gen que codifica para el fragmento scFv HspX fue sintetizado por GenScript (Piscataway, NJ). El gen codifica para la cadena VH, un *linker* Glicina/Serina, la cadena VL, 6xHis-TAG y los sitios de restricción enzimática *Sall* y *NotI*. El fragmento scFv HspX fue clonado en el vector fagémido pHEN1-Trip con su extremo C-terminal fusionado a la proteína de cápside mayor P3 del fago M13. La bacteria *E. coli* cepa CJ236 se transformó con el vector fagémido para la producción del ADN uridinado. Se inoculó una colonia transformada en 5 mL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (15 µg/mL) y se incubó a 37 °C, 200 rpm toda la noche. El cultivo se diluyó en 500 mL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/mL) hasta una OD<sub>600</sub> de 0,01. El cultivo se incubó a 37 °C, 200 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,1. Se adicionó el fago *helper* KM13 con una multiplicidad de infección (MOI) de 5. El cultivo se incubó a 37 °C durante 45 min sin agitación y 45 min a 75 rpm. El cultivo se centrifugó a 5000 g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 500 mL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), uridina (0.25 µg/mL) y se incubó a 37 °C, 200 rpm durante 6 horas. El cultivo se centrifugó a 10000 g por 10 min. Los fagos se precipitaron a partir del sobrenadante con solución PEG y se resuspendieron en PBS (Ver sección 2.6.1.2). Se purificó el ADN uridinado a partir de los fagos purificados utilizando el kit E.Z.N.A.® M13 DNA Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.7.2.3. Síntesis del heterodúplex de doble cadena**

En primer lugar, se realizó la fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos. La reacción se detalla a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2. Fosforilación de oligonucleótidos mutagénicos.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
Oligonucleótido mutagénico	Variable	0.6 µg
TM Buffer 10X	2 µL	1X
ATP 10 mM	2 µL	1 mM
DTT 100 mM	1 µL	5 mM
T4 Polynucleotide Kinase	2 µl	20 U
H <sub>2</sub> O	Hasta 20 µL	

La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Inmediatamente, se hibridó el oligonucleótido fosforilado con el molde de dU-ssADN. La reacción de hibridación se detalla a continuación en la Tabla 3.

**Tabla 3. Hibridación del oligonucleótido mutagénico.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
dU-ssDNA	Variable	20 µg
TM Buffer 10X	25 µL	1X
Oligonucleótido fosforilado	20 µL	0.6 µg
H <sub>2</sub> O	Hasta 250 µL	

Similar a una amplificación por PCR, se llevó a cabo un ciclo de denaturación e hibridación del oligonucleótido mutagénico fosforilado de acuerdo con el siguiente protocolo: 90 °C por 3 min, 50 °C por 5 min y 20 °C por 5 min. Luego, se adicionaron las enzimas T7 ADN polimerasa y T7 ADN ligasa para completar la síntesis del heterodúplex de doble cadena. La reacción se detalla a continuación en la tabla 4.

**Tabla 4. Síntesis del heterodúplex CCC-dsDNA.**

Componente	Volumen	Concentración final
dU-ssDNA/oligonucleótido	250 $\mu$ L	
ATP 10 mM	10 $\mu$ L	346 $\mu$ M
dNTP mix (25 mM cada nucleótido)	10 $\mu$ L	846 $\mu$ M cada nucleótido
DTT 100 mM	15 $\mu$ L	5.19 mM
T4 DNA ligasa	1 $\mu$ L	2000 unidades de ligación
T7 DNA polimerasa	3 $\mu$ L	30 U

La reacción se incubó a 20 °C toda la noche. Los productos de la polimerización se purificaron utilizando el kit E.Z.N.A® Cycle Pure.

#### **2.7.2.4. Preparación de bacterias *E. coli* TG1-KM13.**

Una colonia aislada de *E. coli* TG1 infectada con fago auxiliar KM13 se propagó en 50 mL de medio 2YT suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/mL). Seis matraces tipo *baffled* de 2 L conteniendo 500 mL de medio 2YT suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/mL) se inocularon con 5 mL de *E. coli* TG1-KM13. Los cultivos se incubaron a 37 °C, 200 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> = 0,6. Los cultivos se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 5000 g a 4 °C por 10 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1 mM HEPES, pH 7.4. Este paso se repitió tres veces. Luego, el pellet se resuspendió en 150 mL de glicerol 10% (v/v) y se centrifugó a 5000 g a 4 °C por 15 min. El sobrenadante se descartó y los pellets se resuspendieron en un volumen final de 3 mL en glicerol 10%. Se prepararon alícuotas de 350  $\mu$ L que se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

#### **2.7.2.5. Generación de las bibliotecas de mutantes scFv HspX**

Para la generación de las bibliotecas, se realizó la transformación de bacterias *E. coli* TG1-KM13 mediante electroporación con las bibliotecas construidas con anterioridad (Ver Sección 2.7.2.2). La electroporación se realizó en

cubetas 2 mm bajo los siguientes parámetros: 2,5 kV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F utilizando el equipo Gene Pulser (Bio-Rad, EE.UU.). Inmediatamente, las bacterias se diluyeron en 25 mL de medio 2YT y se incubaron a 37 °C, 200 rpm por 30 min. La diversidad de las bibliotecas se determinó mediante diluciones seriadas a partir de 10  $\mu$ L de cultivo empleando un factor de dilución 1/10. Las diluciones se sembraron en placas TYE suplementadas con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y se incubaron a 37 °C toda la noche. Posteriormente, la diversidad se estimó basándose en el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). El cultivo se diluyó en 500 mL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), kanamicina (50  $\mu$ g/mL) y se incubó a 37 °C, 200 rpm toda la noche. El cultivo se centrifugó a 12000 g por 10 min. Los fagos se precipitaron a partir del sobrenadante (Ver Sección 2.6.1.2) y se resuspendieron en PBS. El título viral se determinó mediante diluciones seriadas (Ver Sección 2.6.1.3).

### **2.7.3. Selección de mutantes scFv HspX con afinidad mejorada.**

Se recubrió una placa de 96 pocillos High Binding Assay Costar ® con 100  $\mu$ L de antígeno HspX disuelto en tampón de recubrimiento a 4 °C toda la noche. La placa se lavó tres veces con PBS y se incubó con 300  $\mu$ L de solución de 3% (p/v) BSA en PBS a 4 °C toda la noche. Los fagos de las bibliotecas previamente construidas se diluyeron en buffer PBT. 100  $\mu$ L de solución de fagos conteniendo  $5 \times 10^{12}$  UFC se incubaron en los pocillos de la placa recubierta durante 1 hora a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó y se etiquetó como fracción no unida (N). La placa se lavó 20 veces con una solución PBS, 0,5% Tween 20. Previo a la elución de los fagos, la placa se incubó con 100  $\mu$ L de solución 0.1 M TEA (trietilamina) durante 10 min a temperatura ambiente. La placa se lavó 20 veces y se incubó con 100  $\mu$ L de solución de Tripsina (0,1 mg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó y se etiquetó como fracción unida (B). La fracción B se incubó con 30 mL de cultivo de *E. coli* TG1 (OD<sub>600</sub> ~0,5) a 37 °C sin agitación durante 1 hora. El cultivo se centrifugó a 5000 g durante 10

min, el pellet se resuspendió en 1 mL de medio 2YT y las bacterias se sembraron en placas TYE suplementadas con ampicilina (100 µg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Las bacterias se rasparon con 5 mL de medio 2YT y se diluyeron en 500 mL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/mL) a una OD<sub>600</sub> =0,1. El cultivo se incubó a 37 °C, 200 rpm hasta una OD<sub>600</sub> ~05. Se adicionó fago auxiliador KM13 y se incubó 37 °C durante 1 hora sin agitación. El cultivo se centrifugó a 5000 g y el pellet se resuspendió en 500 mL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL). El cultivo se incubó a 30 °C durante 20 horas. El cultivo se centrifugó a 10000 g por 10 min y los fagos se precipitaron del sobrenadante (Ver Sección 2.6.1.2) y se resuspendieron en PBS. El título viral se determinó mediante diluciones seriadas (Ver Sección 2.6.1.3). Los fagos obtenidos se utilizaron para la siguiente ronda de selección. En total, se realizaron 3 rondas de selección, el enriquecimiento en cada ronda se evaluó mediante la determinación del título viral de las fracciones N y B.

Finalizado el proceso de selección, clones individuales de la tercera ronda se cultivaron en un formato de placa ELISA. Colonias aisladas de *E. coli* TG1 que contenían los distintos fagémidos se inocularon en una placa de 96 pocillos de fondo redondo que contenía 150 µL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/mL), 4% (p/v) glucosa y se incubó a 37 °C, 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se inoculó una placa de 96 pocillos que contenía 200 µL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/mL), 4% glucosa con 5 µL del cultivo anterior. La placa se incubó a 37 °C, 200 rpm durante 3 horas. Se adicionó 100 µL por pocillo de medio 2YT suplementado con fago auxiliador y se incubó a 37 °C durante 1 hora sin agitación. La placa se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y las bacterias se resuspendieron en 200 µL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y 0,1% glucosa. La placa se incubó a 30 °C, 200 rpm durante 20 horas. La placa se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El sobrenadante se utilizó directamente en un ensayo ELISA para detectar las distintas mutantes scFv HspX con afinidad

mejorada. Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron en tampón PBT (dilución 1:5) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en pocillos de una placa de High Binding Assay Costar® previamente recubierta con el antígeno HspX y bloqueada con 3% BSA como se describió anteriormente. La placa se lavó 5 veces con PBS, 0,5% Tween 20 y se incubó con 100 µL de solución de anticuerpo anti-M13 HRP (dilución 1:5000 en tampón PBT) durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces y se incubó con 100 µL de solución de revelado durante 5-10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por la adición de 50 µL de solución de parada y se determinó la absorbancia mediante espectrofotometría a 492 nm. Los clones potenciales se identificaron como aquellos que mostraban señales ELISA al menos cinco veces mayores en placas recubiertas de antígeno en comparación con placas recubiertas de BSA.

#### **2.7.3.1. Identificación de mutantes scFv HspX con afinidad mejorada**

Se utilizó un formato de ELISA competitivo para estimar rápidamente la afinidad de los mutantes scFv HspX. Colonias aisladas de *E. coli* TG1 que contiene los distintos fagémidos se cultivaron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo como se describió en la sección anterior. Los sobrenadantes se diluyeron en tampón PBT (dilución 1:5) con o sin 100 nM de antígeno HspX. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, las soluciones se transfirieron a pocillos de una placa ELISA previamente recubierta con el antígeno HspX y bloqueada con 3% BSA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. La placa se lavó 5 veces con una solución PBS, 0.5% Tween 20 y se incubó con 100 µL de solución de anticuerpo anti-M13 HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces y se incubó con 100 µL de solución de revelado durante 5-10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por la adición de 50 µL de solución de parada y se determinó la absorbancia mediante espectrofotometría a 492 nm. Para cada clon, se calculó la fracción del fago scFv HspX que no formaba un complejo con el antígeno HspX en solución dividiendo la absorbancia obtenida en

presencia de 100 nM de antígeno HspX por la absorbancia en ausencia del antígeno. Los clones con mayor afinidad aparente se cultivaron en medio 2YT para la extracción de ADN plasmídico utilizando el kit E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini de acuerdo con los procedimientos del fabricante. El ADN purificado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y su concentración se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm. Las muestras de ADN se ajustaron a una concentración de 200 ng/μL en un volumen de 30 μL y fueron enviadas para su secuenciación a la empresa AUSTRAL-omics (Chile). Se utilizó el primer universal M13R que se encuentra a 117 pb corriente arriba del gen que codifica para el fragmento scFv. Las secuencias obtenidas fueron analizadas usando el programa bioinformático SnapGene, lo que permitió identificar las secuencias de los mutantes scFv HspX.

#### **2.7.3.2. Estimación de la afinidad mediante ELISA.**

Se utilizó un formato de ELISA competitivo para estimar las afinidades de los distintas mutantes scFv HspX. Se prepararon diluciones en serie con los fagos que desplegaban las distintas mutantes scFv HspX en tampón PBT. Las diluciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en pocillos de una placa ELISA previamente recubierta con el antígeno HspX y bloqueada con 3% BSA. La placa se lavó 5 veces con una solución PBS, 0,5% Tween 20 y se incubó con 100 μL de solución de anticuerpo anti-M13 HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces y se incubó con 100 μL de solución de revelado durante 5-10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por la adición de 50 μL de solución de parada y se determinó la absorbancia mediante espectrofotometría a 492 nm. Se determinó una concentración de fagos que generara aproximadamente el 50% de la señal máxima en saturación. Se llevó a cabo una incubación de dos horas con una concentración fija de fagos, determinada con anterioridad, en presencia de diluciones seriadas del antígeno HspX. Posteriormente, las mezclas se transfirieron a pocillos de una placa ELISA previamente recubierta con el

antígeno HspX y bloqueada con 3% BSA. Tras 15 min de incubación, la placa se lavó 5 veces con una solución PBS, 0,5% Tween 20 y se incubó con 100 µL de solución de anticuerpo anti-M13 HRP durante 30 min a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces y se incubó con 100 µL de solución de revelado durante 5-10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por la adición de 50 µL de solución de parada y se determinó la absorbancia mediante espectrofotometría a 492 nm. La afinidad se estimó mediante el valor IC<sub>50</sub> que se define como la concentración de antígeno HspX que inhibe el 50% de la unión del fago al antígeno inmovilizado en la placa ELISA.

Las curvas IC<sub>50</sub> se ajustaron utilizando un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL) con la concentración de antígeno HspX en escala logarítmica. La ecuación se detalla a continuación:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log(\text{IC}_{50}) - X) \cdot \text{HillSlope}}}$$

El ajuste de las curvas y el análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism v9.5. Se calcularon los valores IC<sub>50</sub> y los intervalos de confianza del 95%. La bondad del ajuste se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) y prueba de falta de ajuste basada en réplicas.

#### **2.7.4. Mapeo de epítomos del antígeno HspX.**

La identificación de epítomos del antígeno HspX se realizó utilizando la biblioteca de péptidos lineales expuestos fusionados a la proteína pVIII de M13. Una placa de 96 pocillos High Binding Assay Costar® fue recubierta con 100 µL de anticuerpo Tb HspX disuelto en tampón de recubrimiento a 4 °C toda la noche. La placa se lavó tres veces con PBS y se incubó con 300 µL de solución de 3% (p/v) BSA en PBS a 4 °C toda la noche. Los fagos de la biblioteca de péptidos se diluyeron en tampón PBT. 100 µL de solución de fagos conteniendo 5x10<sup>12</sup> UFC se incubaron en los pocillos de la placa recubierta durante 1 hora a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó y se etiquetó como fracción no unida (N).

La placa se lavó 20 veces con una solución PBS, 0,5% Tween 20 y se incubó con 100  $\mu$ L de solución de Tripsina durante 1 hora a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó y se etiquetó como fracción unida (B). La fracción B se incubó con 30 mL de cultivo de *E. coli* TG1 ( $OD_{600} \sim 0,5$ ) a 37 °C sin agitación durante 1 hora. El cultivo se centrifugó a 5000 g durante 10 min, el pellet se resuspendió en 1 mL de medio 2YT y las bacterias se sembraron en placas TYE suplementadas con ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Las bacterias se rasparon en 5 mL de medio 2YT y se diluyeron en 500 mL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) a una  $OD_{600} = 0,1$ . El cultivo se incubó a 37 °C, 200 rpm hasta una  $OD_{600} \sim 0,5$ . Se adicionó fago auxiliador KM13 y se incubó 37 °C durante 1 hora sin agitación. El cultivo se centrifugó a 5000 g y el pellet se resuspendió en 500 mL de medio 2YT suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), kanamicina (50  $\mu$ g/mL). El cultivo se incubó a 30 °C durante 20 horas. El cultivo se centrifugó a 10000 g por 10 min y los fagos se precipitaron del sobrenadante (Ver Sección 2.6.1.2) y se resuspendieron en PBS. El título viral se determinó mediante diluciones seriadas (Ver Sección 2.6.1.3). Los fagos obtenidos se utilizaron para la siguiente ronda de selección. En total, se realizaron 3 rondas de selección, el enriquecimiento en cada ronda se evaluó mediante la determinación del título viral de las fracciones N y B.

Finalizado el proceso de selección, clones individuales de la tercera ronda se cultivaron en un formato de placa ELISA. Colonias aisladas de *E. coli* TG1 que contiene los distintos fagémidos se inocularon en una placa de 96 pocillos de fondo redondo que contenía 150  $\mu$ L de medio 2YT suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), 4% (p/v) glucosa y se incubó a 37 °C, 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se inoculó una placa de 96 pocillos que contenía 200  $\mu$ L de medio 2YT suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), 4% glucosa con 5  $\mu$ L del cultivo anterior. La placa se incubó a 37 °C, 200 rpm durante 3 horas. Se adicionó 100  $\mu$ L por pocillo de medio 2YT suplementado con fago auxiliador y se incubó a 37 °C durante 1 hora sin agitación. La placa se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El

sobrenadante se descartó y las bacterias se resuspendieron en 200  $\mu$ L de medio 2YT suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), kanamicina (50  $\mu$ g/mL), 0,1% glucosa. La placa se incubó a 30 °C, 200 rpm durante 20 horas. La placa se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El sobrenadante se utilizó directamente en un ensayo ELISA para identificar los péptidos que se unieron al anticuerpo Tb HspX. Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron en tampón PBT (dilución 1:5) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en pocillos de una placa de High Binding Assay Costar ® previamente recubierta con el anticuerpo Tb HspX y bloqueada con 3% BSA como se describió anteriormente. placa recubierta durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces con PBS, 0,5% Tween 20 y se incubó con 100  $\mu$ L de solución de anticuerpo anti-M13 HRP (dilución 1:5000 en tampón PBT) durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces y se incubó con 100  $\mu$ L de solución de revelado durante 5-10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por la adición de 50  $\mu$ L de solución de parada y se determinó la absorbancia mediante espectrofotometría a 492 nm. Los péptidos que conforman un epítipo del antígeno HspX se identificaron como aquellos que mostraban señales ELISA al menos cinco veces mayores en placas recubiertas de antígeno en comparación con placas recubiertas de BSA.

## **2.8. Análisis de secuenciación de nueva generación**

Los vectores fagémidos se aislaron a partir de células TG1 infectadas por fagos provenientes de las bibliotecas seleccionadas utilizando el kit E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini de acuerdo con los procedimientos del fabricante. La preparación de las muestras para el análisis de secuenciación profunda se subcontrataron a un proveedor de servicios externo (AUSTRAL-omics, Chile). La secuenciación se realizó utilizando la plataforma Illumina MiSeq PE300. Los datos de secuenciación brutos de los dominios VH y VL se alinearon con la secuencia scFv del anticuerpo original utilizando Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012). Los archivos SAM generados se convirtieron a formato BAM, se clasificaron y se extrajo el

alineamiento primario de las lecturas pareadas utilizando Samtools (Danecek et al., 2021). El procesamiento posterior de las secuencias alineadas se llevó a cabo, incluida la fusión de las lecturas directa e inversa mediante la elección de la base nucleotídica con la puntuación de calidad más alta en las regiones superpuestas, utilizando scripts personalizados de Python y la biblioteca Pysam. Para evaluar las mutaciones de aminoácidos, las secuencias se tradujeron con la biblioteca Biopython, considerando una tabla de uso de codones que incluía el codón de parada ámbar (TAG). Posteriormente, se analizó el enriquecimiento de cada aminoácido en posiciones específicas dentro de las CDR seleccionadas.

## **2.9. Análisis matemáticos y estadísticos.**

Los análisis matemáticos y estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism v9.5.

## **2.10. Creación y análisis de imágenes.**

Las imágenes fueron analizadas y procesadas usando los programas ImageJ (<https://imagej.net>) e Image Studio Lite (<https://www.licor.com/bio/image-studio-lite/>). Esquemas y figuras fueron creados utilizando la aplicación BioRender (<https://biorender.com>).

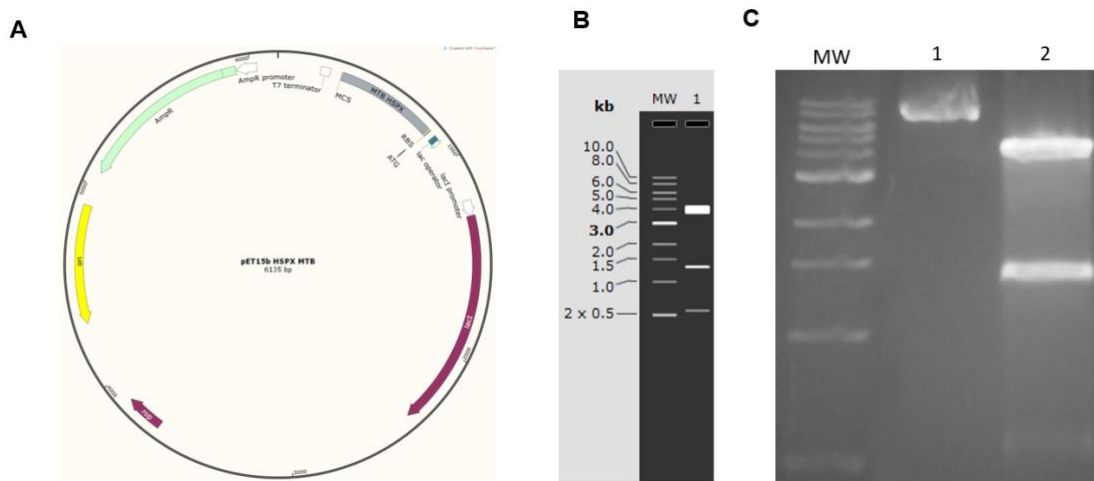
## IV. RESULTADOS

### Objetivo Específico 1: Obtener y caracterizar un fragmento scFv a partir del anticuerpo Tb HspX.

#### 1.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante HspX

El proceso inicial para la expresión de la proteína HspX recombinante consistió en la amplificación y purificación del plásmido pET15b-HSPX. Se obtuvo una concentración final de 400 ng/ $\mu$ L y una relación de absorbancia 260/280 de 1,832, indicando un buen grado de pureza del ADN plasmídico. El plásmido purificado se sometió a digestión con las enzimas de restricción NdeI y EcoRV. Tras este procedimiento, se observaron tres bandas en el gel de electroforesis con tamaños aproximados de 4, 1,5 y 0,5 kb (Figura 5). El patrón de fragmentos obtenido coincidió con la simulación realizada previamente en el programa SnapGene®, confirmando la presencia de la secuencia codificante para la proteína HspX.

