



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

**SELECCIÓN, EXPRESIÓN RECOMBINANTE Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOANTICUERPOS DE TIPO CAMÉLIDO BLOQUEADORES DE TNF- α
HUMANO**

Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular

Alumno: Matheus Soares Alves
Profesor Guía: Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso
Profesor Co-Guía: Dr. Oliberto Sánchez Ramos

CONCEPCIÓN-CHILE

2025

Esta tesis ha sido realizada en los Departamentos de Fisiopatología y Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
Tesis financiada por beca ANID Doctorado nacional folio 21221358.

DEDICATORIA

A mi esposa, Thays, la persona que me alentó a luchar por mis sueños incluso cuando yo no creía. Gracias por creer y embarcarte conmigo en este mundo de desafíos, escuchando mis problemas y viviendo por un objetivo, brindándome fuerza en los momentos difíciles. Este logro es nuestro.

A mi compañero Xerife, aunque no entienda, forma parte de nuestra familia y fue un placer caminar por las calles y parques de Concepción contigo. Fuiste un apoyo en muchos momentos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme vivir esta experiencia única y por darme fuerzas para enfrentar todas las adversidades durante el camino.

A la Universidad de Concepción y a la Facultad de Ciencias Biológicas por todo el conocimiento que adquirí a lo largo del doctorado.

A la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por apoyarme con la beca de doctorado y brindar financiamiento adicional para la adquisición de materiales fundamentales para el desarrollo de la tesis.

Al programa de posgrado en Biotecnología Molecular, en nombre de la directora Raquel Montesino, por todo el apoyo y la humanidad en la coordinación de todas las actividades.

A los Departamentos de Fisiopatología y Farmacología, lugares donde aprendí y apliqué en la práctica todos los conceptos de biología molecular que se utilizaron en el presente trabajo. Y a la Universidad de Fortaleza, especialmente al Laboratorio de Biología Molecular y del Desarrollo.

A mi tutor, Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso, un profesional y persona excepcional, que tiene una visión de la investigación como una herramienta práctica para resolver problemas reales. Estoy agradecido por toda la ayuda, confianza y enseñanzas que me ha brindado.

A mi co-tutor, Dr. Oliberto Ramos Sánchez, ejemplo de investigador, humilde y extremadamente competente. Una de las mentes más brillantes que he conocido. Agradezco la oportunidad de aprender de usted.

A la Dra. María Angélica, estoy seguro de que nació para ser investigadora. Extremadamente organizada y competente, siempre dispuesta a ayudar de manera paciente y cordial.

A los miembros del comité evaluador, que contribuyeron a este trabajo y a mi formación. Las aportaciones realizadas por ustedes son de gran valor para este trabajo.

A mis amigos de diferentes laboratorios y nacionalidades, gracias por toda la ayuda y compañerismo durante esta ardua travesía. Ustedes me brindaron una familia lejos de Brasil.

A mis padres, José y María de Jesús, agradezco sus enseñanzas. Siempre serán parte de mis logros y estoy agradecido con ustedes por todo. A mis hermanos, João Pedro y Thiago, gracias por las buenas vibras durante este camino.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE	
Resumen	10
Abstract	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Caracterización del factor de necrosis tumoral	12
1.2 Fisiopatología del TNF- α en las enfermedades autoinmunes	14
1.3 Tratamiento farmacológico para la artritis reumatoide	18
1.4 Bloqueadores de TNF- α	21
1.5 Innovación biotecnológica: producción de nanoanticuerpos para el sector biomédico.	26
1.6 Tecnología <i>phage display</i> para la obtención de una biblioteca de nanoanticuerpos.	30
1.7 Plataformas de producción biofarmacéutica	31
1.8 Plataforma adenoviral como solución rápida para testeo de proteínas producidas en la glándula mamaria	35
2. HIPOTESIS DE TRABAJO	38
3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. METODOLOGÍA	40
4.1 Técnicas generales de análisis y manipulación de ADN	40
4.2 Técnicas generales de análisis y manipulación de proteínas	42
4.3 Expresión, purificación y validación del TNF- α humano y murino recombinantes	44
4.3.1 Producción y cromatografía del TNF- α humano y murino	44
4.3.2 Ensayo de actividad de TNF- α humano y murino recombinantes en células L929	45
4.4 Seleccionar y caracterizar variantes de nanoanticuerpos de tipo camélido, previamente obtenidos de la biblioteca de phage display, para bloquear el TNF- α	45
4.5 Biopanning para selección de los fagos con mayor reconocimiento al TNF- α humano	47
4.6 Obtención de ADN y transformación de las bacterias quimiocompetentes HB2151.....	48
4.7 Producción de los nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α ligados a la proteína PIII del fago M13	49
4.7.1 ELISA con los nanoanticuerpos titulados unidos a PIII do fago M13..	49
4.7.2 ELISA para determinación de la unión de los fagos titulados al TNF- α humano y murino.....	50

4.8 Producción de anticuerpos policlonales para identificación de los nanoanticuerpos bloqueadores de rhTNF- α	51
4.9 Purificación, ensayo de unión y bloqueo de los nanoanticuerpos expresados en el periplasma de E. coli HB2151	52
4.9.1 Expresión y purificación de los nanoanticuerpos en periplasma de HB2151.....	52
4.9.2 ELISA para medir la unión del nanoanticuerpo al TNF- α humano y murino	53
4.9.3 Ensayo de bloqueo in vitro del nanoanticuerpo bloqueador de TNF- α en células L929	54
4.10 Producción del clon P1D10 en E.coli SHuffle	54
4.11 Evaluación de la afinidad del nanoanticuerpo contra rhTNF- α	55
4.11.1 Determinación de la KD mediante ELISA no competitivo	55
4.11.2 Determinación de la KD mediante ensayo de termoforesis microescala	56
4.12 Producción transiente del nanoanticuerpo P1D10 bivalente unido a la región Fc.....	56
4.12.1 Validación de la expresión del nanoanticuerpo bivalente	56
4.12.2 Transformación y recombinación en el sistema pAdTrack y pAdEasy	57
4.12.3 Transfección para la confirmación de la expresión del nanoanticuerpo bivalente	58
4.12.4 Transducción en células HEK293A para confirmación del título viral	58
4.12.5 Protocolo hormonal de inducción de lactancia y recolección de leche	59
4.12.6 Evaluación de la integridad, los niveles de expresión y la capacidad de unión a ligando del nanoanticuerpo producido en la leche	61
4.13 Análisis estadístico.....	61
5. RESULTADOS.....	62
5.1 Expresión del TNF- α humano y murino recombinantes.....	62
5.2 Ensayo de citotoxicidad del TNF- α humano y murino recombinante.....	64
5.3 Secuencia del vector para la producción de la biblioteca de nanoanticuerpos.....	65
5.4 Transformación y expresión de los nanoanticuerpos en E. coli HB2151	69
5.5 Producción de anticuerpos policlonales IgY para detección de los nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α	71
5.6 ELISA con los fagos titulados.....	74
5.7 Expresión y evaluación de la unión y bloqueo de los nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α en periplasma	77
5.8 Expresión y evaluación de la unión y bloqueo de los nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α en periplasma	79
5.9 Expresión y purificación del nanoanticuerpo P1D10 en bacteria.....	81
5.10 Ensayo de afinidad del nanoanticuerpo contra TNF- α humano.....	82

5.10.1 Determinación de la KD mediante ELISA no competitivo y termoforesis en microescala	83
5.11 Producción del vector adenoviral	84
5.12 Inducción de la lactancia en cabra	88
5.13 Expresión del nanoanticuerpo unido a la región Fc en glándula mamaria de cabras.....	91
6. Discusión.....	93
7. Conclusión	104
8. Bibliografía	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de la estructura y el mecanismo de acción de diversos agentes anti-TNF	23
Tabla 2. Indicaciones aprobadas por la FDA de varios agentes anti-TNF	23
Tabla 3. Costo de producción estimado comparativo entre cultivo celular y transgénicos.....	34
Tabla 4. Preparación de gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes ..	42
Tabla 5. Cronograma de aplicaciones de la lactancia inducida hormonalmente (mg/kg).....	60
Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de los clones de nanoanticuerpos seleccionados mediante ELISA	69
Tabla 7. Colonias obtenidas por crecimiento en placas de agar	70
Tabla 8. Titulación de los fagos con la proteína PIII unido a los nanoanticuerpos	75
Tabla 9. Determinación de la concentración de los clones de nanoanticuerpos	78
Tabla 10. Características de la leche después de la infusión del adenovirus para expresión transitoria.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía general de señalización del TNF- α a través de TNFR1 y TNFR2	13
Figura 2. Estructura molecular comparativa de los diferentes anticuerpos anti-TNF- α disponibles en el mercado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes	22
Figura 3. Validación de la expresión de rhTNF- α y rmTNF- α	63
Figura 4. Cromatograma de la purificación del TNF- α murino (A) y humano (B) utilizando lavados con 100mM de imidazol y la elución con 300mM de imidazol.	64
Figura 5. Ensayo de citotoxicidad de rmTNF α y rhTNF α	65
Figura 6. Secuencia y estructura del cAbBCII10 utilizada para la construcción del nanoanticuerpo bloqueador de TNF- α	66
Figura 7. Biblioteca de fagos que presentan nanoanticuerpos	67
Figura 8. Detección basada en ELISA de clones de fagos contra TNF- α humano recombinante	68
Figura 9. Evaluación de la expresión de nanoanticuerpos en el periplasma de la cepa de E.coli HB2151 transformada con el ADN de los clones bloqueadores de TNF- α	71
Figura 10. Expresión y purificación del <i>pool</i> de nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α	73
Figura 11. Evaluación de las IgY para el reconocimiento de los nanoanticuerpos.....	74
Figura 12. ELISA para determinar la unión de los nanoanticuerpos frente el rhTNF- α y rmTNF- α	76
Figura 13. Expresión y purificación de los nanoanticuerpo solubles.....	77
Figura 14. ELISA realizado con lisados bacterianos que expresan los clones de mayor afinidad hacia el TNF- α	79
Figura 15. Ensayo de bloqueo del rhTNF- α en celulas L929 utilizando el anticuerpo monoclonal Adalimumab.....	80
Figura 16. Ensayo de bloqueo del rhTNF- α en celulas L929 utilizando el nanoanticuerpo P1D10	81
Figura 17. Expresión del clon P1D10 en bacterias SHuffle	82
Figura 18. Purificación del clon P1D10 en bacterias SHuffle.....	83
Figura 19. Determinación de la interacción mediante ELISA no competitivo de Adalimumab y P1D10 contra rhTNF- α	84
Figura 20. Confirmación por ELISA del reconocimiento contra TNF- α mediante la expresión del clon P1D10 fusionado a la región Fc de la IgG humana, expresado en células HEK293A con el vector pAdTrack.....	86
Figura 21. Confirmación del ADN plasmídico para la producción del adenovirus destinado a la expresión de la proteína P1D10 fusionada a la región Fc humana	87
Figura 22. Confirmación de la infección con el adenovirus.....	88
Figura 23. Evaluación de volúmenes de lactancia tras la infusión de adenovirus en la glándula mamaria de una cabra no transgénica	89
Figura 24. Cromatograma del día 3 post-infusión del adenovirus.....	92
Figura 25. Identificación de la expresión de la proteína P1D10 unida a la región Fc de la IgG1 en la leche de cabra	92
Figura 26. Evolución de las ventas anuales del medicamento HUMIRA entre 2011 y 2024	103

RESUMEN

La autoinmunidad es una condición del sistema inmunológico caracterizada por la generación de moléculas autorreactivas. Si bien su presencia está regulada por mecanismos de tolerancia inmunológica que permiten la eliminación de células autorreactivas y la modificación de proteínas de membrana, estos procesos pueden fallar, conduciendo al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Tales patologías, incluidas las enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, así como la psoriasis y la artritis reumatoide, afectan entre el 3 % y el 5 % de la población mundial. En particular, la artritis reumatoide, que impacta aproximadamente al 1 % de la población global, se caracteriza por provocar un daño crónico severo al sistema musculoesquelético.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una citocina homotrimérica de 157 aminoácidos expresada principalmente por macrófagos activados, desempeña un papel central en la respuesta inflamatoria y está directamente implicado en la fisiopatología de la artritis reumatoide. Actualmente, cinco fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) emplean estructuras de anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión dirigidas contra TNF- α o sus receptores, producidos en sistemas bacterianos o en células de mamífero, siendo estas últimas las plataformas más utilizadas. No obstante, ambos sistemas presentan altos costos de producción, lo que incrementa significativamente el precio final del tratamiento.

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo expresar y caracterizar nanoanticuerpos de tipo camélido con capacidad de bloquear TNF- α . Se propone el uso de una nueva molécula con potencial terapéutico y la optimización de procesos biotecnológicos orientados al desarrollo de bioproductos innovadores, con el fin de ofrecer alternativas terapéuticas más accesibles y eficientes para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

ABSTRACT

Autoimmunity is a condition of the immune system characterized by the generation of self-reactive molecules. Although their presence is regulated by immune tolerance mechanisms that allow for the elimination of self-reactive cells and the modification of membrane proteins, these processes can fail, leading to the development of autoimmune diseases. Such pathologies, including inflammatory bowel diseases such as ulcerative colitis and Crohn's disease, as well as psoriasis and rheumatoid arthritis, affect between 3% and 5% of the global population. In particular, rheumatoid arthritis, which affects approximately 1% of the global population, is characterized by causing severe chronic damage to the musculoskeletal system.

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), a homotrimeric cytokine composed of 157 amino acids, mainly expressed by activated macrophages, plays a central role in the inflammatory response and is directly implicated in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. Currently, five drugs approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) employ full antibody structures, antibody fragments, or fusion proteins directed against TNF- α or its receptors, produced in bacterial systems or mammalian cells, the latter being the most commonly used platforms. However, both systems present high production costs, which significantly increase the final price of the treatment.

In this context, the present work aims to express and characterize camelid-type nanobodies capable of blocking TNF- α . The use of a new molecule with therapeutic potential and the optimization of biotechnological processes aimed at the development of innovative bioproducts is proposed, with the objective of offering more accessible and efficient therapeutic alternatives for the treatment of autoimmune diseases.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Caracterización del factor de necrosis tumoral alfa

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina producida principalmente por macrófagos activados, células *natural killer* y linfocitos T, implicada en diversas patologías, responsable de la respuesta inflamatoria y también en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Es una proteína homotrimérica compuesta por 157 aminoácidos y puede encontrarse en forma soluble o transmembrana (Jang et al., 2021). La forma transmembrana (tmTNF- α), que se encuentra en las membranas de los macrófagos, es escindida por la enzima convertidora de TNF- α (TACE), originando la forma soluble de TNF- α (sTNF- α), que se une a los receptores de TNF- α tipo 1 (TNFR1) y tipo 2 (TNFR2). Aunque el tmTNF- α también puede unirse a ambos receptores, su actividad biológica se asocia principalmente a TNFR2 (Ruiz et al., 2021).

La función de ambos receptores es distinta: TNFR1 se expresa en todos los tejidos humanos y es el principal receptor de señalización de TNF- α . Cuando TNFR1 interactúa con sTNF- α o tmTNF- α , activa un dominio de muerte que se asocia con la proteína adaptadora TRADD. Esta interacción da lugar a la formación de los complejos I, IIa, IIb y IIc, cada uno generando diferentes respuestas biológicas. Cuando el complejo I se forma en la membrana plasmática, se activa el factor nuclear κ B (NF- κ B), lo que provoca inflamación, crecimiento tisular, supervivencia y proliferación celular, así como la defensa inmunitaria frente a patógenos (Pobezinskaya y Lu, 2012). Los complejos IIa, IIb y IIc se ensamblan en el citoplasma: el complejo IIa es responsable de la activación del dominio de muerte celular asociado a FAS (FADD), mientras que el IIb posee la misma composición que el IIa, pero además incluye la proteína RIPK3 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3). Ambos cumplen una función central en la cascada apoptótica al activar la caspasa-8. El complejo IIc, también conocido como necrosoma, está constituido por la asociación de RIPK1 y RIPK3, que activa el dominio quinasa de linaje mixto (MLKL) mediante

la fosforilación mediada por RIPK3, induciendo necroptosis e inflamación (Holbrook et al., 2019).

TNFR2 no posee dominio de muerte, por lo que no induce apoptosis celular. TNFR2 se activa principalmente a través de la interacción con tmTNF- α , reclutando las proteínas TRAF2, TRAF1, cIAP1 y cIAP2 para formar un complejo cuya función principal es la activación de NF- κ B, MAPK y la proteína quinasa B (Akt). La señalización a través de TNFR2 está directamente relacionada con la regulación de la homeostasis, la regeneración tisular, la proliferación y la supervivencia celular (Fischer et al., 2020). Además, destaca por su capacidad de desencadenar respuestas inflamatorias y de defensa frente a patógenos.

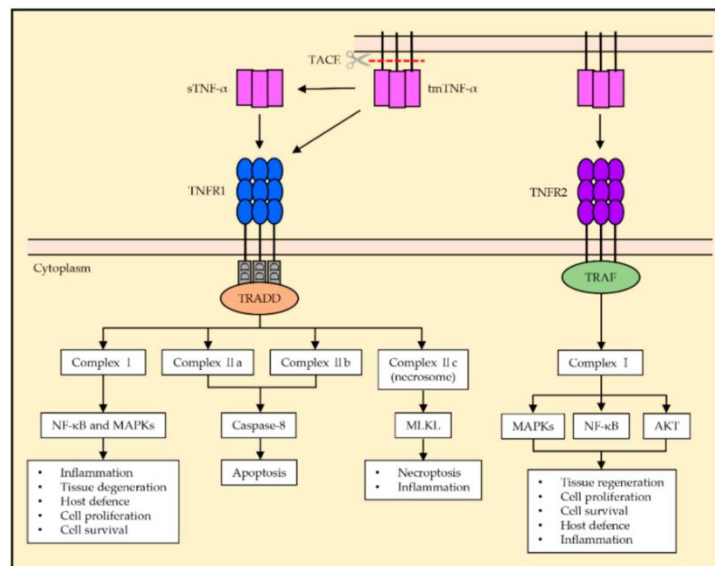


Figura 1. Vía general de señalización del TNF- α a través de TNFR1 y TNFR2 (Jang et al., 2021).

TNFR1 es esencial en la respuesta citotóxica y proinflamatoria, mientras que TNFR2 desempeña un papel fundamental en la activación, migración y proliferación celular (Jang et al., 2021). La expresión regulada de TNF- α en el organismo es un factor clave para el mantenimiento de la homeostasis; sin embargo, en enfermedades autoinmunes, concentraciones elevadas de esta molécula inducen inflamación sistémica, daño orgánico, producción de

mediadores inflamatorios y múltiples efectos perjudiciales en el organismo (Chen et al., 2019).

1.2 Fisiopatología del TNF- α en las enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes pueden ser analizadas a través del concepto de tolerancia inmunológica, que se define como la capacidad del sistema inmunitario para no responder a un antígeno debido a la exposición previa a ese mismo antígeno. Esta propiedad permite eliminar o inactivar los linfocitos con receptores de alta afinidad frente a autoantígenos, previniendo así ataques contra moléculas, células o tejidos propios (Wang et al., 2014; Shirafkan et al., 2024).

Dentro del concepto de tolerancia inmunológica se incluyen aspectos fundamentales como la tolerancia central, la anergia periférica, las células T reguladoras y la homeostasis mediada por citocinas, quimiocinas y sus receptores correspondientes. La tolerancia central se produce en el timo, mientras que la homeostasis del sistema inmunológico depende de la médula ósea. El timo realiza una selección positiva de linfocitos en desarrollo antes de que maduren y entren al torrente sanguíneo. En pacientes sanos, los linfocitos capaces de reaccionar contra el propio organismo son eliminados en la médula del timo por medio de la selección negativa. Posteriormente, cuando las células abandonan el timo, las células T maduras son sometidas a otra presión de selección secundaria, llamada selección periférica, que identifica y elimina las células T autorreactivas o las induce a entrar en un estado de anergia. Además, existe otro proceso llamado delección clonal, que tiene como objetivo excluir las células B que reconocen antígenos propios en la superficie celular. Sin embargo, algunas células B pueden reorganizar sus receptores y escapar de esta eliminación clonal (Abbas et al., 2019; Collet et al., 2025).

A pesar de estos mecanismos que bloquean posibles fallas en el cuerpo bajo estricta vigilancia central y periférica, algunos linfocitos con potencial autorreactivo pueden llegar a la periferia, incluso en individuos sanos. Por lo

tanto, los linfocitos T y B autorreactivos pueden inducir la producción de autoanticuerpos sin que necesariamente se desarrolle alguna patología. También existen autoantígenos que generan autoanticuerpos pero inducen tolerancia, a diferencia de los antígenos exógenos, que generan inmunidad. La tolerancia a los autoantígenos es fundamental para el correcto funcionamiento de nuestro sistema, pero si ocurren fallas en la tolerancia hacia estos autoantígenos se desencadenan procesos de reacciones autoinmunes, que se denominan enfermedades autoinmunes (Wang et al., 2015).

En este contexto, las enfermedades autoinmunes surgen como consecuencia de una ruptura en la tolerancia inmunológica, lo que conduce a una falla en la eliminación de autoanticuerpos que reconocen autoantígenos, afectando directamente la homeostasis del individuo. Esta desregulación también involucra a un conjunto de moléculas encargadas de modular la actividad efectora de las células inmunes, entre ellas el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el gen asociado a la activación de linfocitos 3 (LAG-3) y la inmunoglobulina y dominio de mucina de células T-3 (TIM-3) (Andretto et al., 2023). La alteración en la expresión de estos receptores en los linfocitos puede inducir una respuesta inmunitaria descontrolada, caracterizada por la liberación de citocinas proinflamatorias solubles, como IFN- γ , IL-23 y TNF- α , las cuales promueven y perpetúan la respuesta inmune tanto a nivel local como sistémico (Van der Vlist et al., 2016; Jang et al., 2021).

El TNF- α cumple una función primordial en el proceso inicial de la respuesta inmunológica, siendo uno de los principales reguladores del proceso inflamatorio. Se han producido ratones genéticamente modificados para no expresar TNF- α y otros que no presentan el receptor TNFR1, y los resultados indicaron que esta citocina tiene una acción homeostática, regulando el sistema inmunológico y los procesos inflamatorios (Croft et al., 2024). Su función, cuando se asocia al TNFR2, sugiere procesos fisiológicos naturales, como la regeneración tisular y cartilaginosa, la remielinización neuronal y la remodelación cardíaca (Probert, 2015; Fischer et al., 2020).

El efecto beneficioso está asociado a niveles normales de TNF- α ; sin embargo, cuando ocurre una desregulación en este proceso, esta citocina induce la inflamación, favoreciendo el reclutamiento de células inmunitarias que provocan la destrucción tisular (Kalliolias et al., 2016). Comúnmente, el desarrollo de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide (AR), la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la psoriasis se asocia a la función descontrolada del TNF- α (De Stefano et al., 2023).

A pesar de que esta citocina es objeto de muchos estudios, la fisiopatología del TNF- α en algunas enfermedades aún presenta muchas lagunas, mostrando efectos opuestos en distintas situaciones y fases de la enfermedad. En el cáncer, las evidencias indican que el TNF- α puede favorecer la mutagénesis y la progresión de tumores bien establecidos (Elinav et al., 2013; Croft et al., 2024). También puede presentar efectos contrarios en enfermedades cardíacas, teniendo un efecto cardioprotector en pacientes con miocardio sano y actuando como cardioprotector en pacientes con insuficiencia cardíaca (Haudek et al., 2007; Papathanasiou et al., 2015), pero el tratamiento preventivo con bloqueadores de TNF- α puede provocar efectos secundarios y no es financieramente viable (Rolski et al., 2020).

La AR es una enfermedad autoinmune crónica que afecta al 0,5-1% de la población mundial (Zhang et al., 2025). En América del Sur, se estima que esta enfermedad tiene una prevalencia del 0,5% en la población general y afecta principalmente a las articulaciones, ocasionando enrojecimiento, inflamación, artralgia y restricciones en la amplitud de los movimientos (Radner & Aletaha, 2015; Castro-Santos et al., 2017; Black et al., 2023). La AR produce déficits musculoesqueléticos, disminución de la calidad de vida y de las funciones físicas. El tejido sinovial sufre un daño severo y progresivo debido a la erosión continua del cartílago y de los tejidos adyacentes, lo que conduce a una discapacidad crónica. Además de afectar el ámbito socioeconómico, pues los medicamentos son costosos, los signos y síntomas de la enfermedad pueden

limitar la capacidad laboral del individuo y reducir su participación social (Smolen et al., 2016; Gao et al., 2024).

La inflamación del tejido sinovial (sinovitis) es el síntoma central en la patogenia de la AR, siendo el TNF- α la principal citocina inflamatoria involucrada en este proceso (Saurin et al., 2022). El proceso de edema articular y activación inmunitaria se caracteriza por la infiltración de células en el compartimento sinovial, predominantemente linfocitos T auxiliares tipo 1 (Th1) y macrófagos, aunque también pueden encontrarse linfocitos B y células dendríticas. Las células Th1 y los macrófagos son los mayores productores de TNF- α , lo que genera la activación de fibroblastos sinoviales que asumen un fenotipo invasivo, provocando una inflamación agresiva. Esto promueve la hiperplasia sinovial y el reclutamiento de células inflamatorias. Mediante la acción de citocinas (IL-1, IL-6 y TNF- α), los fibroblastos sinoviales se activan y, junto con células T y B acumuladas en el tejido sinovial, así como macrófagos y monocitos, inician un proceso de alta expresión de catepsinas y metaloproteinasas de matriz (MMP), que provocan la descomposición del colágeno y los proteoglicanos (Ingegnoli et al., 2013; Farrugia et al., 2016). Los condrocitos sufren un efecto catabólico y se estimulan los osteoclastos, acelerando la progresión patológica. Estos mecanismos provocan la erosión de cartílagos y huesos, generando un impacto negativo en las articulaciones (Feldmann y Mani, 2008; Jang et al., 2021).

En pacientes con AR, se observan niveles séricos elevados de TNF- α , además de una alta expresión de esta citocina en el líquido y la membrana sinovial, lo que provoca inflamación local y formación de *pannus*. Esta estructura se caracteriza por el crecimiento anómalo de tejido de granulación en las articulaciones, que conduce a la erosión del cartílago y la destrucción ósea (Hassany et al., 2024). Tanto las moléculas en forma soluble como transmembrana interactúan con los receptores de TNF- α (TNFR1 y TNFR2), activando un proceso inflamatorio. Por lo tanto, los bloqueadores del TNF- α pueden actuar disminuyendo la inflamación en sitios específicos al unirse al tmTNF, al sTNF- α y a los receptores TNFR1 y TNFR2 (Chen et al., 2019). La

desregulación fisiológica de las citocinas, especialmente del TNF- α , promueve eventos inflamatorios que pueden derivar en enfermedades inflamatorias autoinmunes. Durante las últimas décadas, se han desarrollado con éxito varios tratamientos biotecnológicos. Sin embargo, aún persiste una importante brecha que debe ser abordada mediante el desarrollo de nuevas terapias más eficaces y específicas (Singh, 2022).

1.3 Tratamiento farmacológico para la artritis reumatoide

En las últimas tres décadas, el tratamiento de la AR ha experimentado una transformación significativa en distintos ámbitos, dada la incorporación de nuevos fármacos e incluso clases novedosas de moléculas para la aplicación clínica. De acuerdo con las recomendaciones vigentes, muchos tratamientos ya están sólidamente establecidos, abarcando variadas categorías de medicamentos y etapas de la enfermedad. Los antiinflamatorios no esteroides (AINE), los glucocorticoides, los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) y los bloqueadores de TNF- α son habitualmente empleados. La prescripción de estos fármacos es altamente común en la práctica clínica para el manejo de enfermedades inflamatorias autoinmunes, ya que contribuyen a mitigar el dolor y el deterioro articular; por ello se requiere una evaluación exhaustiva en pacientes con este tipo de patologías (Singh, 2022).

Los AINE se han utilizado en el tratamiento de trastornos reumáticos por varios siglos. A lo largo del tiempo, se han identificado y desarrollado diversas variedades de AINE, todos ellos con propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias, siendo ampliamente utilizados en el manejo de las alteraciones articulares (Kaduševičius, 2021). Los AINE se agrupan en dos categorías: los tradicionales no selectivos y los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2).

Los AINEs no selectivos pueden diferenciarse según su estructura química y fueron descubiertos a mediados del siglo pasado (Rainsford, 2007).

Esta familia de fármacos bloquea tanto la COX-1 como la COX-2, lo que puede conllevar efectos adversos tales como alteraciones en la agregación plaquetaria, problemas gastrointestinales y nefrotoxicidad. Por otra parte, los AINEs selectivos para la inhibición de la COX-2 presentan una menor frecuencia de complicaciones gastrointestinales, aunque existen reportes de efectos adversos cardiovasculares, incluyendo eventos severos e incluso muerte súbita, en comparación con los AINE no selectivos (Davis & Robson, 2016; Ghlichloo & Gerriets, 2025).

Glucocorticoides

Los glucocorticoides son una clase de medicamentos que fueron descubiertos en la década de 1940, cuando se observó que la cortisona tenía efectos beneficiosos en pacientes con AR grave (Ferreira et al., 2016). El desarrollo y uso de los glucocorticoides en la práctica clínica están ampliamente difundidos, principalmente a través del empleo de prednisona, prednisolona y metilprednisolona, así como de glucocorticoides fluorados como la dexametasona y la betametasona, que se utilizan frecuentemente. Estos fármacos se unen a sus receptores para inhibir diferentes vías de señalización celular, como AP-1 y NF- κ B, lo que regula la expresión de citocinas y quimiocinas (Eiers et al., 2024). A pesar de su amplio potencial terapéutico y de los buenos resultados obtenidos en el tratamiento de la AR, los efectos secundarios pueden ser graves, incluyendo patologías cardiovasculares, infecciones, complicaciones gastrointestinales, alteraciones psicológicas, trastornos endocrinos, problemas dermatológicos, afecciones musculoesqueléticas (incluida la osteoporosis) y enfermedades oftalmológicas (Hua et al., 2020). Aunque existen diversas posibilidades de efectos adversos, el uso de glucocorticoides puede ser una herramienta valiosa en la clínica médica si se administra con cautela.

Medicamentos antirreumáticos convencionales modificadores de la enfermedad

El uso de AINEs y glucocorticoides contribuye al alivio del dolor y a la inhibición parcial del proceso inflamatorio. Sin embargo, ambas clases de medicamentos se emplean de manera paliativa, sin poseer la capacidad terapéutica de revertir la enfermedad. Ante este desafío, la búsqueda de fármacos capaces de reducir los síntomas de la AR, manteniendo los efectos secundarios bajo control, se convirtió en una prioridad, lo que llevó al desarrollo de los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs).

Entre los principales DMARDs, dos destacan en el tratamiento de la artritis reumatoide: leflunomida y metotrexato (MTX). Este último es un análogo y antagonista del ácido fólico, empleado para el manejo de diversas enfermedades inflamatorias autoinmunes. El tratamiento de primera línea, reconocido como el estándar de referencia para la AR, utiliza MTX, que se encuentra disponible en varias formulaciones, como oral y subcutánea. La elección de este fármaco responde a su adecuado perfil de toxicidad, respuesta clínica favorable, bajo costo y eficacia demostrada en el tratamiento prolongado (Singh, 2022). El mecanismo de acción del MTX consiste en la inhibición de enzimas dependientes de folato involucradas en la síntesis de purinas y pirimidinas, cruciales para la síntesis de ácidos nucleicos, lo que resulta en la supresión de la proliferación de linfocitos y la producción de citocinas proinflamatorias (Cronstein & Aune, 2020).

La leflunomida es un derivado del isoxazol y actúa inhibiendo selectivamente la síntesis de pirimidinas; al metabolizarse en teriflunomida, ejerce una acción inhibitoria sobre NF- κ B, regulando negativamente la producción de citocinas proinflamatorias. Además, la leflunomida disminuye la producción de metaloproteinasas, generando efectos beneficiosos en la AR (Laev & Salakhutdinov, 2015). El tratamiento de pacientes con AR es complejo y debe considerar múltiples factores, tales como el grado de la enfermedad, comorbilidades y tratamientos previos. La administración de DMARDs puede

realizarse como monoterapia o como parte de una terapia combinada, a menudo junto con glucocorticoides por períodos breves (Singh, 2022).

A pesar de los buenos resultados, algunos pacientes no responden a los tratamientos con DMARDs convencionales, por lo que se hace necesaria la utilización de medicamentos biológicos, los cuales también pueden administrarse como monoterapia o en combinación con otros DMARDs (Ma & Xu, 2012; Hwang & Moreland, 2014; Melo & Fonseca, 2021). Los bloqueadores de TNF- α son moléculas complejas que, en general, se basan en la estructura de inmunoglobulinas G (IgG) y presentan alta afinidad por su diana terapéutica. Estas biomoléculas son producidas mediante cultivos celulares especializados y se consideran tratamientos de alto costo.

1.4 Bloqueadores de TNF- α

La gran mayoría de los anticuerpos monoclonales (mAbs) aprobados emplean la estructura de la IgG humana, compuesta por dos cadenas pesadas de aproximadamente 50 kDa y dos cadenas ligeras de cerca de 25 kDa, formando así una molécula de 150 kDa (Vidarsson et al., 2014). La elección de esta estructura para el diseño de nuevos anticuerpos monoclonales se fundamenta en que la IgG, en comparación con otras inmunoglobulinas, es la más abundante en la sangre y está vinculada a la formación de complejos inmunes, activación del complemento y de células efectoras, además de contar con una mayor vida media en el organismo (Schroeder & Cavacini, 2010; Vidarsson et al., 2014; Damelang et al., 2024).

Actualmente, cinco bloqueadores del TNF- α cuentan con aprobación de la FDA y se encuentran disponibles en el mercado: etanercept, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y golimumab (Zheng et al., 2024). Etanercept (Enbrel[®]) corresponde a una proteína formada por dos regiones del receptor TNFR2 fusionadas a un fragmento Fc de IgG1 humana (Patel et al., 2023). Infliximab (Remicade[®]) es un anticuerpo monoclonal quimérico, con una región variable murina y una región constante de IgG1 humana. Adalimumab

(Humira®), generado mediante tecnología de *phage display*, se produce en células CHO y es completamente humano. Golimumab (Simponi®) corresponde a un isotipo de IgG1 humana producido en células de hibridoma murino. Certolizumab pegol (Cimzia®) consiste en un fragmento Fab monovalente de un anticuerpo anti-TNF- α que carece de región Fc y está conjugado con dos cadenas de polietilenglicol (PEG) de 20 kDa, lo que incrementa su vida media y solubilidad plasmática, además de reducir la inmunogenicidad y la sensibilidad a proteasas (Xue et al., 2025) (Fig. 2). Todos los bloqueadores de TNF- α mencionados anteriormente poseen indicaciones terapéuticas para distintas enfermedades autoinmunes, habiendo sido evaluados y aprobados por la FDA (Tabla 2).

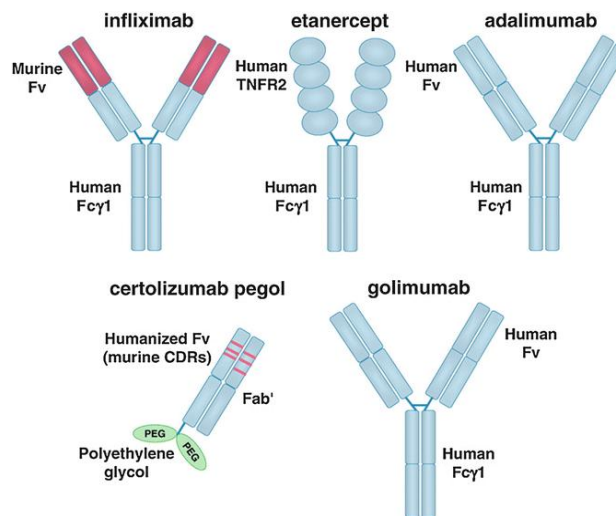


Figura 2. Estructura molecular comparativa de los diferentes anticuerpos anti-TNF- α disponibles en el mercado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Tabla 1. Descripción de la estructura y el mecanismo de acción de diversos agentes anti-TNF.
Adaptado de Gerriets et al., 2025.

Agentes	Estructura	Unión al TNF y acción
Etanercept	Proteína de fusión recombinante humana dimérica; 2 dominios del receptor soluble extracelular de TNF con la porción Fc de IgG1 humana;	Se une tanto a TNF- α como a TNF-beta con alta afinidad; Puede unirse a 2 moléculas de TNF circulante o unido a células; No causa apoptosis de células que expresan TNF- α ;
Infliximab	Anticuerpo monoclonal quimérico ratón-humano (70 % humano); Región constante (Fc) de IgG1k humana con región variable (Fv) murina;	Se une al TNF- α (no al TNF-beta) con alta afinidad; Puede unirse a TNF circulante o unido a células; Causa apoptosis de células que expresan TNF- α ;
Adalimumab	Anticuerpo monoclonal completamente humanizado IgG1k anti-TNF	Se une al TNF- α (no al TNF-beta) con alta afinidad; Puede unirse a TNF circulante o unido a células; Causa apoptosis de células que expresan TNF- α ;
Golimumab	Anticuerpo monoclonal completamente humanizado IgG1k anti-TNF	Se une al TNF- α (no al TNF-beta) con alta afinidad; Puede unirse a TNF circulante o unido a células; Causa apoptosis de células que expresan TNF;
Certolizumab pegol	Fragmento Fab de anticuerpo monoclonal recombinante totalmente humanizado anti-TNF fusionado con un grupo Peg de 400 kDa; No tiene región Fc;	Se une al TNF- α (no al TNF-beta) con alta afinidad; Puede unirse a TNF circulante o unido a células; No causa citotoxicidad mediada por complemento o anticuerpos; No causa apoptosis de células que expresan TNF ni desgranulación de neutrófilos;

Tabla 2. Indicaciones aprobadas por la FDA de varios agentes anti-TNF

	Adalimumab	Infliximab	Etanercept	Certolizumab	Golimumab
Artritis reumatoide	✓	✓	✓	✓	✓
Espondilitis anquilosante	✓	✓	✓	✓	✓
Artritis psoriásica	✓	✓	✓	✓	✓
Psoriasis en placas	✓	✓	✓	✓	
Enfermedad de Crohn en adultos	✓	✓		✓	
Enfermedad de Crohn pediátrica	✓	✓			
Colitis ulcerosa	✓	✓			✓ (subcutáneo)
Artritis idiopática juvenil (poliarticular)	✓		✓		
Hidradenitis supurativa	✓				
Uveítis	✓				
Espondiloartritis axial no radiográfica				✓	

El mecanismo de acción de estos agentes se diseñó para neutralizar el TNF soluble (sTNF), aunque también pueden ligarse al TNF transmembrana (tmTNF) (Tabla 1). Entre los bloqueadores, infliximab, adalimumab y golimumab presentan la estructura de IgG1, lo que les permite inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y activar la vía del complemento, conduciendo a citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y a la apoptosis. En consecuencia, estos agentes pueden inducir apoptosis y detención del ciclo celular, inhibiendo tanto células productoras como respondedoras de TNF- α (Lim et al., 2018; Melo et al., 2020).

Sin embargo, a pesar de su amplia utilización en tratamientos complejos, los anticuerpos monoclonales presentan efectos secundarios que pueden impactar significativamente la salud y el desarrollo del tratamiento a largo plazo. La formación de anticuerpos anti-fármacos puede comprometer la calidad y eficacia del tratamiento, dependiendo de si estos son de tipo neutralizante o no neutralizante, así como de los complejos inmunes que pueden formarse con el agente biológico (Thomas et al., 2015; Atiqi et al., 2020; Tourdot et al., 2025). Otro aspecto relevante es la variabilidad del sistema inmunológico individual. Entre los bloqueadores de TNF- α , el anticuerpo adalimumab es uno de los más utilizados y cuenta con aprobación para diversas enfermedades autoinmunes (Food and Drug Administration, 2018). Estudios recientes realizados en 417 pacientes identificaron que el 43,1% desarrolló anticuerpos anti-adalimumab después de 16 semanas de tratamiento, lo que podría llevar a una disminución de la actividad terapéutica de este anticuerpo monoclonal (Tourdot et al., 2025).

A pesar de los notables avances en las tecnologías de producción de nuevos fármacos, persisten brechas en el conocimiento que no han sido completamente dilucidadas: i) La complejidad de los mecanismos moleculares que permiten predecir respuestas óptimas o riesgos para ciertos pacientes (Xiao et al., 2025); ii) La dependencia del fármaco para mantener baja actividad de la enfermedad, o la necesidad de sustituirlo por otro medicamento; iii) La pérdida progresiva de la capacidad del paciente para responder al medicamento con el

tiempo; iv) La necesidad de perfeccionar las terapias, considerando la autoinmunidad primaria y los daños derivados del uso prolongado de estos fármacos (Smolen et al., 2016; Tourdot et al., 2025).

Entre los efectos adversos más frecuentes asociados al uso de bloqueadores de TNF- α se cuentan cefaleas, reacciones en el sitio de inyección o durante la infusión intravenosa, erupciones cutáneas, daño hepático leve, infecciones del tracto respiratorio, náuseas y dolor abdominal (Hansel et al., 2010; Goyal et al., 2023). Además, la administración conjunta de bloqueadores de TNF- α con agentes inmunosupresores puede favorecer infecciones bacterianas, fúngicas y virales graves — potencialmente fatales. Se han reportado casos de reactivación de tuberculosis y hepatitis viral B o C; por ello, resulta indispensable realizar una evaluación exhaustiva de los pacientes candidatos a estos tratamientos (Hadam et al., 2014; Jahnich & Arkwright, 2023).

El tratamiento con bloqueadores de TNF- α se asocia con un aumento en el riesgo de cáncer de piel no melanoma y linfoma no Hodgkin, por lo que es necesario extremar las precauciones en su uso en pacientes con antecedentes de neoplasias malignas o con mayor riesgo de desarrollo de neoplasias, según criterio médico (Mariette et al., 2011; Calip et al., 2018). Asimismo, la administración de estos fármacos en pacientes con patologías cardiovasculares, en particular insuficiencia cardíaca crónica, debe evaluarse cuidadosamente, ya que puede empeorar el pronóstico o inducir descompensación (Rolski et al., 2020). El uso de bloqueadores de TNF- α en pacientes con artritis reumatoide e insuficiencia cardíaca puede desregular las funciones sistólicas y diastólicas, especialmente a dosis elevadas. Estos efectos adversos están asociados con la unión de estos fármacos al receptor TNFR2, el cual posee funciones cardioprotectoras, por lo que resulta imprescindible extremar las precauciones en pacientes con algún grado de compromiso cardíaco (Hussain et al., 2021).

Considerando el escenario actual, persiste la necesidad de desarrollar moléculas con alta eficiencia, capaces de superar los problemas relacionados con la aparición de nuevas enfermedades y de mejorar la tasa de respuesta positiva de los pacientes. La obtención de un bloqueador de TNF- α que combine elevada capacidad de neutralización sobre la proteína diana, baja toxicidad, gran estabilidad, podría dar lugar a una molécula con relevancia comercial y competitiva frente a los bloqueadores de TNF- α actualmente aprobados y comercializados.

1.5 Innovación biotecnológica: producción de nanoanticuerpos para el sector biomédico.

El mercado de biofármacos experimenta un crecimiento acelerado, impulsado por la incorporación de nuevas moléculas dirigidas a una amplia variedad de blancos terapéuticos y producidas en diversas plataformas tecnológicas. Se proyecta que el mercado de anticuerpos monoclonales superará los 300 mil millones de dólares (USD) en 2025, alcanzando cifras superiores al billón de dólares para el año 2034 (The Business Research Company, 2025). Además, los anticuerpos monoclonales constituyen una clase de medicamentos de alto costo y representan un avance significativo en la industria biofarmacéutica, ya que aportan características como alta especificidad, selectividad y versatilidad terapéutica para el tratamiento de enfermedades complejas. El desarrollo de cada nuevo anticuerpo monoclonal puede implicar costos que oscilan entre 1 y 2 mil millones de dólares por medicamento aprobado (Chen et al., 2025).