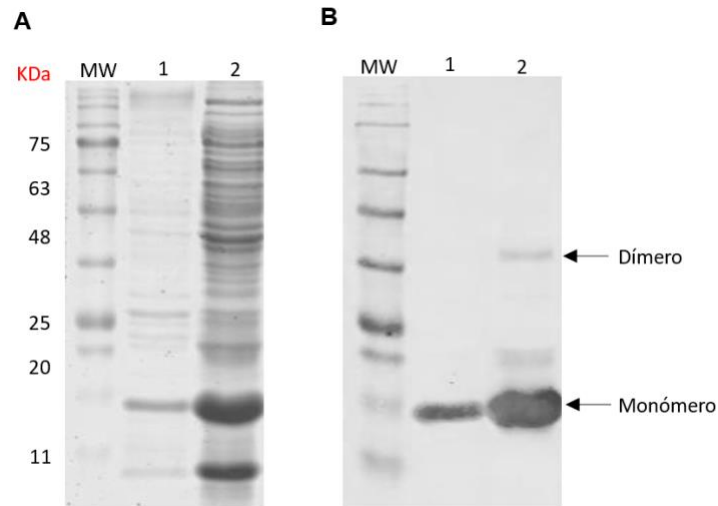
La producción de la proteína recombinante HspX se llevó a cabo utilizando la cepa *E. coli* BL21/DE3, seleccionada debido a que la transcripción del gen de interés está regulada por el promotor T7. La proteína recombinante se expresó intracelularmente y se liberó al medio extracelular mediante la disrupción de las células bacterianas empleando un molino de bolas. La expresión de la proteína fue analizada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y Western Blot. Los resultados mostraron una mayor cantidad de proteína recombinante en la fracción soluble, observándose una banda intensa de aproximadamente 16 kDa. Esta banda fue inmunodetectada por el anticuerpo Tb HspX. Adicionalmente, se identificaron homodímeros como una banda tenue de aproximadamente 32 kDa (Figura 6). La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC) utilizando una matriz IMAC Sepharose High Performance.



**Figura 5. Análisis de restricción del vector pET15b HSPX.**

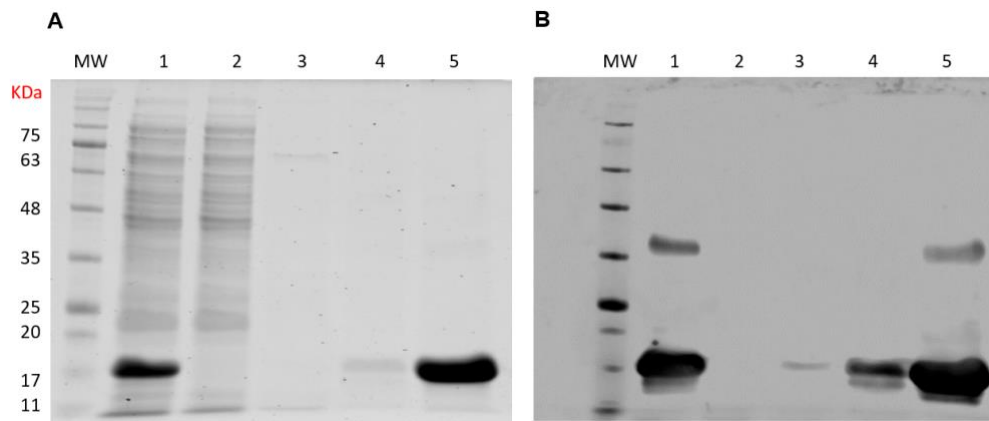
**(A)** Mapa del plásmido pET15b-HSPX que contiene la secuencia que codifica para la proteína HspX derivada de MTB. **(B)** Simulación de la digestión enzimática del plásmido con las enzimas de restricción NdeI y EcoRV en el programa SnapGene®. **(C)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% MW: 1 Kb DNA Ladder, Carril 1: plásmido no digerido, Carril 2: plásmido digerido con enzimas NdeI y EcoRV.

Las fracciones recolectadas durante el proceso fueron analizadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y Western Blot. En las fracciones inicial y elución se identificó una banda intensa de peso aproximado 16 kDa (Figura 7A). Esta banda fue inmunodetectada por el anticuerpo Tb HspX, confirmando que la proteína presente en la fracción de elución correspondía a la HspX recombinante (Figura 7B). La proteína purificada fue dializada en TBS y su concentración se ajustó a 2 mg/mL. La pureza de la proteína recombinante se evaluó mediante cromatografía de alta presión (HPLC) utilizando una matriz de fase reversa ZORBAX 300SB-C3, obteniendo un porcentaje de pureza estimado del 97% (Figura 8).



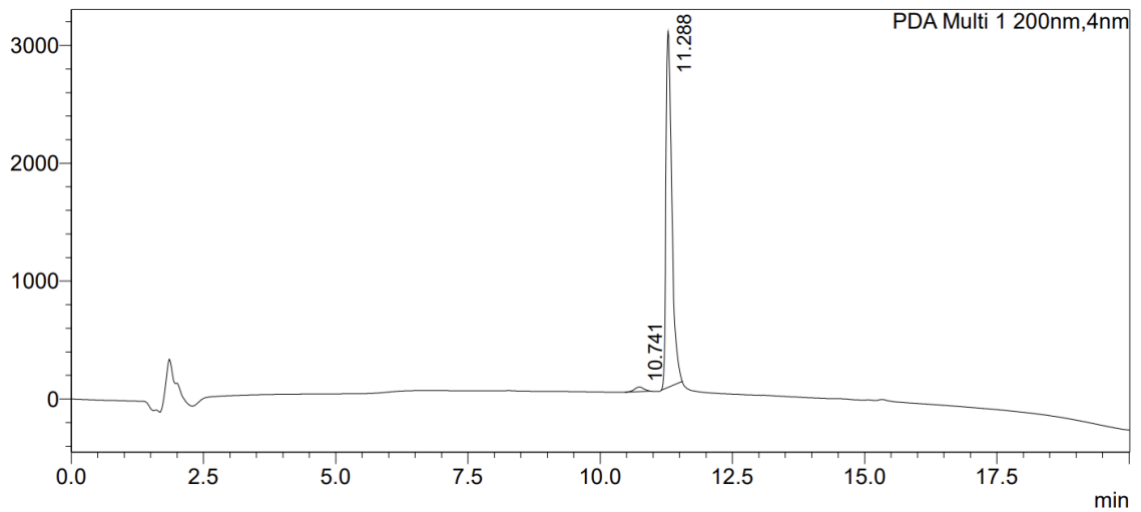
**Figura 6. Expresión de HspX recombinante.**

**(A)** SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras. La proteína recombinante se liberó al medio extracelular mediante la disrupción de las células bacterianas utilizando un molino de bolas. MW: Prestained Protein Ladder. La expresión de la proteína recombinante se evaluó en el pellet (fracción insoluble, carril 1) y el sobrenadante (fracción soluble, carril 2). **(B)** Inmunodetección de HspX recombinante con el anticuerpo murino Tb HspX.



**Figura 7. Purificación de HspX recombinante.**

**(A)** SDS-PAGE 15% condiciones reductoras. La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía utilizando un matriz IMAC Sepharose High Performance a partir de la fracción soluble (carril 1). Distintas concentraciones de imidazol: 150 mM (carril 3), 250 mM (carril 4) se emplearon para el lavado de la matriz. La proteína recombinante se eluyó con 350 mM de imidazol (carril 5). **(B)** Inmunodetección de la proteína recombinante con el anticuerpo monoclonal Tb HspX. Carril MW: Prestained Protein Ladder. Carril 1: fracción soluble, carril 2: fracción no unida, carril 3: lavado 150 mM imidazol, carril 4: lavado 250 mM imidazol, carril 5: fracción de elución.

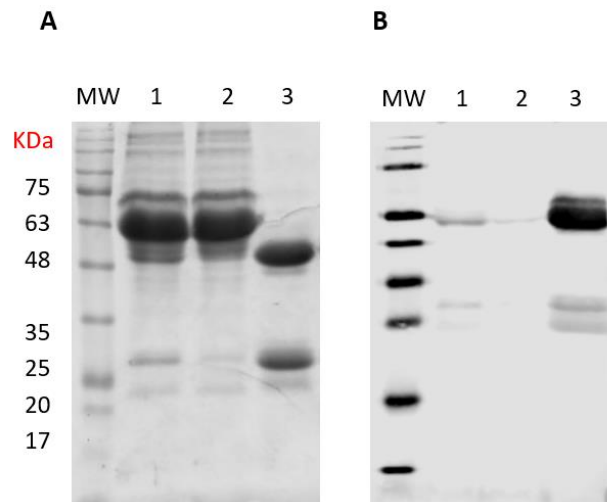


**Figura 8. Análisis de pureza de HspX recombinante.**

La pureza de la proteína se determinó mediante cromatografía de alto rendimiento (HPLC) utilizando una matriz de fase reversa. La proteína se diluyó en la fase móvil (TFA 0.1%). 20  $\mu$ L de muestra se inyectaron en la matriz y se aplicó un gradiente de acetonitrilo (30-60%) para la elución de la proteína.

## 1.2. Producción del anticuerpo monoclonal Tb HspX

El anticuerpo Tb HspX fue purificado a partir del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz de proteína A. Las fracciones recolectadas durante el proceso fueron evaluadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y Western Blot. En la fracción de elución se identificaron dos bandas con pesos moleculares aproximados de 50 y 25 kDa, respectivamente. Estas bandas fueron inmunodetectadas utilizando un anticuerpo anti-IgG murino. Las bandas observadas correspondían a la cadena pesada (50 kDa) y ligera (25 kDa) del anticuerpo (Figura 9).

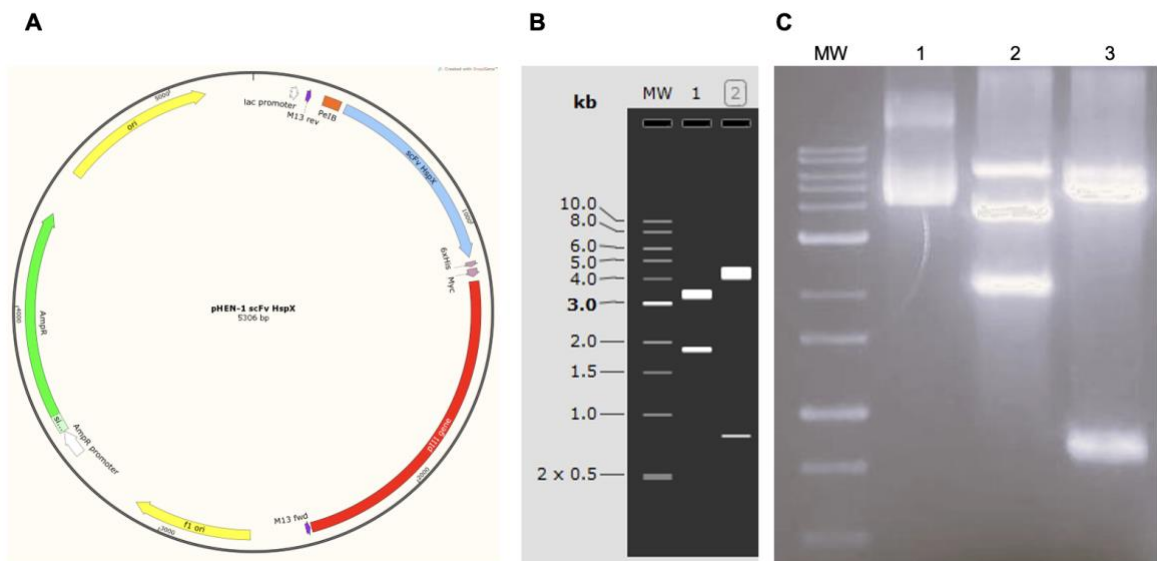


**Figura 9. Purificación del anticuerpo Tb HspX.**

**(A)** SDS-PAGE 12% en condiciones reductoras. El anticuerpo Tb HspX se purificó mediante cromatografía de afinidad por proteína A. **(B)** Inmunodetección del anticuerpo Tb HspX con anti-IgG murino Alexa 790. MW: Prestained Protein Ladder. Carril 1: fracción inicial, carril 2: fracción no unida, carril 3: fracción de elución.

### 1.3. Generación del fragmento scFv HspX

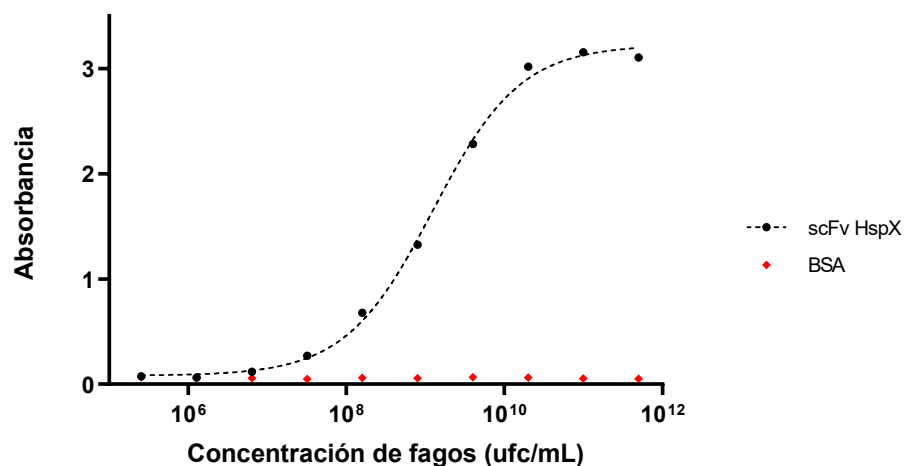
Se obtuvo un fragmento scFv a partir del anticuerpo Tb HspX. Este fragmento se fusionó al dominio C-terminal de la proteína menor de cubierta (P3) del bacteriófago M13, y el casete de expresión completo fue clonado en el vector fagémido pHEN-1-Tryp. El fagémido resultante fue digerido con dos combinaciones de enzimas de restricción: *NdeI* + *NheI* y *Sall* + *NotI*. El análisis de las bandas obtenidas tras la digestión enzimática mostró un patrón que coincidió con la simulación previa realizada en el programa SnapGene®, confirmando la correcta inserción de la secuencia codificante para el fragmento scFv HspX (Figura 10).



**Figura 10. Análisis de restricción del plásmido pHEN-1 scFv HspX.**

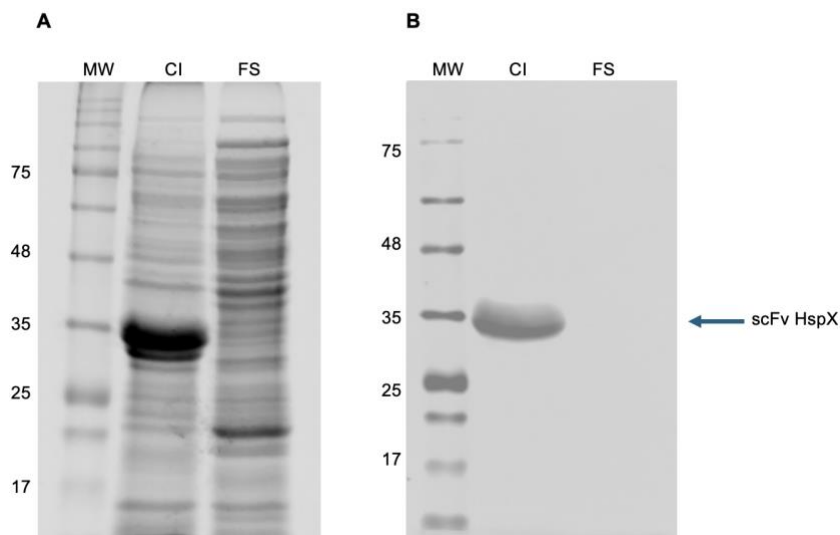
**(A)** Mapa del plásmido pHEN-1 scFv HspX que contiene la secuencia que codifica la proteína de fusión pIII-scFv HspX **(B)** Simulación de la digestión enzimática del plásmido con las enzimas de restricción: NdeI + NheI (1) y Sall + NotI (2) en el programa SnapGene®. **(C)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% MW: 1 Kb DNA Ladder, carril 1: plásmido no digerido, carril 2: plásmido digerido con enzimas NdeI + NheI, carril 3: plásmido digerido con enzimas Sall + NotI.

La coinfección de *E. coli* TG1 con el fagémido y el bacteriófago auxiliar KM13 permitió la expresión del fragmento scFv sobre la superficie del bacteriófago. Este hecho fue corroborado mediante la captura específica de las partículas del fago en presencia del antígeno HspX inmovilizado (Figura 11). Adicionalmente, se intentó producir el fragmento scFv de forma soluble en la cepa *E. coli* BL21 (DE3). Tras la lisis bacteriana, se observó que menos del 1% de la proteína se encontraba de forma soluble, mientras que el resto se acumuló como cuerpos de inclusión (Figura 12). Debido a la baja cantidad de fragmento scFv soluble, no fue posible realizar estudios cristalográficos, los cuales habrían sido de gran utilidad para los ensayos posteriores.



**Figura 11. Unión específica del bacteriófago scFv HspX.**

Diluciones seriadas de bacteriófago scFv HspX se incubaron en los pocillos de placas ELISA previamente recubiertas con el antígeno HspX. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como control negativo.



**Figura 12. Expresión recombinante del fragmento scFv HspX.**

(A) El anticuerpo Tb HspX se expresó como un fragmento de anticuerpo de cadena simple (scFv) en la cepa *E. coli* BL21 (DE3). Tras la inducción con IPTG, las células bacterianas se lisaron en un molino de bolas. (A) La fracción soluble (FS) y los cuerpos de inclusión (CI) se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%. (B) Inmunodetección del fragmento scFv con un anticuerpo murino anti-His TAG. MW: Patrón de peso molecular.

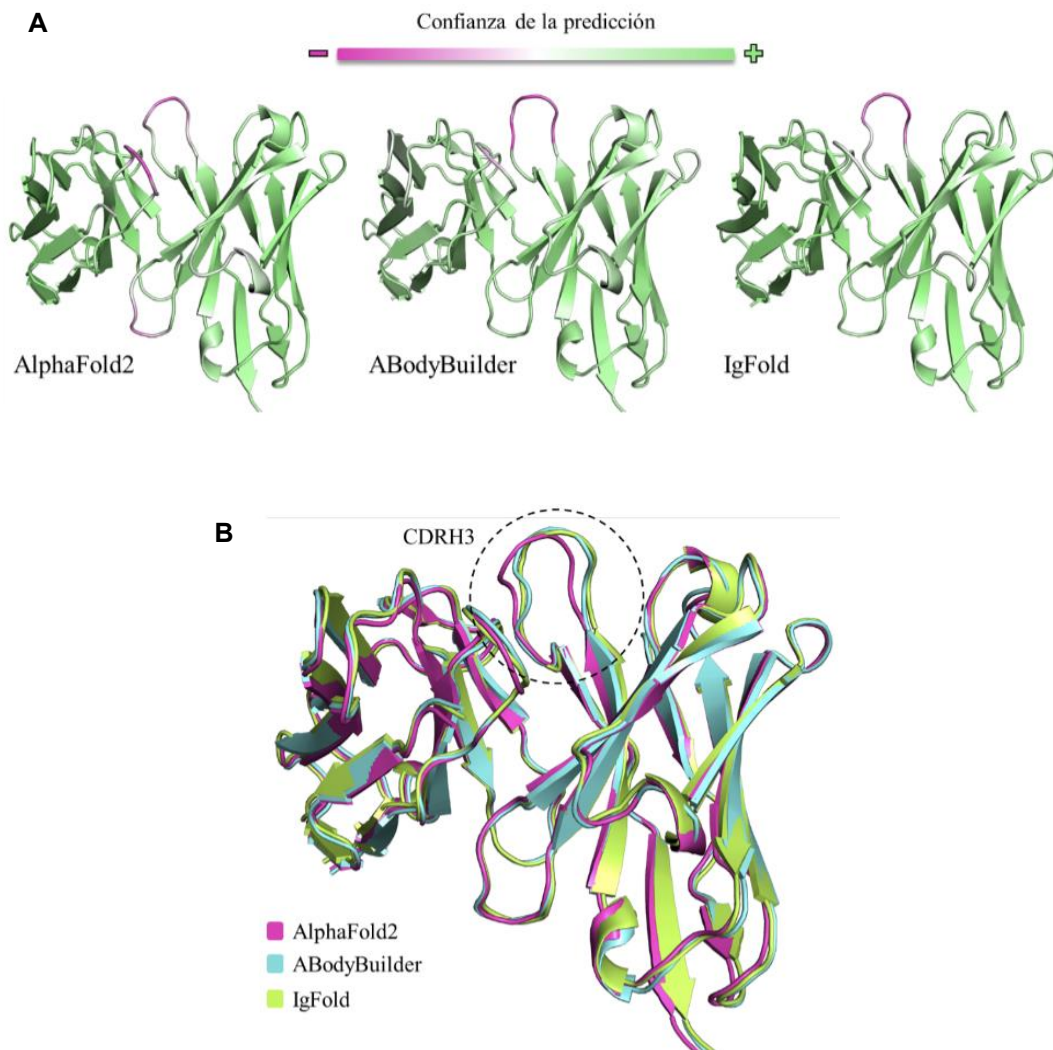
## **Objetivo específico 2. Generar una biblioteca de mutantes de fragmentos scFv mediante la técnica de presentación de proteínas sobre fagos filamentosos.**

### **2.1. Modelamiento informático del fragmento scFv**

Dado la dificultad para obtener suficiente cantidad de anticuerpo scFv HspX para estudios de análisis estructural, se realizó el modelamiento computacional del fragmento scFv HspX utilizando tres de las herramientas más robustas reportadas en la literatura: AlphaFold2 (considerado como el *gold standard* de los programas de modelación de proteínas), ABodyBuilder2 y IgFoldv0.4.0 (ambos son programas específicos para la modelación de anticuerpos basados en inteligencia artificial) (Leem, 2016; Ruffolo et al., 2023). Los modelos obtenidos coinciden estructuralmente con ciertas desviaciones en las regiones CDR, particularmente en el CDR-H3. La variación observada fue mínima, motivo por el que se puede concluir que el modelamiento fue consistente entre los programas. De manera similar, la confianza en la predicción fue alta, principalmente en las regiones *framework*, mientras que el mayor error se focalizó en el CDR-H3 (Figura 13).