Resulta innegable el impacto biomédico y tecnológico de los anticuerpos monoclonales en el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, se vuelve imprescindible continuar la búsqueda y desarrollo de nuevos anticuerpos que amplíen las opciones terapéuticas y mejoren las respuestas a lo largo de los tratamientos, incrementando la eficacia y reduciendo la inmunogenicidad a través de innovaciones estructurales y funcionales (Kothari et al., 2024).

Asimismo, la reducción de los costos de producción constituye un desafío central para favorecer el acceso universal a estos fármacos, que han demostrado impacto positivo en múltiples enfermedades (Lexchin, 2020).

Una de las clases que está ganando relevancia en el campo de la ingeniería de proteínas corresponde a los anticuerpos derivados de camélidos, los cuales disponen de un fragmento VHH (región variable de cadena pesada única) de aproximadamente 15 kDa. Esta característica facilita su manipulación y expresión en laboratorio, permitiendo el reconocimiento de una amplia gama de antígenos. Los nanoanticuerpos presentan tres Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) responsables por la unión a la diana (Moreno et al., 2022). En contraste, los anticuerpos humanos requieren de seis regiones CDR para alcanzar su máxima capacidad de unión a la molécula objetivo. Además, en los mAbs, las regiones CDR actúan sinérgicamente para favorecer la unión con los antígenos, mientras que en los nanoanticuerpos, la región CDR3 posee la capacidad total de promover una unión máxima al objetivo.

Estudios han demostrado que, pese a su pequeño tamaño, los nanoanticuerpos mantienen una capacidad de unión comparable a la de los mAbs, presentando constantes de disociación de equilibrio en el rango nano y picomolar, lo que evidencia parámetros de unión similares a los encontrados en los mAbs (Muyldermans, 2013; Ishiwatari-Ogata et al., 2022). Actualmente, ya se han desarrollado nanoanticuerpos empleados contra infecciones virales, tales como en la neutralización del virus de la fiebre aftosa, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de influenza A, coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), virus de la rabia, rotavirus y el virus asociado a la reciente pandemia global, SARS-CoV-2 (Rizk et al., 2024).

El uso de nanoanticuerpos también se extiende al diagnóstico de enfermedades infecciosas, orientándose al reconocimiento de proteínas relevantes en infecciones virales como el virus del dengue, hepatitis E y VIH, así como en patógenos bacterianos como *Brucella* spp. (Abbadly et al., 2011), *Escherichia coli*, *S. aureus* (Hu et al., 2021), y en la detección de la neurotoxina

botulínica (Goldman et al., 2008). Con el avance de la investigación oncológica, se han identificado numerosos biomarcadores que permiten evaluar procesos neoplásicos. En los últimos años, los nanoanticuerpos se han utilizado como marcadores para objetivos específicos, tales como la proteína 4 del epidídimo humano (HE4) (Tran et al., 2022), el antígeno carbohidrato 125 (CA 125) (Prantner et al., 2018), el antígeno prostático específico (PSA) (Huang et al., 2004) y la alfa-fetoproteína (AFP) (Su et al., 2021).

Estos marcadores moleculares resultan fundamentales para el diagnóstico de diversos tipos de cáncer. La utilización de nanoanticuerpos como metodología para el diagnóstico, monitoreo y seguimiento de enfermedades se presenta como una herramienta altamente eficaz (Rizk et al., 2024). El diagnóstico por imagen también se ha visto beneficiado gracias a las tecnologías basadas en nanoanticuerpos, facilitando el seguimiento clínico de distintas patologías. Sin embargo, su aplicación debe ser analizada con cautela, ya que la visualización de mecanismos intracelulares puede implicar riesgos de nefrotoxicidad debido a la elevada captación de estas moléculas por los riñones; dicha captación podría, además, dificultar la obtención de imágenes precisas en la proximidad de estos órganos (Ruggiero et al., 2010). Considerando su valiosa utilidad y la posibilidad de obtener secuencias altamente específicas y funcionales, los nanoanticuerpos destacan igualmente por su resiliencia en ambientes adversos.

Esta clase de anticuerpos posee aproximadamente una décima parte del tamaño de los anticuerpos convencionales, una alta afinidad de unión y características como rápida distribución y eliminación, eficiente penetración tisular, estabilidad frente a variaciones de pH y temperatura, además de una elevada solubilidad (Nguyen et al., 1999; Schoonooghe et al., 2012; Wanner et al., 2021). Gracias a esta capacidad de penetración en tejidos, ha sido demostrado que los nanoanticuerpos pueden atravesar la barrera hematoencefálica, posicionándolos como candidatos prometedores para el desarrollo de fármacos dirigidos al sistema nervioso (Ruiz-López &

Schuhmacher, 2021). Asimismo, debido a su alta solubilidad, es posible diseñar estructuras multiméricas que incrementan la capacidad de neutralización, superando a la de los anticuerpos monovalentes (Yang et al., 2023).

Los nanoanticuerpos se consolidan como moléculas prometedoras en aplicaciones terapéuticas, gracias a sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas singulares. Se han reportado resultados que muestran una mayor actividad de bloqueo de TNF- α utilizando VHH anti-TNF α humano, en comparación con los anticuerpos monoclonales humanizados infliximab y adalimumab, en un modelo murino de artritis reumatoide (Coppieters et al., 2006). Adicionalmente, su estructura permite la fusión con otros componentes que aumentan la vida media, como la región Fc de IgG (De Vlieger et al., 2018; Li et al., 2024).

Caplacizumab representa el primer fármaco basado en la estructura de un nanoanticuerpo que ha sido aprobado y comercializado para el tratamiento de la Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT). Además, diversos otros nanoanticuerpos destinados a tumores sólidos, trastornos inflamatorios y otras patologías se encuentran actualmente en fase clínica (Morrison, 2019). En los últimos años, se han desarrollado múltiples fármacos dirigidos a enfermedades autoinmunes utilizando la estructura de nanoanticuerpos. En 2022, el nanoanticuerpo Ozoralizumab, un bloqueador de TNF- α (Nanzora[®]), fue aprobado en Japón para el tratamiento de la AR (Keam, 2022). Junto a Nanzora[®], existen otros candidatos en desarrollo para el bloqueo de TNF- α y el tratamiento de enfermedades autoinmunes, los cuales se encuentran en fase de pruebas clínicas y podrían consolidarse como moléculas terapéuticas prometedoras (Alexander & Leong, 2024).

A pesar de los evidentes beneficios asociados al uso de nanoanticuerpos, dependiendo de la aplicación específica aún es necesario implementar modificaciones dirigidas a optimizar la afinidad por el ligando, aumentar la vida media en circulación y adicionar regiones funcionales, como la

región Fc de la IgG humana, que permitan conferir funciones efectoras (Bobkov et al., 2018; Jin et al., 2023).

La búsqueda de nuevas moléculas con capacidad terapéutica basadas en la estructura de nanoanticuerpos es una tendencia actual y prometedora. Sin embargo, existen obstáculos que pueden dificultar este proceso. Muchos grupos de investigación emplean la inmunización de llamas para ampliar la diversidad de nanoanticuerpos de alta afinidad frente al antígeno de interés. No obstante, la obtención de nanoanticuerpos sintéticos mediante secuencias con regiones aleatorizadas y optimizadas a través de métodos moleculares, como el *phage display*, permite generar moléculas innovadoras, con una reducción significativa en los costos y en el tiempo de producción (Baolong et al., 2025).

1.6 Tecnología *phage display* para la obtención de una biblioteca de nanoanticuerpos

La tecnología de *phage display* fue descrita por primera vez en 1985 (Smith, 1985) y pronto se difundió para diversas aplicaciones, consolidándose como una herramienta clave en el desarrollo de moléculas innovadoras con capacidad terapéutica para múltiples propósitos (Zhang, 2023). Gracias a esta herramienta biotecnológica, ya se han desarrollado varios medicamentos, como Humira® y Nanozora® (Frenzel & Schirrmann, 2016; Ishiwatari-Ogata et al., 2022).

La técnica de *phage display* utiliza bacteriófagos para generar bibliotecas de interés, que presentan una amplia variedad de secuencias y afinidad por moléculas diana. Se emplean fagos como T4, lambda y el bacteriófago filamentoso M13, aunque este último es el más usado en esta tecnología (Gamkrelidze & Dąbrowska, 2014; Jaroszewicz et al., 2022). El fago M13 produce una infección crónica, liberando de manera continua nuevos virus, y en particular infecta exclusivamente la bacteria *E. coli* mediante una proteína de la cápside que reconoce el pilus F. Tiene un genoma de ADN monocatenario de 6,407 pb que codifica 11 proteínas: cinco implicadas en la formación de la

cápside y seis relacionadas con procesos de replicación y ensamblaje (Davydova, 2022). El fago M13 presenta un diámetro de 6,5 nm y una longitud de 900 nm, con elevada abundancia de la proteína de la cápside G8P — encargada de recubrir el cromosoma— y otras cuatro proteínas principales (G3P, G6P, G7P y G9P), presentes en aproximadamente cinco copias cada una (Ledsgaard et al., 2018).

La tecnología de *phage display* permite la generación de bibliotecas con una alta diversidad de secuencias, facilitando la obtención de proteínas con gran potencial competitivo. Sin embargo, no se utiliza como sistema de expresión a gran escala, lo que hace necesario recurrir posteriormente a plataformas de producción robustas y validadas. Se ha ensayado la expresión en la superficie del fago de diversos péptidos y anticuerpos de camélidos (VHH), llamas (VHH), tiburones (IgVNAR), lampreas (VLR) y gallinas (IgY), con proteínas de hasta 100 kDa (Song et al., 2024). Entre estos anticuerpos, destacan los VHH, ampliamente producidos mediante la tecnología de *phage display*, debido a su estabilidad y elevada capacidad para mantener su estructura en entornos adversos.

La tecnología de *phage display* es altamente robusta y posibilita la generación de nuevas moléculas de interés económico y social. Sin embargo, es necesario producir esta proteína a gran escala, lo que implica seleccionar el método más adecuado para su producción. La elección de la plataforma de producción es fundamental para lograr una expresión proteica correcta, por lo que resulta indispensable evaluar las fortalezas y debilidades de cada sistema, ajustando la estrategia según las características específicas de cada proteína.

1.7 Plataformas de producción biofarmacéutica

Las moléculas de interés terapéutico pueden ser producidas en bacterias, levaduras, células de insecto/baculovirus, plantas, células de mamíferos y animales (Saleem et al., 2024). Las bacterias constituyen un modelo bien establecido para la producción de proteínas recombinantes y han sido el

sistema pionero utilizado durante décadas. Sin embargo, este sistema procariota presenta limitaciones para la formación de proteínas funcionales que requieren estructuras más complejas, pues enfrenta dificultades tanto en el plegamiento correcto de proteínas como en la realización de modificaciones postraduccionales. Además, las proteínas generadas pueden presentarse en cuerpos de inclusión o estar mal plegadas, lo que implica pasos adicionales de procesamiento (Íncir & Kaplan, 2024).

Ante el problema de la conformación proteica en organismos procariotas, los organismos eucariotas surgieron como solución para la producción de moléculas altamente complejas. Por ejemplo, las levaduras destacan por su capacidad para producir proteínas con modificaciones postraduccionales de manera soluble. No obstante, tales modificaciones, a menudo con patrones palindrómicos y elevadas cantidades de manosa, pueden afectar la termoestabilidad y la inmunogenicidad de las proteínas (Das et al., 2024).

El sistema de expresión basado en baculovirus también demostró ser una herramienta relevante en la producción de proteínas recombinantes, vacunas, terapia génica y bioplaguicidas. Sin embargo, cuestiones como la baja productividad y la presencia de baculovirus en el medio de cultivo pueden volver el proceso inviable (Hwang et al., 2024).

La plataforma vegetal ofrece ventajas tales como la capacidad de producir grandes cantidades de proteínas a bajo costo. Sin embargo, esta tecnología enfrenta desafíos para la obtención de biofármacos destinados a uso humano, ya que las células vegetales agregan modificaciones postraduccionales incompatibles con los patrones animales, incorporando azúcares como xilosa y α -(1,3)-fucosa, los cuales aumentan la inmunogenicidad de las moléculas producidas (Bardor et al., 2002; Liu & Timko, 2022).

Para este tipo de molécula, las plataformas basadas en células de mamíferos y animales son las más adecuadas (Martins et al., 2015; Laible et al., 2020). Las células de ovario de hámster chino (CHO) se emplean ampliamente para la producción de proteínas terapéuticas gracias a sus

características: crecimiento robusto en suspensión bien definida, libres de suero fetal bovino, un perfil de seguridad adecuado frente a la replicación de virus patógenos humanos, y una excelente capacidad para realizar modificaciones postraduccionales similares a las humanas. Estas cualidades, sumadas a su alta productividad estable, hacen de las células CHO una de las plataformas líderes para la obtención de proteínas recombinantes (Fischer et al., 2015; Zhang et al., 2024).

El uso de animales transgénicos representa una de las opciones más prometedoras actualmente para la producción de biofármacos complejos, dirigidos al tratamiento de enfermedades de gran impacto como diferentes tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes (Echelard et al., 2006; Gavin et al., 2014; Ciolek et al., 2021). La plataforma animal utilizada como biorreactor presenta importantes ventajas: i) bajo costo de implantación estructural; ii) facilidad de producción y escalado; iii) alta productividad combinada con el máximo valor biológico de las proteínas sintetizadas (Martins et al., 2016; Laible et al., 2020; Hay et al., 2022). Además, la proximidad filogenética entre mamíferos hace posible que las proteínas producidas sean estructuralmente similares a las humanas, reduciendo posibles efectos secundarios y aumentando la eficacia terapéutica. Por todos estos motivos, la plataforma animal destaca cada vez más y consolida un escenario robusto para el crecimiento global del sector (Monzani et al., 2022).

La expresión de proteínas recombinantes mediante la plataforma animal puede presentar ventajas en los costos de producción respecto a las células CHO, y puede conferir mayor afinidad (Tabla 3) (Wang et al., 2013; Laible et al., 2020; Biosourcing, 2025).

Tabla 3. Costo de producción estimado comparativo entre cultivo celular y transgénicos (Wang et al., 2013).

Producción en escala (Kg/año)	Sistema	Costo (USD/gramo)
50	Cultivo celular	147
	Transgénico	20
100	Cultivo celular	48
	Transgénico	6

Las proteínas recombinantes producidas en animales pueden expresarse a través de la orina, la sangre, el plasma seminal, el huevo de gallina, el gusano de seda y las larvas de *Drosophila* (Wang et al., 2013). Todas estas alternativas son viables, pero el sistema de expresión en la leche representa la alternativa más prometedora y ventajosa. La glándula mamaria se considera un sistema cerrado, evitando el paso de proteínas de gran tamaño al sistema vascular, permitiendo así una fácil recolección y alta expresión. Este sistema de expresión ha sido empleado en la producción de medicamentos aprobados tanto por la FDA como por la EMA (European Medicines Agency) (Gavin et al., 2014; Walsh & Walsh, 2022).

Se han utilizado ampliamente cabras, vacas, conejos y ratones para la expresión de proteínas recombinantes en su leche. Las agencias estadounidense (FDA) y europea (European Medicines Agency – EMA) ya han aprobado medicamentos producidos a través de la glándula mamaria de cabras (Atryn®) y conejos (Ruconest® y Sevenfact®), consolidando esta plataforma como un sistema de producción validado (Echelard et al., 2006; Gavin et al., 2014; Food And Administration, 2025).

En 2020, la FDA aprobó otro medicamento producido en leche de coneja: Sevenfact®, factor VII humano recombinante (rFVIIa) (Watson & Al-Samkari, 2022). Recientemente, la empresa Biosourcing® anunció que, gracias a la optimización en la producción de animales genéticamente modificados y en la purificación de la leche para obtener la proteína de interés, el costo puede alcanzar aproximadamente 10 USD por gramo (Bio-Sourcing, 2025).

1.8 Plataforma adenoviral como solución rápida para testeo de proteínas producidas en la glándula mamaria

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae* y se caracterizan por la ausencia de envoltura viral y por poseer ADN de doble cadena. Hasta el momento, se conocen siete especies de adenovirus (A a G) que provocan trastornos oculares, gastrointestinales, urinarios y neurológicos, aunque suelen asociarse principalmente con enfermedades respiratorias en humanos de todas las edades (Crenshaw et al., 2019).

El ciclo del HAdV depende de la especie y, en términos generales, el virus puede unirse a los receptores Coxsackievirus y Adenovirus (CAR), CD46, desmogleína-2 (DSG2) o al ácido siálico. Tras este reconocimiento inicial, el motivo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) en la base pentón del HAdV interactúa con las integrinas presentes en la membrana celular, facilitando la endocitosis. Para evadir la degradación celular, las proteínas de la fibra se eliminan y esto interrumpe la unión con los receptores primarios; posteriormente, se expone la proteína VI, lo que favorece la fuga endosómica hacia el citoplasma. Luego, el capsídeo es transportado hasta el núcleo, donde el genoma se condensa para ingresar a través de los poros nucleares (MacNeil et al., 2023; Salauddin et al., 2024).

Una vez en el núcleo, los genes del HAdV se expresan en dos etapas: la temprana, enfocada en la síntesis de genes relacionados con la replicación del genoma viral, y la tardía, dedicada a la expresión de proteínas cuya función es el ensamblaje de nuevos viriones dentro del núcleo y su posterior salida por la vía lítica (Murali et al., 2014; Crisostomo et al., 2019).

Gracias a su capacidad de ser modificados, su baja patogenicidad, la facilidad para obtener altos títulos virales y su eficiencia para transferir material genético exógeno, los adenovirus se han consolidado como herramientas valiosas en aplicaciones tanto terapéuticas como biotecnológicas (Tavares et al., 2016; Wang et al., 2022). A diferencia de otros virus, el adenovirus no se integra en el genoma celular, puede infectar células que se dividen y que no se

dividen, entrega múltiples copias en el interior de la célula, desencadena una intensa respuesta inmunitaria y, al no integrarse su ADN, permite que la expresión de los genes sea transitoria y, por lo tanto, más segura (Zhao et al., 2022).

Los vectores adenovirales más utilizados se basan en el adenovirus humano tipo 5 (Ad5), con modificaciones que generan defectos en la replicación por la eliminación de los genes E1 y E3. Esto garantiza que solo puedan replicarse en organismos específicos y aumenta la seguridad durante su manipulación (Araújo et al., 2022). Por lo general, la inserción de un gen de interés en estos vectores va acompañada de un promotor constitutivo fuerte, como el del citomegalovirus (CMV), lo que favorece altos niveles de expresión de proteínas recombinantes (Wold & Toth, 2013). Una vez que se completa el vector (tras la recombinación entre pAdTrack y pAdEasy-1), este fragmento linealizado debe ser introducido en células HEK293A, que aportan las partículas virales necesarias para la producción de adenovirus debido a que poseen una inserción estable del gen E1 en su propio genoma (Tavares et al., 2016).

Esta estrategia resulta fundamental para evaluar el sistema de expresión en la glándula mamaria, dado la gran complejidad que implica el establecimiento de líneas transgénicas de mamíferos para la expresión de proteínas recombinantes (Tavares et al., 2016; Leiva et al., 2021). La infusión de adenovirus en la glándula mamaria permite la expresión transitoria, posibilitando el análisis de la producción de la proteína deseada. Durante este proceso, la síntesis de la proteína de interés se mantiene hasta por 20 días, alcanzando niveles superiores a 2 g/L (Sánchez et al., 2004; Toledo et al., 2006).

Dada la alta prevalencia de las enfermedades autoinmunes (Zhang et al., 2025), el uso de fármacos permite reducir los signos y síntomas, aunque en muchos casos es necesario cambiar el medicamento o incluso la clase terapéutica empleada. La búsqueda de nuevos fármacos capaces de unirse y bloquear dianas específicas es esencial, y las modificaciones en su estructura pueden tener un impacto positivo en pacientes que dejan de responder a los

tratamientos convencionales. Los nanoanticuerpos presentan características que los convierten en candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos, especialmente cuando se obtienen a partir de bibliotecas de fagos, lo que permite introducir modificaciones en la secuencia que pueden maximizar la afinidad de unión y el bloqueo frente al objetivo seleccionado. La expresión de estos anticuerpos debe analizarse cuidadosamente, sobre todo cuando se añaden otras regiones a la secuencia principal, como la porción Fc de la IgG1 humana, que necesariamente debe ser expresada de forma funcional en células animales o en organismos genéticamente modificados.

A pesar de la amplia gama de bloqueadores de TNF- α actualmente disponibles en el mercado, la literatura evidencia limitaciones asociadas a estas terapias, incluyendo posibles efectos adversos, alto costo, resistencia al tratamiento o pérdida de respuesta con el tiempo. Por lo tanto, sigue siendo vigente la necesidad de identificar y desarrollar nuevas moléculas capaces de bloquear eficazmente el TNF- α , con potencial para ser utilizadas como opciones terapéuticas de primera o segunda línea, ofreciendo eficacia y seguridad comparables a los anticuerpos monoclonales comerciales.

El uso de nanoanticuerpos generados mediante *phage display* a partir de una secuencia degenerada es una estrategia oportuna para seguir investigando en el tema, por diversas razones: 1) su innovadora estructura; 2) la posibilidad de obtener secuencias con mayor actividad bloqueante; 3) su bajo peso molecular, que les confiere una gran capacidad de penetración tisular.

II. HIPOTESIS DE TRABAJO:

Los nanoanticuerpos sintéticos de tipo camélido, seleccionados mediante bibliotecas randomizadas por *phage display* utilizando un único ciclo de biopanning, bloquean eficazmente el rhTNF- α en comparación al anticuerpo comercial Adalimumab[®] en ensayos *in vitro*.

III. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Objetivo general:

Seleccionar, expresar y caracterizar nanoanticuerpos de tipo camélido capaces de bloquear el TNF- α en ensayos *in vitro*.

Objetivos específicos:

1. Seleccionar y caracterizar variantes de nanoanticuerpos de tipo camélido, obtenidos previamente de una biblioteca por *phage display*, para bloquear el TNF- α .

1.1 Expresión y purificación de las formas recombinantes humana y murina de TNF- α (rhTNF- α y rmTNF- α) en un sistema de expresión basado en *E. coli*.