Se seleccionó el modelo generado por AlphaFold2 como base para los ensayos experimentales posteriores. Para evaluar la calidad y confiabilidad del modelo estructural del fragmento scFv, se realizaron análisis complementarios considerando la cobertura del alineamiento múltiple de secuencias (MSA), las métricas PAE (*predicted aligned error*) y pLDDT (*predicted local-distance difference test*). El análisis de cobertura del MSA mostró una alta densidad de secuencias homólogas alineadas en la mayoría de las posiciones del modelo, particularmente entre los residuos 10 a ~95, y a partir del ~130 hasta el extremo C-terminal (residuo ~210) (Figura 14A). En estas regiones, más de 2000 secuencias presentaron identidades moderadas a altas con la secuencia del fragmento scFv, lo cual refuerza la confiabilidad de la predicción en las zonas estructuralmente conservadas del fragmento. En contraste, se observó una caída abrupta en la cobertura entre los residuos ~95 y 130, coincidente con una región altamente variable,

presumiblemente correspondiente al CDR-H3, donde la representación en bases de datos es escasa debido a su diversidad natural. Esta disminución puede asociarse a una menor precisión estructural en dicha región.



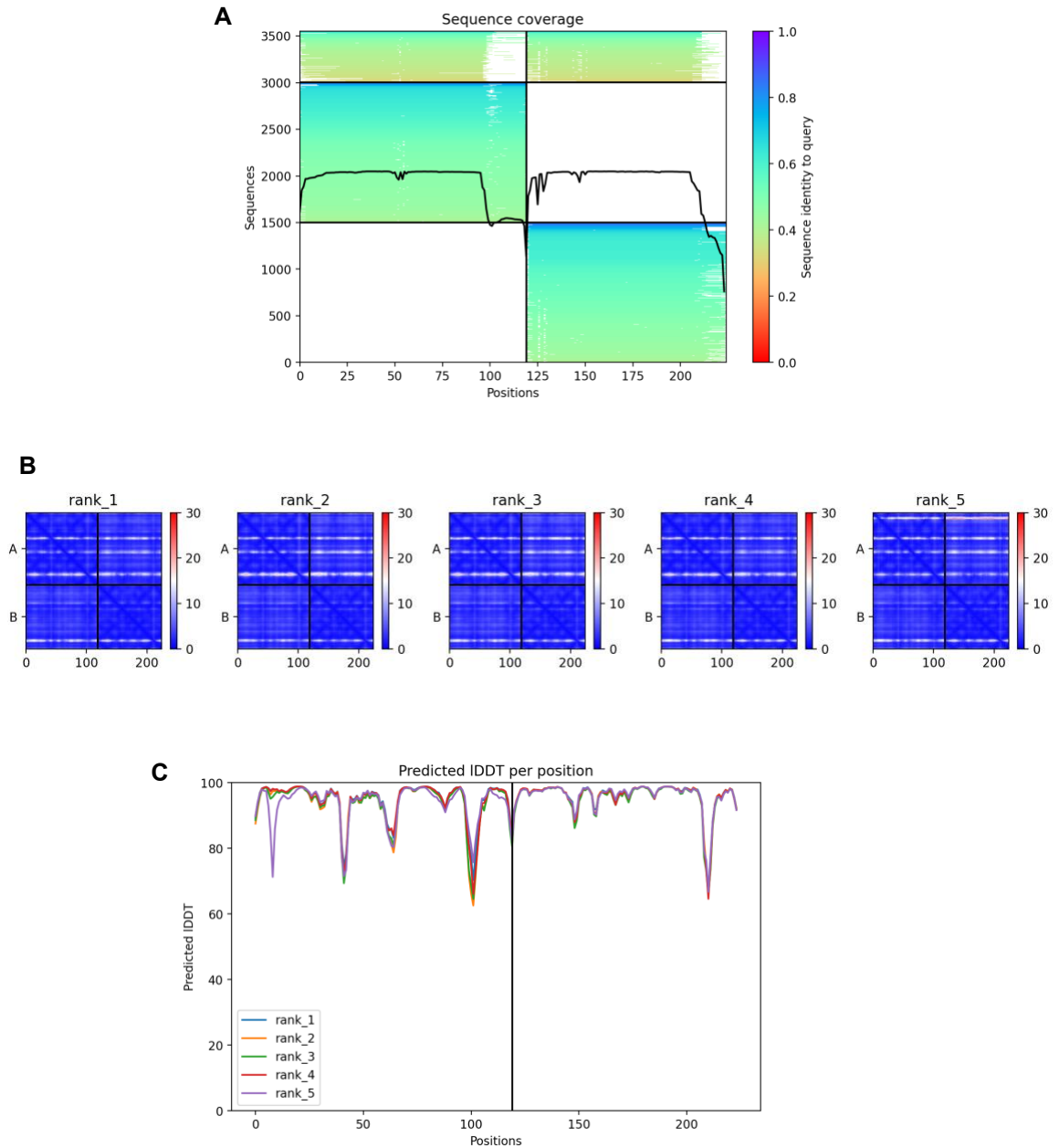
**Figura 13. Modelación del anticuerpo scFv HspX.**

Modelos estructurales generados usando AlphaFold2, ABodyBuilder y IgFold. **(A)** La barra representa la confianza de predicción, donde el magenta y el verde representan la menor y mayor confianza relativa respectivamente, Los modelos se muestran en representación de cintas. A la izquierda se muestra la cadena VL y a la derecha la cadena VH. **(B)** Superposición estructural de los modelos. Los modelos obtenidos coinciden estructuralmente con ciertas desviaciones en las regiones CDR, particularmente en el CDR-H3.

Complementariamente, las matrices PAE de los cinco modelos generados evidenciaron una alta confianza en la predicción de las estructuras internas de cada dominio (VH y VL), con errores bajos (0–10 Å) dentro de las regiones A-A y B-B. No obstante, las regiones A-B y B-A, que representan la interacción entre dominios, presentaron errores predichos superiores (~10–20 Å), indicando una mayor incertidumbre en la orientación relativa entre ambas cadenas. Este resultado es coherente con lo observado típicamente en fragmentos scFv, especialmente en ausencia de restricciones espaciales o datos experimentales que guíen la conformación interdominio (Figura 14B).

Por último, los valores de pLDDT mostraron una predicción altamente confiable a nivel local, con puntuaciones superiores a 90 en la mayoría de los residuos, lo que sugiere una correcta predicción del empaquetamiento interno de las regiones estructurales (Figura 14C). Las disminuciones localizadas en los valores de pLDDT (~60–75) coincidieron con las regiones de menor cobertura en el MSA y mayor error en el PAE, lo que reafirma que estas zonas probablemente corresponden a las regiones CDR que poseen mayor flexibilidad estructural. En conjunto, estos tres análisis demuestran que el modelo generado por AlphaFold2 es estructuralmente confiable en sus regiones *framework* y delimitan con precisión las regiones más flexibles, permitiendo considerar al modelo como una herramienta válida para estudios de afinidad o diseño racional de variantes.

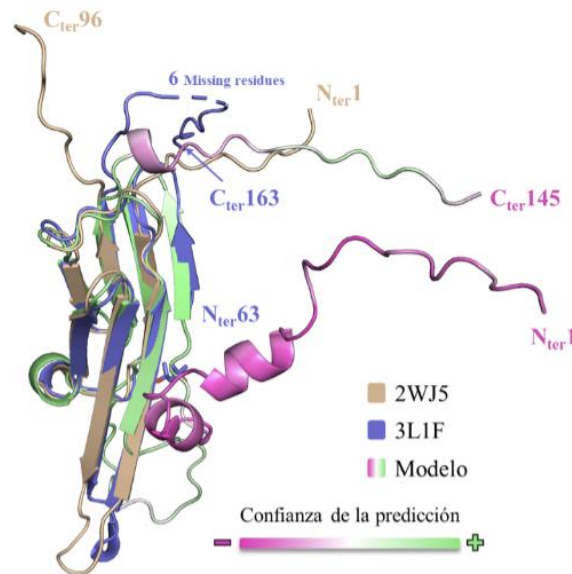
La predicción estructural del antígeno HspX se realizó mediante la herramienta bioinformática AlphaFold2. A pesar del tamaño relativamente pequeño de esta proteína (145 aminoácidos), la modelación no fue precisa (Figura 14). Una búsqueda preliminar de la proteína HspX en distintas especies arrojó varias entradas que mostraban la estructura predicha de forma semiautomática por AlphaFold2 (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P9WMK1/entry#structure>), no obstante, en todos los casos la modelación era deficiente.



**Figura 14. Evaluación de la calidad estructural del modelo scFv predicho por AlphaFold2.**

**(A)** Cobertura del alineamiento múltiple de secuencias (MSA) utilizado por AlphaFold2 para la predicción del modelo scFv. El eje X corresponde a las posiciones del modelo y el eje Y a las secuencias homólogas incluidas en el alineamiento. Los colores indican el grado de identidad con la secuencia consulta, y la línea negra representa la cobertura por posición **(B)** Mapas PAE para los cinco modelos generados. **(C)** Valores pLDDT por posición para los cinco modelos generados. Las puntuaciones superiores a 90 indican una alta confiabilidad estructural local. Las caídas localizadas (valores entre 60 y 75) se concentran en las regiones variables, como los bucles CDR, en especial el CDR-H3, coincidiendo con la baja cobertura MSA y la mayor incertidumbre observada en el PAE.

Curiosamente, la mayoría de las estructuras cristalográficas ortólogas reportadas para otros organismos mostraron problemas similares. Por ejemplo, la AlphaA cristalina bovina (3L1F) y de ratón (2WJ5) presentan consistentemente regiones no plegadas en los extremos C y N terminal (Figura 15).

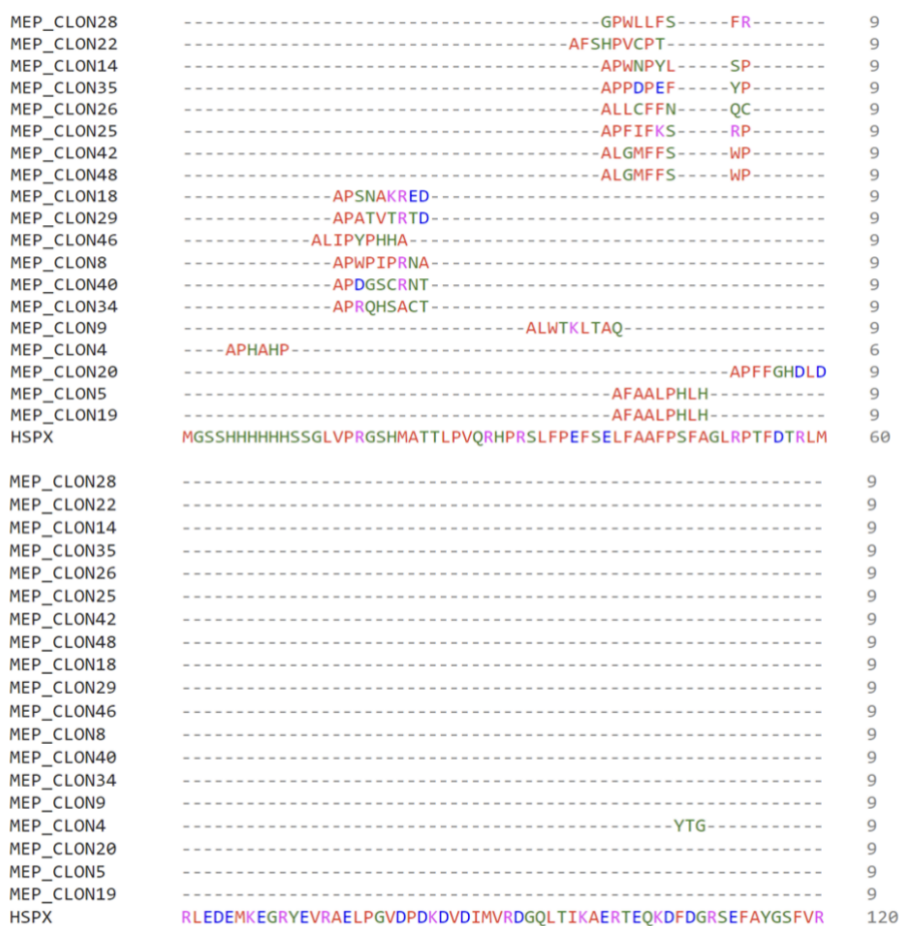


**Figura 15. Modelación del antígeno HspX de MTB.**

Representación de la confianza de predicción del modelo para la proteína HspX de MTB (strain ATCC 25618/H37Rv) a nivel estructural. En la figura se muestra la superposición de la AlphaA cristalina de ratón (2WJ5), bovina (3L1F) y el modelo generado por AlphaFold2. La barra representa la confianza de predicción, donde el magenta y el verde representa la menor y mayor confianza relativa respectivamente.

Con base en este análisis se catalogó el modelo obtenido como aceptable, dado que su confiabilidad a nivel estructural por posición coincide con estructuras cristalográficas similares; sin embargo, los análisis que impliquen la estructura, como la predicción de la interacción antígeno-anticuerpo, usando este modelo pudieran ser cuestionables. Por otra parte, con la finalidad de recabar la mayor información respecto a la unión antígeno-anticuerpo, se realizó un mapeo de epítomos para el antígeno HspX utilizando una biblioteca de péptidos lineales (8 aminoácidos) mediante TPDF. Se obtuvieron 20 secuencias de péptidos que fueron

analizadas mediante alineamiento múltiple con la secuencia de la proteína HspX. Con base en este análisis, se puede deducir que el anticuerpo Tb HspX podría reconocer un epítipo que se sitúa en el extremo N-terminal de la proteína HspX (Figura 16). Dado que modelación del antígeno HspX no fue precisa, particularmente en los extremos N y C-terminal, el análisis de la interacción antígeno-anticuerpo mediante acoplamiento molecular (*docking*) no fue factible.



**Figura 16. Mapeo de epítomos del antígeno HspX de *M. tuberculosis*.**

El mapeo de epítomos se realizó mediante TPDF utilizando una biblioteca de péptidos lineales. Tras 3 rondas de selección, se seccionaron 20 clones que fueron secuenciados y analizados mediante alineamiento múltiple de secuencias con la proteína HspX.

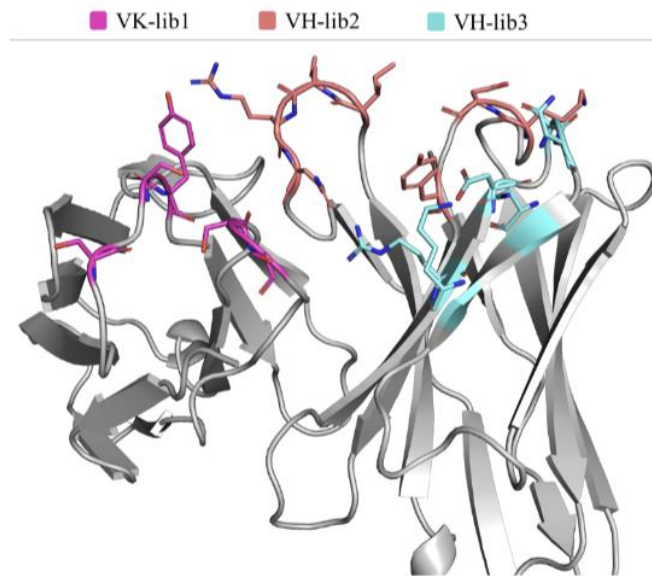
## 2.2. Diversificación de las regiones CDR del fragmento scFv HspX.

La diversidad de las bibliotecas fue generada mediante mutagénesis sitio dirigida empleando la metodología de Kunkel, basada en un esquema de mutagénesis parsimoniosa (PM) según lo descrito por Balint & Larrick, 1993. El primer paso consistió en la selección de los aminoácidos a mutar. Para ello, se identificaron las regiones CDR siguiendo el esquema de numeración de Kabat. A partir del modelo estructural generado por AlphaFold2, se seleccionaron los aminoácidos expuestos cuyas cadenas laterales no apuntaran hacia el interior del anticuerpo. Se seleccionaron un total 18 aminoácidos como dianas de mutagénesis: Lys<sup>30</sup>, Asp<sup>31</sup> y Tyr<sup>33</sup> en el CDR-H1; Arg<sup>50</sup>, Asp<sup>52</sup>, Ala<sup>53</sup>, Asn<sup>54</sup>, Asn<sup>56</sup> y Lys<sup>58</sup> en el CDR-H2; Ile<sup>97</sup>, Leu<sup>98</sup>, Arg<sup>99</sup> y Gn<sup>100</sup> en el CDR-H3; Ser<sup>29</sup>, Ser<sup>31</sup> y Tyr<sup>32</sup> en el CDR-L1; y Ser<sup>92</sup>, Ser<sup>93</sup> del CDR-L3 (Figure 17). Las posiciones degeneradas (aquellas en las que un aminoácido se sustituye por otro) se limitaron a seis, dado que  $20^6 = 6,4 \times 10^7$ . Esto requirió distribuir las dianas de mutagénesis en tres bibliotecas independientes: Vk-Lib1: incluye las regiones CDR-L1 y CDR-L3; VH-Lib2: incluye las regiones CDR-H1 y CDR-H3; y VH-Lib3 que incluye la región CDR-H2.

El segundo paso consistió en la selección de la secuencia de exploración óptima (s). Este parámetro se determinó utilizando la fórmula matemática:

$$F(m, n, s) = \left[ \frac{m!}{n! (m-n)!} \right] \left[ \frac{s}{m} \right]^n \left[ 1 - \left( \frac{s}{m} \right) \right]^{m-n}$$

Donde F es la frecuencia, 'm' es el número total de residuos que serán mutados, 'n' es el número de residuos no parentales y, 's' el número óptimo de residuos explorados simultáneamente. Con base en la distribución de frecuencias obtenida, se estableció un valor de s=2 para cada biblioteca, asegurando que más del 50% de las variantes generadas incorporarán entre 1 y 2 mutaciones (Figura 18).

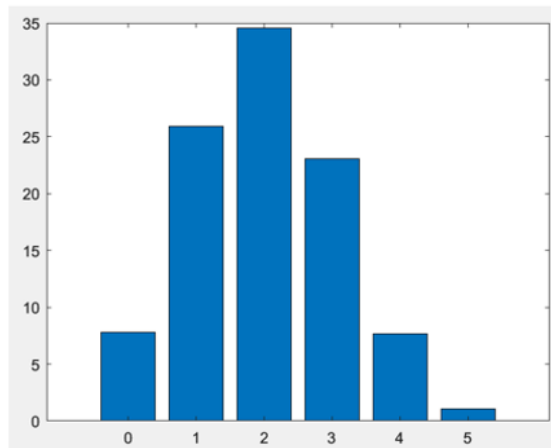


**Figura 17. Visualización estructural de residuos aminoácidos para el diseño de bibliotecas.**

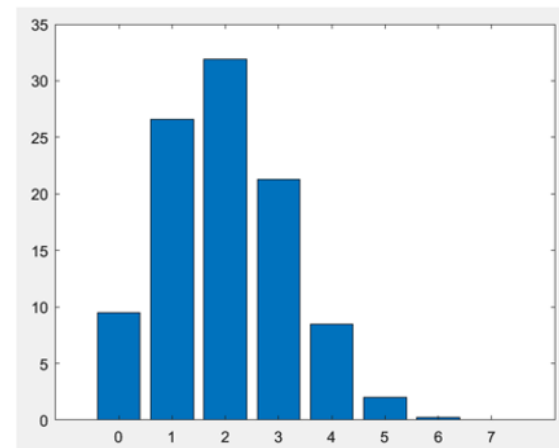
Los aminoácidos de referencia de las posiciones seleccionadas para mutagénesis se representan en palitos con el color representativo de cada biblioteca, mientras el anticuerpo se representa en cintas grises.

Una vez establecido el valor 's', se seleccionaron los codones dopados para los residuos a mutar. Se utilizó el codón NNK, que codifica para los 20 aminoácidos con un 3% de probabilidad de generar un codón de parada. Posteriormente, se diseñó una mezcla de nucleótidos para la síntesis de los oligonucleótidos que serán utilizados en la mutagénesis (Ver Materiales y Métodos, Sección 1.3). Las bibliotecas fueron generadas utilizando el método de Kunkel y, posteriormente, la diversidad de cada una fue evaluada mediante diluciones seriadas (Tonikian et al., 2007). Se obtuvieron tres bibliotecas con los siguientes tamaños:  $1.6 \times 10^6$  clones en Vc-Lib1,  $2 \times 10^7$  clones en VH-Lib2 y  $4 \times 10^7$  clones en VH-Lib3.

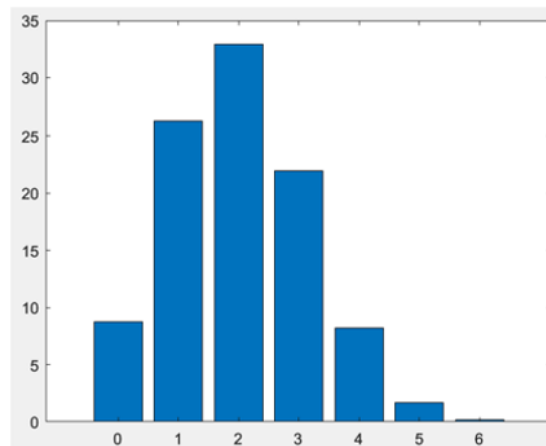
**A. V<sub>k</sub>-Lib1**



**B. V<sub>H</sub>-Lib2**



**C. V<sub>H</sub>-Lib3**



**Figura 18. Distribución de frecuencias de mutaciones en una biblioteca construida con mutagénesis parsimoniosa.**

Cada barra representa el porcentaje de todas las secuencias en la biblioteca que poseen el # de mutaciones indicado en el eje de las abscisas. **(A)** Distribución de frecuencias para un valor  $s=2$  y  $m=5$ . **(B)** Distribución de frecuencias para un valor de  $s=2$  y  $m=7$ . **(C)** Distribución de frecuencias para un valor  $s=2$  y  $m=6$ . Los histogramas fueron generados utilizando un *script* en el programa Matlab.

### **Objetivo específico 3: Obtener un fragmento scFv de afinidad mejorada por el antígeno HspX de *Mycobacterium tuberculosis*.**

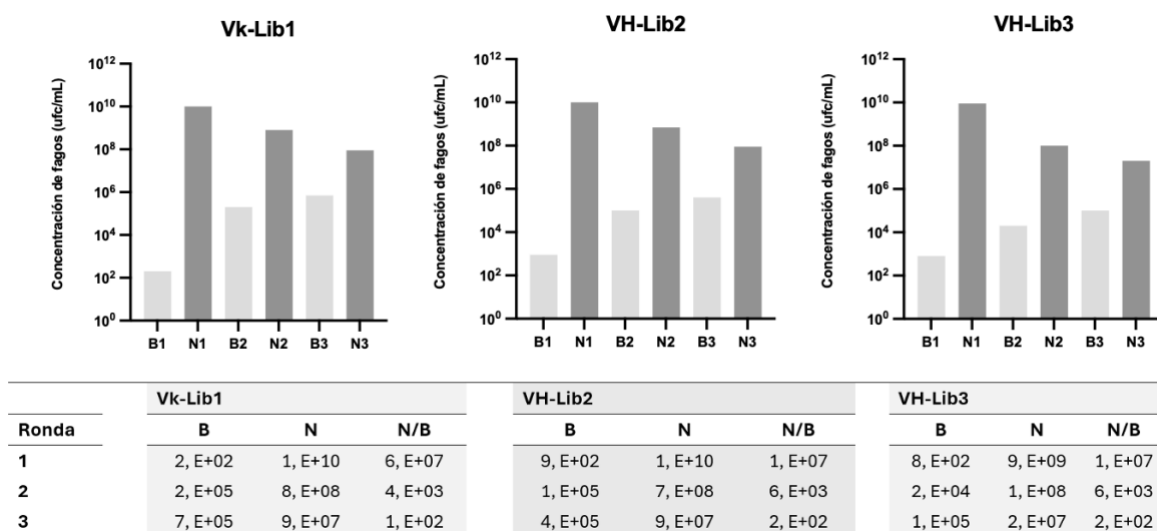
#### **3.1. Selección de anticuerpos con afinidad mejorada.**

Cada biblioteca se sometió a tres rondas de selección contra el antígeno HspX, con el objetivo de aislar las variantes con mayor afinidad. El proceso inició con la incubación de la biblioteca con el antígeno inmovilizado. Los fagos que desplegaban variantes de baja afinidad fueron descartados a través de múltiples rondas de lavado, seguido de una incubación con una solución de TEA. Posteriormente, los fagos que permanecieron unidos al antígeno inmovilizado fueron eluidos utilizando una solución de tripsina y se amplificaron mediante infección en *E. coli* TG1. Este esquema de selección permitió enriquecer la población de fagos con variantes de alta afinidad hacia el antígeno.

Durante cada ronda de selección se determinó el título viral de las fracciones no unida (N) y unida (B). El proceso de selección se consideró exitoso cuando la relación N/B alcanzó un orden de magnitud  $10^2$ . Tras completar las rondas de selección, la unión específica de clones individuales al antígeno fue evaluado mediante ELISA. Los potenciales clones con afinidad mejorada se definieron como aquellos que mostraron una señal ELISA al menos cinco veces mayor en placas recubiertas con antígeno en comparación con aquellas recubiertas con BSA. Las tres bibliotecas demostraron ser efectivas en la generación de potenciales ligandos contra el antígeno HspX con porcentajes que oscilaron entre el 31 % y el 61 % (Figura 19).

En la ronda final de selección de cada biblioteca, se aislaron 60 clones, cuya afinidad fue evaluada mediante ELISA competitivo. Para cada clon, los fagos se incubaron con una solución 100 nM de HspX para establecer un equilibrio en la interacción entre los scFv desplegados en los fagos y el antígeno. Posteriormente, estas mezclas se transfirieron a placas recubiertas con antígeno para capturar los

fagos que no interaccionaron con el HspX en solución. Comparando la captura de los fagos en presencia y ausencia del antígeno en solución, se clasificaron los clones según sus afinidades relativas (Figura 20). Este ensayo sirvió como un filtro preliminar, permitiendo una estimación rápida de las afinidades dentro de una población amplia de muestras. Con base en estos resultados, se seleccionaron clones que mostraron una relación:  $A_{492} \text{ 100 nM HspX}/A_{492} \text{ sin HspX}$ , menor en comparación con el scFv parental.

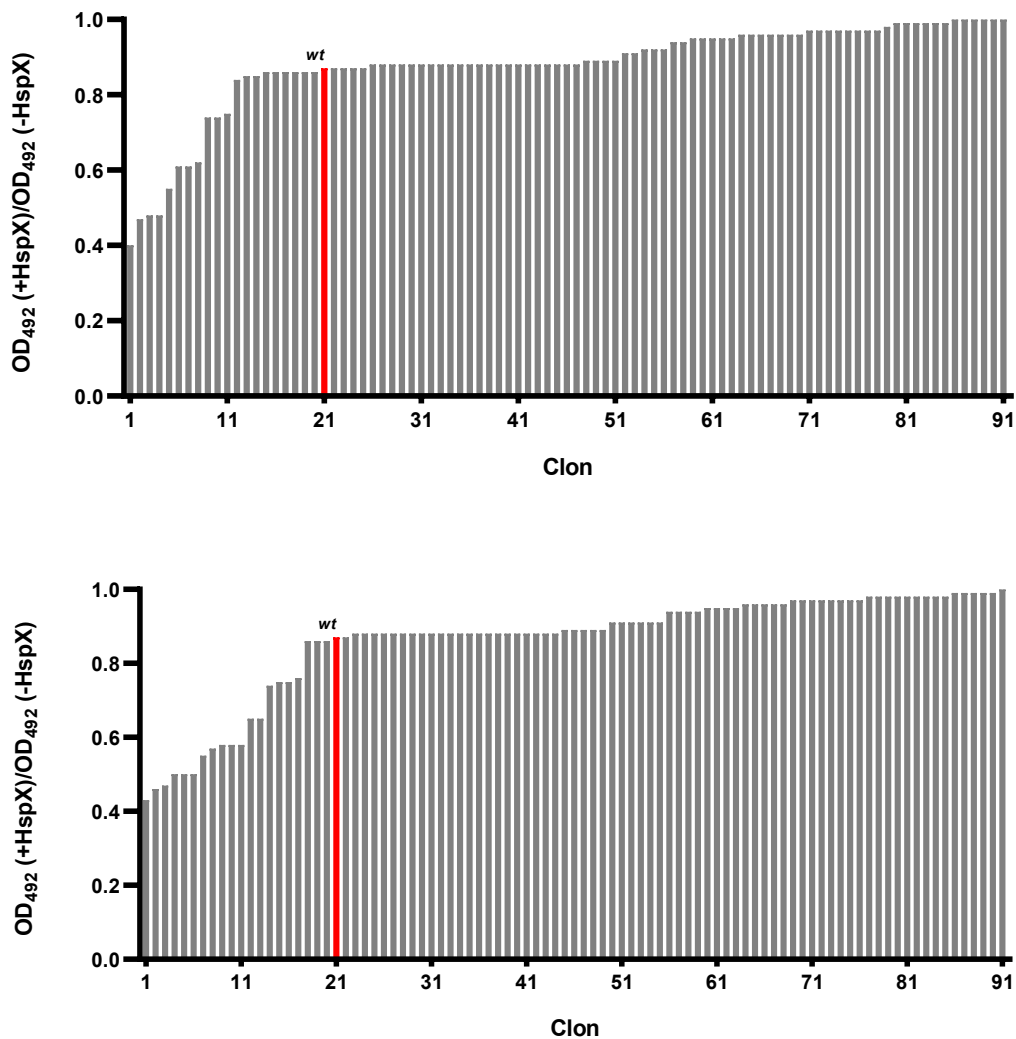


**Figura 19. Selección de variantes del anticuerpo scFv HspX de afinidad mejorada.**

Se realizaron 3 rondas de selección con cada biblioteca. Los fagos que despliegan las distintas variantes del fragmento scFv HspX se incubaron con el antígeno inmovilizado en una placa ELISA. Los fagos unidos al antígeno inmovilizado fueron eluidos con una solución de Tripsina. Se determinó el título viral de la fracción de fagos no unida (N) y la fracción unida (B) mediante infección en *E. coli* TG1. Como criterio para finalizar el proceso de selección se estableció como límite que la relación N/B no supere el orden de  $10^2$ .

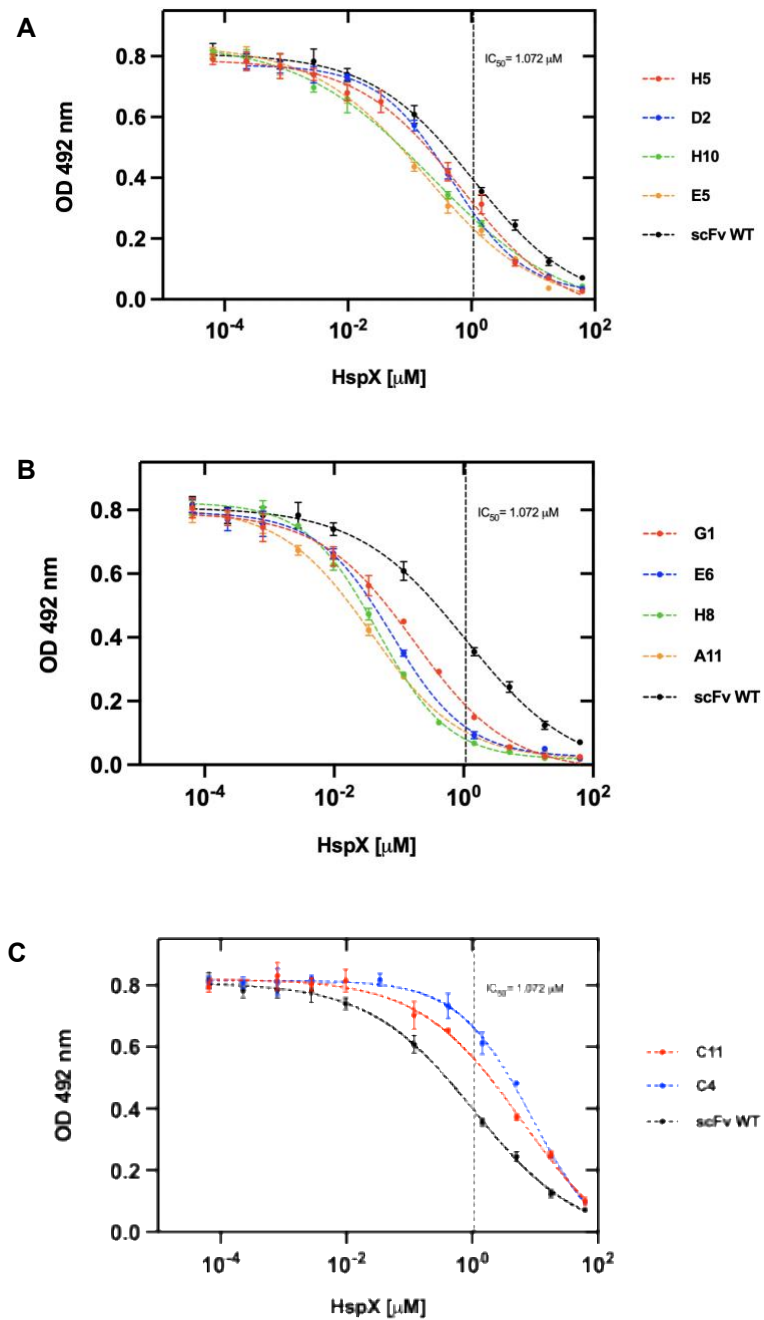
La secuenciación de estos clones reveló sustituciones en ocho de dieciocho posiciones seleccionadas (aproximadamente 44%), distribuidas en todos los CDRs sometidos a mutagénesis, con la excepción del CDR-H3 (Tabla 5). La mayoría de las sustituciones identificadas fueron simples o dobles, mientras que solo se detectó una sustitución triple en la cadena VL. En total, se identificaron ocho secuencias

únicas, cuyas afinidades se determinaron mediante un ensayo ELISA competitivo, calculando los valores de IC50 (Figura 21).



**Figura 20. High-throughput ELISA para estimar las afinidades de las variantes scFv.**

El eje *x* muestra el número de clones. El eje *y* muestra la relación entre la señal ELISA del fago ( $A_{492}$ ) en presencia de 100 nM HspX (+HspX) y en ausencia de HspX en fase de solución (-HspX). La barra roja representa el scFv sin sustituciones (*wt*). Los clones con una relación de señal ELISA inferior al *wt* se seleccionaron para análisis posteriores.



**Figura 21. Estimación de la afinidad de las variantes scFv HspX.**

Se estimaron las afinidades de unión de diez clones únicos mediante ELISA. Las afinidades de las variantes se determinaron como valores  $\text{IC}_{50}$  definidos como la concentración de antígeno HspX que bloqueaba el 50% de la unión del fago al antígeno inmovilizado. **(A, B)** Curvas  $\text{IC}_{50}$  de clones que muestran una mayor afinidad de unión en comparación al anticuerpo scFv sin mutaciones **(C)** Curvas  $\text{IC}_{50}$  de clones con afinidad reducida en comparación con el anticuerpo scFv sin mutaciones.

Este formato de ensayo facilitó la evaluación de las distintas variantes scFv identificadas tras la secuenciación Sanger. Aunque los ensayos de competición con fagos no proporcionan una medición directa de las constantes de afinidad debido a los niveles desconocidos de presentación de los fragmentos scFv en la superficie del fago, el método utilizado proporcionó un acceso rápido a las afinidades relativas. La mejora más significativa se observó en el CDR-H2, donde dos sustituciones específicas: Lys<sup>50</sup> y Gln<sup>59</sup>, dieron lugar a un aumento en la afinidad de 28 veces con respecto al fragmento scFv parental (Tabla 5).

**Tabla 5. Medición de la afinidad de las variantes scFv.**

La afinidad se estimó como un valor IC<sub>50</sub> mediante ELISA competitivo. ↑ indica incremento respecto al scFv parental (WT). ↓ indica disminución respecto al scFv parental.

Clon	IC <sub>50</sub> (μM)	Variación respecto al WT	Mutaciones	Región CDR
WT	1.072	-		
H5	0.684	↑ 1.6x	Lys <sup>30</sup> →Gln	CDR-H1
D2	0.474	↑ 2.3x	Ser <sup>93</sup> →Gly	CDR-L3
H10	0.238	↑ 4.5x	Ser <sup>29</sup> →Arg, Ser <sup>93</sup> →Gly	CDR-L1/L3
E5	0.180	↑ 5.8x	Ser <sup>31</sup> →Arg, Ser <sup>92</sup> →Gly, Ser <sup>93</sup> →Gly	CDR-L1/L3
G1	0.173	↑ 6.2x	Asn <sup>57</sup> →Asp	CDR-H2
E6	0.078	↑ 13.7x	Asn <sup>57</sup> →Lys	CDR-H2
H8	0.047	↑ 22.9x	Lys <sup>58</sup> →Gln	CDR-H2
A11	0.037	↑ 28.6x	Arg <sup>50</sup> →Lys, Lys <sup>58</sup> →Gln	CDR-H2
C11	6.517	↓ 6.08x	Ile <sup>97</sup> →Phe	CDR-H3
C4	9.047	↓ 8.44x	Ile <sup>97</sup> →Thr	CDR-H3

Adicionalmente, se seleccionaron y secuenciaron aleatoriamente cinco clones que mostraron una relación: A<sub>492</sub> 100 nM HspX/A<sub>492</sub> sin HspX, mayor en comparación con el scFv sin mutaciones. Dos clones únicos, C4 y C11, cada uno con una única mutación en Ile<sup>97</sup> dentro del CDR-H3 mostraron una disminución de

afinidad de ocho y seis veces, respectivamente (Tabla 5). Todas las curvas IC<sub>50</sub> se ajustaron a un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL), con valores R<sup>2</sup> superiores a 0,99 y valores p de falta de ajuste no significativos, lo que confirma el excelente rendimiento del modelo (Tabla 6).

**Tabla 6. Resumen estadístico del ajuste del modelo.**

Las curvas IC<sub>50</sub> se ajustaron a un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL). IC: intervalo de confianza, DE: Desviación estándar, R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación.

Clon	95% IC	DE	R <sup>2</sup>	Falta de ajuste (p-value)	¿Modelo adecuado?
WT	0.727–1.582	0.023	0.9946	0.6173	Si
H5	0.454–1.031	0.026	0.991	0.0597	Si
D2	0.396–0.567	0.017	0.9971	0.3229	Si
H10	0.153–0.371	0.022	0.9949	0.3908	Si
E5	0.135–0.240	0.021	0.995	0.1068	Si
G1	0.137–0.218	0.023	0.9938	0.1156	Si
E6	0.063–0.097	0.021	0.9957	0.1387	Si
H8	0.042–0.051	0.013	0.9983	0.1149	Si
A11	0.032–0.043	0.013	0.9982	0.1194	Si
C11	2.578-15.71	0.027	0.9890	0.1435	Si
C4	5.56-14.73	0.025	0.9913	0.4239	Si

### 3.2. Análisis de secuenciación profunda post-selección.

Tras el proceso de selección, las bibliotecas de scFv fueron analizadas mediante secuenciación masiva (Illumina). Los datos obtenidos por NGS permitieron examinar en detalle la evolución de la frecuencia relativa de cada clon identificado previamente, a lo largo de las rondas de selección. En todas las bibliotecas y en cada ronda de selección, el scFv parental mantuvo de forma consistente una frecuencia elevada, entre ~50 y 65%, superando a la mayoría de las variantes derivadas (Tabla 7).

**Tabla 7. Resumen de los datos de secuenciación profunda de las bibliotecas post-selección.**

Las secuencias nucleotídicas se tradujeron con la librería Biopython para evaluar la frecuencia de mutación en cada biblioteca post-selección. Se utilizó una tabla de uso de codones que incluía el codón de parada ámbar (TAG).

<b>Biblioteca</b>	<b>Secuencias aminoacídicas totales</b>	<b>Secuencias aminoacídicas únicas</b>	<b>Secuencias sin mutaciones</b>	<b>Secuencias con 1 mutación</b>	<b>Secuencias con 2 mutaciones</b>
1 <sup>ra</sup> ronda Vk-Lib1	417390	11167	241426	124380	37027
2 <sup>da</sup> ronda Vk-Lib1	492340	10652	288885	150959	39934
3 <sup>ra</sup> ronda Vk-Lib1	614448	12925	328610	206168	60525
1 <sup>ra</sup> ronda VH-Lib2	125550	5384	80932	30840	9615
2 <sup>da</sup> ronda VH-Lib2	420260	10440	254881	120089	34991
3 <sup>ra</sup> ronda VH-Lib2	307989	8401	192273	68848	21059
1 <sup>ra</sup> ronda VH-Lib3	289761	5452	161565	108895	12148
2 <sup>da</sup> ronda VH-Lib3	360946	6204	199845	136358	12934
3 <sup>ra</sup> ronda VH-Lib3	261461	5924	136817	97888	11610

<b>Biblioteca</b>	<b>Secuencias con 3 mutaciones</b>	<b>Secuencias con 4 mutaciones</b>	<b>Secuencias con 5 mutaciones</b>	<b>Secuencias con más de 5 mutaciones</b>
1 <sup>ra</sup> ronda Vk-Lib1	8479	1427	235	4416
2 <sup>da</sup> ronda Vk-Lib1	8525	1199	171	2667
3 <sup>ra</sup> ronda Vk-Lib1	13944	1855	321	3025
1 <sup>ra</sup> ronda VH-Lib2	2128	436	74	1525
2 <sup>da</sup> ronda VH-Lib2	4988	717	144	4450
3 <sup>ra</sup> ronda VH-Lib2	2989	459	85	22276
1 <sup>ra</sup> ronda VH-Lib3	5119	591	121	1322
2 <sup>da</sup> ronda VH-Lib3	9200	856	137	1616
3 <sup>ra</sup> ronda VH-Lib3	12105	1003	113	1925

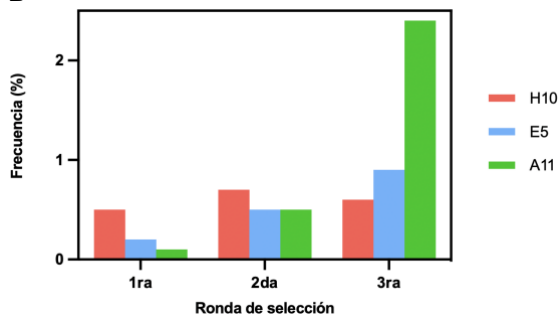
En la biblioteca Vk-Lib1, todos los clones identificados por secuenciación de Sanger: D2, E5 y H10, mostraron un aumento en su frecuencia a lo largo del proceso de selección; sin embargo, ninguno de estos clones representaba la variante más abundante. En particular, la frecuencia combinada de E5 y H10 apenas superaba el 1%, lo que las convertía en las variantes menos representadas (Figura 22C, 22C). La variante más frecuente exhibió una sustitución Ser<sup>29</sup>→Pro, que no se identificó mediante el cribado tradicional de colonias. Una tendencia similar se observó en la biblioteca VH-Lib2. El clon H5 mostró un aumento progresivo en su frecuencia y se convirtió en la variante más prevalente tanto en la segunda como en la tercera ronda. Por el contrario, la variante con Ile<sup>96</sup>→Met fue la más frecuente en la primera ronda, pero su abundancia disminuyó en las rondas posteriores (Figura 22A). En la biblioteca VH-Lib3, el clon E6 fue la variante más abundante en las tres rondas de selección, pero su frecuencia disminuyó a lo largo del proceso. Se observó una tendencia decreciente similar para el clon G1 (Figura 22C).