1.2 Selección y aislamiento de nanoanticuerpos presentados en el fago M13 en base a su capacidad de unión a rhTNF- α y rmTNF- α .

1.3 Evaluación de la especificidad y afinidad de unión de los nanoanticuerpos seleccionados hacia rhTNF- α y rmTNF- α .

2. Producir IgY en gallinas para el reconocimiento de los nanoanticuerpos.

2.1 Expresión de nanoanticuerpos para inmunización en dos gallinas.

2.2 Evaluación y padronización de la capacidad de reconocimiento de IgY contra los nanoanticuerpos.

3. Evaluar la afinidad y la capacidad de bloqueo del nanoanticuerpo en comparación con Adalimumab[®] en ensayos *in vitro*.

3.1 Expresar el nanoanticuerpo soluble en bacterias *E. coli* para realizar ensayos de bloqueo en células L929, en comparación con Adalimumab[®].

3.2 Evaluar la constante de afinidad del nanoanticuerpo expresado en *E. coli* frente a TNF- α mediante termoforesis en microescala.

3.3 Validación de la expresión del nanoanticuerpo fusionado a la región Fc humana en células HEK293A.

3.4 Infusión de adenovirus en la glándula mamaria de cabras para la expresión transitoria y validación del anticuerpo en leche para futuros ensayos.

IV. METODOLOGÍA:

4.1 Técnicas generales de análisis y manipulación de ADN.

Electroforesis de ADN 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 200 ng/ml. A las muestras se les agregó tampón de carga y fueron cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a 100 V constantes durante 30 min. Los geles se visualizaron en un transiluminador UV.

Purificación de ADN plasmídico a escala mini-preparativa.

Para la purificación del ADN a pequeña escala (mini-preparación), se seleccionaron colonias individuales de *E.coli* que portaban los plásmidos de interés y se inocularon en tubos que contenían 5 ml de caldo LB suplementado con el antibiótico adecuado. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación constante a 150 rpm durante un periodo de 16 horas. Finalizado este tiempo, las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas a 8000 g durante 5 min, eliminando cuidadosamente el sobrenadante. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en 100 µl de solución I, asegurando una homogenización completa. Posteriormente, se añadieron 100 µl de solución II y se realizó una mezcla suave mediante inversión manual, incubando la mezcla durante 5 min a 25 °C. A continuación, se incorporaron 100 µl de solución III, homogeneizando con nuevas inversiones y manteniendo las muestras en hielo durante 15 min para facilitar la precipitación de los restos celulares. Las suspensiones se sometieron a centrifugación a 12000 g durante 15 min, transfiriendo el sobrenadante resultante a tubos limpios para evitar la contaminación con residuos celulares. A cada muestra se adicionaron 240 µl de isopropanol, mezclando cuidadosamente y se procedió a una centrifugación adicional a 12000 g durante 15 min para precipitar el ADN. El sobrenadante fue eliminado completamente y el precipitado de ADN se disolvió en 20 µl de agua ultrapura, evaluando tanto la integridad como

la presencia de ADN obtenido mediante corridas de electroforesis en gel de agarosa.

Digestión analítica con enzimas de restricción.

Para confirmar la identidad del plásmido introducido, se realizaron análisis por restricción enzimática. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 20 μ l con 1 μ g de ADN plasmídico y la cantidad de enzima de restricción recomendada por el fabricante, empleando el tampón adecuado. Las mezclas se incubaron durante 2 horas a 37 °C, o a la temperatura especificada para cada enzima. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se evaluaron los perfiles de fragmentos obtenidos para verificar la integridad y el tamaño esperado de los plásmidos en cada ensayo.

Preparación de bacterias quimiocompetentes y transformación

Todas las bacterias empleadas en este trabajo fueron preparadas para el proceso de quimiocompetencia siguiendo el protocolo descrito a continuación. Inicialmente, las cepas de *E. coli* se sembraron en agar sólido suplementado con antibióticos correspondientes. A partir de una colonia, se preparó un preinóculo cultivado en 5ml de medio LB durante 12 horas a 37 °C, con agitación a 150 rpm. Posteriormente, el preinóculo se transfirió a 300 ml de medio LB líquido sin antibióticos, incubándose hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0,6 nm. Finalizada esta etapa, las bacterias se enfriaron en hielo durante 15 a 30 min y se centrifugaron a 5000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado resultante se resuspendió en 200 ml de una solución fría de CaCl₂ 0,1 M, y la mezcla se centrifugó nuevamente a 5000 g durante 10 min a 4 °C, repitiendo este paso una vez más. Finalmente, el precipitado fue suspendido en una solución de CaCl₂ 0,1 M con un 10 % de glicerol y almacenado a -80 °C. Una vez obtenidas las bacterias quimiocompetentes, se les añadió ADN (concentración entre 200 y 1000 ng) y se incubaron en hielo durante 15 min. La mezcla de bacterias y ADN fue sometida a un choque térmico a 42 °C durante 2 min, seguida de una incubación en hielo

durante 2 min y, posteriormente, a temperatura ambiente durante 10 min. Luego, se agregó 1 ml de medio LB líquido y la suspensión se incubó a 37 °C con agitación a 150 rpm durante 1 hora, para posteriormente sembrar en placas de agar LB con los antibióticos correspondientes.

4.2 Técnicas generales de análisis y manipulación de proteínas.

Preparación de geles de poliacrilamida.

Se prepararon geles desnaturantes de poliacrilamida al 12 % y 1,5 mm de grosor para todos los análisis realizados. La composición de los geles empleados en la electroforesis de proteínas se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.

	Gel separador		Gel concentrador
	12,50%	15%	
Agua (mL)	2	1,4	1,3
Acrilamida 30% - Bisacrilamida 0,8% (mL)	2,4	3	0,5
Tris HCl 1,5M pH 8,0 (mL)	1,5	1,5	-
Tris HCl 0,5M pH 6,5 (mL)	-	-	650
SDS 10% (µl)	60	60	25
PSA 10% (µl)	60	60	25
TEMED (µl)	5	5	5

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).

Para la electroforesis de proteínas, se mezclaron las muestras con tampón de carga 6X con β-mercaptoetanol y se incubaron a 95 °C durante 5 min en placa térmica. Posteriormente, se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular en los geles de poliacrilamida. La separación de las proteínas se realizó con una corriente constante de 100 V durante 10 min, seguida de 120 V durante 90 min. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con azul de coomassie bajo agitación durante 60 min y, posteriormente, se lavó con una solución de

decoloración. Finalmente, el resultado fue digitalizado utilizando el equipo ODYSSEY-C1x (LI-COR).

Western blot.

Finalizada la electroforesis SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa mediante un equipo de transferencia semiseca (Trans-Blot® Turbo, BioRad), utilizando una corriente de 0,3 A y un voltaje de 20 V durante 30 min. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5 % (p/v) en TBS durante 1 hora, en agitación a 25 °C. La membrana se incubó con una solución de anticuerpo primario preparado en leche descremada al 1 % (p/v) en TBS, durante por 2 horas en agitación. A continuación, la membrana se lavó tres veces durante 10 min con tampón de lavado. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo, preparado en leche descremada al 1 % (p/v) en TBS, durante 1 hora en agitación. Tras una nueva serie de tres lavados, la detección de la señal de fluorescencia se realizó empleando el equipo ODYSSEY-C1x (LI-COR) y el análisis de las imágenes se llevó a cabo con el software Image Studio.

ELISA indirecto

Placas Maxisorp (Nunc, Thermo) fueron recubiertas con 50 o 100 µl de proteína a una concentración de 2,5 hasta 5 µg/ml (valores son distintos para diferentes objetivos) en tampón de recubrimiento, incubándose durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Tras retirar la solución de recubrimiento, las placas se lavaron tres veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado PBS con 0,05% tween. A continuación, los pocillos se bloquearon con 200 µl de una solución de leche descremada al 3 % (p/v) en PBS durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron las muestras preparadas en una solución de leche descremada al 1 % (p/v) en PBS-Tween 0,05 %. La incubación se realizó a 37 °C durante 1 hora. Después, se efectuaron tres lavados con tampón de lavado, se agregaron 100 µl por pocillo de anticuerpo

secundario conjugado a HRP y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Tras otros tres lavados con PBS-Tween, se añadieron 100 µl de la solución de revelado 1-Step™ Ultra TMB (Thermo Scientific). La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 50 µl de solución de parada (2,5M H₂SO₄), y la D.O. se midió a 450 nm en el lector de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek).

4.3 Expresión, purificación y validación del TNF-α humano y murino recombinantes.

4.3.1 Producción y cromatografía del TNF-α humano y murino.

Para la producción de rhTNF-α y rmTNF-α, se utilizaron los vectores pET-28b y pET-28a, respectivamente, ambos portadores de una cola de histidina (6xHis) para facilitar el proceso de purificación. El vector fue transformado en bacterias SHuffle quimiocompetentes, siguiendo el protocolo previamente descrito, y las bacterias transformadas fueron sembradas en placas de LB agar suplementadas con los antibióticos correspondientes (kanamicina para el rmTNF-α y ampicilina para el rhTNF-α).

Tras el crecimiento de colonias positivas, se seleccionaron aleatoriamente dos colonias para la expresión de cada proteína, y se realizó un preinóculo para evaluar la capacidad de las cepas de producir rhTNF-α y rmTNF-α. Replicamos el procedimiento de inducción de la expresión de ambos TNF-α, previamente optimizado en el laboratorio (Contreras et al., 2020). Las cepas se cultivaron en un biorreactor de 5 L con medio LB líquido y los antibióticos de selección correspondientes, induciendo la expresión con 0,1 mM de IPTG a 30°C durante 5 horas.

Tras el cultivo e inducción, el precipitado bacteriano se lisó en una solución de 50 mM Tris-HCl y 300 mM NaCl, pH 8, utilizando un homogeneizador EmulsiFlex C5 (Avestin, Canadá). Posteriormente, se realizó una centrifugación a 10000 g durante 30 min a 4°C para separar la fracción soluble de la insoluble.

Después de la separación, evaluamos la expresión de ambas variantes de TNF- α en la fracción soluble mediante Western blot. A continuación, se inició el proceso de cromatografía de afinidad utilizando una columna IMAC Sepharose High Performance cargada con Ni²⁺ en el equipo AKTA Start (GE Healthcare Life Sciences, Suecia). El proceso de cromatografía ya había sido establecido para el rhTNF- α , eluyendo a 300 mM de imidazol con un flujo de 3 ml/min (Contreras et al., 2020).

4.3.2 Ensayo de actividad de TNF- α humano y murino recombinantes en células L929.

El ensayo de actividad de rhTNF- α y rmTNF- α se realizó en células L929. Las células se sembraron a una concentración de 5×10^3 por pocillo en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB (Gibco®) y 1 % de antibiótico-antimicótico (Gibco®). Después de alcanzar el 100 % de confluencia, el medio se reemplazó por DMEM con 10 % de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico, suplementado con 1 μ g/ml de actinomicina D y diferentes concentraciones de rhTNF- α y rmTNF- α (de 1 a 0 ng/ml, en triplicados). Las placas se incubaron a 37 °C durante 20 horas en una incubadora con 5 % de CO₂. Para medir la viabilidad celular después del cultivo, se realizó un ensayo de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio] durante 4 horas a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO₂. Este ensayo mide la viabilidad mediante la formación de cristales de formazán, que generan una coloración azul, indicativa de actividad mitocondrial.

Transcurrido el tiempo establecido, se aspiró cuidadosamente el medio y se añadieron 100 μ l de isopropanol ácido. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 570 nm. El control correspondió al pocillo que contenía únicamente medio de cultivo y sus respectivos cambios.

4.4 Seleccionar y caracterizar variantes de nanoanticuerpos de tipo camélido, previamente obtenidos de la biblioteca de *phage display*, para bloquear el TNF- α .

La biblioteca de nanoanticuerpos fue construida utilizando un *scaffold* altamente estable en ambientes reductores, que también permitió cambios en las CDRs (regiones determinantes de complementariedad) sin desestabilizar la molécula. Debido a estas cualidades, se utilizó la “estructura universal” del dominio variable de cadena pesada (VHH) de camélido del nanoanticuerpo cAbBCII10. A partir de trabajos previos, fue posible emplear codones degenerados en las regiones CDR1 y CDR2, aunque adaptados para limitar solamente la presencia de aminoácidos hidrofóbicos. CDR1 y CDR2 fueron diseñadas con tamaño fijo. Para CDR3, se eligió una secuencia de 10 aminoácidos con el fin de obtener una topología de sitio de unión convexa. Se utilizaron tres codones degenerados, VRN, WYN y VNN, todos ellos variables, pero excluyendo la posibilidad de sustitución por cisteína, fenilalanina, triptófano y tirosina. Los nanoanticuerpos fueron clonados en el vector fagémido pMAC, que contiene sitios de restricción (NcoI, EcoRI, BamHI y NotI), seguidos de una secuencia codificante de enlace corto (SGGGG), un tag de histidina, un codón de parada ámbar y la proteína PIII del fago M13 (Moreno et al., 2022).

Las bacterias *E. coli* SS320 se cultivaron con el fagémido en un medio suplementado con ampicilina. Posteriormente, se añadió el fago auxiliar M13KO7 a una concentración de 1×10^{10} UFC/ml. Tras este procedimiento, las bacterias fueron centrifugadas a 2500 g, el sedimento bacteriano se resuspendió en medio líquido con antibióticos y se incubaron durante 20 horas a 30 °C para la producción de fagos.

Los fagos fueron purificados por precipitación con polietilenglicol, centrifugados a 8 000 g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo con 1/5 del volumen de polietilenglicol (PEG) al 20 % (p/v) y 2,5 M NaCl, homogeneizándose durante 1 hora. Las muestras se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en PBS, seguido de una nueva centrifugación a 12.000 g durante 5 min. El sobrenadante que contiene los fagos se transfirió a tubos nuevos para su almacenamiento a -20 °C y, para almacenamiento a largo plazo, se añadió glicerol al 10 % y se almacenó a -80 °C.

Las bacterias *E. coli* se cultivaron en agar (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar) durante 8 horas a 37 °C, para determinar el título de fagos mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). El cálculo del título de fagos se realizó utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Título (UFC } \mu\text{l)} = 25 \times \text{número de colonias} \times \text{factor de dilución}$$

La detección de fagos que reconocen la proteína diana se realizó en pocillos de placas de alta capacidad de unión (*high binding*, Costar Corning) con 100 μl de proteína diana a una concentración de 5–10 $\mu\text{g/ml}$ en tampón de recubrimiento durante la noche a 4 °C en una cámara húmeda. Tras eliminar la solución de recubrimiento, la placa se lavó con 200 μl de PBS por pocillo, seguido de un bloqueo con leche desnatada durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se eliminó la solución de bloqueo y se agregaron las muestras de fagos. Estas fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora, lavadas con PBS, y se añadió el anticuerpo anti-M13-HRP, manteniendo las mismas condiciones de incubación. Luego, se realizaron lavados sucesivos con PBS y se añadió la solución de revelado, incubando sin luz durante 10–20 min. Finalmente, a la reacción se añadió ácido sulfúrico 2,5 M y la lectura se realizó por D.O. a 492 nm.

4.5 Biopanning para selección de los fagos con mayor reconocimiento al TNF- α humano.

Se llevó a cabo el proceso de selección conocido como biopanning, que consiste en los siguientes pasos. Se recubrió una placa de 96 pocillos de alta capacidad de unión (*high binding*, Costar Corning) con una solución de rhTNF- α a 10 $\mu\text{g/ml}$ (100 $\mu\text{l/pocillo}$) y se incubó en cámara húmeda a 4 °C durante la noche. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0,1% y luego los pocillos fueron bloqueados con 300 μl de leche al 5% (p/v) diluida en PBS, incubándose a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se prepararon muestras de la biblioteca de fagos (10 μl) diluidas en 2,5 ml de leche al 5%.

Después del bloqueo, se efectuaron 20 lavados con PBS-Tween 0,1%, seguido de 4 lavados con 100 µl/pocillo de una solución de glicina-HCl con pH 2.2, agitando a 400 rpm durante 5 min. Luego, se eliminó la solución ácida y se neutralizó con 200 µl/pocillo de PBS pH 7.4, incubando por otros 5 min. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados adicionales, utilizando la misma metodología con la solución ácida, seguido de un nuevo bloqueo. Tras los extensos procesos de lavado, los fagos fueron eluidos utilizando una solución de rhTNF- α a 100 µg/ml diluido en PBS, agitando a 400 rpm durante 1 hora. Las muestras eluidas se emplearon para infectar bacterias *E. coli* TG1, que se cultivaron en placas con 2xYT/ampicilina, realizándose el recuento de colonias. Las colonias obtenidas fueron aisladas y los fagos producidos individualmente para evaluar su capacidad de unión a la proteína diana, rhTNF- α , mediante ELISA.

4.6 Obtención de ADN y transformación de las bacterias quimiocompetentes HB2151

La biblioteca de nanoanticuerpos fusionados con la proteína pIII del fago filamentoso fue construida utilizando una secuencia degenerada del vector pHEN-1-Tryp. Para la obtención de ADN de cadena sencilla, las bacterias fueron transformadas con los vectores pHEN-1-Tryp y pC89, y posteriormente infectadas con el fago auxiliar M13KO7. Tras la infección, las células se centrifugaron a 2500 g durante 10 min, los sedimentos se resuspendieron y suplementaron, luego se cultivaron durante 20 horas a 30 °C y 200 rpm, y los fagos se purificaron mediante polietilenglicol. Para la extracción del ADN de los fagos producidos, fue necesario sintetizar hebras heterodúplex para obtener la doble hebra. Los oligonucleótidos mutagénicos fueron fosforilados en el extremo 5' para la ligación con la ligasa T4. Tras la adición de los sustratos, el buffer y el agua, la reacción se llevó a cabo bajo los siguientes parámetros: 1 hora a 37 °C para la anillación, 3 min a 90 °C para la desnaturalización, descenso de la temperatura a 0,1 °C/segundo hasta 25 °C, y posterior incubación a 4 °C. Para la

polimerización, el ADN, junto a los sustratos necesarios, fue incubado a 20 °C durante toda la noche. El ADN resultante se purificó utilizando el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen®), siguiendo el protocolo con modificaciones. Posteriormente, los clones óptimos fueron secuenciados por la empresa MacroGen®.

Para la generación de las bibliotecas de nanoanticuerpos de camélido, se transformaron bacterias *E. coli* HB2151 quimiocompetentes. Se inocularon 5 ml de la cepa HB2151 en 500 ml de LB, incubando a 37 °C y 200 rpm durante la noche. Tras alcanzar la D.O. requerida (entre 0,5 y 0,8), el matraz se colocó en hielo durante 30 min, las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y se lavaron con cloruro de calcio 0,1 M. Posteriormente, se agregaron 1 µl de ADN a 100 µl de células HB2151 y la mezcla se incubó en hielo durante 15 min. Los tubos se colocaron en un bloque seco a 42 °C durante 2 min y luego se transfirieron a hielo durante 2 min. Se añadió 1 ml de LB y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se sembraron en placas de agar LB con ampicilina para seleccionar colonias positivas. Las colonias seleccionadas se cultivaron y se transfirieron a tubos con 25 ml de LB hasta alcanzar una D.O. de 0,5–0,8, induciéndose la expresión con IPTG a 1 mM a 30 °C durante 5 horas. Después, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C, el sedimento se resuspendió en tampón TES pH 7,2 (50 mM Tris-HCl + 0,1 mM EDTA + 20% sacarosa) e incubó en hielo durante 60 min. Finalmente, se centrifugó durante 30 min a 10000 g y 4 °C, y las muestras resultantes se almacenaron a –80 °C.

4.7 Producción de los nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α ligados a la proteína PIII del fago M13.

4.7.1 ELISA con los nanoanticuerpos titulados unidos a PIII do fago M13

A diferencia del ensayo anterior, en este ELISA se utilizó la misma concentración de fagos por pocillo para proporcionar condiciones estandarizadas

entre los diferentes clones. Se transformaron cepas de *E. coli* TG1 quimiocompetentes (empleando la misma metodología que para la HB2151 quimiocompetente) con el ADN de los clones de nanoanticuerpos y fueron seleccionadas en placas de LB con ampicilina.

Tras la transformación y el cultivo, se seleccionó una colonia por cada clon y se inició el proceso de producción de los fagos. Cada clon se cultivó en 200 ml de medio 2xYT hasta alcanzar una D.O. entre 0,6 y 0,9. En ese punto, se añadió el fago auxiliar M13KO7 a una concentración de 1×10^{10} UFC/ml, seguido de agitación suave e incubación durante 1 hora a 37 °C sin agitación.

Posteriormente, las células bacterianas fueron centrifugadas a 4000 g durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en medio 2xYT con 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de kanamicina y 0,5 mM de IPTG. Luego, se cultivaron durante 20 horas a 30 °C con agitación a 180 rpm.

Al día siguiente, el cultivo bacteriano fue centrifugado a 9000 g durante 10 min a 4 °C, y al sobrenadante se le añadió 1/5 (v/v) de polietilenglicol 6.000 junto con 2,5 M de NaCl. La mezcla se agitó por inversión y se almacenó a 4 °C durante 24 horas, seguida de una centrifugación a 9000 g durante 30 min.

El precipitado se resuspendió en 10 ml de solución con 2,5 M de NaCl y 20 % de PEG 6.000, se incubó a 4 °C durante 1 hora y se centrifugó nuevamente a 9.000 g durante 30 min. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 500 µl de PBS y se centrifugó a 12000 g durante 30 min. El sobrenadante se almacenó con 10 % de glicerol para proceder con la titulación por dilución y así determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias.

4.7.2 ELISA para determinación de la unión de los fagos titulados al TNF- α humano y murino.

Placas de alta afinidad (*high binding*) fueron recubiertas con rhTNF- α y rmTNF- α a una concentración de 5 µg/ml durante toda la noche a 4 °C y bloqueadas posteriormente con leche descremada al 3 %. Posteriormente, los fagos fueron diluidos a una concentración de 2×10^8 partículas por pocillo,

incubados a 37 °C durante 1 hora y lavados tres veces con PBS-T al 0,05 %. La placa fue incubada con anticuerpos anti-M13 en una proporción de 1:5000 (Sino Biological, Beijing, China) para determinar la afinidad de los fagos al rhTNF- α y rmTNF- α . Finalmente, la reacción se reveló añadiendo TMB Ultra (Thermo Scientific®), con lectura a una longitud de onda de 450 nm.

4.8 Producción de anticuerpos policlonales para identificación de los nanoanticuerpos bloqueadores de rhTNF- α .

Las citocinas rhTNF- α y mrTNF- α , así como los nanoanticuerpos, poseen una cola de histidina (6xHistag) para facilitar su identificación y purificación. Sin embargo, para evaluar la interacción entre ambas proteínas, fue necesario emplear un anticuerpo específico que reconociera únicamente a los nanoanticuerpos. Por este motivo, uno de los objetivos de este trabajo fue la producción de anticuerpos policlonales IgY capaces de reconocer los nanoanticuerpos producidos *in vitro*.

Para la generación de un anticuerpo policlonal frente a los nanoanticuerpos, se inmunizaron gallinas de la raza Isa brown (*Gallus gallus domesticus*). Para preparar el inmunógeno, se realizó una fermentación a escala de dos litros de los clones P1B6, P2B7, P2E2, P2E5 y P1G6 anti-TNF- α . Las proteínas presentes en la fracción periplásmica poseen una cola de histidina (6xHistag) y fueron purificadas utilizando columna IMAC Sepharose High Performance cargada con Ni²⁺ en el equipo AKTA Start (GE Healthcare Life Sciences, Suecia). La pureza fue evaluada mediante SDS-PAGE y posteriormente cuantificadas utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (Thermo Scientific, EE. UU.). A la solución que contiene los antígenos, se agregó el adyuvante Montanide ISA 61 VG (Seppic, Francia) en una proporción 60:40 de fase oleosa a fase acuosa.

En el ensayo se emplearon dos gallinas, que fueron inmunizadas por vía subcutánea (debajo del ala), usando 0,3 ml de la preparación vacunal que contenía 83,3 microgramos de antígeno (mezcla de los cinco clones de

nanoanticuerpos). Las inmunizaciones se realizaron en los días 0, 21 y 35. Los huevos se recolectaron desde el día 14 del esquema vacunal hasta 10 días después del último refuerzo.

Para la obtención de IgY anti-nanoanticuerpos, las yemas fueron separadas y el contenido se vertió en un tubo de 50 ml. Se añadió el doble del volumen obtenido de PBS, se mezcló y se incorporó PEG 6000 a una concentración final de 3,5 % (p/v) en la solución, agitando durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min a 4 °C. Tras obtener la fase acuosa, se filtró y se añadió PEG 6000 hasta una concentración de 8,5 % (p/v), para posteriormente agitar y centrifugar nuevamente a 10000 rpm a 4 °C durante 20 min. Se desechó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 10 ml de PBS, seguido de la adición de PEG 6000 al 12 % (p/v). Se procedió a una nueva ronda de agitación y centrifugación bajo las mismas condiciones. El sedimento obtenido se resuspendió en 0,8 ml de PBS y se dializó contra 1,6 litros de solución salina al 0,1 % durante la noche; posteriormente, la solución se cambió a PBS y se continuó la diálisis durante 4 horas más. Tras este proceso, las muestras se almacenaron en un congelador a -80 °C para, posteriormente, evaluar su capacidad de reconocimiento mediante ELISA.

4.9 Purificación, ensayo de unión y bloqueo de los nanoanticuerpos expresados en el periplasma de *E. coli* HB2151

4.9.1 Expresión y purificación de los nanoanticuerpos en periplasma de HB2151.

Los nanoanticuerpos fusionados a la proteína PIII del fago M13 que presentaron la mayor señal de unión por ELISA al rhTNF- α fueron seleccionados y transformados en bacterias HB2151 para la expresión de proteínas recombinantes en el periplasma. Las colonias positivas correspondientes a los principales clones fueron inducidas a la expresión cuando alcanzaron una D.O.

(600 nm) entre 0,6 y 0,9, utilizando 0,3 mM de IPTG durante 12 horas de cultivo a 30 °C.

Las bacterias fueron centrifugadas y posteriormente sometidas a ruptura celular utilizando un Vertical Planetary Ball Mill BKBM-V0.4 (Changsha City, China). Para separar la fracción soluble de la insoluble, las muestras fueron centrifugadas a 12000 g durante 30 min. Este proceso de centrifugación se repitió tres veces antes de destinar el sobrenadante al proceso de cromatografía de afinidad con columna IMAC, empleando Sepharose de alto rendimiento cargada con sulfato de níquel.

La columna fue equilibrada con 20 mM de NaH_2PO_4 y 300 mM de NaCl, ambos a pH 7,4, utilizando 5 volúmenes de columna. A continuación, la muestra fue diluida en tampón de equilibrio con 10 mM de imidazol (pH 7,4). La muestra recirculó dos veces en el sistema, realizándose lavados con tampón de equilibrio suplementado con 100 mM de imidazol y elución con concentraciones de imidazol desde 200 hasta 400 mM.

4.9.2 ELISA para medir la unión del nanoanticuerpo al TNF- α humano y murino.

Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de unión de los nanoanticuerpos producidos en cepas HB2151 frente a rhTNF- α mediante ELISA. El rhTNF- α fue inmovilizado en placas *high binding* a diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas fueron bloqueadas con PBS suplementado con 3 % de leche desnatada durante 2 horas a 37 °C.

A continuación, los nanoanticuerpos, purificados mediante un único paso cromatográfico por IMAC, fueron incubados en las placas durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, las placas fueron incubadas con anticuerpo primario IgY, obtenido en nuestro laboratorio, durante 1 hora a 37 °C en una dilución 1:10000. Se añadió anticuerpo secundario anti-IgY en la misma dilución (1:10000) e incubó durante 1 hora a 37 °C.

La reacción fue revelada con TMB Ultra (Thermo Fisher®) durante 10–15 min, deteniéndose con una solución de 2M de ácido sulfúrico (H₂SO₄), y la lectura se realizó a 450 nm. Cabe destacar que, entre cada etapa, las placas fueron lavadas 5 veces de forma automatizada utilizando una solución salina con 0,05 % de Tween.

4.9.3 Ensayo de bloqueo *in vitro* del nanoanticuerpo bloqueador de TNF- α en células L929.

Para el ensayo de viabilidad celular mediante MTT, las células L929 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB (Gibco®) y 1x de antibiótico-antimicótico (Gibco®) a 37 °C. Cuando el cultivo alcanzó el 80–90 % de confluencia, las células fueron tripsinizadas, contadas y sembradas en placas de 96 pocillos a una concentración de 5000 células por pocillo. Después de 72 horas, todos los pocillos alcanzaron el 100% de confluencia, momento ideal para iniciar el ensayo.

Verificada la confluencia y homogeneidad de los pocillos, se reemplazó completamente el medio por DMEM suplementado con 10% de SFB, 1x antibiótico-antimicótico, 1 μ g/ml de Actinomicina D y diferentes concentraciones de rhTNF- α humano, desde 3000 pg/ml hasta 0 pg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante 20 horas en una incubadora con 5 % de CO₂.

Posteriormente, para determinar la viabilidad celular, se realizó el ensayo de MTT durante 4 horas a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO₂. Tras el tiempo determinado, se aspiró cuidadosamente el medio y se añadieron 100 μ l de isopropanol ácido. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 570 nm.

4.10 Producción del clon P1D10 en *E.coli* SHuffle

La expresión del nanoanticuerpo en bacterias se llevó a cabo en un cultivo de 5 L de caldo LB suplementado con kanamicina. Tras el crecimiento del cultivo hasta alcanzar una D.O. (600nm) entre 0,6 y 0,9, la expresión fue inducida con 0,1 mM de IPTG durante 12 horas a 18 °C.

Las bacterias fueron recolectadas mediante centrifugación y posteriormente sometidas a lisis celular utilizando un molino de bolas planetario Vertical Planetary Ball Mill BKBM-V0.4 (Changsha City, China). El extracto bacteriano fue centrifugado a 10000 g durante 30 min, proceso repetido tres veces antes de destinar el sobrenadante al proceso de cromatografía de afinidad por IMAC empleando resina Sepharose de alto rendimiento cargada con sulfato de níquel.

4.11 Evaluación de la afinidad del nanoanticuerpo contra rhTNF- α .

4.11.1 Determinación de la K_D mediante ELISA no competitivo.

Se empleó el método descrito por Beatty et al. (1987) para la determinación de la constante de afinidad (K_D) del nanoanticuerpo P1D10 en comparación con Adalimumab mediante un ELISA no competitivo. Se recubrieron *placas high binding* con 100 μ l de rhTNF- α a concentraciones de 2,5 y 5 μ g/ml en tampón de recubrimiento y incubadas durante la noche a 4 °C. Posteriormente, se descartó la solución de recubrimiento y los pocillos se lavaron con 200 μ l de PBS-T. El bloqueo se realizó con 200 μ l de BSA al 3% (p/v) en PBS durante 2 horas a 37 °C.

Tras el bloqueo, se eliminó la solución y se agregaron soluciones de P1D10 (rango: 867 nM a 105,8 pM) y Adalimumab (rango: 200 nM a 12,2 pM), ambas en diluciones seriadas 1:2, con 100 μ l por pocillo preparados en PBS. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 hora, seguidas de tres lavados con (200 μ l/pocillo de PBS-T. En el caso de Adalimumab, se añadió 100 μ l por pocillo de anticuerpo anti-IgG humano conjugado a HRP (dilución 1:10000) y se incubó a 37 °C por 1 hora. Para el nanoanticuerpo, se empleó primero el anticuerpo primario IgY producido en este trabajo (dilución 1:5000) durante 1 hora a 37 °C y, posteriormente, anti-IgY (dilución 1:5000) durante 1 hora a 37 °C. Luego, se realizaron cuatro lavados con PBS-T y se agregó 100 μ l/pocillo de la solución reveladora TMB Ultra (Thermo Scientific), incubando en oscuridad durante 10

min. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M, y la lectura de la D.O. se realizó a 450 nm.

Los resultados de las curvas de unión fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism versión 7.0, determinando las concentraciones de anticuerpo correspondientes al 50% de la D.O. máxima registrada (DO₅₀). Finalmente, la K_D se calculó mediante la siguiente fórmula, donde [Ab] corresponde a la concentración de anticuerpo al DO₅₀ usando la mayor concentración de antígeno en el recubrimiento, y [Ab'] corresponde a la concentración de anticuerpo al DO₅₀ con la mitad de dicha concentración:

$$K_D = 2x(2 [Ab'] - [Ab])$$

4.11.2 Determinación de la K_D mediante ensayo de termoforesis microescala

Con el objetivo de caracterizar la interacción entre P1D10 y rhTNF-α, utilizamos termofóresis en microescala. Marcamos la rhTNF-α con RED-NHS y preparamos diluciones seriadas del componente no marcado; en todas las mezclas, la proteína marcada se mantuvo constante a 2 nM. Las concentraciones ensayadas para P1D10 abarcaron de 500 nM a 0.061 nM. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente, cargamos las muestras en capilares Premium y procedimos a las lecturas. Los experimentos se corrieron a 25 °C, con 80% de potencia de excitación y 60% de potencia de MST, y el análisis de las trazas se realizó al segundo 5.

4.12 Producción transiente del nanoanticuerpo P1D10 bivalente unido a la región Fc.

4.12.1 Validación de la expresión del nanoanticuerpo bivalente

Para la expresión del nanoanticuerpo bivalente (P1D10-P1D10-Fc), se construyó el vector pAd-Track con la secuencia del nanoanticuerpo en el formato bivalente. El vector fue transfectado en células HEK293A utilizando una

proporción de 1 µg de ADN por cada 100.000 células, empleando el sistema Neon System® con los parámetros de 1.500 mV, 20 ms y 1 pulso. Tras la transfección, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos y el medio fue sustituido por DMEM sin SFB, con el objetivo de facilitar la detección del anticuerpo.

Después de 3 días de cultivo en medio sin SFB, se recolectó el sobrenadante y se realizó un ensayo ELISA para detectar la expresión del nanoanticuerpo bloqueador de rhTNF-α. La placa de ELISA fue recubierta con 5 µg/ml de rhTNF-α y se siguió el mismo protocolo descrito previamente, salvo que se utilizó un anticuerpo anti-IgG humano conjugado con HRP (dilución 1:10000) e incubado durante 1 hora a 37 °C.

Para la revelación, se empleó TMB Ultra (Thermo Fisher®) durante 10–15 min, deteniendo la reacción con una solución de 2 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄), y la lectura se realizó a 450 nm. Cabe destacar que entre cada etapa, las placas fueron lavadas 5 veces de forma automatizada utilizando una solución salina con 0,05 % de Tween. Como control, se empleó el medio sin SFB de células transfectadas sin ADN.

4.12.2 Transformación y recombinación en el sistema pAdTrack y pAdEasy

El vector que contiene el gen para la expresión de P1D10 fusionado a la región Fc de una IgG humana fue sintetizado por la empresa GeneScript® y clonado en el vector pAdTrack bajo el control del promotor CMV. Este vector fue transformado en bacterias TOP10, seguido de la obtención del ADN plasmídico mediante midiprep (PureYield™ Plasmid Midiprep System, PROMEGA) y su posterior linealización con la enzima PacI, con el fin de promover la recombinación en bacterias *E. coli* BJ5183 previamente transformadas con el vector pAdEasy-1.

A continuación, el plásmido recombinante fue extraído, purificado y amplificado en la cepa DH5α. Finalmente, se realizó una segunda linealización con la enzima PacI para la posterior transfección.

4.12.3 Transfección para la confirmación de la expresión del nanoanticuerpo bivalente.

Después de la transfección, se realizó la visualización de la fluorescencia verde en las células, lo que confirmó la presencia del adenovirus. Para la transfección, se utilizó el sistema NEON (ThermoFisher®) en una proporción de 1 µg de ADN por cada 100000 células. En total, se transfectaron 1 millón de células, las cuales fueron cultivadas en placas de 6 pocillos y, posteriormente, el medio fue sustituido por 1 mL de DMEM suplementado únicamente con antibiótico durante 3 días. Transcurrido este período, se recolectó el medio de cultivo y se precipitaron 300 µl mediante la adición de 900 µl de acetona, incubando la mezcla durante 1 hora a 4 °C, seguida de centrifugación a 10.000 g durante 15 min. El precipitado resultante fue resuspendido en PBS y luego incubado en una placa high binding previamente inmovilizada con 5 µg/mL de rhTNF-α y bloqueada con PBS al 3 % que contenía 0,05 % de Tween durante 2 horas a 37 °C.

Después de la incubación con el sobrenadante del cultivo celular, se utilizó un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP para el reconocimiento del nanoanticuerpo fusionado a la región Fc de la IgG humana producida. La revelación de la reacción se realizó con TMB Ultra (ThermoFisher®) durante 10 a 15 min, deteniéndola con una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 M y la lectura se efectuó a 450 nm. Cabe destacar que, entre cada etapa, la placa se lavó en 5 ocasiones de forma automatizada utilizando una solución salina con 0,05 % de Tween.

4.12.4 Transducción en células HEK293A para confirmación del título viral.

Las células HEK293A fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico hasta alcanzar una confluencia del 80 % para el proceso de transfección mediante el sistema NEON (Thermo Fisher®). Tras la transfección, que se realizó empleando pulsos eléctricos con

parámetros de 1.500 mV, 20 ms y 1 pulso, las células fueron incubadas en medio sin antibióticos durante 24 horas.

Posteriormente, la formación de cometas en la placa de cultivo, indicativo de la replicación viral y de la infección de células vecinas fue observada. En ese momento, se procedió a la lisis celular mediante ciclos de congelación y descongelación, seguida de la infección de nuevas placas hasta obtener la cantidad suficiente de virus para su inoculación en el techo mamario de cabras inducidas hormonalmente a la lactancia.

La lisis consiste en 5 ciclos de congelación-descongelación, el producto fue centrifugado a 5000 rpm durante 30 min, y el sobrenadante obtenido se empleó para transducir una placa con aproximadamente 90 % de confluencia. Este proceso se repitió varias veces, siguiendo la proporción de que cada placa sometida a transducción infectaba tres placas nuevas de células HEK293A. Este procedimiento se realizó hasta alcanzar un título viral de 1×10^9 , cantidad necesaria para la infusión en la glándula mamaria.

4.12.5 Protocolo hormonal de inducción de lactancia y recolección de leche.

El protocolo de inducción de la lactancia se llevó a cabo en dos cabras adaptadas a la región semiárida del estado de Ceará. El experimento fue realizado en las instalaciones de la Universidad de Fortaleza (Unifor). El clima de la región se caracteriza como tropical cálido y húmedo, clasificado como tipo Aw/As según la clasificación de Köppen-Geiger (Beck et al., 2018). Las dos cabras seleccionadas estaban libres de problemas de salud y presentaban edades entre 3 y 4 años, alojadas en una misma instalación, con acceso ad libitum a sal mineral y agua, así como una dieta balanceada compuesta por pasto elefante, heno de tifton, maíz y soja, diseñada para suministrar entre 14 y 16 % de proteína bruta y de 65 a 75 % de NDT (nutrientes digestibles totales).

El protocolo hormonal incluyó la administración de cipionato de estradiol (ECP), progesterona (P4), acetato de prednisolona y somatotropina bovina

recombinante (rBST). La tabla 5 presenta el cronograma de aplicaciones para la inducción hormonal de la lactancia.

Tabla 5. Cronograma de aplicaciones de la lactancia inducida hormonalmente (mg/kg)

	Cipionato de Estradiol (mg/kg)	P4 (mg/kg)	Acetado de Prednisolona (mg/kg)	rBST (mg)
Día 1	0,25	0,75		125
Día 3	0,25	0,75		
Día 5	0,25	0,75		
Día 7	0,25	0,75		125
Día 9	0,25	0,75		
Día 11	0,25	0,75		
Día 13	0,25	0,75		
Día 14			0,4	125
Día 15			0,4	
Día 16			0,4	

Cipionato de estradiol: ECP (Zoetis®);

Progesterona: Projecio (Agener União®);

Acetato de metilprednisolona: Depo-Medrol (Wyeth®);

rBST: Boostin (MSD®);

Las aplicaciones hormonales se realizaron siempre en el mismo período del día, seguidas de masajes diarios a partir del cuarto día del protocolo. Ante los primeros signos de inicio de la lactancia, la leche fue recolectada para la medición del volumen producido. Se seleccionaron dos animales bajo los siguientes criterios: i) nunca haber gestado; ii) no haber experimentado procesos de lactancia, ya sean artificiales o naturales; iii) encontrarse clínicamente sanos.

4.12.6 Evaluación de la integridad, los niveles de expresión y la capacidad de unión a ligando del nanoanticuerpo producido en la leche.

Las muestras de leche fueron diluidas en Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 8. El suero fue extraído y centrifugado a 10000 g durante 30 min a 4 °C. La purificación cromatográfica se realizó utilizando una matriz de Proteína A-Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare, EE. UU.) en un sistema AKTA start controlado por el software AKTA prime view (GE Healthcare, EE. UU.). La columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,25 M, pH 8. Antes de cargar la muestra, esta fue filtrada mediante membranas Whatman, seguidas de filtros de 0,8, 0,4 y 0,22 µm (Merck-Millipore, Alemania) y diluida 1:3 en el tampón de equilibrio. Se realizó un lavado con el tampón de equilibrio y la elución se llevó a cabo con glicina 0,1 M, NaCl 0,25 M, pH 3, seguida de neutralización inmediata con Tris-HCl 1 M, pH 8 en una proporción de 100 µl/mL.

Se realizó un SDS-PAGE utilizando un gel de acrilamida al 10 %, y las muestras fueron desnaturalizadas y aplicadas en cada pocillo. Los parámetros utilizados fueron 110 V durante 1 hora y 30 min. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema Trans-blot®. Tras este proceso, la membrana se incubó con leche descremada al 5 % durante 1 hora. Después de este período, se incubó con anticuerpos secundarios anti-humano IgG Alexa Fluor® 790 (Cat. N.º 709 655-149) y anti-cabra IgG Alexa Fluor® 680 (Cat. N.º 705 625-147). Entre cada etapa, la membrana fue lavada con TBS con 1 % SDS y 1 % Tween. Finalmente, la detección se realizó utilizando un sistema de fluorescencia Odyssey® DLx (Li-cor, EE. UU.).

4.13 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizará el programa GraphPad Prism versión 7.0, considerándose estadísticamente significativo un valor de p menor o igual a 0,05.

5. Resultados

5.1 Expresión del TNF- α humano y murino recombinantes.

La expresión de las moléculas de rhTNF- α y rmTNF- α fue fundamental para los ensayos de selección de los nanoanticuerpos. Ambos TNF- α recombinantes fueron diseñados y optimizados en trabajos previos (Contreras, 2020). En síntesis, el rhTNF- α producido en el laboratorio mostró actividad biológica, y su forma homotrimérica (~54 kDa) fue visualizada en geles de poliacrilamida. Resultados previos demostraron que el rhTNF- α producido en laboratorio posee una actividad biológica más pronunciada que el rhTNF- α comercial. Además, esta actividad puede ser bloqueada en presencia de inhibidores de TNF- α , lo que demuestra que la molécula producida es completamente funcional.

Se emplearon distintos vectores para cada citocina: el rhTNF- α fue clonado en el vector pET22b(+), que confiere resistencia a la ampicilina, mientras que el rmTNF- α fue clonado en el vector pET29a(+), con resistencia al antibiótico kanamicina. Ambas secuencias están bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y poseen una cola de histidina (6xHis), lo que facilita su identificación y purificación.

Para la expresión, se utilizaron bacterias *E. coli* SHuffle[®] T7 Express, y la inducción se realizó con IPTG a una concentración final de 0,1 mM, lo que permitió la obtención de la proteína en forma soluble y en cantidades suficientes para el desarrollo del estudio. La identidad de rhTNF- α y rmTNF- α fue confirmada mediante SDS-PAGE y Western blot, mostrando un tamaño de aproximadamente 17 kDa, correspondiente al valor esperado para esta citocina (Fig. 3).