El clon H8 mostró el enriquecimiento más destacado a lo largo del proceso de selección, incrementando su frecuencia desde un 1.4 % en la primera ronda hasta un 27.2 % en la tercera. Esta variante correspondió, además, a la segunda con mejor afinidad dentro de los clones previamente identificados. En contraste, el clon A11, que presentó la mayor mejora en afinidad respecto al fragmento scFv parental, se mantuvo entre los menos abundantes durante todo el proceso, con una frecuencia inferior al 1 % en la ronda inicial y alcanzando solo un 2.4 % en la ronda final. Para cada CDR, se calculó el Z-score de los veinte aminoácidos y codones de parada de la última ronda de selección de cada biblioteca. El mapa de calor ilustra el “enriquecimiento” de aminoácidos en las posiciones sometidas a mutagénesis de cada CDR (Figura 23).

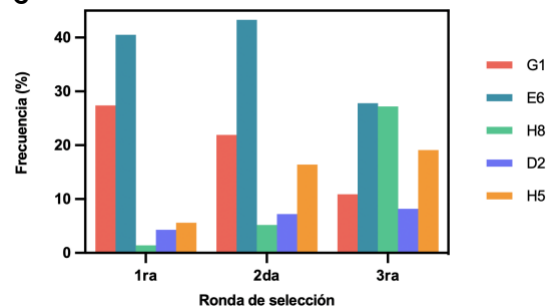
**A**

Ronda de selección	Vk-Lib1		VH-Lib2		VH-Lib3	
	Clon	Frecuencia (%)	Clon	Frecuencia (%)	Clon	Frecuencia (%)
1	*Ser <sup>29</sup> →Pro	11.4	*Ile <sup>97</sup> →Met	6.3	*Asn <sup>54</sup> →Lys	40.5
	D2	4.3	H5	5.6	G1	27.4
	E5	0.5			E6	40.5
	H10	0.2			H8	1.4
					A11	0.1
2	*Ser <sup>29</sup> →Pro	17.4	*Lys <sup>30</sup> →Gln	16.4	*Asn <sup>54</sup> →Lys	43.3
	D2	7.2	H5	16.4	G1	21.9
	E5	0.7			E6	43.3
	H10	0.5			H8	5.2
					A11	0.5
3	*Ser <sup>29</sup> →Pro	19.8	*Lys <sup>30</sup> →Gln	19.1	*Asn <sup>54</sup> →Lys	27.8
	D2	8.2	H5	19.1	G1	10.9
	E5	0.6			E6	27.8
	H10	0.9			H8	27.2
					A11	2.4

**B**



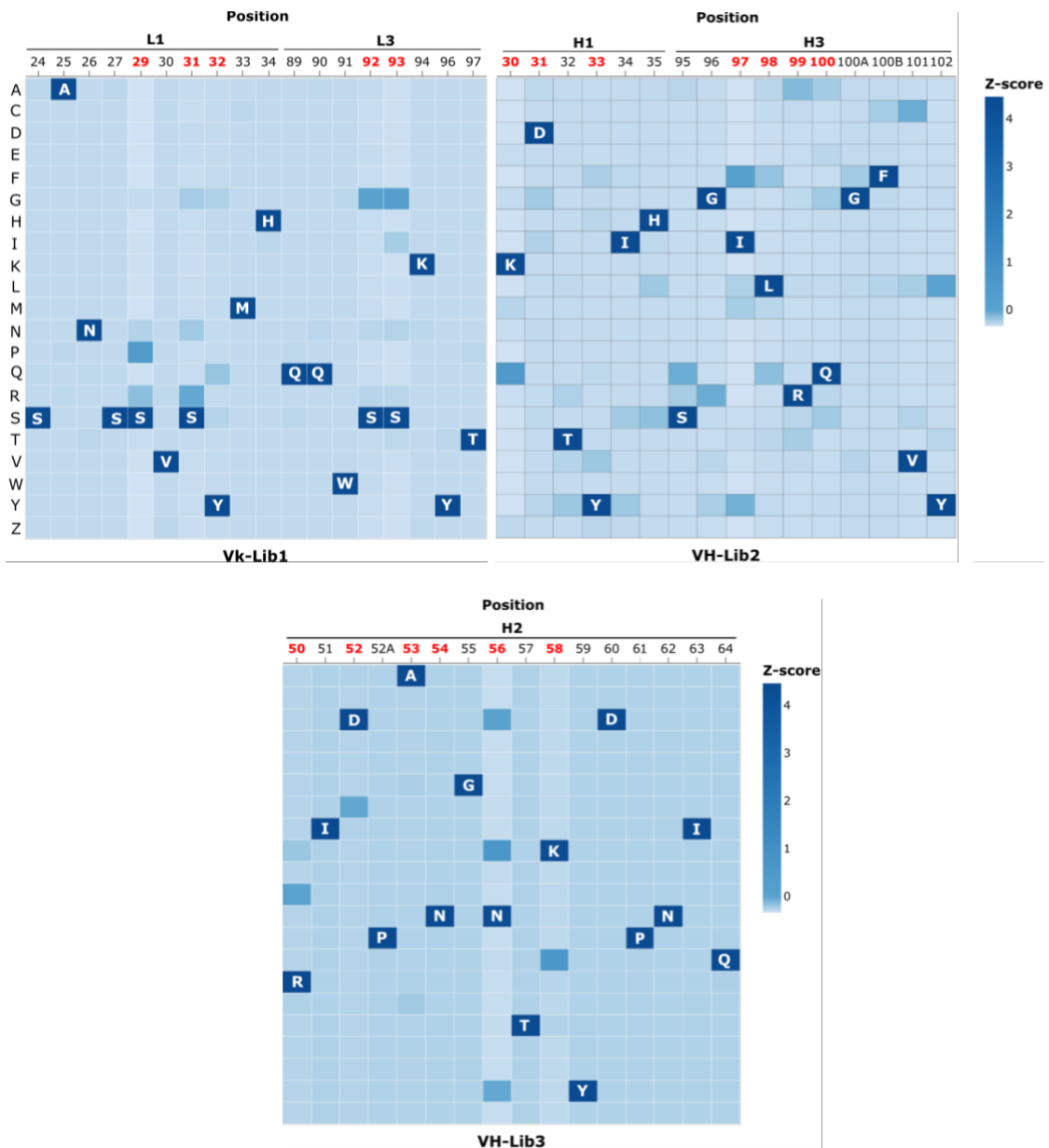
**C**



**Figura 22. Análisis de secuenciación profunda post-selección.**

Los paneles **A**, **B** y **C** muestran la dinámica de frecuencia de los clones de scFv, identificados previamente por secuenciación Sanger, que mostraron un aumento en la afinidad de unión a lo largo del proceso de selección. La frecuencia se calculó como la proporción de cada variante en relación con el número total de secuencias scFv no parentales. Los asteriscos (\*) indican la variante scFv más abundante en cada ronda.

En cada posición, los aminoácidos parentales se observaron con mayor frecuencia (aproximadamente 80%). Este resultado es coherente con el diseño de nuestras bibliotecas, destinadas a «escanear» la superficie del antígeno minimizando las interrupciones de la complementariedad y las interacciones críticas de alta afinidad. En general, el perfil de sustitución de aminoácidos concordaba con los datos de secuenciación Sanger, no obstante, se observaron nuevas sustituciones que no fueron detectadas por el método de cribado convencional. En los CDR-L1 y CDR-L3, Pro<sup>29</sup> y Arg<sup>29</sup> fueron las sustituciones más frecuentes: 6% y 4%, respectivamente. Otras sustituciones, como Asn<sup>29</sup>, Asn<sup>31</sup>, Gly<sup>31</sup> y Gln<sup>32</sup> se detectaron con frecuencias superiores al 1%. Las sustituciones con frecuencias menores al 1% no fueron analizadas. En los CDR-H1 y CDR-H3, las sustituciones Phe<sup>97</sup> y Tyr<sup>9</sup> fueron predominantes: 4% y 2%, respectivamente. Estas sustituciones impactaron negativamente en la afinidad, reduciéndola en 6,08 veces. Curiosamente, la sustitución Thr<sup>97</sup>, que también reducía la afinidad, tenía una frecuencia inferior al 1%. Además, se observaron sustituciones en posiciones que no fueron sometidas a mutagénesis, con frecuencias comparables a las de las posiciones diana. Esto podría deberse a errores de alineación o a artefactos relacionados con la polimerasa durante la síntesis de la biblioteca. En el CDR-H2, la sustitución Met<sup>50</sup> fue más frecuente (2%) que Lys<sup>50</sup> (0,74%), esta última encontrada mediante secuenciación Sanger. Es importante resaltar que la sustitución Lys<sup>50</sup>, combinada con la sustitución Gln<sup>58</sup>, generó la variante con el mayor incremento en la afinidad. En la posición Asn<sup>56</sup>, las sustituciones predominantes fueron Tyr, Asp y Lys, mientras que en la posición Asp<sup>52</sup> se observó una sustitución por histidina. Aún queda por evaluar el impacto de estas nuevas mutaciones en la afinidad de unión para determinar cualquier correlación entre la frecuencia de mutación y sus efectos sobre la afinidad. Este análisis quedó fuera del alcance del proyecto de tesis.



**Figura 23. Mapa de calor de los valores Z-score de los aminoácidos.**

Los valores Z-score de todas las sustituciones de aminoácidos individuales se calcularon a partir de las secuencias funcionales de las bibliotecas seleccionadas mediante la fórmula  $(X-\mu)/\sigma$ . Las filas representan la posición del aminoácido dentro de la CDR. Los aminoácidos sometidos a mutagénesis están marcados en rojo. Las columnas representan los aminoácidos listados en código de una sola letra, donde Z representa un codón de parada. Los residuos CDR de tipo salvaje en el anticuerpo scFv HspX están resaltados en rojo.

## V. DISCUSIÓN

La tecnología de presentación sobre fagos filamentosos (TPFF) se ha utilizado ampliamente en la ingeniería de anticuerpos, facilitando el desarrollo de variantes de alta afinidad a través de un proceso de optimización gradual que implica mutaciones en las regiones CDR que mejoran las interacciones antígeno-anticuerpo (Almagro et al., 2019; Davydova, 2022). En este proyecto de tesis describimos una estrategia racional, paso a paso, para mejorar la afinidad de unión de un anticuerpo murino contra el antígeno HspX derivado de MTB utilizando TPFF. En primera instancia, el anticuerpo Tb HspX fue convertido en un fragmento scFv. Posteriormente, se construyeron bibliotecas mutantes para diversificar las regiones CDR del fragmento scFv HspX empleando el método de Kunkel. A continuación, estas bibliotecas se sometieron a múltiples rondas de selección para identificar variantes con mayor afinidad por el antígeno HspX. Por último, se utilizaron técnicas de secuenciación del ADN para identificar las sustituciones específicas responsables de la mejora de la afinidad.

Frente a la ausencia de datos estructurales, determinar qué aminoácidos deben ser sometidos a mutagénesis es una limitante importante. Normalmente, entre 15 y 22 aminoácidos del sitio de unión de un anticuerpo interactúan con un número similar de residuos del antígeno. Sin embargo, estudios que implican cálculos de energía libre y análisis mutacionales muestran que sólo una pequeña parte de los residuos en contacto contribuyen a la mayor parte de la energía de unión (Chong et al., 1999; Novotny et al., 1997; Novotny et al., 1989; Schwarz et al., 1995). En algunos casos, pueden producirse interacciones repulsivas, incurriendo en una penalización energética (Lafont et al., 2007). Por lo tanto, la afinidad de unión de un anticuerpo podría mejorarse sustituyendo los contactos de baja afinidad o repulsivos al tiempo que se conservan los pocos aminoácidos que contribuyen en mayoría a la energía de unión. La mutagénesis tradicional suele

descartar los contactos parentales e introduce múltiples mutaciones por anticuerpo, creando probablemente numerosas variantes no funcionales (Burks et al., 1997).

En este proyecto, utilizamos la metodología de mutagénesis parsimoniosa (PM) para limitar el número de aminoácidos manteniendo las características estructurales parentales. Este enfoque utiliza codones dopados para garantizar que alrededor del 50% de los aminoácidos en cada posición sometida a mutagénesis permanezcan del tipo parental. Esta estrategia ofrece varias ventajas. En primer lugar, se reduce el número total de sustituciones por anticuerpo, lo que da lugar a un mayor número de variantes con plegamiento correcto y funcionales en la biblioteca. En segundo lugar, si un aminoácido sujeto a mutagénesis es crucial para la unión, los métodos de mutagénesis convencionales suelen sustituirlo por uno de los otros 20 aminoácidos, lo que da lugar a una biblioteca en la que el 95% de los clones son inactivos. En el caso que dos residuos críticos sean mutados, el 99,75% de los clones de la biblioteca podrían ser inactivos. En cambio, la mutagénesis parsimoniosa conserva los aminoácidos de tipo parental en aproximadamente el 50% de los clones para una sola mutación y en el 25% para dos mutaciones. Esto aumenta la probabilidad de identificar las sustituciones que conducen a un mejoramiento de la afinidad. Las estructuras no viables se minimizan utilizando mezclas de nucleótidos no equimolares que favorecen la frecuencia del aminoácido parental y aprovechan la tendencia del código genético a preferir los cambios de aminoácidos química o estéricamente conservadores (Balint & Larrick, 1993; Schier et al., 1996).

Se optó por este enfoque para mejorar la afinidad del fragmento scFv HspX mediante la incorporación de mutaciones aleatorias en determinadas posiciones, guiadas por el modelado molecular y TPDF. La estructura de un anticuerpo es muy conservada, e incluso puede predecirse el plegamiento de sus regiones hipervariables a partir de su secuencia primaria (Polonsky et al., 2023; Yin & Pierce, 2024). El modelado del fragmento de anticuerpo se centró en identificar los

aminoácidos expuestos hacia el solvente cuyas cadenas laterales probablemente interactúen con el antígeno. Con la ayuda del programa AlphaFold2, identificamos dieciocho posiciones dentro de las regiones CDR, excepto en el CDR-L2, para el proceso de mutagénesis. Las razones para excluir el CDR-L2 fueron dos: en primer lugar, los análisis estructurales de los complejos antígeno-anticuerpo muestran sistemáticamente que el CDR-L2 es el más corto y el menos diverso de los CDR; en segundo lugar, su contribución a la energía de unión suele ser mínima en comparación con otros *loops*, en particular el CDR-H2 y el CDR-H3 (Qu et al., 2021). Las sustituciones se distribuyeron en tres bibliotecas: Vk-Lib1, VH-Lib2 y VH-Lib3. Mediante clonación y electroporación, construimos tres bibliotecas que contenían  $1,6 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$  y  $4 \times 10^7$  clones, respectivamente. En general, los procesos de selección tuvieron éxito y permitieron descubrir variantes con afinidad mejorada en cada biblioteca. La secuenciación del ADN de estos clones reveló ocho secuencias únicas. Las mediciones de IC50 posteriores mostraron mejoras en la afinidad en todas las variantes seleccionadas. La variante con el mejor valor IC50 de 37 nM presentaba dos sustituciones: Lys<sup>50</sup> y Glu<sup>58</sup>, lo que reflejó un aumento de 28,14 veces. De las dieciocho posiciones sometidas a mutagénesis, sólo ocho influyeron positivamente en la afinidad del anticuerpo: Lys<sup>30</sup>, Asn<sup>57</sup>, Arg<sup>50</sup>, Lys<sup>58</sup>, Ser<sup>29</sup>, Ser<sup>31</sup>, Ser<sup>92</sup> y Ser<sup>93</sup>. Esto indica que los residuos restantes, en particular los de la región CDR3, podrían tener funciones estructurales esenciales en el reconocimiento del antígeno, ya que ninguna sustitución en esta zona mejoró la afinidad. Las sustituciones identificadas incluyen aminoácidos con cadenas laterales cargadas eléctricamente (Lys, Arg y Asp), cadenas laterales polares no cargadas (Gln) y un caso inusual de glicina.

Aunque no se disponía de datos estructurales para este estudio, las mejoras observadas en la afinidad pueden interpretarse teniendo en cuenta los hallazgos previos y los conocimientos estructurales recogidos en la literatura científica. La mutación Asn<sup>57</sup> por Lys o Asp en el CDR-H2 produjo un aumento en la afinidad de 6,20 y 11,51 veces, respectivamente. Esta mejora podría deberse a la formación de

un puente salino en la interfaz anticuerpo-antígeno. El análisis estructural del complejo HyHEL-10-Hen Egg White ha demostrado que el papel de los residuos Asn en la interacción antígeno-anticuerpo depende de la estructura de la zona interfacial local (Yokota et al., 2010). Las mutaciones que afectan a los residuos de Asn expuestos al solvente en el complejo anticuerpo-antígeno podrían contrarrestarse con cambios conformacionales o ganancias en otras interacciones. Por consiguiente, la contribución de dos enlaces de hidrógeno es mínima, y su interrupción mediante mutación puede aumentar o reducir la afinidad del anticuerpo. Además, en la interacción HyHEL-5-Lisozima de huevo Hen, la pérdida de un puente salino en la interfaz redujo significativamente la constante de unión, lo que subraya la importancia de tales interacciones. (Tsumoto et al., 1996; Warszawski et al., 2019; Wibbenmeyer et al., 1999).

La sustitución que más influyó en la afinidad del fragmento scFv fue la conversión de lisina en glutamina en el CDR-H2. La lisina se encuentra habitualmente en las interacciones antígeno-anticuerpo debido a su cadena lateral cargada positivamente, que suele estar expuesta en la superficie del anticuerpo y fácilmente disponible para la unión con el antígeno. Por el contrario, la glutamina es un residuo polar pero sin carga. Su cadena lateral polar favorece las interacciones con otros átomos polares o cargados, lo que le permite participar en interacciones hidrofílicas sin provocar la repulsión electrostática asociada a la lisina. (Gavade et al., 2024). Esta característica hace que la glutamina sea especialmente apta para mantener la estabilidad de la unión, sobre todo en zonas donde los residuos cargados podrían interferir en la unión mediante fuerzas repulsivas. En las interacciones proteína-proteína, si los residuos de lisina están presentes en la interfase y se encuentran con regiones de carga similar en la otra parte, la repulsión puede debilitar u obstruir la unión. (Sokalingam et al., 2012). Esto podría explicar el aumento de afinidad observado tras la conversión de lisina en glutamina. Además, la cadena lateral amida de la glutamina puede tanto donar como aceptar enlaces de hidrógeno, lo que la hace muy adaptable a la hora de formar interacciones

estables con diversos grupos funcionales del antígeno. Esta versatilidad permite a la glutamina adaptarse a diferentes superficies antigénicas, reforzando así la afinidad de unión. (Chiu et al., 2019; Clark, Boriack-Sjodin, et al., 2006; Xie et al., 2015). Curiosamente, los residuos de lisina han mostrado una tendencia positiva a la mutación durante el proceso de hipermutación somática en las regiones de unión de anticuerpos (Burkovitz et al., 2014; Clark, Ganesan, et al., 2006). En este caso, la sustitución por Gln puede haber ofrecido una combinación óptima de estabilidad y flexibilidad de interacción, lo que resultó en un mejoramiento de la afinidad.

En la cadena VL, se eligieron cinco aminoácidos para mutar, de los cuales cuatro eran residuos de serina en las regiones CDR-L1 y CDR-L3. Las sustituciones en estos residuos de serina produjeron variantes con mayor afinidad mientras que no se hallaron mutaciones ventajosas en Tyr<sup>32</sup>. La variante más eficaz fue un triple mutante que aumentó la afinidad 5,82 veces. La serina, un aminoácido polar y sin carga, prevalece en las regiones CDR del anticuerpo, desempeñando un papel crucial en el reconocimiento del antígeno y la afinidad de unión. En particular, la serina está significativamente sobrerrepresentada en la línea germinal (12,63%), pero disminuye tras los eventos de hipermutación somática (8,18%) y en las interfaces proteína-proteína (6,66%) (Osajima et al., 2014). Esta disminución se debe a la propensión de la serina a formar parte de motivos asociados a puntos calientes mutacionales, lo que facilita su conversión en otros residuos durante la maduración de la afinidad (Clark, Ganesan, et al., 2006).