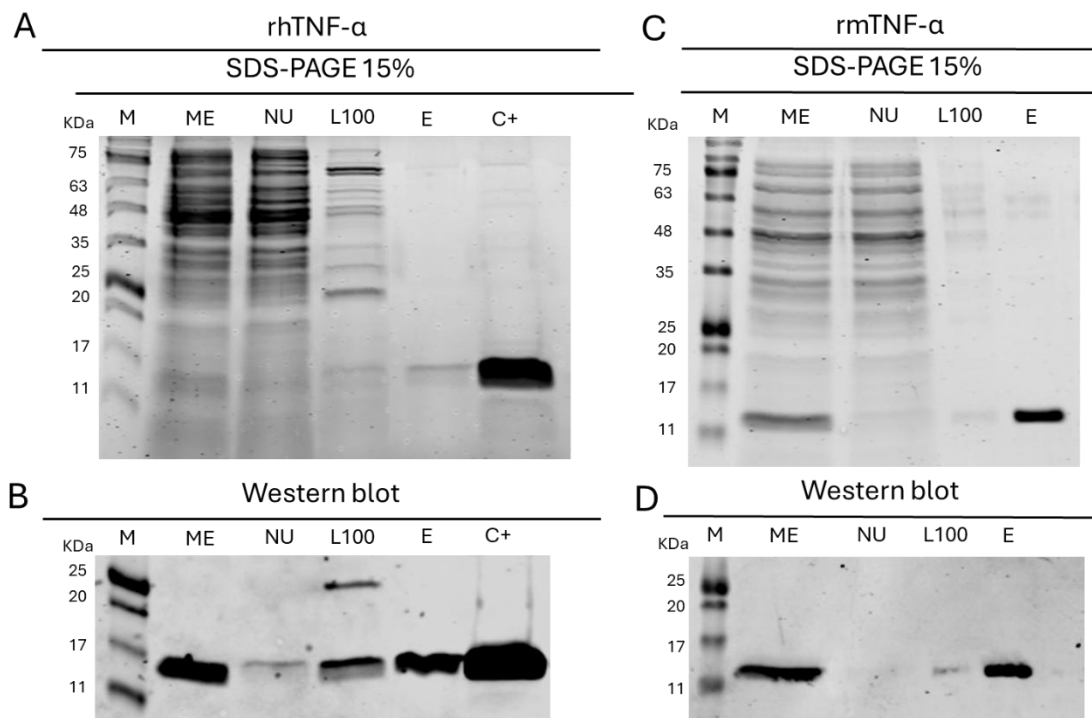


Figura 3. Validación de la expresión de rhTNF- α y rmTNF- α . (A) SDS-PAGE 15% de la purificación de rhTNF- α , indicando el grado de pureza de la muestra. (B) Western blot para detección de la presencia de rhTNF- α . M: marcador de peso molecular. ME: Muestra de entrada. NU: Muestra no unida. L100: Lavado con 100mM de imidazol. E: Elución con 300mM de imidazol. C+: Control positivo con rhTNF- α (A y B). (C) SDS-PAGE 15% de la purificación de rmTNF- α , indicando el grado de pureza de la muestra. (D) Western blot para detección de la presencia de rmTNF- α . M: marcador de peso molecular, ME: Muestra de entrada, NU: Muestra no unida, L100: Lavado con 100mM de imidazol. E: Elución con 300mM de imidazol. C+: Control positivo con rhTNF- α (C y D). Los Western blot fueron marcados con anti-6x HisTag producidos en ratones (1:10000) (BioLegend) y el anticuerpo secundario anti-mouse (1:10000).

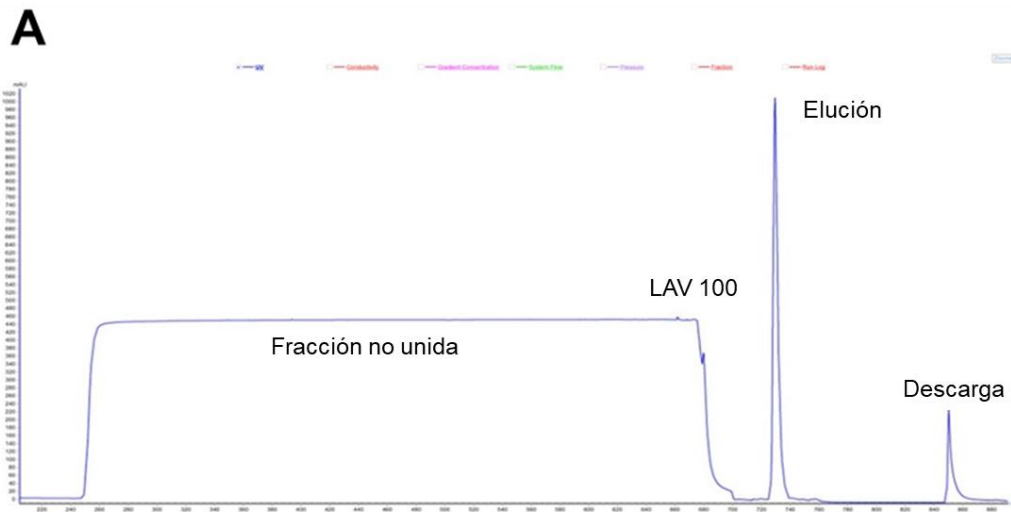


Figura 4. Cromatograma de la purificación del TNF- α . (A) murino y (B) humano, utilizando lavados con 100mM de imidazol y la elución con 300mM de imidazol.

5.2 Ensayo de citotoxicidad del TNF- α humano y murino recombinante.

El ensayo de citotoxicidad de las citocinas rhTNF- α y rmTNF- α fue fundamental para validar la actividad de estas moléculas recombinantes. Las células L929 fueron tratadas con diferentes concentraciones de rhTNF- α y rmTNF- α , en un rango de 3000 pg/ml a 0 pg/ml. Tras 20 horas de tratamiento, la viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de MTT, empleando como control células no tratadas.

La concentración inhibitoria del 50% (IC50) para el grupo tratado con rmTNF- α fue de 5,8 pg/ml (Fig. 5A), mientras que para el grupo tratado con rhTNF- α fue de 22,81 pg/ml (Fig. 5B). En consecuencia, el rmTNF- α mostró una citotoxicidad aproximadamente cuatro veces mayor sobre las células L929 que el rhTNF- α . Dado que L929 es una línea celular de origen murino, es esperable una mayor susceptibilidad a citocinas murinas. En conjunto, estos resultados confirman la actividad biológica de ambas citocinas y demuestran que las moléculas producidas son funcionales, habilitando su uso en los ensayos subsiguientes.

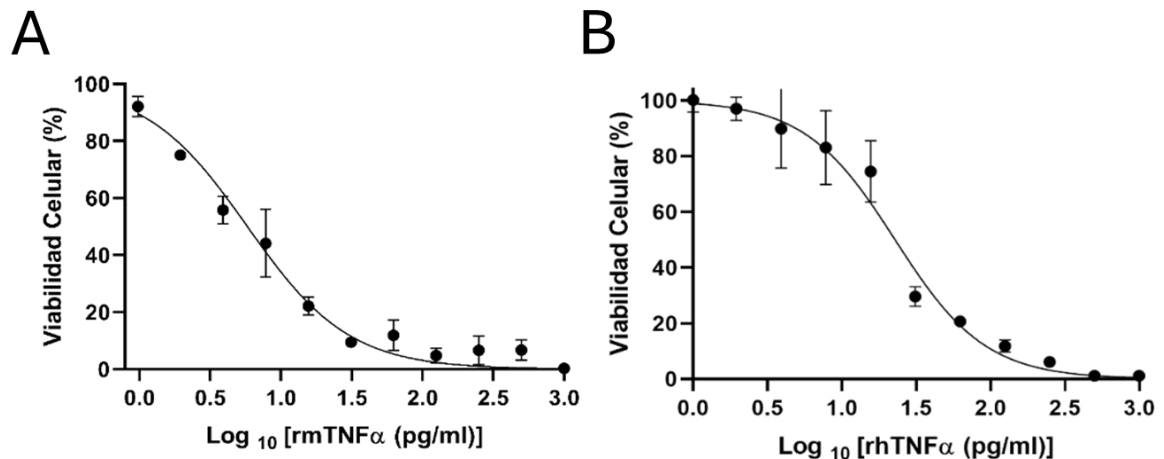


Figura 5. Ensayo de citotoxicidad de rmTNF α y rhTNF α . Células L929 fueron tratadas con distintas concentraciones de rhTNF- α y rmTNF- α (0-1ng/ml). Tras 20 horas, la viabilidad celular fue determinada mediante ensayo de MTT. Se utilizó rhTNF- α (producido y validado en el laboratorio) como control positivo (C+). (A) El valor de EC50 para TNF- α recombinante murino fue de 5.8pg/ml, rango (5,032 to 6,707). (B) El valor de EC50 para TNF- α recombinante humano fue de 22.81pg/ml, rango (19,19 to 27,08).

5.3 Secuencia del vector para la producción de la biblioteca de nanoanticuerpos.

La biblioteca sintética utilizada en este estudio fue derivada del nanoanticuerpo de camélido cAbBCII10 (3DWT en el PDB) (Fig. 6). Con el objetivo de preservar la estabilidad molecular, el diseño de las regiones CDR1 y

CDR2 mantuvo una longitud fija, correspondiente a la original de la secuencia cAbBCII10. Las modificaciones se dirigieron hacia los residuos seleccionados del nanoanticuerpo cuyas cadenas laterales están expuestas en la superficie, con el fin de favorecer la estructura y permitir alteraciones que maximicen la afinidad por los objetivos.

A

ATGCGAAGACTccatggGCCAGGTGCAACTGGTCGAGAGT
 GGCGGCGGCTCCGTCCAAGCTGGTGGCTCGCTTCGCTT
 GTCCTGCACGGCTTCGGGTDMYVRNVRNHWYVRNTACD
 MYVNNTTCKMYTTAGGCTGGTTTTGCCAAGCACCAGGA
 CAGGAACGTGAGGCTGTAGCCGCAATCKMYWBGVRNG
 GTGGAADMACTTACTACGCAGATTCCGTAAAAGGCCGCT
 TTACAATTCGCGTGATAACGCCAAGAATACCGTGACATT
 GCAAATGAATAACTTGAAACCGGTAGACACTGCCATTTAC
 TATTGCGCGGCCVNNVRNWMYVRNWMYVNNWMYYWYV
 RNTMYTGGGGACAGGGAACCCAGGTCACCGTGTCTGG
 CGGAGGCGGATCTCACCACCACCACCACCTAGgcgggcc
 gcGTCTTCGATC

B

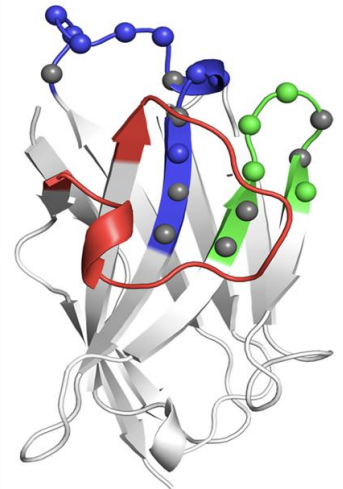


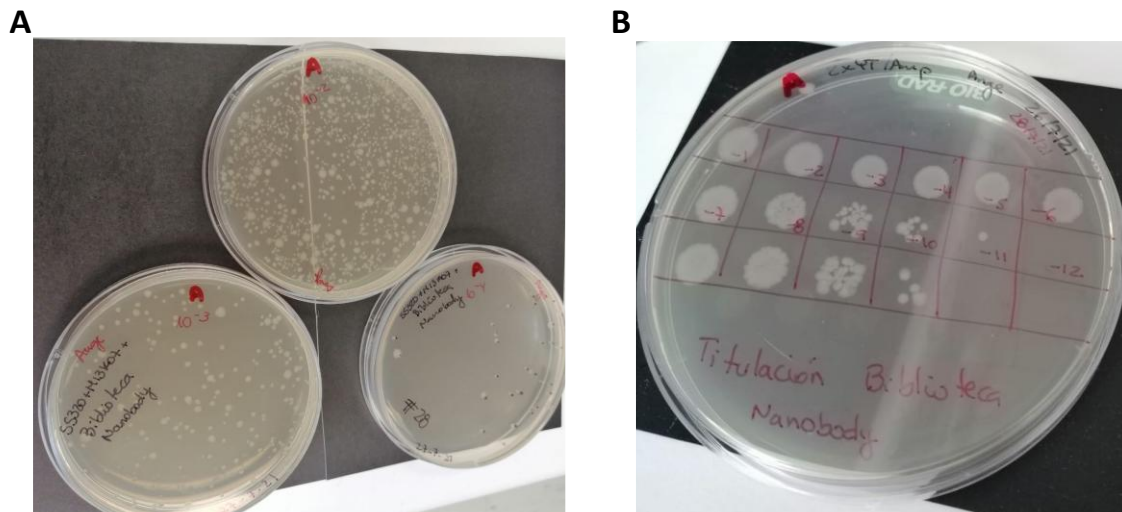
Figura 6. Secuencia y estructura del cAbBCII10 utilizada para la construcción del nanoanticuerpo bloqueador de TNF- α . (A) Secuencia del nanoanticuerpo con las regiones CDR randomizadas. (B) Modelo 3D del nanoanticuerpo con regiones degeneradas (diseño basado en el PDB: 3DWT). Las regiones CDR están representadas con los mismos colores que en la secuencia mostrada en (A).

La randomización de las secuencias se llevó a cabo utilizando codones degenerados representados mediante los símbolos de bases degeneradas de la IUPAC, excluyendo la inserción de cisteínas en las regiones randomizadas. Se conservaron los aminoácidos que, aparentemente, son cruciales para la estabilidad y conformación de los nanoanticuerpos (Moreno et al., 2022; Contreras et al., 2023). Las regiones degeneradas se seleccionaron con el objetivo de introducir aminoácidos hidrofóbicos, realizando mayores modificaciones en la CDR3, compuesta por 10 residuos. La presencia de aminoácidos cargados también fue considerada esencial, por lo que se añadieron

los codones VRN y WMY en varias posiciones. El codón VRN puede ser sustituido por una glicina, lo que favorece una mayor diversidad conformacional de la proteína. Asimismo, el codón VNN proporciona una alta variabilidad en la secuencia, permitiendo la sustitución por una amplia gama de aminoácidos. En total, se randomizaron 22 posiciones a lo largo de la secuencia.

De esta manera, nuestra secuencia incluye 22 posiciones randomizadas para la codificación de los distintos aminoácidos mencionados, lo que favorece la generación de una gran diversidad de clones frente a las proteínas objetivo.

La construcción y síntesis del vector para la producción de la biblioteca de nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α fusionados a la proteína pIII resultó en la obtención de 97 clones en una placa de LB ágar (Fig. 7).



Diana de selección	Conteo de UFC tras la infección de <i>E.coli</i> TG1 con el total de la elución
rhTNF- α	97 (Conteo total)

Figura 7. Biblioteca de fagos que presentan nanoanticuerpos. (A) Diversidad de biblioteca de nanoanticuerpos. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) tras la electroporación de bacterias *E. coli* cepa SS320 con M13KO7 electrocompetentes con la biblioteca de nanoanticuerpos. (B) Determinación de la concentración de fagos en la biblioteca, por titulación y conteo de UFC. (C) Tabla con las colonias seleccionadas.

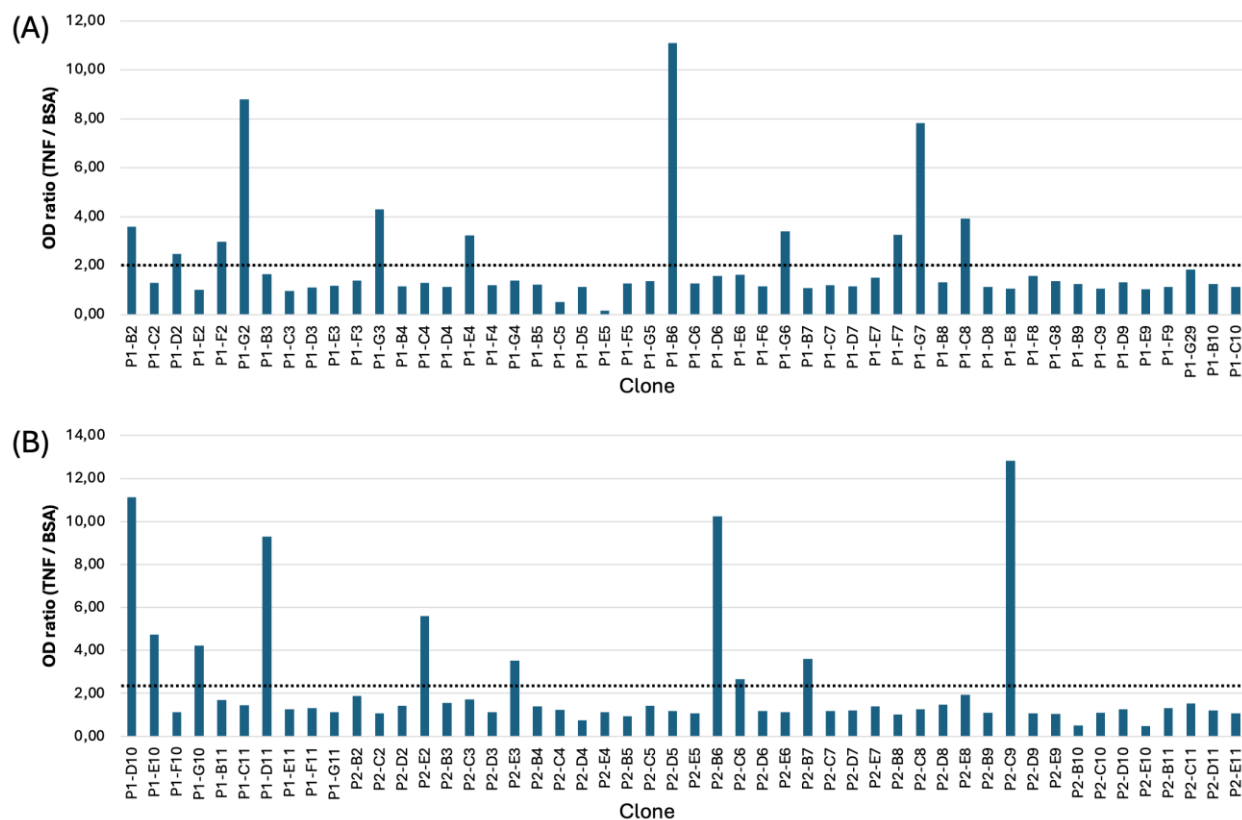


Figura 8. Detección basada en ELISA de clones de fagos contra TNF- α humano recombinante. (A–B) Razones de densidad óptica (DO) obtenidas en ensayos ELISA de 100 clones individuales de fagos evaluados contra TNF- α humano recombinante (rhTNF- α) y el agente bloqueador albúmina sérica bovina (BSA). Cada barra representa la razón DO (TNF/BSA) para un solo clon, calculada como la absorbancia medida en pocillos recubiertos con TNF- α dividida por la absorbancia obtenida en los pocillos de control con solo BSA. En el panel A se muestran cincuenta clones y en el panel B, los cincuenta restantes. La línea punteada indica el valor de corte (razón DO = 2), que se utilizó para definir los clones positivos, los cuales fueron seleccionados para posteriores análisis. El control negativo utilizado fue el fago M13KO7. El ELISA se realizó utilizando un anticuerpo primario anti-M13-HRP (1:5000).

Después del crecimiento de 97 colonias en agar LB, cada colonia fue aislada e inducida individualmente para la producción de fagos. Mediante el cultivo de cada colonia de bacterias *E. coli* TG1, se realizó un ELISA para determinar la capacidad de unión de los fagos al rhTNF- α . Como control, se utilizó la densidad óptica del fago auxiliar M13KO7. Se identificaron 27 clones, mediante ELISA, como posibles candidatos a bloqueadores de TNF- α (Fig. 8), lo que indica que la biblioteca sintética permitió la obtención de clones con capacidad de unirse al

TNF- α . Esto demuestra que la utilización de un solo paso de biopanning también puede permitir la selección de fagos con alta capacidad de unión al blanco.

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de los clones de nanoanticuerpos seleccionados mediante ELISA.

Clone	Secuencia
p1-B2	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG NHDLRYASFAL GWFRQAPGQEREAVAA IYWRGGI TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA RGYGNRYLHY WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p1-G2	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG YQRHKYNHFL GWFRQAPGQEREAVAA ISRKGGK TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA QRTESDNRYR WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p1-G3	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG ARKFRYYAFAL GWFRQAPGQEREAVAA ISMNGGN TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA TRTRNRSFGY WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p1-B6	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG YGNRYNTFSL GWFRQAPGQEREAVAA ISSSGGI TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA IGSKTASHRS WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p1-G6	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG DORISYSRFA GWFRQAPGQEREAVAA ISSEGGK TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA GRYHNVNHR WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p1-G7	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG SRNNHYTFAL GWFRQAPGQEREAVAA ISWGGGK TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA LGYGVSYGY WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p1-C8	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG TRRLQYSRFA GWFRQAPGQEREAVAA IASRGGK TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA PDTHITNFGY WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p1-D10	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG NQRFYYGFAL GWFRQAPGQEREAVAA ISSSGGN TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA LRYSNITHRS WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p1-E10	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG TNRFYSYTRFAL GWFRQAPGQEREAVAA IAMQGGK TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA IQSSNLTHRY WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p1-D11	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG TNRFYSYTRFAL GWFRQAPGQEREAVAA IAMQGGK TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA IQSSNLTHRY WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p2-E2	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG TGRLRYAVFDL GWFRQAPGQEREAVAA IYMRGGI TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA VRSGNASFN WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p2-B6	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG ARNNGYNPFAL GWFRQAPGQEREAVAA IYWHGGI TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA TRSKSRSYGY WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p2-B7	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG ANKNRYALFAL GWFRQAPGQEREAVAA IASQGGK TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA RRSTANHYR WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH
p2-C9	MGQVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCTASG YRRNGYTFDL GWFRQAPGQEREAVAA ASKGGN TYADSVKGRFTISRDNAKNTVTLQMNNLKPVDTAIYYCAA NKYRNPFSKY WGQGTQVTVSGGGGSHHHHHH

La tabla 6 muestra los 14 clones de nanoanticuerpos que arrojaron secuencias legibles después de la secuenciación de Sanger. La primera columna presenta los identificadores de los clones y la segunda columna muestra las secuencias completas de aminoácidos de cada nanoanticuerpo. Las tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) están resaltadas en negrita y subrayadas, destacando las regiones variables que difieren entre los clones. Estas variaciones en las secuencias corresponden a la diversidad introducida durante la construcción de la librería y son responsables de la especificidad de unión al antígeno.

Además, otro factor fundamental que debe considerarse es la diversidad de la biblioteca generada. Por ello, se procedió a extraer el ADN de los 27 clones, el cual fue cuantificado utilizando Nanodrop® y posteriormente enviado a la empresa MacroGen® para su secuenciación. Los resultados del análisis de las secuencias respaldaron el diseño estructural del nanoanticuerpo bloqueador del rhTNF- α , ya que se identificaron modificaciones en aminoácidos ubicados en regiones clave. Estas alteraciones permitieron el desarrollo de nanoanticuerpos con diferentes

capacidades de unión y bloqueo (Tabla 6). Este resultado indica que los clones obtenidos mediante la metodología empleada permiten seleccionar variantes con distintas capacidades de unión al rhTNF- α .

5.4 Transformación y expresión de los nanoanticuerpos en *E. coli* HB2151

Con esta primera evaluación, y reconociendo que todas las proteínas presentan diferencias funcionales, se inició la etapa de selección de los nanoanticuerpos con mayor capacidad de unión y bloqueo. El ADN de los 27 clones fue empleado para transformar bacterias *E. coli* HB2151 quimiocompetentes, con el objetivo de expresar los nanoanticuerpos en el periplasma. A través do protocolo de quimiocompetência mencionado anteriormente neste manuscrito, apenas um clone não teve crescimento (TNF-P2-E3). El grupo control corresponde a la cepa de *E. coli* HB2151 que no fue transformada y, por lo tanto, no presenta resistencia a antibióticos (Tabla 7).

Tabla 7. Colonias obtenidas por crecimiento en placas de agar.

CÓDIGO	COL	CÓDIGO	COL	CÓDIGO	COL	CÓDIGO	COL
TNF-P2-C9	SÍ	TNF-P1-F7	SÍ	TNF-P2-B7	SÍ	TNF-P1-G7	SÍ
TNF-P1-G3	SÍ	TNF-P1-D10	SÍ	TNFP1-B3	SÍ	TNF-P1-G6	SÍ
TNF-P1-B2	SÍ	TNF-P1-E6	SÍ	TNFP2-B6	SÍ	TNF-P2-E2	SÍ
TNF-P1-F8	SÍ	TNF-P1-B6	SÍ	TNFP1-D9	SÍ	TNF-P1-E10	SÍ
TNF-P2-D2	SÍ	TNF-P2-C4	SÍ	TNFP1-G2	SÍ	TNF-P2-D4	SÍ
TNF-P2-B5	SÍ	TNF-P1-D11	SÍ	TNFP2-B2	SÍ	TNF-P2-E3	NO
TNF-P1-C8	SÍ	TNF-P1-G10	SÍ	TNFP2-C3	SÍ	CONTROL	NO

Mediante el crecimiento de las colonias positivas, se indujo la expresión y posterior identificación de las proteínas, considerando tanto su peso molecular como su detección mediante el uso de anticuerpos específicos: anticuerpo primario anti-HisTag (1:10000) y anticuerpo secundario anti-mouse (1:10000).

Aquellas cepas que produjeron proteínas con un peso molecular cercano a los 15 kDa y que, además, fueron reconocidas por los anticuerpos en el ensayo de Western blot, fueron seleccionadas como positivas para la expresión de nanoanticuerpos. Se utilizó como control una proteína con cola de histidina y peso molecular conocido (17 kDa) para validar el procedimiento de Western blot (Fig. 9).

Cabe destacar que este resultado indica que la cepa HB2151 expresó una proteína de aproximadamente 15 kDa, que presumiblemente corresponde al nanoanticuerpo bloqueador de TNF- α . Esta proteína fue detectada mediante la técnica de Western blot y se encuentra localizada en el espacio periplasmático de las bacterias.

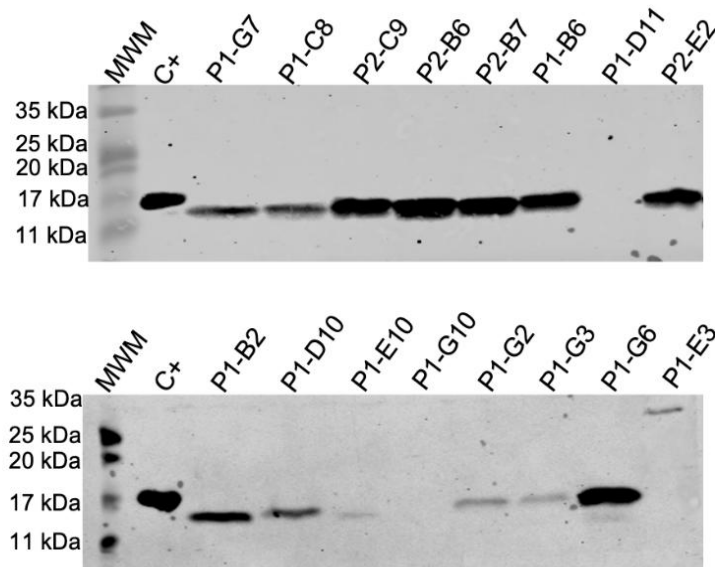


Figura 9. Evaluación de la expresión de nanoanticuerpos en el periplasma de la cepa de *E.coli* HB2151 transformada con el ADN de los clones bloqueadores de TNF- α . Western blot utilizando un anticuerpo primario anti-histidina (1/10000) y un secundario marcado con anti-mouse (1/10000).

5.5 Producción de anticuerpos policlonales IgY para detección de los nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α

En este trabajo, se produjeron rmTNF- α , rhTNF- α y los nanoanticuerpos con una cola de histidina para facilitar el proceso de purificación e identificación mediante Western blot. Debido a ello, fue necesario buscar estrategias que permitieran la identificación de los nanoanticuerpos sin interferencia o reconocimiento cruzado con otras moléculas. Para resolver este inconveniente, utilizamos IgY en huevos de gallinas ponedoras (gentilmente cedidos por la EMBIOTEC SpA) para reconocer los nanoanticuerpos.

Se seleccionaron cinco colonias positivas que expresaban los nanoanticuerpos en el periplasma y fueron cultivadas en un matraz de 2 L y se extrajeron las proteínas del periplasma. En este experimento, fue necesario eliminar un componente del medio de extracción de proteínas periplasmáticas debido a la capacidad quelante del EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), se presenta una dificultad en la adsorción de proteínas durante el proceso de purificación. La adición de EDTA al tampón TES tiene como objetivo unir iones metálicos, dificultando la acción de metaloproteasas y otras proteasas activadas por metales divalentes que podrían dañar las proteínas presentes en el periplasma.

La selección de los clones se basó en la intensidad de la banda observada en un Western blot realizado previamente (Fig. 9). Tras el cultivo y la lisis bacteriana, el lisado resultante fue filtrado secuencialmente a través de membranas de 0,8, 0,4 y 0,2 μm antes de la purificación en el sistema ÄKTA Start. Se realizaron dos lavados con imidazol, a concentraciones de 50 mM y 100 mM, respectivamente. La elución se efectuó empleando 250 mM de imidazol; no obstante, para garantizar una mayor pureza, las fracciones eluidas fueron recolectadas de manera fraccionada y posteriormente analizadas mediante SDS-PAGE. Con base en los resultados obtenidos, se logró reunir un pool de nanoanticuerpos producidos en el periplasma de HB2151 con un nivel de pureza superior al 95% para inmunización en gallinas (Fig. 10).

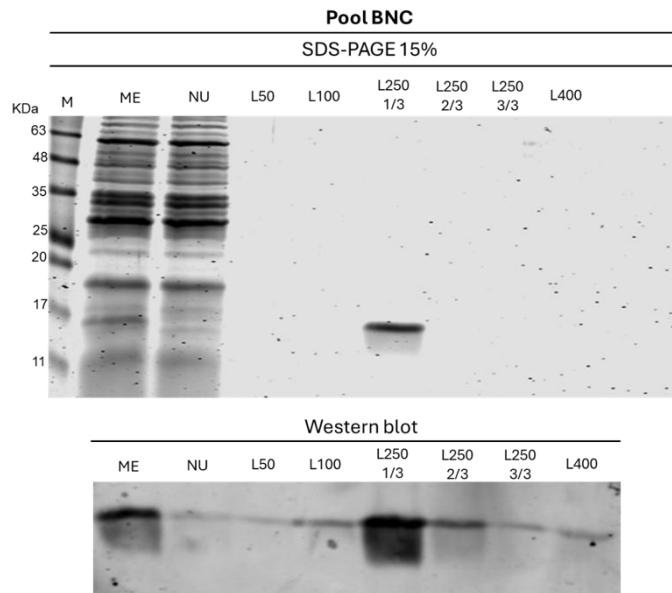


Figura 10. Expresión y purificación del *pool* de nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α . M: Marcador de peso. ME: muestra de entrada. NU: muestra no unida. L50: Lavado con imidazol 50mM. L100: Lavado con imidazol 100mM. L250 1/3: Lavado con imidazol 250mM fracción 1/3. L250 2/3: Lavado con imidazol 250mM fracción 2/3. L250 3/3: Lavado con imidazol 250mM fracción 3/3. L400: Lavado con imidazol 400mM.

En la inmunización se utilizaron 83,3 μ g de nanoanticuerpos por aplicación subcutánea en el ala, y los huevos se recolectaron a partir de la tercera inmunización, dado que después del segundo refuerzo se prevé encontrar concentraciones más elevadas de IgY que reconozcan los nanoanticuerpos.

Los anticuerpos anti-nanoanticuerpo fueron producidos y extraídos de huevos de gallina, obteniéndose cantidades satisfactorias de moléculas para el reconocimiento de los nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α expresados en bacterias. A partir de los resultados obtenidos mediante ELISA, se determinó que los anticuerpos IgY reconocen eficientemente los nanoanticuerpos, siendo las diluciones 1:10000 y 1:20000 las que proporcionan los mejores resultados (Fig. 11A). Estas diluciones permiten alcanzar una combinación óptima de sensibilidad y especificidad, consolidando a los anticuerpos IgY como una herramienta eficiente para estudios de detección y análisis de nanoanticuerpos.

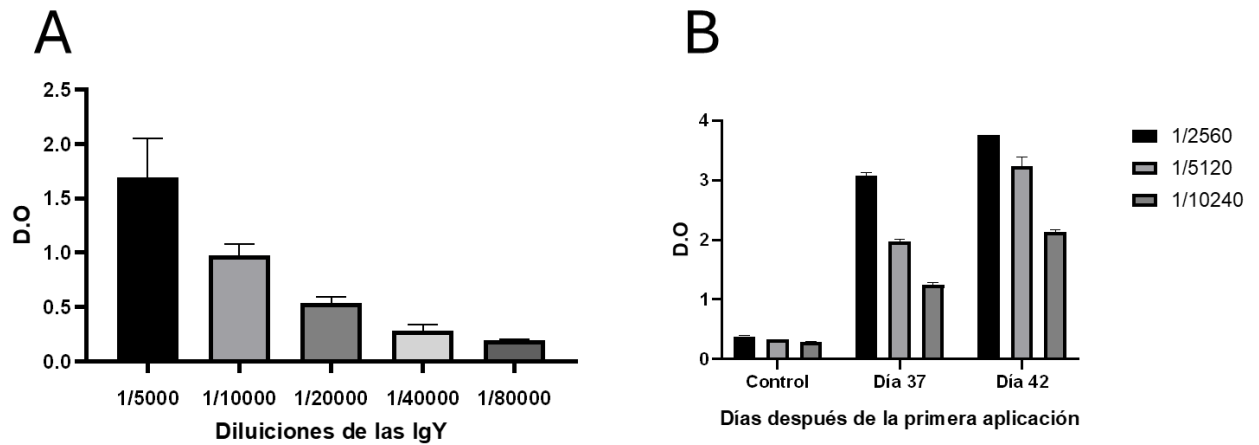


Figura 11. Evaluación de las IgY para el reconocimiento de los nanoanticuerpos. (A) Diluciones de los anticuerpos extraídos del día 40, en las diluciones de 1/5000 hasta 1/80000. (B) ELISA para determinar la unión entre las IgY producidas en huevos de gallinas contra los nanoanticuerpos producidos en la cepa *E. coli* HB2151 a través del periplasma. Se utilizaron diluciones hasta 1/10.240. El control utilizado fue de proteínas extraídas de gallinas que no recibieron la aplicación de la proteína.

Además, esta estrategia resulta sumamente valiosa para moléculas en desarrollo, ya que posibilita la obtención de anticuerpos para análisis de manera económica y en grandes cantidades. Al término del proceso de extracción, cada huevo produjo aproximadamente 800 μ l de anticuerpos IgY que reconocen las proteínas diana aplicadas previamente en los animales.

5.6 ELISA con los fagos titulados

La producción de fagos que exhiben los clones de los nanoanticuerpos fusionados a la proteína PIII se realizó con éxito para los 25 clones analizados. Las titulaciones obtenidas oscilaron entre 8×10^8 y $4,6 \times 10^{11}$, cantidades suficientes para la realización de los ensayos posteriores de ELISA. Estos resultados demuestran que la titulación de los fagos puede variar considerablemente entre los diferentes clones; por ello, el empleo de fagos previamente titulados constituye la estrategia más adecuada para seleccionar,

con mayor precisión, el clon que será utilizado en las siguientes etapas del estudio (Tabla 8).

Tabla 8. Titulación de los fagos con la proteína PIII unido a los nanoanticuerpos.

ID del Fago	titulo ufc/uL	ID del Fago	titulo ufc/uL
P1B2	4,00E+09	P1G3	1.20e+9
P1B3	4.00e+9	P1G6	4.00e+9
P1B6	2.40e+10	P1G7	4.8e+11
P1C8	1.60e+9	P2B2	1.60e+10
P1D10	8.00e+8	P2B6	5.20e+9
P1D11	8.00e+8	P2B7	1.2e+11
P1D9	8.00e+9	P2C3	4.00e+10
P1E10	4.00e+9	P2C4	4.00e+10
P1E6	8.00e+9	P2C9	6.80e+9
P1F7	1.6e+11	P2D2	3,20E+10
P1F8	8,00E+09	P2D4	2.80e+10
P1G10	1.20e+10	P2E2	2.80e+10
P1G2	7,20E+09		

Los resultados del ELISA realizado con fagos previamente titulados y estandarizados por pozo indican que el clon P1D10 presenta mayor afinidad frente a las citocinas rhTNF- α y rmTNF- α , alcanzando un 76,3% de unión en la comparación entre ambas moléculas. La elección de rmTNF- α como parámetro de selección se justifica por la necesidad de emplear este bloqueador de TNF- α en modelos animales para la validación in vivo de la molécula. En consecuencia, el clon P1D10, fusionado a la proteína pIII del fago M13, mostró los mejores resultados de afinidad contra ambas citocinas recombinantes (Fig. 12).

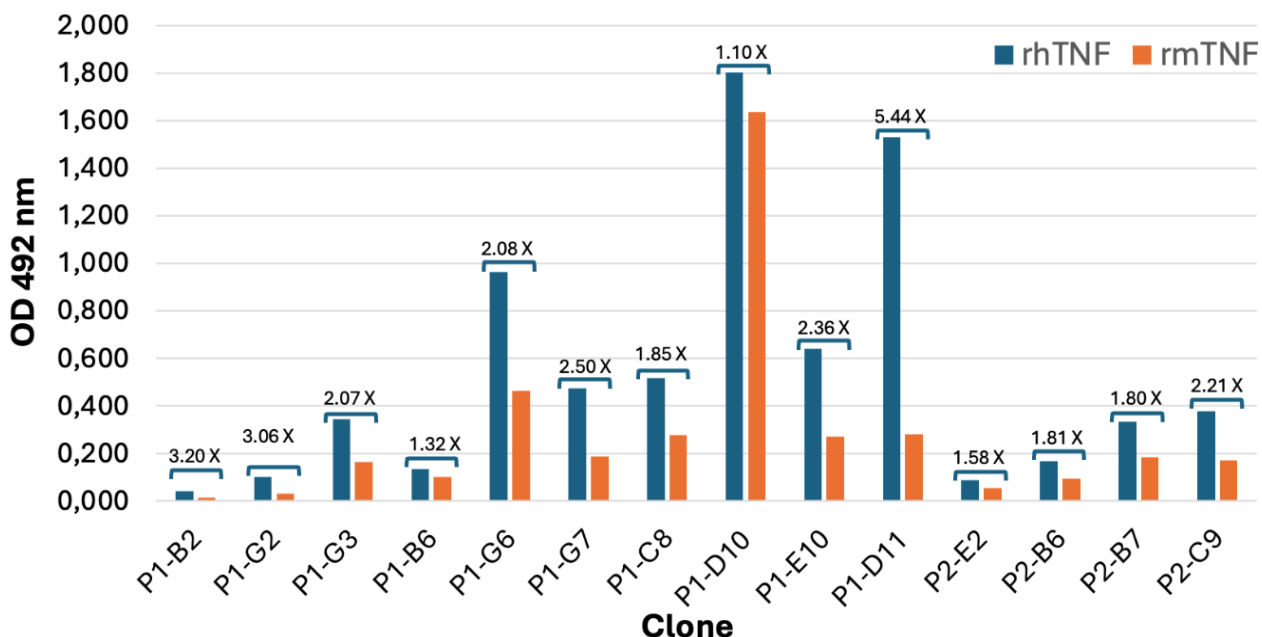


Figura 12. ELISA para determinar la unión de los nanoanticuerpos frente el rhTNF- α y rmTNF- α . Se realizó un ensayo de ELISA utilizando una cantidad estandarizada de fagos por pocillo (1×10^8) para determinar la unión contra la proteína diana inmobilizada. ELISAs bloqueados con leche, utilizando placas inmobilizadas con leche, TNF- α humano y murino. Se utilizó anticuerpo anti-M13-HRP (1:5000).

Asimismo, se observó que algunos clones mostraban alta afinidad exclusivamente por el rhTNF- α , aspecto esperado dado que fueron inicialmente seleccionados en función de su afinidad por la citocina humana. Sin embargo, la confirmación de la capacidad de unión frente al rmTNF- α resultó ser un factor clave para la viabilidad de ensayos futuros en modelos animales.

5.7 Expresión y evaluación de la unión y bloqueo de los nanoanticuerpos bloqueadores de TNF- α en periplasma.

Ante las dificultades encontradas para la obtención de las proteínas a partir del periplasma de las bacterias HB2151, se optó por llevar a cabo la lisis completa del cultivo. De este modo, la expresión de los nanoanticuerpos se confirmó en la fracción soluble resultante de la lisis total mediante análisis de Western blot (Fig. 13).

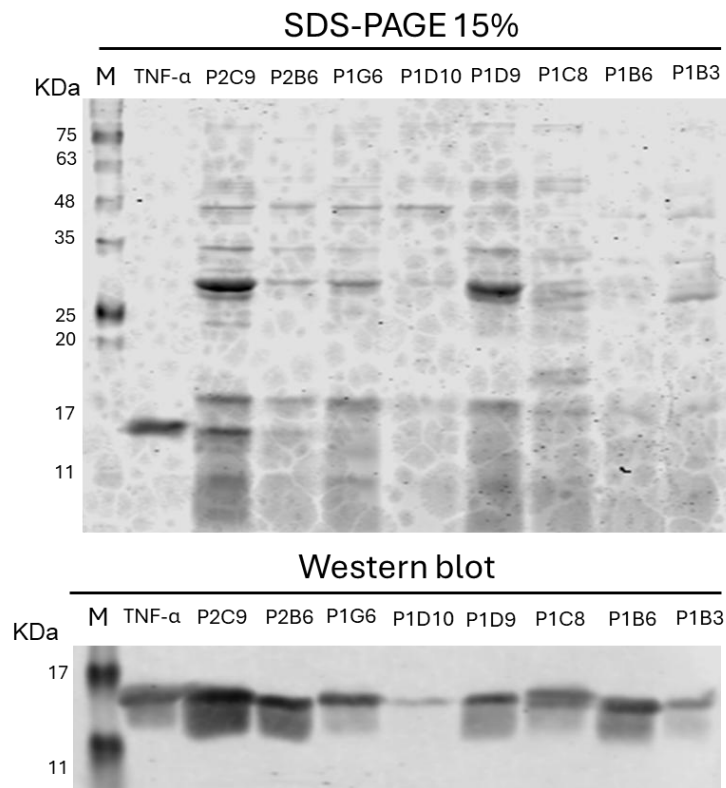


Figura 13. Expresión y purificación de los nanoanticuerpo solubles. (A) SDS-PAGE para detección de la pureza de los nanoanticuerpos expresados en cepa *E.coli* HB2151.(B) Western blot. 1: WM; 2: TNF- α ; 3: P2C9; 4: P2B6; 5: P1G6; 6: P1D10; 7: P1D9; 8: P1C8; 9: P1B6; 10: P1B3. Se utilizó el anticuerpo primario anti-HisTag (1:10000) y anticuerpo secundario anti-mouse (1:10000).