En la región CDR-L3, la sustitución de serina por glicina fue la única observada en ambas posiciones sometidas a mutagénesis: Ser<sup>92</sup>, Ser<sup>93</sup>. La glicina, que se distingue por su cadena lateral de hidrógeno, ofrece una flexibilidad y libertad excepcionales a los aminoácidos contiguos. Esta flexibilidad podría permitir al sitio de unión del anticuerpo adoptar mejores conformaciones para el antígeno diana, mejorando la afinidad de unión. La glicina es incorporada a menudo durante el procesos de hipermutación somática en regiones estructurales, en particular en la

interfaz VH-VL, caracterizada por la interacción de  $\beta$ -hojas enriquecidas con aminoácidos hidrófobos o polares cortos introducidos durante el proceso de maduración (Burkovitz et al., 2014). El cambio de serina a glicina también puede disminuir el impedimento estérico en el sitio de unión, permitiendo una interacción más estrecha con el antígeno debido a la pérdida de interacciones de cadena lateral. (Birtalan et al., 2008; Gavade et al., 2024). Es probable que estos cambios estructurales contribuyan al aumento observado en la afinidad del anticuerpo. Por el contrario, la sustitución de Ser<sup>29</sup> y Ser<sup>31</sup> por arginina podría aumentar la afinidad del anticuerpo al permitir enlaces de hidrógeno adicionales con el antígeno. La cadena lateral de la arginina, caracterizada por múltiples átomos de nitrógeno, puede actuar como donante de enlaces de hidrógeno, facilitando las interacciones en la interfaz de unión al antígeno. Al igual que la glicina, la arginina se introduce con frecuencia en las regiones estructurales durante la hipermutación somática y suele aparecer en los puntos de contacto entre el antígeno y el anticuerpo (Spisak et al., 2020).

También se identificaron sustituciones que provocaron una disminución de la afinidad del fragmento scFv. En concreto, la sustitución de Ile<sup>97</sup> por Phe o Thr dio lugar a una disminución de la afinidad de 6,08 y 8,44 veces, respectivamente. La isoleucina, un aminoácido alifático e hidrofóbico, es crucial en el reconocimiento de antígenos y la función inmunitaria, y suele encontrarse en las regiones CDR de los anticuerpos, figurando entre los diez aminoácidos más implicados en las interacciones antígeno-anticuerpo (Burkovitz et al., 2014; González-Muñoz et al., 2012; Sela-Culang et al., 2013). La sustitución de isoleucina por fenilalanina puede provocar choques estéricos debido a la voluminosa cadena lateral aromática de la fenilalanina, que es mucho mayor que la cadena lateral alifática de la isoleucina. Este cambio estructural podría reducir la flexibilidad del CDR, perjudicando su capacidad para adaptarse a la superficie del antígeno. Aunque ambos aminoácidos son hidrófobos, el anillo aromático de la fenilalanina introduce un tipo de interacción diferente, que podría alterar el equilibrio hidrofóbico necesario para una unión estable

al antígeno. Alternativamente, la sustitución de isoleucina por treonina sustituye un residuo hidrofóbico por uno polar, lo que puede alterar las interacciones hidrofóbicas esenciales para mantener una interfaz de unión estable. Esta desestabilización podría mermar aún más la capacidad del anticuerpo para unirse eficazmente al antígeno (Betts & Russell, 2003; Clark, Boriack-Sjodin, et al., 2006; Clark, Ganesan, et al., 2006).

El análisis de secuenciación profunda de las bibliotecas post-selección reveló un enriquecimiento progresivo de clones previamente identificados mediante ELISA y el chequeo de clones aislados. En particular, sólo los clones G1 y E6 se desviaron de esta tendencia, mostrando dinámicas de enriquecimiento alternativas. Un análisis más detallado de las frecuencias de aminoácidos en las posiciones mutadas reveló nuevas sustituciones. En la mayoría de los casos, las sustituciones identificadas por secuenciación de Sanger ocurrieron con más frecuencia en las posiciones mutadas que las nuevas sustituciones encontradas por NGS. Se observaron algunas excepciones; sin embargo, una elevada frecuencia de sustitución no indica necesariamente una mayor afinidad de unión. Este fenómeno concuerda con observaciones anteriores de que ciertas mutaciones pueden conferir ventajas no relacionadas con la afinidad de unión, como el aumento de las tasas de crecimiento de huéspedes *E. coli* o la mejora de la eficacia de despliegue en la superficie de fagos de la fusión pIII-anticuerpo. Estas variantes, que pueden aparecer con alta frecuencia en las bibliotecas, no siempre mejoran la afinidad de unión. (Derda et al., 2011). Por ejemplo, la variante Phe<sup>97</sup> identificada mediante secuenciación de Sanger era muy frecuente, pero con una reducción en la afinidad del anticuerpo. Un hallazgo interesante se hizo en el CDR-H3. Aunque no se identificaron mutaciones que mejoraran la afinidad mediante secuenciación de Sanger, la NGS reveló numerosas sustituciones, tanto en posiciones mutadas como no mutadas. Estas últimas podrían atribuirse a errores de polimerización o alineación durante la etapa de síntesis del ADN (Liu et al., 2020). En este proyecto no se abordó el posible impacto de estas nuevas sustituciones en la afinidad del

anticuerpo. Para aprovechar al máximo los resultados proporcionados por la NGS, son necesarios más análisis.

Por otra parte, estudios sobre la maduración de la afinidad han puesto de relieve el papel fundamental de las mutaciones compensatorias durante el proceso de maduración. Julian *et al.* demostraron que las mutaciones clave que aumentan la afinidad adquirida durante la evolución dirigida de los anticuerpos suelen ser fuertemente desestabilizadoras. Una comparación directa del impacto de las mutaciones sobre la afinidad y la estabilidad de un anticuerpo contra el péptido A $\beta$ 42 de la enfermedad de Alzheimer durante la maduración de la afinidad reveló interesantes compensaciones entre afinidad y estabilidad. Cabe destacar que el aumento de la afinidad de la variante P2 (segunda ronda de mutagénesis) se debió a dos mutaciones desestabilizadoras: Arg<sup>62</sup> y Asn<sup>72</sup>. Este mismo patrón se observó en la variante P3, en la que el aumento de afinidad se debió a una mutación desestabilizadora: Arg<sup>50</sup>. Sin embargo, en la variante P4, una mutación estabilizadora Lys<sup>98</sup> aumentó la estabilidad en relación con la variante P3. (Julian et al., 2017). El análisis del repertorio de anticuerpos en respuesta a la experiencia antigénica ha demostrado que, durante la hipermutación somática, los anticuerpos acumulan mutaciones con carga positiva no solo para mejorar su afinidad, sino también para preservar su estabilidad. (Burkovitz et al., 2014; DeKosky et al., 2016; Wülfing & Dovedi, 2023). Una posible mutación estabilizadora de nuestro fragmento scFv podría ser la sustitución de Arg<sup>50</sup> por lisina. Austeberry *et al.* observaron que la sustitución de arginina por lisina mejora la estabilidad coloidal de los anticuerpos scFv. Los residuos de arginina, al favorecer las interacciones con los estados desplegados, pueden incrementar el potencial de agregación debido a la adhesividad de la superficie. La sustitución de arginina por lisina reduce estas interacciones, lo que disminuye la agregación y mejora la estabilidad (Austerberry et al., 2019).

En resumen, aunque nuestra estrategia de mutagénesis no utilizó como guía datos estructurales, los efectos funcionales observados concuerdan con los principios establecidos a partir de análisis cristalográficos y computacionales de complejos anticuerpo-antígeno. Para dilucidar plenamente la base molecular de las mejoras de afinidad observadas en este estudio, será necesaria una mayor caracterización biofísica, que incluya estudios estructurales del complejo anticuerpo-antígeno. Tales análisis aclararían las interacciones específicas responsables de la mejora de la afinidad de unión mostrada en este trabajo.

A pesar de estas limitaciones, nuestro enfoque identificó con éxito las variantes que mejoran la afinidad y proporciona un fuerte candidato para el desarrollo de herramientas de diagnóstico de próxima generación para la tuberculosis. La aplicación de mutagénesis selectiva y parsimoniosa combinada con secuenciación profunda representa un marco poderoso para la optimización de anticuerpos, en particular cuando no se dispone de datos estructurales.

## VI. CONCLUSIONES

Este trabajo ha permitido el desarrollo de un fragmento de anticuerpo scFv de afinidad mejorada contra el antígeno HspX de MTB, con potencial utilización para el diagnóstico y/o tratamiento de la tuberculosis. Las conclusiones del estudio son:

- Se obtuvo un fragmento scFv derivado del anticuerpo Tb HspX, con un valor IC<sub>50</sub> de 1,072  $\mu$ M. Sin embargo, la expresión soluble del fragmento scFv en un hospedero bacteriano resultó inviable, lo que plantea un desafío en su producción funcional para futuras aplicaciones. No obstante, se logró su presentación en la proteína PIII del fago filamentoso M13.
- La técnica de TPDF combinada con la mutagénesis de Kunkel permitió la construcción exitosa de tres bibliotecas de mutantes scFv con diversidad adecuada, facilitando la diversificación y el análisis de cinco de las seis regiones CDR del fragmento scFv. Estas bibliotecas proporcionaron una plataforma robusta para el mejoramiento de la afinidad del anticuerpo.
- Las condiciones de selección aplicadas durante el proceso de *panning* permitieron aislar e identificar ocho variantes de scFv con afinidad mejorada. La mejor variante mostró un incremento de 28 veces en la afinidad con un valor IC<sub>50</sub> de 37 nM.

Como conclusiones generales del proyecto de investigación:

- En ausencia de datos estructurales experimentales, el modelado basado en algoritmos bioinformáticos combinado con un diseño racional de mutaciones permite modificar de manera dirigida la afinidad de un anticuerpo.
- La mutagénesis parsimoniosa, en conjunto con la TPDF, constituyen una estrategia eficaz para la identificación y selección de variantes con características deseadas. En este trabajo, la aplicación conjunta de estas

metodologías permitió el aislamiento de variantes scFv con afinidad mejorada, destacándose un mutante con una afinidad 28 veces superior en comparación con la variante parental. Estos resultados demuestran que este enfoque es efectivo para la maduración *in-vitro* de la afinidad de anticuerpos y sugiere que su aplicación podría extrapolarse a otras áreas de la ingeniería de proteínas, como la optimización de la estabilidad, modificación de sitios catalíticos, entre otros.

Futuros estudios deberán evaluar el potencial diagnóstico y/o tratamiento del fragmento scFv obtenido en este trabajo. En un contexto más amplio, estos hallazgos representan un aporte en la lucha contra la diseminación de la tuberculosis que afecta principalmente a las poblaciones más vulnerables.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- (OMS), O. M. d. I. S. (2011). Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis: policy statement. In *Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis: policy statement*.
- (OMS), O. M. d. I. S. (2016). *Aplicación de la estrategia fin de la TB: aspectos esenciales*.
- (OMS), O. M. d. I. S. (2024). Tuberculosis. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- (OPS), O. P. d. I. S. (2024). *Situación de la Tuberculosis en las Américas*. <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis/situacion-tuberculosis-americas>
- Abbas, A. K. (2012). Inmunología celular y molecular.
- Abramovitch, R. B., Rohde, K. H., Hsu, F.-F., & Russell, D. G. (2011). aprABC: a Mycobacterium tuberculosis complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Molecular Microbiology*, 80(3), 678-694. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07601.x>
- Adler, H., Straub, C., & Frei, R. (2005). Comparison of BacT/ALERT 3D, Lowenstein-Jensen medium and Middlebrook 7H10/7H11 biplate for recovering mycobacteria from clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(7), 499-500. <https://doi.org/10.1007/s10096-005-1362-2>
- Ahmad, S. (2011). Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. *Journal of Immunology Research*, 2011(1), 814943. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2011/814943>
- Almagro, J. C., Pedraza-Escalona, M., Arrieta, H. I., & Pérez-Tapia, S. M. (2019). Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. *Antibodies*, 8(3).
- Andersen, P., Munk, M. E., Pollock, J. M., & Doherty, T. M. (2000). Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *The Lancet*, 356(9235), 1099-1104. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02742-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02742-2)
- Arcos, J., Sasindran, S. J., Fujiwara, N., Turner, J., Schlesinger, L. S., & Torrelles, J. B. (2011). Human Lung Hydrolases Delineate Mycobacterium tuberculosis–Macrophage Interactions and the Capacity To Control Infection. *The Journal of Immunology*, 187(1), 372-381. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100823>
- Ariffin, N., Yusof, N. A., Abdullah, J., Abd Rahman, S. F., Ahmad Raston, N. H., Kusnin, N., & Suraiya, S. (2020). Lateral Flow Immunoassay for Naked Eye Detection of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Sensors*, 2020(1), 1365983. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2020/1365983>
- Austerberry, J. I., Thistlethwaite, A., Fisher, K., Golovanov, A. P., Pluen, A., Esfandiary, R., van der Walle, C. F., Warwicker, J., Derrick, J. P., & Curtis, R. (2019). Arginine to Lysine Mutations Increase the Aggregation Stability of a Single-Chain Variable Fragment through Unfolded-State Interactions.

- Biochemistry*, 58(32), 3413-3421.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00367>
- Balint, R. F., & Larrick, J. W. (1993). Antibody engineering by parsimonious mutagenesis. *Gene*, 137(1), 109-118.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90258-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90258-5)
- Barderas, R., Desmet, J., Timmerman, P., Meloen, R., & Casal, J. I. (2008). Affinity maturation of antibodies assisted by *in silico* modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26), 9029-9034.  
<https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0801221105>
- Barrett, A., Magee, J. G., & Freeman, R. (2002). An evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples. *Journal of Medical Microbiology*, 51(10), 895-898.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-10-895>
- Batista, F. D., & Neuberger, M. S. (1998). Affinity Dependence of the B Cell Response to Antigen: A Threshold, a Ceiling, and the Importance of Off-Rate. *Immunity*, 8(6), 751-759. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80580-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80580-4)
- Bell, L. C. K., & Noursadeghi, M. (2018). Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis co-infection. *Nature Reviews Microbiology*, 16(2), 80-90.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.128>
- Betts, M. J., & Russell, R. B. (2003). Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists* (pp. 289-316).  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0470867302.ch14>
- Bhasin, M., & Varadarajan, R. (2021). Prediction of Function Determining and Buried Residues Through Analysis of Saturation Mutagenesis Datasets [Original Research]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.635425>
- Birtalan, S., Zhang, Y., Fellouse, F. A., Shao, L., Schaefer, G., & Sidhu, S. S. (2008). The Intrinsic Contributions of Tyrosine, Serine, Glycine and Arginine to the Affinity and Specificity of Antibodies. *Journal of Molecular Biology*, 377(5), 1518-1528. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.093>
- Bowers, P. M., Verdino, P., Wang, Z., da Silva Correia, J., Chhoa, M., Macondray, G., Do, M., Neben, T. Y., Horlick, R. A., Stanfield, R. L., Wilson, I. A., & King, D. J. (2014). Nucleotide Insertions and Deletions Complement Point Mutations to Massively Expand the Diversity Created by Somatic Hypermutation of Antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 289(48), 33557-33567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607176>
- Brock, I., Weldingh, K., Lillebaek, T., Follmann, F., & Andersen, P. (2004). Comparison of Tuberculin Skin Test and New Specific Blood Test in Tuberculosis Contacts. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(1), 65-69. <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-232OC>
- Brown, M. C. (2009). Antibodies: Key to a Robust Lateral Flow Immunoassay. In R. Wong & H. Tse (Eds.), *Lateral Flow Immunoassay* (pp. 1-16). Humana Press.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3_4)

- Brust, B., Lecoufle, M., Tuailon, E., Dedieu, L., Canaan, S., Valverde, V., & Kremer, L. (2011). Mycobacterium tuberculosis lipolytic enzymes as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis. *PLOS ONE*, 6(9), e25078.
- Buckwalter, S. P., Olson, S. L., Connelly, B. J., Lucas, B. C., Rodning, A. A., Walchak, R. C., Deml, S. M., Wohlfiel, S. L., & Wengenack, N. L. (2016). Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacterium species, Nocardia species, and Other Aerobic Actinomycetes. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(2), 376-384. <https://doi.org/10.1128/jcm.02128-15>
- Burbelo, P. D., Keller, J., Wagner, J., Klimavicz, J. S., Bayat, A., Rhodes, C. S., Diarra, B., Chetchotisakd, P., Suputtamongkol, Y., Kiertiburanakul, S., Holland, S. M., Browne, S. K., Siddiqui, S., & Kovacs, J. A. (2015). Serological diagnosis of pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection by LIPS using a multiple antigen mixture. *BMC Microbiology*, 15(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0545-y>
- Burkovitz, A., Sela-Culang, I., & Ofran, Y. (2014). Large-scale analysis of somatic hypermutations in antibodies reveals which structural regions, positions and amino acids are modified to improve affinity. *The FEBS Journal*, 281(1), 306-319. <https://doi.org/10.1111/febs.12597>
- Burks, E. A., Chen, G., Georgiou, G., & Iverson, B. L. (1997). In vitro scanning saturation mutagenesis of an antibody binding pocket. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2), 412-417. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.412>
- Castro-Garza, J., García-Jacobo, P., Rivera-Morales, L. G., Quinn, F. D., Barber, J., Karls, R., Haas, D., Helms, S., Gupta, T., Blumberg, H., Tapia, J., Luna-Cruz, I., Rendon, A., Vargas-Villarreal, J., Vera-Cabrera, L., & Rodríguez-Padilla, C. (2017). Detection of anti-HspX antibodies and HspX protein in patient sera for the identification of recent latent infection by Mycobacterium tuberculosis. *PLOS ONE*, 12(8), e0181714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181714>
- Caulfield, A. J., & Wengenack, N. L. (2016). Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 4, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2016.05.005>
- Chen, G., Dubrawsky, I., Mendez, P., Georgiou, G., & Iverson, B. L. (1999). In vitro scanning saturation mutagenesis of all the specificity determining residues in an antibody binding site. *Protein Engineering, Design and Selection*, 12(4), 349-356. <https://doi.org/10.1093/protein/12.4.349>
- Chen, J., Zhang, R., Wang, J., Liu, L., Zheng, Y., Shen, Y., Qi, T., & Lu, H. (2011). Interferon-Gamma Release Assays for the Diagnosis of Active Tuberculosis in HIV-Infected Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 6(11), e26827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026827>
- Chen, J. H. K., She, K. K. K., Kwong, T. C., Wong, O. Y., Siu, G. K. H., Leung, C. C., Chang, K. C., Tam, C. M., Ho, P. L., Cheng, V. C. C., Yuen, K. Y., & Yam, W.

- C. (2015). Performance of the new automated Abbott RealTime MTB assay for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(9), 1827-1832. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2419-5>
- Chikamatsu, K., Aono, A., Yamada, H., Sugamoto, T., Kato, T., Kazumi, Y., Tamai, K., Yanagisawa, H., & Mitarai, S. (2014). Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-54>
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*, 8(4).
- Chong, L. T., Duan, Y., Wang, L., Massova, I., & Kollman, P. A. (1999). Molecular dynamics and free-energy calculations applied to affinity maturation in antibody 48G7. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), 14330-14335. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14330>
- Chowdhury, P. S., & Pastan, I. (1999). Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. *Nature Biotechnology*, 17(6), 568-572. <https://doi.org/10.1038/9872>
- Clark, L. A., Boriack-Sjodin, P. A., Eldredge, J., Fitch, C., Friedman, B., Hanf, K. J. M., Jarpe, M., Liparoto, S. F., Li, Y., Lugovskoy, A., Miller, S., Rushe, M., Sherman, W., Simon, K., & Van Vlijmen, H. (2006). Affinity enhancement of an in vivo matured therapeutic antibody using structure-based computational design. *Protein Science*, 15(5), 949-960. <https://doi.org/https://doi.org/10.1110/ps.052030506>
- Clark, L. A., Ganesan, S., Papp, S., & van Vlijmen, H. W. T. (2006). Trends in Antibody Sequence Changes during the Somatic Hypermutation Process. *The Journal of Immunology*, 177(1), 333-340. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.333>
- Corstjens, P. L. A. M., de Dood, C. J., van der Ploeg-van Schip, J. J., Wiesmeijer, K. C., Riuttamäki, T., van Meijgaarden, K. E., Spencer, J. S., Tanke, H. J., Ottenhoff, T. H. M., & Geluk, A. (2011). Lateral flow assay for simultaneous detection of cellular- and humoral immune responses. *Clinical Biochemistry*, 44(14), 1241-1246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.06.983>
- Cruciani, M., Scarparo, C., Malena, M., Bosco, O., Serpelloni, G., & Mengoli, C. (2004). Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2321-2325. <https://doi.org/doi:10.1128/jcm.42.5.2321-2325.2004>
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, 10(2), giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>

- Davydova, E. K. (2022). Protein Engineering: Advances in Phage Display for Basic Science and Medical Research. *Biochemistry (Moscow)*, 87(1), S146-S167. <https://doi.org/10.1134/S0006297922140127>
- de Martino, M., Galli, L., & Chiappini, E. (2014). Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein? *BMC Infectious Diseases*, 14(1), S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-S1-S1>
- DeKosky, B. J., Lungu, O. I., Park, D., Johnson, E. L., Charab, W., Chrysostomou, C., Kuroda, D., Ellington, A. D., Ippolito, G. C., Gray, J. J., & Georgiou, G. (2016). Large-scale sequence and structural comparisons of human naive and antigen-experienced antibody repertoires. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), E2636-E2645. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525510113>
- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 5(1), e2013070. <https://doi.org/10.4084/mjihid.2013.070>
- Derda, R., Tang, S. K. Y., Li, S. C., Ng, S., Matochko, W., & Jafari, M. R. (2011). Diversity of Phage-Displayed Libraries of Peptides during Panning and Amplification. *Molecules*, 16(2), 1776-1803.
- Diel, R., Loddenkemper, R., Meywald-Walter, K., Gottschalk, R., & Nienhaus, A. (2009). Comparative Performance of Tuberculin Skin Test, QuantiFERON-TB-Gold In Tube Assay, and T-Spot.TB Test in Contact Investigations for Tuberculosis. *Chest*, 135(4), 1010-1018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1378/chest.08-2048>
- Dinnes, J., Deeks, J., Kunst, H., Gibson, A., Cummins, E., Waugh, N., Drobniewski, F., & Lalvani, A. (2007). A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess*, 11(3), 196. <https://doi.org/10.3310/hta11030>
- Dong, S., Gao, M., Bo, Z., Guan, L., Hu, X., Zhang, H., Liu, B., Li, P., He, K., Liu, X., & Zhang, C. (2020). Production and characterization of a single-chain variable fragment antibody from a site-saturation mutagenesis library derived from the anti-Cry1A monoclonal antibody. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 60-69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.152>
- Doucet, N., De Wals, P.-Y., & Pelletier, J. N. (2004). Site-saturation Mutagenesis of Tyr-105 Reveals Its Importance in Substrate Stabilization and Discrimination in TEM-1  $\beta$ -Lactamase \*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46295-46303. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407606200>
- Douthwaite, J. A., Sridharan, S., Huntington, C., Hammersley, J., Marwood, R., Hakulinen, J. K., Ek, M., Sjögren, T., Rider, D., Privezentzev, C., Seaman, J. C., Cariuk, P., Knights, V., Young, J., Wilkinson, T., Sleeman, M., Finch, D. K., Lowe, D. C., & Vaughan, T. J. (2015). Affinity maturation of a novel antagonistic human monoclonal antibody with a long VH CDR3 targeting the Class A GPCR formyl-peptide receptor 1. *mAbs*, 7(1), 152-166. <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.985158>

- Dowdy, D. W., Steingart, K. R., & Pai, M. (2011). Serological Testing Versus Other Strategies for Diagnosis of Active Tuberculosis in India: A Cost-Effectiveness Analysis. *PLOS Medicine*, 8(8), e1001074. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001074>
- Drobniewski, F. A., Caws, M., Gibson, A., & Young, D. (2003). Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(3), 141-147. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00544-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00544-9)
- Dubey, K. K., Pramanik, A., Ankush, Khushboo, & Yadav, J. (2019). Chapter 12 - Enzyme Engineering. In R. S. Singh, R. R. Singhania, A. Pandey, & C. Larroche (Eds.), *Advances in Enzyme Technology* (pp. 325-347). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00012-1>
- Dutt, T. S., Karger, B. R., Fox, A., Youssef, N., Dadhwal, R., Ali, M. Z., Patterson, J., Creissen, E., Rampacci, E., Cooper, S. K., Podell, B. K., Gonzalez-Juarrero, M., Obregon-Henao, A., & Henao-Tamayo, M. (2022). Mucosal exposure to non-tuberculous mycobacteria elicits B cell-mediated immunity against pulmonary tuberculosis. *Cell Reports*, 41(11). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111783>
- Escobar, N., & Peña, C. (2022). Situación epidemiológica de la tuberculosis en Chile 2020-2021: repercusiones de la pandemia de COVID-19. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 38(3), 194-201.
- Escobar, N., & Peña, C. (2023). Avances en tuberculosis en el 54° Congreso Chileno de Enfermedades Respiratorias. 2ª parte: Nuevas normas técnicas chilenas para el control y eliminación de la tuberculosis. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 39(2), 175-179.
- Escobar Salinas, N. R. L., Natalia; Arias Muñoz, Fabiola; Herrea Martínez, Tania. (2021). *Norma técnica para el control y la eliminación de la Tuberculosis*.
- Falconi, F. Q., Infante Suárez, L., López, M. d. j. c., & Sancho, C. g. (2008). Comparison of the VersaTREK system and Löwenstein-Jensen medium for the recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 40(1), 49-53. <https://doi.org/10.1080/00365540701522967>
- FDA. (2021). *Nucleic Acid Based Tests*. <https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/nucleic-acid-based-tests>
- Ferguson, J. S., Voelker, D. R., Ufnar, J. A., Dawson, A. J., & Schlesinger, L. S. (2002). Surfactant Protein D Inhibition of Human Macrophage Uptake of Mycobacterium tuberculosis Is Independent of Bacterial Agglutination<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology*, 168(3), 1309-1314. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1309>
- Fermér, C., Andersson, I., Nilsson, K., & Nilsson, O. (2004). Specificity Rescue and Affinity Maturation of a Low-Affinity IgM Antibody against Pro-Gastrin-Releasing Peptide using Phage Display and DNA Shuffling. *Tumor Biology*, 25(1-2), 7-13. <https://doi.org/10.1159/000077717>
- Forloni, M., Liu, A. Y., & Wajapeyee, N. (2019). Saturation mutagenesis by codon cassette insertion. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb. prot097790.

- Forman, H. J., & Torres, M. (2002). Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(supplement\_1), S4-S8. <https://doi.org/10.1164/rccm.2206007>
- Frei, J. C., & Lai, J. R. (2016). Chapter Three - Protein and Antibody Engineering by Phage Display. In V. L. Pecoraro (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 580, pp. 45-87). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.05.005>
- Gao, Y., Liu, M., Chen, Y., Shi, S., Geng, J., & Tian, J. (2021). Association between tuberculosis and COVID-19 severity and mortality: A rapid systematic review and meta-analysis. *Journal of Medical Virology*, 93(1), 194-196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.26311>
- Garton, N. J., Waddell, S. J., Sherratt, A. L., Lee, S.-M., Smith, R. J., Senner, C., Hinds, J., Rajakumar, K., Adegbola, R. A., Besra, G. S., Butcher, P. D., & Barer, M. R. (2008). Cytological and Transcript Analyses Reveal Fat and Lazy Persister-Like Bacilli in Tuberculous Sputum. *PLOS Medicine*, 5(4), e75. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050075>
- Gavade, A., Nagraj, A. K., Patel, R., Pais, R., Dhanure, P., Scheele, J., Seiz, W., & Patil, J. (2024). Understanding the Specific Implications of Amino Acids in the Antibody Development. *The Protein Journal*, 43(3), 405-424. <https://doi.org/10.1007/s10930-024-10201-4>
- Gaynor, C. D., McCormack, F. X., Voelker, D. R., McGowan, S. E., & Schlesinger, L. S. (1995). Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol*, 155(11), 5343-5351.
- Geddie, M. L., & Matsumura, I. (2004). Rapid Evolution of  $\beta$ -Glucuronidase Specificity by Saturation Mutagenesis of an Active Site Loop \*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26462-26468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401447200>
- Ginocchio, C. C. (2011). Strengths and Weaknesses of FDA-Approved/Cleared Diagnostic Devices for the Molecular Detection of Respiratory Pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 52(suppl\_4), S312-S325. <https://doi.org/10.1093/cid/cir046>
- Gitlin, A. D., Shulman, Z., & Nussenzweig, M. C. (2014). Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature*, 509(7502), 637-640. <https://doi.org/10.1038/nature13300>
- González-Muñoz, A., Bokma, E., O'Shea, D., Minton, K., Strain, M., Vousden, K., Rossant, C., Jermutus, L., & Minter, R. (2012). Tailored amino acid diversity for the evolution of antibody affinity. *mAbs*, 4(6), 664-672. <https://doi.org/10.4161/mabs.21728>
- Gray, V. E., Hause, R. J., & Fowler, D. M. (2017). Analysis of Large-Scale Mutagenesis Data To Assess the Impact of Single Amino Acid Substitutions. *Genetics*, 207(1), 53-61. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300064>
- Grenier, J., Pinto, L., Nair, D., Steingart, K., Dowdy, D., Ramsay, A., & Pai, M. (2012). Widespread use of serological tests for tuberculosis: data from 22 high-

- burden countries. *European Respiratory Journal*, 39(2), 502-505. <https://doi.org/10.1183/09031936.00070611>
- Guan, W.-j., Ni, Z.-y., Hu, Y., Liang, W.-h., Ou, C.-q., He, J.-x., Liu, L., Shan, H., Lei, C.-l., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L.-j., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R.-c., Tang, C.-l., Wang, T., Chen, P.-y., Xiang, J.,...Zhong, N.-s. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708-1720. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa2002032>
- Handa, P., & Varshney, U. (1998). Rapid and reliable site directed mutagenesis using Kunkel's approach. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 35, 63-66.
- Harmsen, M. M., van Solt, C. B., van Zijderveld-van Bommel, A. M., Niewold, T. A., & van Zijderveld, F. G. (2006). Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(3), 544-551. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0300-7>
- Harriff, M. J., Cansler, M. E., Toren, K. G., Canfield, E. T., Kwak, S., Gold, M. C., & Lewinsohn, D. M. (2014). Human Lung Epithelial Cells Contain Mycobacterium tuberculosis in a Late Endosomal Vacuole and Are Efficiently Recognized by CD8+ T Cells. *PLOS ONE*, 9(5), e97515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097515>
- Hasnain, S. E., Ehtesham, N. Z., & Grover, S. (2019). *Mycobacterium tuberculosis: molecular infection biology, pathogenesis, diagnostics and new interventions*. Springer.
- Hentrich, C., Ylera, F., Frisch, C., Ten Haaf, A., & Knappik, A. (2018). Chapter 3 - Monoclonal Antibody Generation by Phage Display: History, State-of-the-Art, and Future. In S. K. Vashist & J. H. T. Luong (Eds.), *Handbook of Immunoassay Technologies* (pp. 47-80). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811762-0.00003-7>
- Herrera, T., & Farga, V. (2015). Historia del Programa de Control de la Tuberculosis de Chile. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 31(4), 227-231.
- Huang, C., Pan, L., Shen, X., Tian, H., Guo, L., Zhang, Z., & Liu, X. (2021). Hsp16.3 of mycobacterium tuberculosis in exosomes as a biomarker of tuberculosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(11), 2427-2430. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04246-x>
- Ireton, G. C., Greenwald, R., Liang, H., Esfandiari, J., Lyashchenko, K. P., & Reed, S. G. (2010). Identification of Mycobacterium tuberculosis Antigen of High Serodiagnostic Value. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(10), 1539-1547. <https://doi.org/doi:10.1128/CVI.00198-10>
- Irving, R. A., Kortt, A. A., & Hudson, P. J. (1996). Affinity maturation of recombinant antibodies using E. coli mutator cells. *Immunotechnology*, 2(2), 127-143.
- Ishida, E., Corrigan, D. T., Chen, T., Liu, Y., Kim, R. S., Song, L., Rutledge, T. M., Magee, D. M., LaBaer, J., Lowary, T. L., Lin, P. L., & Achkar, J. M. (2024). Mucosal and systemic antigen-specific antibody responses correlate with

- protection against active tuberculosis in nonhuman primates. *eBioMedicine*, 99. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104897>
- Jacobs, H., & Bross, L. (2001). Towards an understanding of somatic hypermutation. *Current Opinion in Immunology*, 13(2), 208-218. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00206-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00206-5)
- Jasenosky, L. D., Scriba, T. J., Hanekom, W. A., & Goldfeld, A. E. (2015). T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Immunological Reviews*, 264(1), 74-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/imr.12274>
- Jasmer, R. M., Nahid, P., & Hopewell, P. C. (2002). Latent Tuberculosis Infection. *New England Journal of Medicine*, 347(23), 1860-1866. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMcp021045>
- Jones, A., Pitts, M., Al Dulayymi, J. a. R., Gibbons, J., Ramsay, A., Goletti, D., Gwenin, C. D., & Baird, M. S. (2017). New synthetic lipid antigens for rapid serological diagnosis of tuberculosis. *PLOS ONE*, 12(8), e0181414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181414>
- Julian, M. C., Li, L., Garde, S., Wilen, R., & Tessier, P. M. (2017). Efficient affinity maturation of antibody variable domains requires co-selection of compensatory mutations to maintain thermodynamic stability. *Scientific Reports*, 7(1), 45259. <https://doi.org/10.1038/srep45259>
- Khéchine, A. E., Couderc, C., Flaudrops, C., Raoult, D., & Drancourt, M. (2011). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice. *PLOS ONE*, 6(9), e24720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024720>
- Kiguchi, Y., Oyama, H., Morita, I., Nagata, Y., Umezawa, N., & Kobayashi, N. (2021). The VH framework region 1 as a target of efficient mutagenesis for generating a variety of affinity-matured scFv mutants. *Scientific Reports*, 11(1), 8201. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87501-7>
- Kim, B., Aravena, M., Hernández, V., & Vilches, D. (2024). Situación epidemiológica de la tuberculosis en Chile.
- Kumari, P., Sikri, K., Kaur, K., Gupta, U. D., & Tyagi, J. S. (2017). Sustained expression of DevR/DosR during long-term hypoxic culture of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 106, 33-37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.06.003>
- Kunkel, T. A., Bebenek, K., & McClary, J. (1991). Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. In *Methods in Enzymology* (Vol. 204, pp. 125-139). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04008-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04008-C)
- Lafont, V., Schaefer, M., Stote, R. H., Altschuh, D., & Dejaegere, A. (2007). Protein-protein recognition and interaction hot spots in an antigen-antibody complex: Free energy decomposition identifies “efficient amino acids”. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 67(2), 418-434. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/prot.21259>

- Lange, C., & Mori, T. (2010). Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology*, 15(2), 220-240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01692.x>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lavania, S., Das, R., Dhiman, A., Myneedu, V. P., Verma, A., Singh, N., Sharma, T. K., & Tyagi, J. S. (2018). Aptamer-Based TB Antigen Tests for the Rapid Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Potential Utility in Screening for Tuberculosis. *ACS Infectious Diseases*, 4(12), 1718-1726. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00201>
- Lee, K. B., Dunn, Z., & Ge, X. (2019). Reducing proteolytic liability of a MMP-14 inhibitory antibody by site-saturation mutagenesis. *Protein Science*, 28(3), 643-653. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.3567>
- Lee, M.-R., Chung, K.-P., Wang, H.-C., Lin, C.-B., Yu, C.-J., Lee, J.-J., & Hsueh, P.-R. (2013). Evaluation of the Cobas TaqMan MTB real-time PCR assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 62(8), 1160-1164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jmm.0.052043-0>
- Lee, S. H. (2015). Diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis and respiratory diseases*, 78(2), 56.
- Leem, J. (2016). *Development of computational methodologies for antibody design* [University of Oxford].
- Lew, M. H., Norazmi, M. N., & Tye, G. J. (2020). Enhancement of immune response against Mycobacterium tuberculosis HspX antigen by incorporation of combined molecular adjuvant (CASAC). *Molecular Immunology*, 117, 54-64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.10.023>
- Li, B., Fouts, A. E., Stengel, K., Luan, P., Dillon, M., Liang, W.-C., Feierbach, B., Kelley, R. F., & Hötzel, I. (2014). In vitro affinity maturation of a natural human antibody overcomes a barrier to in vivo affinity maturation. *mAbs*, 6(2), 437-445. <https://doi.org/10.4161/mabs.27875>
- Li, J., Kang, G., Wang, J., Yuan, H., Wu, Y., Meng, S., Wang, P., Zhang, M., Wang, Y., Feng, Y., Huang, H., & de Marco, A. (2023). Affinity maturation of antibody fragments: A review encompassing the development from random approaches to computational rational optimization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 247, 125733. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125733>
- Li, Y., Wang, Y., & Liu, X. (2012). The Role of Airway Epithelial Cells in Response to Mycobacteria Infection. *Journal of Immunology Research*, 2012(1), 791392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2012/791392>
- Lindenstrøm, T., Aagaard, C., Christensen, D., Agger, E. M., & Andersen, P. (2014). High-frequency vaccine-induced CD8+ T cells specific for an epitope naturally processed during infection with Mycobacterium tuberculosis do not confer protection. *European Journal of Immunology*, 44(6), 1699-1709. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/eji.201344358>

- Liu, B., Long, S., & Liu, J. (2020). Improving the mutagenesis efficiency of the Kunkel method by codon optimization and annealing temperature adjustment. *New Biotechnology*, 56, 46-53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.11.004>
- Liu, D., Huang, Y., Chen, M., Wang, S., Liu, K., & Lai, W. (2015). Rapid detection method for aflatoxin B1 in soybean sauce based on fluorescent microspheres probe. *Food Control*, 50, 659-662. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.011>
- Liu, J.-L., Hu, Z.-Q., Xing, S., Xue, S., Li, H.-P., Zhang, J.-B., & Liao, Y.-C. (2012). Attainment of 15-Fold Higher Affinity of a Fusarium-specific Single-Chain Antibody by Directed Molecular Evolution Coupled to Phage Display. *Molecular Biotechnology*, 52(2), 111-122. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9478-3>
- Low, N. M., Holliger, P., & Winter, G. (1996). Mimicking Somatic Hypermutation: Affinity Maturation of Antibodies Displayed on Bacteriophage Using a Bacterial Mutator Strain. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 359-368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0406>
- Lowden, M. J., van Faassen, H., Raphael, S., Ryan, S., Hussack, G., & Henry, K. A. (2022). Facile Affinity Maturation of Single-Domain Antibodies Using Next-Generation DNA Sequencing. In G. Hussack & K. A. Henry (Eds.), *Single-Domain Antibodies: Methods and Protocols* (pp. 245-268). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2075-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2075-5_12)
- Loxton, A. G. (2019). Bcells and their regulatory functions during Tuberculosis: Latency and active disease. *Molecular Immunology*, 111, 145-151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.012>
- Lu, L. L., Chung, A. W., Rosebrock, T. R., Ghebremichael, M., Yu, W. H., Grace, P. S., Schoen, M. K., Tafesse, F., Martin, C., Leung, V., Mahan, A. E., Sips, M., Kumar, M. P., Tedesco, J., Robinson, H., Tkachenko, E., Draghi, M., Freedberg, K. J., Streeck, H.,...Alter, G. (2016). A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell*, 167(2), 433-443.e414. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.072>
- Marintcheva, B. (2018). Chapter 5 - Phage Display. In B. Marintcheva (Ed.), *Harnessing the Power of Viruses* (pp. 133-160). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810514-6.00005-2>
- Martineau, P. (2002). Error-prone polymerase chain reaction for modification of scFvs. *Antibody Phage Display: Methods and Protocols*, 287-294.
- Martínez, M. R., Sardiñas, M., García, G., Mederos, L. M., & Díaz, R. (2014). Evaluation of BacT/ALERT 3D System for Mycobacteria Isolates. *Journal of Tuberculosis Research*, 02, 59-64.
- Mdluli, P., Tetyana, P., Sosibo, N., van der Walt, H., Mlambo, M., Skepu, A., & Tshikhudo, R. (2014). Gold nanoparticle based Tuberculosis immunochromatographic assay: The quantitative ESE Quanti analysis of the intensity of test and control lines. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 1-6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.019>

- Mitchell, L. S., & Colwell, L. J. (2018). Analysis of nanobody paratopes reveals greater diversity than classical antibodies. *Protein Engineering, Design and Selection*, 31(7-8), 267-275. <https://doi.org/10.1093/protein/gzy017>
- Mohd Amiruddin, M. N., Ang, G. Y., Yu, C. Y., Falero-Diaz, G., Otero, O., Reyes, F., Camacho, F., Chin, K. L., Sarmiento, M. E., Norazmi, M. N., Acosta, A., & Yean Yean, C. (2020). Development of an immunochromatographic lateral flow dipstick for the detection of Mycobacterium tuberculosis 16 kDa antigen (Mtb-strip). *Journal of Microbiological Methods*, 176, 106003. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106003>
- Mondon, P., Souyris, N., Douchy, L., Crozet, F., Bouayadi, K., & Kharrat, H. (2007). Method for generation of human hyperdiversified antibody fragment library. *Biotechnology Journal*, 2(1), 76-82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/biot.200600205>
- Morgan, M., Kalantri, S., Flores, L., & Pai, M. (2005). A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*, 5, 62. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-62>
- Myung, Y., Pires, D. E. V., & Ascher, D. B. (2020). mmCSM-AB: guiding rational antibody engineering through multiple point mutations. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W125-W131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa389>
- Nicod, L. P. (2005). Lung defences: an overview. *European Respiratory Review*, 14(95), 45-50. <https://doi.org/10.1183/09059180.05.00009501>
- Novotny, J., Brucoleri, R. E., Davis, M., & Sharp, K. A. (1997). Empirical free energy calculations: a blind test and further improvements to the method 11Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, 268(2), 401-411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0961>
- Novotny, J., Brucoleri, R. E., & Saul, F. A. (1989). On the attribution of binding energy in antigen-antibody complexes McPC 603, D1.3, and HyHEL-5. *Biochemistry*, 28(11), 4735-4749. <https://doi.org/10.1021/bi00437a034>
- Nur, A., Lai, J. Y., Ch'ng, A. C. W., Choong, Y. S., Wan Isa, W. Y. H., & Lim, T. S. (2024). A review of in vitro stochastic and non-stochastic affinity maturation strategies for phage display derived monoclonal antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 277, 134217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134217>
- Orikiriza, P., Nyehangane, D., Atwine, D., Kisakye, J. J., Kassaza, K., Amumpaire, J. M., & Boum, Y., 2nd. (2017). Evaluation of the SD Boline TB Ag MPT64 test for identification of Mycobacterium tuberculosis complex from liquid cultures in Southwestern Uganda. *Afr J Lab Med*, 6(2), 383. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v6i2.383>
- Osajima, T., Suzuki, M., Neya, S., & Hoshino, T. (2014). Computational and statistical study on the molecular interaction between antigen and antibody. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 53, 128-139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.07.005>

- Oyama, H., Yamaguchi, S., Nakata, S., Niwa, T., & Kobayashi, N. (2013). "Breeding" Diagnostic Antibodies for Higher Assay Performance: A 250-Fold Affinity-Matured Antibody Mutant Targeting a Small Biomarker. *Analytical Chemistry*, 85(10), 4930-4937. <https://doi.org/10.1021/ac3037602>
- Padlan, E. A., Abergel, C., & Tipper, J. P. (1995). Identification of specificity-determining residues in antibodies. *The FASEB Journal*, 9(1), 133-139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.9.1.7821752>
- Padlan, E. A., Silverton, E. W., Sheriff, S., Cohen, G. H., Smith-Gill, S. J., & Davies, D. R. (1989). Structure of an antibody-antigen complex: crystal structure of the HyHEL-10 Fab-lysozyme complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(15), 5938-5942. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5938>
- Pai, M., Kalantri, S., & Dheda, K. (2006). New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. Latent tuberculosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 6(3), 413-422. <https://doi.org/10.1586/14737159.6.3.413>
- Pang, Q., Chen, Y., Mukhtar, H., Xiong, J., Wang, X., Xu, T., Hammock, B. D., & Wang, J. (2022). Camelization of a murine single-domain antibody against aflatoxin B1 and its antigen-binding analysis. *Mycotoxin Research*, 38(1), 51-60. <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00433-z>
- Parpia, Z. A., Elghanian, R., Nabatiyan, A., Hardie, D. R., & Kelso, D. M. (2010). p24 Antigen Rapid Test for Diagnosis of Acute Pediatric HIV Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 55(4), 413-419. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181f1afbc>
- Peláez, E. C., Estevez, M. C., Mongui, A., Menéndez, M. C., Toro, C., Herrera-Sandoval, O. L., Robledo, J., García, M. J., Portillo, P. D., & Lechuga, L. M. (2020). Detection and Quantification of HspX Antigen in Sputum Samples Using Plasmonic Biosensing: Toward a Real Point-of-Care (POC) for Tuberculosis Diagnosis. *ACS Infectious Diseases*, 6(5), 1110-1120. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00502>
- Peng, H.-P., Hsu, H.-J., Yu, C.-M., Hung, F.-H., Tung, C.-P., Huang, Y.-C., Chen, C.-Y., Tsai, P.-H., & Yang, A.-S. (2022). Antibody CDR amino acids underlying the functionality of antibody repertoires in recognizing diverse protein antigens. *Scientific Reports*, 12(1), 12555. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16841-9>
- Peng, H.-P., Lee, K. H., Jian, J.-W., & Yang, A.-S. (2014). Origins of specificity and affinity in antibody–protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(26), E2656-E2665. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1401131111>
- Phuah, J. Y., Mattila, J. T., Lin, P. L., & Flynn, J. L. (2012). Activated B Cells in the Granulomas of Nonhuman Primates Infected with Mycobacterium tuberculosis. *The American Journal of Pathology*, 181(2), 508-514. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.05.009>

- Pinto, L. M., Grenier, J., Schumacher, S. G., Denking, C. M., Steingart, K. R., & Pai, M. (2011). Immunodiagnosis of Tuberculosis: State of the Art. *Medical Principles and Practice*, 21(1), 4-13. <https://doi.org/10.1159/000331583>
- Polonsky, K., Pupko, T., & Freund, N. T. (2023). Evaluation of the Ability of AlphaFold to Predict the Three-Dimensional Structures of Antibodies and Epitopes. *The Journal of Immunology*, 211(10), 1578-1588. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2300150>
- Poulsen, T. R., Jensen, A., Haurum, J. S., & Andersen, P. S. (2011). Limits for Antibody Affinity Maturation and Repertoire Diversification in Hypervaccinated Humans. *The Journal of Immunology*, 187(8), 4229-4235. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000928>
- Qu, L., Qiao, X., Qi, F., Nishida, N., & Hoshino, T. (2021). Analysis of Binding Modes of Antigen–Antibody Complexes by Molecular Mechanics Calculation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(5), 2396-2406. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00167>
- Rabahi, M. F., Silva, J. L. R. d., Ferreira, A. C. G., Tannus-Silva, D. G. S., & Conde, M. B. (2017). Tuberculosis treatment. *Jornal brasileiro de pneumologia*, 43(06), 472-486.
- Rani, M., Bolles, M., Donaldson, E. F., Blarcom, T. V., Baric, R., Iverson, B., & Georgiou, G. (2012). Increased Antibody Affinity Confers Broad *In Vitro* Protection against Escape Mutants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Virology*, 86(17), 9113-9121. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.00233-12>
- Raveendran, R., Wattal, C., Oberoi, J. K., Goel, N., Datta, S., & Prasad, K. J. (2012). Utility of GenoType MTBDRplus assay in rapid diagnosis of multidrug resistant tuberculosis at a tertiary care centre in India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 30(1), 58-63. <https://doi.org/https://doi.org/10.4103/0255-0857.93034>
- Reece, S. T., & Kaufmann, S. H. E. (2012). Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 63-70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.006>
- Rivas-Santiago, B., Hernandez-Pando, R., Carranza, C., Juarez, E., Contreras, J. L., Aguilar-Leon, D., Torres, M., & Sada, E. (2008). Expression of Cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Human Alveolar Macrophages, Monocytes, Neutrophils, and Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 76(3), 935-941. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.01218-07>
- Rivas-Santiago, B., Schwander, S. K., Sarabia, C., Diamond, G., Klein-Patel, M. E., Hernandez-Pando, R., Ellner, J. J., & Sada, E. (2005). Human  $\alpha$ -Defensin 2 Is Expressed and Associated with *Mycobacterium tuberculosis* during Infection of Human Alveolar Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 73(8), 4505-4511. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.73.8.4505-4511.2005>

- Robin, E. H., Maybelle, F. S., & John B. Bass, Jr. (1993). The Tuberculin Skin Test. *Clinical Infectious Diseases*, 17(6), 968-975. <http://www.jstor.org/stable/4457498>
- Robin, G., Sato, Y., Desplancq, D., Rochel, N., Weiss, E., & Martineau, P. (2014). Restricted Diversity of Antigen Binding Residues of Antibodies Revealed by Computational Alanine Scanning of 227 Antibody–Antigen Complexes. *Journal of Molecular Biology*, 426(22), 3729-3743. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.013>
- Rodrigues, C., Shenai, S., Sadani, M., Sukhadia, N., Jani, M., Ajbani, K., Sodha, A., & Mehta, A. (2009). Evaluation of the bactec MGIT 960 TB system for recovery and identification of Mycobacterium tuberculosis complex in a high through put tertiary care centre. *Indian J Med Microbiol*, 27(3), 217-221. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.53203>
- Ruffolo, J. A., Chu, L.-S., Mahajan, S. P., & Gray, J. J. (2023). Fast, accurate antibody structure prediction from deep learning on massive set of natural antibodies. *Nature Communications*, 14(1), 2389. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38063-x>
- Russell, D. G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 39-47. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1538>
- Sakamoto, K. (2012). The Pathology of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Veterinary Pathology*, 49(3), 423-439. <https://doi.org/10.1177/0300985811429313>
- Schier, R., Balint, R. F., McCall, A., Apell, G., Larrick, J. W., & Marks, J. D. (1996). Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. *Gene*, 169(2), 147-155. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00821-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00821-7)
- Schrager, L. K., Vekemens, J., Drager, N., Lewinsohn, D. M., & Olesen, O. F. (2020). The status of tuberculosis vaccine development. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(3), e28-e37. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30625-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30625-5)
- Schwarz, F. P., Tello, D., Goldbaum, F. A., Mariuzza, R. A., & Poljak, R. J. (1995). Thermodynamics of Antigen-antibody Binding using Specific Anti-lysozyme Antibodies. *European Journal of Biochemistry*, 228(2), 388-394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0388n.x>
- Sela-Culang, I., Kunik, V., & Ofran, Y. (2013). The Structural Basis of Antibody-Antigen Recognition [Review]. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2013.00302>
- Sergeeva, M., Romanovskaya-Romanko, E., Zabolotnyh, N., Pulkina, A., Vasilyev, K., Shurigina, A. P., Buzitskaya, J., Zabrodskaya, Y., Fadeev, A., Vasin, A., Vinogradova, T. I., & Stukova, M. A. (2021). Mucosal Influenza Vector Vaccine Carrying TB10.4 and HspX Antigens Provides Protection against Mycobacterium tuberculosis in Mice and Guinea Pigs. *Vaccines*, 9(4), 394. <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/4/394>

- Sester, M., Sotgiu, G., Lange, C., Giehl, C., Girardi, E., Migliori, G. B., Bossink, A., Dheda, K., Diel, R., & Dominguez, J. (2010). Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 37(1), 100-111.
- Shen, J., Zhou, Y., Fu, F., Xu, H., Lv, J., Xiong, Y., & Wang, A. (2015). Immunochromatographic assay for quantitative and sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen using highly luminescent quantum dot-beads. *Talanta*, 142, 145-149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.058>
- Sheriff, S., Silverton, E. W., Padlan, E. A., Cohen, G. H., Smith-Gill, S. J., Finzel, B. C., & Davies, D. R. (1987). Three-dimensional structure of an antibody-antigen complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(22), 8075-8079. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.22.8075>
- Sherman, D. R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M. I., & Schoolnik, G. K. (2001). Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding  $\alpha$ -crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7534-7539. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.121172498>
- Shete, P. B., Ravindran, R., Chang, E., Worodria, W., Chaisson, L. H., Andama, A., Davis, J. L., Luciw, P. A., Huang, L., Khan, I. H., & Cattamanchi, A. (2017). Evaluation of antibody responses to panels of *M. tuberculosis* antigens as a screening tool for active tuberculosis in Uganda. *PLOS ONE*, 12(8), e0180122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180122>
- Shingadia, D., & Novelli, V. (2008). The tuberculin skin test: a hundred, not out? *Archives of Disease in Childhood*, 93(3), 189. <https://doi.org/10.1136/adc.2007.129585>
- Siddiqui, K. F., Amir, M., & Agrewala, J. N. (2011). Understanding the biology of 16 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: Scope in diagnosis, vaccine design and therapy. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(4), 349-357. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.606425>
- Singh, P., Saket, V. K., & Kachhi, R. (2019). Diagnosis of TB: From conventional to modern molecular protocols. *Front. Biosci*, 11(1), 38-60.
- Singh, S., & Katoch, V. M. (2011). Commercial serological tests for the diagnosis of active tuberculosis in India: Time for introspection. *Indian Journal of Medical Research*, 134(5), 583-587. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.90980>
- Singhal, R., & Myneedu, V. P. (2015). Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *International Journal of Mycobacteriology*, 4(1), 1-6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.12.006>
- Small, P. M., & Pai, M. (2010). Tuberculosis Diagnosis — Time for a Game Change. *New England Journal of Medicine*, 363(11), 1070-1071. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMe1008496>
- Smith, G. P., & Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chemical Reviews*, 97(2), 391-410. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>

- Sokalingam, S., Raghunathan, G., Soundrarajan, N., & Lee, S.-G. (2012). A Study on the Effect of Surface Lysine to Arginine Mutagenesis on Protein Stability and Structure Using Green Fluorescent Protein. *PLOS ONE*, 7(7), e40410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040410>
- Spisak, N., Walczak, A. M., & Mora, T. (2020). Learning the heterogeneous hypermutation landscape of immunoglobulins from high-throughput repertoire data. *Nucleic Acids Research*, 48(19), 10702-10712. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa825>
- Srivastava, S. K., Ruigrok, V. J. B., Thompson, N. J., Trilling, A. K., Heck, A. J. R., van Rijn, C., Beekwilder, J., & Jongsma, M. A. (2013). 16 kDa Heat Shock Protein from Heat-Inactivated Mycobacterium tuberculosis Is a Homodimer – Suitability for Diagnostic Applications with Specific Llama VHH Monoclonals. *PLOS ONE*, 8(5), e64040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064040>
- Stave, J. W., & Lindpaintner, K. (2013). Antibody and Antigen Contact Residues Define Epitope and Paratope Size and Structure. *The Journal of Immunology*, 191(3), 1428-1435. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203198>
- Steidl, S., Ratsch, O., Brocks, B., Dürr, M., & Thomassen-Wolf, E. (2008). In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification. *Molecular Immunology*, 46(1), 135-144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.013>
- Steingart, K. R., Dendukuri, N., Henry, M., Schiller, I., Nahid, P., Hopewell, P. C., Ramsay, A., Pai, M., & Laal, S. (2009). Performance of Purified Antigens for Serodiagnosis of Pulmonary Tuberculosis: a Meta-Analysis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(2), 260-276. <https://doi.org/doi:10.1128/CVI.00355-08>
- Steingart, K. R., Flores, L. L., Dendukuri, N., Schiller, I., Laal, S., Ramsay, A., Hopewell, P. C., & Pai, M. (2011). Commercial Serological Tests for the Diagnosis of Active Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS Medicine*, 8(8), e1001062. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001062>
- Steingart, K. R., Henry, M., Laal, S., Hopewell, P. C., Ramsay, A., Menzies, D., Cunningham, J., Weldingh, K., & Pai, M. (2007). Commercial Serological Antibody Detection Tests for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Systematic Review. *PLOS Medicine*, 4(6), e202. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040202>
- Steingart, K. R., Henry, M., Laal, S., Hopewell, P. C., Ramsay, A., Menzies, D., Cunningham, J., Weldingh, K., & Pai, M. (2007). A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Postgraduate Medical Journal*, 83(985), 705-712. <https://doi.org/10.1136/thx.2006.075754>
- Steingart, K. R., Ramsay, A., Dowdy, D. W., & Pai, M. (2012). Serological tests for the diagnosis of active tuberculosis: relevance for India. *Indian J Med Res*, 135(5), 695-702.

- Stemmer, W. P. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10747-10751. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.91.22.10747>
- Stewart, G. R., Newton, S. M., Wilkinson, K. A., Humphreys, I. R., Murphy, H. N., Robertson, B. D., Wilkinson, R. J., & Young, D. B. (2005). The stress-responsive chaperone  $\alpha$ -crystallin 2 is required for pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 55(4), 1127-1137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04450.x>
- Sullivan, J. T., Young, E. F., McCann, J. R., & Braunstein, M. (2012). The *Mycobacterium tuberculosis* SecA2 System Subverts Phagosome Maturation To Promote Growth in Macrophages. *Infection and Immunity*, 80(3), 996-1006. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.05987-11>
- Sun, L., Chen, Y., Yi, P., Yang, L., Yan, Y., Zhang, K., Zeng, Q., & Guo, A. (2021). Serological detection of *Mycobacterium Tuberculosis* complex infection in multiple hosts by One Universal ELISA. *PLOS ONE*, 16(10), e0257920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257920>
- Tabasinezhad, M., Talebkhan, Y., Wenzel, W., Rahimi, H., Omidinia, E., & Mahboudi, F. (2019). Trends in therapeutic antibody affinity maturation: From in-vitro towards next-generation sequencing approaches. *Immunology Letters*, 212, 106-113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.06.009>
- Teixeira, A. A. R., D'Angelo, S., Erasmus, M. F., Leal-Lopes, C., Ferrara, F., Spector, L. P., Naranjo, L., Molina, E., Max, T., DeAguero, A., Perea, K., Stewart, S., Buonpane, R. A., Nastri, H. G., & Bradbury, A. R. M. (2022). Simultaneous affinity maturation and developability enhancement using natural liability-free CDRs. *mAbs*, 14(1), 2115200. <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2115200>
- Thom, G., Cockroft, A. C., Buchanan, A. G., Joberty Candotti, C., Cohen, E. S., Lowne, D., Monk, P., Shorrock-Hart, C. P., Jermutus, L., & Minter, R. R. (2006). Probing a protein-protein interaction by *in vitro* evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(20), 7619-7624. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0602341103>
- Tissot, F., Zanetti, G., Francioli, P., Zellweger, J.-P., & Zysset, F. (2005). Influence of Bacille Calmette-Guérin Vaccination on Size of Tuberculin Skin Test Reaction: To What Size? *Clinical Infectious Diseases*, 40(2), 211-217. <https://doi.org/10.1086/426434>
- Tonikian, R., Zhang, Y., Boone, C., & Sidhu, S. S. (2007). Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries. *Nature Protocols*, 2(6), 1368-1386. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.151>
- Tortoli, E., Pecorari, M., Fabio, G., Messinò, M., & Fabio, A. (2010). Commercial DNA Probes for *Mycobacteria* Incorrectly Identify a Number of Less Frequently Encountered Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), 307-310. <https://doi.org/doi:10.1128/jcm.01536-09>

- Trilling, A. K., de Ronde, H., Noteboom, L., van Houwelingen, A., Roelse, M., Srivastava, S. K., Haasnoot, W., Jongasma, M. A., Kolk, A., Zuilhof, H., & Beekwilder, J. (2011). A Broad Set of Different Llama Antibodies Specific for a 16 kDa Heat Shock Protein of Mycobacterium tuberculosis. *PLOS ONE*, 6(10), e26754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026754>
- Tsumoto, K., Ogasahara, K., Ueda, Y., Watanabe, K., Yutani, K., & Kumagai, I. (1996). Role of Salt Bridge Formation in Antigen-Antibody Interaction: ENTROPIC CONTRIBUTION TO THE COMPLEX BETWEEN HEN EGG WHITE LYSOZYME AND ITS MONOCLONAL ANTIBODY HyHEL10 \*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51), 32612-32616. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32612>
- Vainionpää, R., Waris, M., & Leinikki, P. (2015). Diagnostic techniques: serological and molecular approaches. *Reference module in biomedical sciences*, B978-970-912-801238-801233.802558-801237.
- Visca, D., Ong, C. W. M., Tiberi, S., Centis, R., D'Ambrosio, L., Chen, B., Mueller, J., Mueller, P., Duarte, R., Dalcolmo, M., Sotgiu, G., Migliori, G. B., & Goletti, D. (2021). Tuberculosis and COVID-19 interaction: A review of biological, clinical and public health effects. *Pulmonology*, 27(2), 151-165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.12.012>
- Wark, K. L., & Hudson, P. J. (2006). Latest technologies for the enhancement of antibody affinity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(5), 657-670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.01.025>
- Warszawski, S., Borenstein Katz, A., Lipsh, R., Khmel'nitsky, L., Ben Nissan, G., Javitt, G., Dym, O., Unger, T., Knop, O., Albeck, S., Diskin, R., Fass, D., Sharon, M., & Fleishman, S. J. (2019). Optimizing antibody affinity and stability by the automated design of the variable light-heavy chain interfaces. *PLOS Computational Biology*, 15(8), e1007207. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007207>
- Webster, D. M., Henry, A. H., & Rees, A. R. (1994). Antibody-antigen interactions. *Current opinion in structural biology*, 4(1), 123-129. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(94\)90070-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90070-1)
- Weitzner, B. D., Dunbrack, R. L., Jr., & Gray, J. J. (2015). The origin of CDR H3 structural diversity. *Structure*, 23(2), 302-311. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.010>
- Wibbenmeyer, J. A., Schuck, P., Smith-Gill, S. J., & Willson, R. C. (1999). Salt Links Dominate Affinity of Antibody HyHEL-5 for Lysozyme through Enthalpic Contributions \*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 26838-26842. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26838>
- Wülfing, C., & Dovedi, S. J. (2023). For optimal antibody effectiveness, sometimes less is more. In: Nature Publishing Group UK London.
- Xia, X., Xu, Y., Ke, R., Zhang, H., Zou, M., Yang, W., & Li, Q. (2013). A highly sensitive europium nanoparticle-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol residue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(23), 7541-7544. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7210-9>

- Xie, N.-Z., Du, Q.-S., Li, J.-X., & Huang, R.-B. (2015). Exploring Strong Interactions in Proteins with Quantum Chemistry and Examples of Their Applications in Drug Design. *PLOS ONE*, 10(9), e0137113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137113>
- Yan, J., Li, G., Hu, Y., Ou, W., & Wan, Y. (2014). Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 343. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0343-6>
- Yang, J. D., Mott, D., Sutiwisesak, R., Lu, Y.-J., Raso, F., Stowell, B., Babunovic, G. H., Lee, J., Carpenter, S. M., Way, S. S., Fortune, S. M., & Behar, S. M. (2018). Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ and CD8+ T cells differ in their capacity to recognize infected macrophages. *PLOS Pathogens*, 14(5), e1007060. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007060>
- Yang, W.-P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., & Barbas Iii, C. F. (1995). CDR Walking Mutagenesis for the Affinity Maturation of a Potent Human Anti-HIV-1 Antibody into the Picomolar Range. *Journal of Molecular Biology*, 254(3), 392-403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0626>
- Yin, R., & Pierce, B. G. (2024). Evaluation of AlphaFold antibody–antigen modeling with implications for improving predictive accuracy. *Protein Science*, 33(1), e4865. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.4865>
- Yokota, A., Tsumoto, K., Shiroishi, M., Nakanishi, T., Kondo, H., & Kumagai, I. (2010). Contribution of Asparagine Residues to the Stabilization of a Proteinaceous Antigen-Antibody Complex, HyHEL-10-Hen Egg White Lysozyme \*<sup><sup></sup></sup>. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7686-7696. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.089623>
- Yousefi-Avarvand, A., Tafaghodi, M., Soleimanpour, S., & Khademi, F. (2018). HspX protein as a candidate vaccine against Mycobacterium tuberculosis: an overview. *Frontiers in Biology*, 13(4), 293-296. <https://doi.org/10.1007/s11515-018-1494-2>
- Yuan, X., Teng, X., Jing, Y., Ma, J., Tian, M., Yu, Q., Zhou, L., Wang, R., Wang, W., Li, L., & Fan, X. (2015). A live attenuated BCG vaccine overexpressing multistage antigens Ag85B and HspX provides superior protection against Mycobacterium tuberculosis infection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10587-10595. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6962-x>
- Yuksel, P., Saribas, S., & Bagdatli, Y. (2011). Comparison of the VersaTrek and BACTEC MGIT 960 systems for the contamination rate, time of detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Afr. J. Microbiol. Res*, 5, 985-989.
- Zhang, P., Liu, X., Wang, C., Zhao, Y., Hua, F., Li, C., Yang, R., & Zhou, L. (2014). Evaluation of Up-Converting Phosphor Technology-Based Lateral Flow Strips for Rapid Detection of Bacillus anthracis Spore, Brucella spp., and

- Yersinia pestis*. *PLOS ONE*, 9(8), e105305.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105305>
- Zhao, P., Wu, Y., Zhu, Y., Yang, X., Jiang, X., Xiao, J., Zhang, Y., & Li, C. (2014). Upconversion fluorescent strip sensor for rapid determination of *Vibrio anguillarum* [10.1039/C3NR06549A]. *Nanoscale*, 6(7), 3804-3809.  
<https://doi.org/10.1039/C3NR06549A>
- Zimmermann, N., Thormann, V., Hu, B., Köhler, A. B., Imai-Matsushima, A., Locht, C., Arnett, E., Schlesinger, L. S., Zoller, T., Schürmann, M., Kaufmann, S. H., & Wardemann, H. (2016). Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO Molecular Medicine*, 8(11), 1325-1339.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.15252/emmm.201606330>