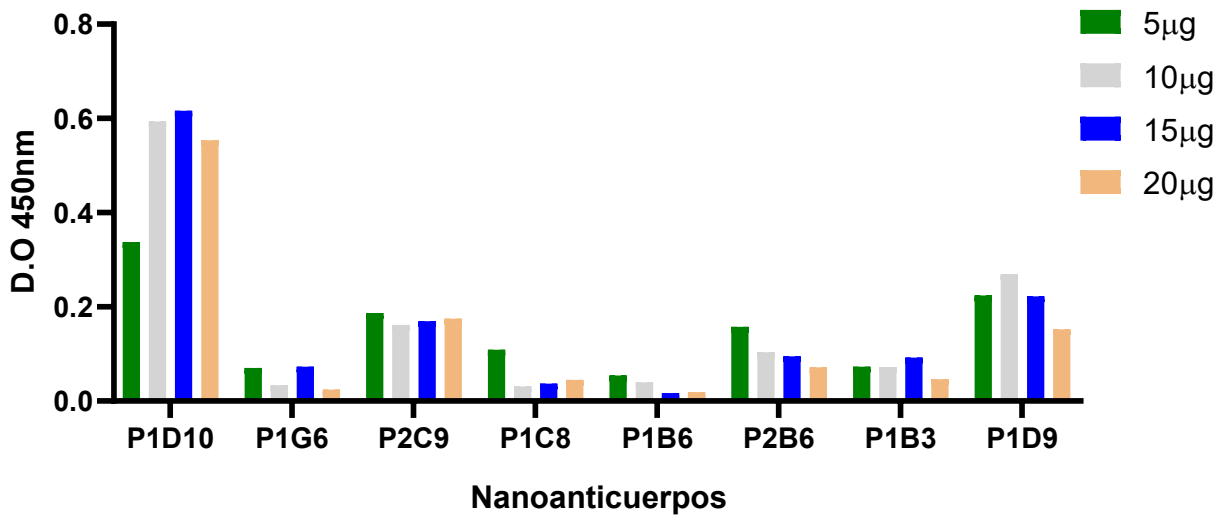
El proceso de purificación de todos los clones producidos en el periplasma no fue completamente exitoso, ya que se obtuvieron muestras con altos niveles de contaminación, cuyo porcentaje se presenta en la Tabla 8. No obstante, para los ensayos realizados, no era imprescindible contar con preparaciones

totalmente puras. La pureza de estas muestras se evaluó mediante una herramienta del software Odyssey® DLx (Li-Cor, EE. UU.). La Tabla 9 presenta el grado de pureza y la concentración correspondientes a cada clon obtenido, calculados a partir de la intensidad de los píxeles.

Tabla 9. Determinación de la concentración de los clones de nanoanticuerpos.

ID Clon	Concentración Prot. Total ug/ml	Pureza (pixels)	Concentración de BNC ug/ml
P2C9	0,405087	19%	0,076966474
P2B6	0,343815	25%	0,085953757
P1G6	1,143815	6%	0,068628902
P1D10	0,718382	2,6~3%	0,021551445
P1D9	0,372717	5,7~6%	0,022363006
P1C8	0,76578	7,5~8%	0,061262428
P1B6	0,344971	32,50%	0,112115607
P1B3	0,894104	5~6%	0,053646243

A pesar del bajo grado de pureza, se llevaron a cabo ensayos de unión en placas de alta capacidad (*high binding*) previamente inmovilizadas con rhTNF- α . Los resultados obtenidos confirmaron los hallazgos previos de los ensayos de ELISA realizados con fagos. Aunque otro clon (P2C9) demostró alta afinidad, el mejor desempeño en los experimentos correspondió al clon P1D10, destacándose como el candidato con mayor afinidad por el rhTNF- α (Fig. 14). Por esta razón, se seleccionó el nanoanticuerpo P1D10 para los ensayos funcionales en células L929, con el objetivo de evaluar su capacidad inhibitoria frente al TNF- α , en comparación con el anticuerpo comercial Adalimumab.



ug/pocillo	ID Clon	5ug	10ug	15ug	20ug
0,828902	P1D10	0,28	0,492	0,511	0,459
2,639573	P1G6	0,186	0,088	0,192	0,064
2,960249	P2C9	0,554	0,478	0,502	0,518
2,356247	P1C8	0,257	0,073	0,087	0,106
4,312139	P1B6	0,233	0,172	0,074	0,081
3,305914	P2B6	0,521	0,342	0,313	0,238
2,063317	P1B3	0,151	0,149	0,191	0,096
0,860116	P1D9	0,193	0,232	0,1915	0,131

Figura 14. ELISA realizado con lisados bacterianos que expresan los clones de mayor afinidad hacia el TNF- α . Se utilizaron placas inmobilizadas con concentraciones crecientes de rhTNF- α (5, 10, 15 y 20 μ g/ml). Para la detección, se empleó un anticuerpo primario IgY anti-nanoanticuerpo (1:5000) y un secundario marcado anti-IgY (1:10000).

5.8 Ensayo de bloqueo del rhTNF- α con el nanoanticuerpo P1D10 en comparación con el anticuerpo monoclonal Adalimumab.

Para evaluar la capacidad de inhibición de los bloqueadores de TNF- α en ensayos *in vitro* con células L929, se diseñó un ensayo de toxicidad basado en la exposición al rhTNF- α , utilizando una proteína con aproximadamente 40% de pureza, determinada con el software Image Studio. Los grupos experimental y control se dispusieron en la misma placa de 96 pocillos, asegurando una

confluencia celular superior al 90%. Cabe señalar que la actividad citotóxica del rhTNF- α había sido validada previamente (Fig. 15).

El nanoanticuerpo P1D10 mostró una eficacia comparable a la del anticuerpo monoclonal comercial Adalimumab. La concentración inhibitoria media (IC50) para Adalimumab fue de 2,31 pM (Fig. 15), mientras que para P1D10 fue de 3,68 pM (Fig. 16). Así, Adalimumab presentó una mayor afinidad (1,6 veces superior) en comparación con P1D10. Estos resultados evidencian que el nanoanticuerpo P1D10 posee una elevada afinidad y capacidad de bloqueo frente al rhTNF- α , siendo equiparable al anticuerpo monoclonal de referencia a nivel mundial. Basándose en estos hallazgos, la secuencia del clon P1D10 fue sintetizada artificialmente y clonada en el vector pET-29a para estudios posteriores de afinidad.

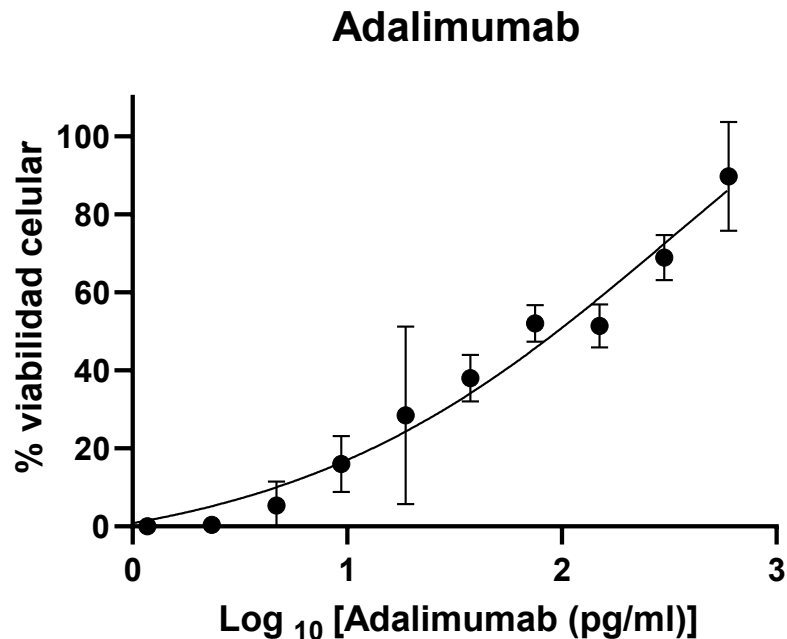


Figura 15. Ensayo de bloqueo del rhTNF- α en células L929 utilizando el anticuerpo monoclonal Adalimumab. Células L929 fueron tratadas con 0,3ng/ml rhTNF α y distintas concentraciones de adalimumab. Tras 20 horas, la viabilidad celular fue determinada mediante ensayo de MTT. El valor de IC50 para Adalimumab fue de **334.1 pg/ml (2,31 pM)**.

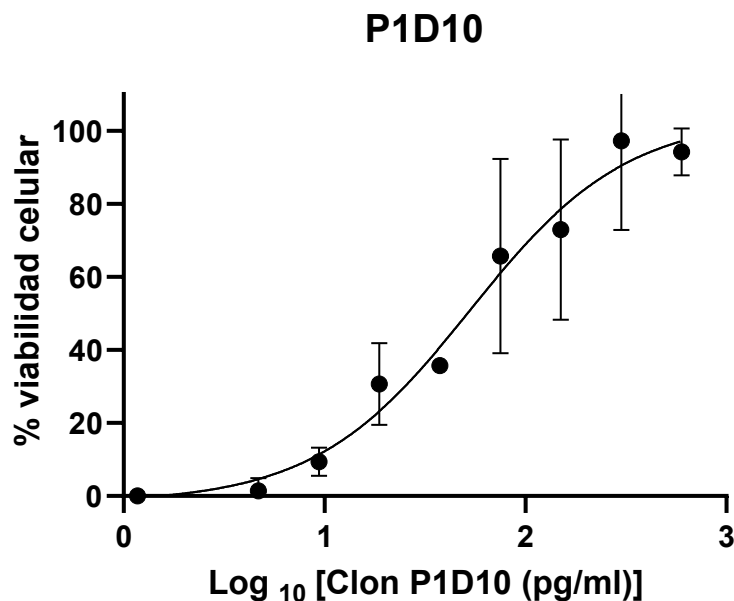


Figura 16. Ensayo de bloqueo del rhTNF- α en células L929 utilizando el nanoanticuerpo P1D10. Células L929 fueron tratadas con 0,3ng/ml rhTNF α y distintas concentraciones de clon P1D10. Tras 20 horas, la viabilidad celular fue determinada por ensayo de MTT. El valor de IC₅₀ para Adalimumab fue de 53,10 pg/ml (3,68 pM).

Los resultados de ELISA (afinidad de unión) y los ensayos funcionales en la línea L929 (bloqueo de citotoxicidad) indican que el nanoanticuerpo se une a rhTNF- α y neutraliza su efecto citotóxico *in vitro*. Con el fin de aumentar la producción del nanoanticuerpo P1D10, se diseñó y construyó un vector de expresión bajo el control del promotor T7 para su implementación en *E. coli* SHuffle.

5.9 Expresión y purificación del nanoanticuerpo P1D10 en bacteria

El vector pET-29a-P1D10 fue transformado en bacterias SHuffle quimiocompetentes siguiendo el protocolo descrito previamente. Tras la transformación, las células se cultivaron en 5L de medio con kanamicina (100 μ g/ml). Cuando la densidad óptica a 600 nm alcanzó valores entre 0,6 y 0,9, se indujo la expresión con 0,1 mM de IPTG. Después de 12 horas de inducción,

las bacterias fueron recolectadas por centrifugación y lisadas utilizando el sistema Vertical Planetary Ball Mill BKBM-V0.4 (Changsha City, China).

La fracción soluble y la fracción insoluble fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot (Fig. 17). Se confirmó la expresión del nanoanticuerpo en ambas fracciones, siendo especialmente relevante la fracción soluble, ya que permite la obtención de la proteína sin necesidad de procesos de desnaturalización y renaturalización. Además, la expresión del nanoanticuerpo P1D10 resultó ligeramente más intensa en la fracción soluble, lo que facilitó un mayor rendimiento en la obtención de la molécula.

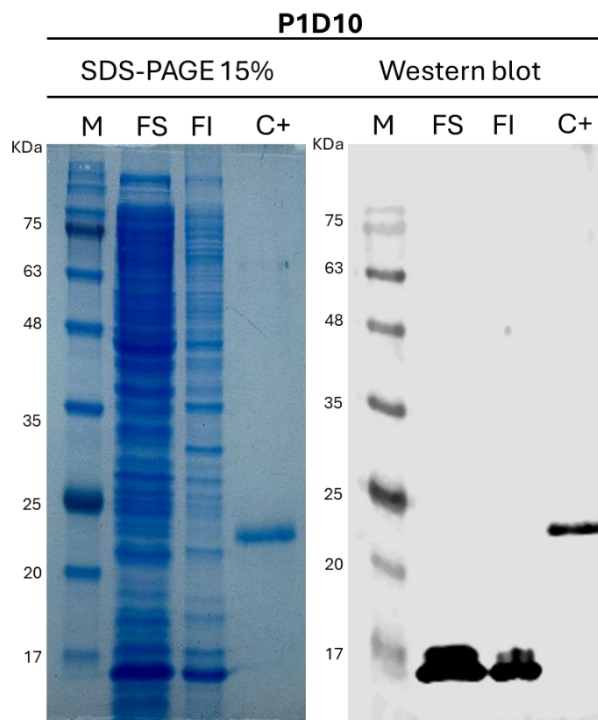


Figura 17. Expresión del clon P1D10 en bacterias SHuffle. M: Patrón de peso molecular; FS: Fracción soluble; FI: Fracción insoluble; C+: IL-6 control positivo.

Además del proceso de obtención del dominio de la región hipervariable, se realizó una evaluación cualitativa de la pureza mediante SDS-PAGE al 17,5 %, la cual indicó una pureza elevada (>90 %) en la fracción eluida con 300 mM de imidazol (Fig. 18). Este resultado contrasta con los ensayos realizados para la

expresión de los nanoanticuerpos en las cepas HB2151. La obtención de nanoanticuerpos con niveles superiores de pureza permite la realización de ensayos de termoforesis a microescala con mayor precisión.

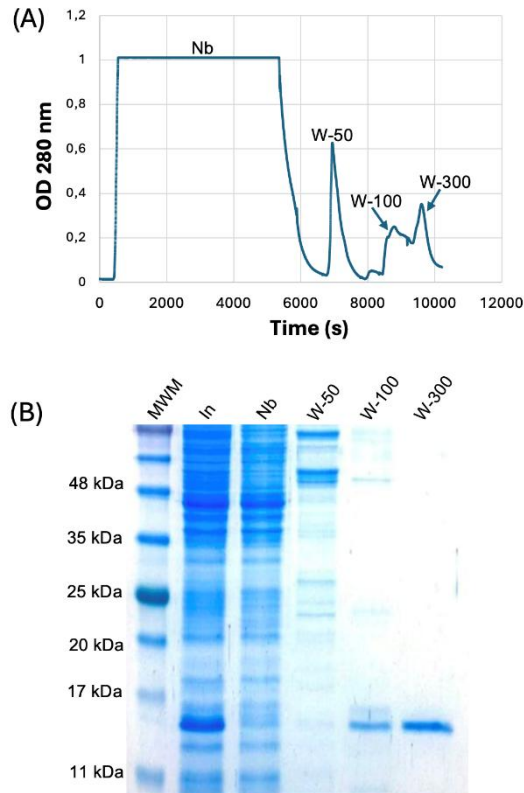


Figura 18. Purificación del clon P1D10 en bacterias SHuffle. (A) Cromatograma de la purificación. (B) M: Patrón de peso molecular; ME: Muestra de Entrada - fracción soluble de la ruptura; NU: Fracción No Unida; L50: Fracción eluida 50 mM Imidazol; L100: Fracción eluida 100 mM Imidazol; L300: Fracción eluida 300 mM Imidazol; L500: Fracción elución.

5.10 Ensayo de afinidad del nanoanticuerpo contra TNF- α humano.

5.10.1 Determinación de la K_D mediante ELISA no competitivo y termoforesis en microescala

Se determinarán las K_D del nanoanticuerpo y Adalimumab frente al rhTNF- α . Se utilizó el método de Beatty y Beatty (Beatty et al., 1987) para calcular la K_D

mediante ELISA no competitivo. Essa metodologia permite aferir de forma simples e confiável através da $D.O_{50}$ da interação entre anticorpo-antígeno em diferentes concentrações. A partir de las curvas de interacción entre P1D10 y $rhTNF\alpha$, se obtuvieron valores de $D.O_{50}$ de 219,1 nM y 144,2 nM, y el valor de K_D determinado para la interacción fue de 138,6 nM (Fig. 19A). En el caso de Adalimumab, la $D.O_{50}$ fue de 0,7168 nM y 0,6664 nM, y el valor de K_D determinado para la interacción fue de 1,232 nM (Fig. 19B).

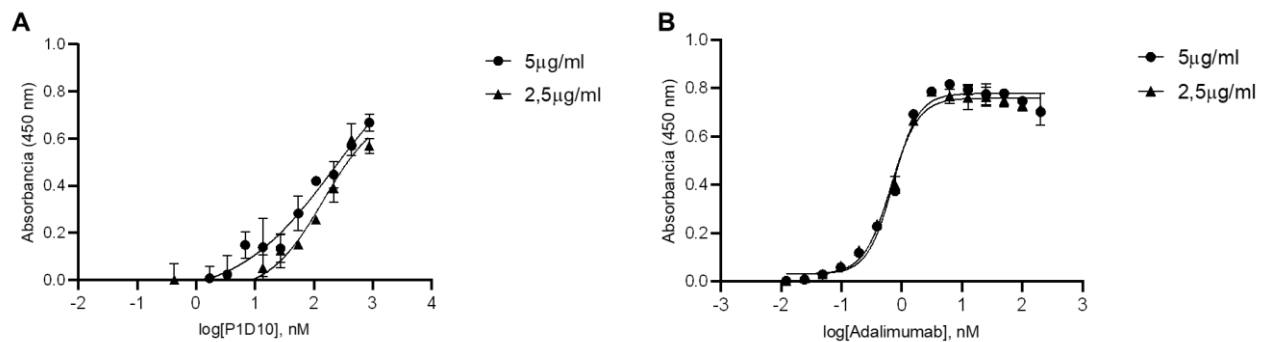


Figura 19. Determinación de la interacción mediante ELISA no competitivo de Adalimumab y P1D10 contra $rhTNF\alpha$. (A) Curvas de unión para P1D10 a dos concentraciones de recubrimiento de $rhTNF\alpha$ (5 y 2.5 μ g/ml). Las concentraciones calculadas para la $D.O_{50}$ fueron de 219,1 nM (5 μ g/ml) y 144,2nM (2,5 μ g/ml). El valor de K_D determinada para la interacción $rhTNF\alpha$ -P1D10 fue de 138,6 nM. (B) Curvas de unión para Adalimumab a dos concentraciones de recubrimiento de $rhTNF\alpha$ (5 y 2.5 μ g/ml). Las concentraciones calculadas para la $D.O_{50}$ fueron de 0,7168 nM (5 μ g/ml) y 0,6664 nM (2,5 μ g/ml). El valor de K_D determinada para la interacción $rhTNF\alpha$ -Adalimumab fue de 1,232 nM.

Los ensayos preliminares de termofóresis en microescala con P1D10 arrojaron un K_D medio de 90 nM considerando dos corridas experimentales. Estos hallazgos indican que el nanoanticuerpo exhibe alta afinidad por su ligando; sin embargo, no fue posible contrastar estos valores con los de Adalimumab debido a limitaciones metodológicas.

5.11 Producción del vector adenoviral

La producción y evaluación de nanoanticuerpos expresados en bacterias constituyen un paso clave para seleccionar la secuencia más adecuada para etapas posteriores. No obstante, la aplicación del nanoanticuerpo en animales

enfrenta una limitación debido a su reducido tamaño, estas moléculas se eliminan rápidamente por vía renal. Con el objetivo de prolongar la vida media en futuras evaluaciones *in vivo*, se incorporó una porción Fc de IgG1 humana, recurso ampliamente empleado en anticuerpos monoclonales. Además, dado el tamaño extremadamente pequeño del nanoanticuerpo, la generación de una arquitectura bivalente, mediante la repetición de los dominios, se considera una estrategia útil para optimizar la capacidad de unión al ligando. Esta modificación permite acoplar dos nanoanticuerpos en la región variable, favoreciendo la afinidad tras la administración en modelos animales. En consecuencia, se efectuó la fusión de P1D10 con una región de IgG1 humana para su expresión transitoria en leche de cabras no transgénicas.

Antes de proceder con la producción a gran escala de adenovirus, se realizó un ensayo de confirmación de la expresión del vector pAdTrack-P1D10-Fc. Este ensayo se realizó para garantizar que el vector expresara correctamente el bloqueador de TNF- α , evitando problemas de no expresión de la proteína por fallas en la expresión del nanoanticuerpo unido a la región Fc. Tras la recolección del medio de cultivo y la precipitación de las proteínas, se evaluó, mediante un ensayo ELISA con placas inmovilizadas con rhTNF- α , la capacidad del anticuerpo para reconocer su objetivo. El grupo control presentó aproximadamente la mitad de la señal registrada en el grupo transfectado con el vector pAdTrack-P1D10-Fc. Este resultado confirmó que el vector pAdTrack expresaba el nanoanticuerpo que reconoce el rhTNF- α (Fig. 20).

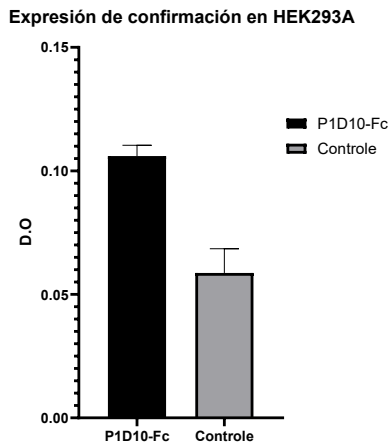


Figura 20. Confirmación por ELISA del reconocimiento contra TNF- α . Mediante la expresión del clon P1D10 fusionado a la región Fc de la IgG humana, expresado en células HEK293A con el vector pAdTrack.

La síntesis del plásmido pAdTrack-P1D10-Fc fue realizada por la empresa GenScript®. El plásmido fue transformado en bacterias *E. coli* TOP10 y el ADN se extrajo utilizando el kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega®). Además, la correcta inserción del transgén se corroboró mediante digestión enzimática con las endonucleasas de restricción PmeI y Bsp1407I (Fig. 21A), confirmando la aparición de las bandas de corte que coinciden las esperadas en base al análisis *in silico* (Fig. 21B).

Tras la obtención del ADN plasmídico, se llevaron a cabo ensayos de validación del vector pAdTrack-P1D10-Fc mediante digestiones con las enzimas de restricción.

Posteriormente, el ADN plasmídico pAdTrack-P1D10-Fc fue linealizado y transfectado en bacterias BJ5183-pAdEasy-1, las cuales contienen el plásmido pAdEasy-1 integrado en su genoma. Al día siguiente, se observaron varias colonias, de las cuales se seleccionaron 10 para su digestión (Fig. 21C), identificándose 4 colonias positivas para la recombinación. De estas, se eligieron dos colonias para ser transformadas en bacterias DH5 α , permitiendo su crecimiento, extracción de ADN y nuevas digestiones para la linealización y

confirmación de los plásmidos recombinantes (pAdTrack-P1D10-Fc y pAdEasy-1) antes de su transfección (Fig. 21D).

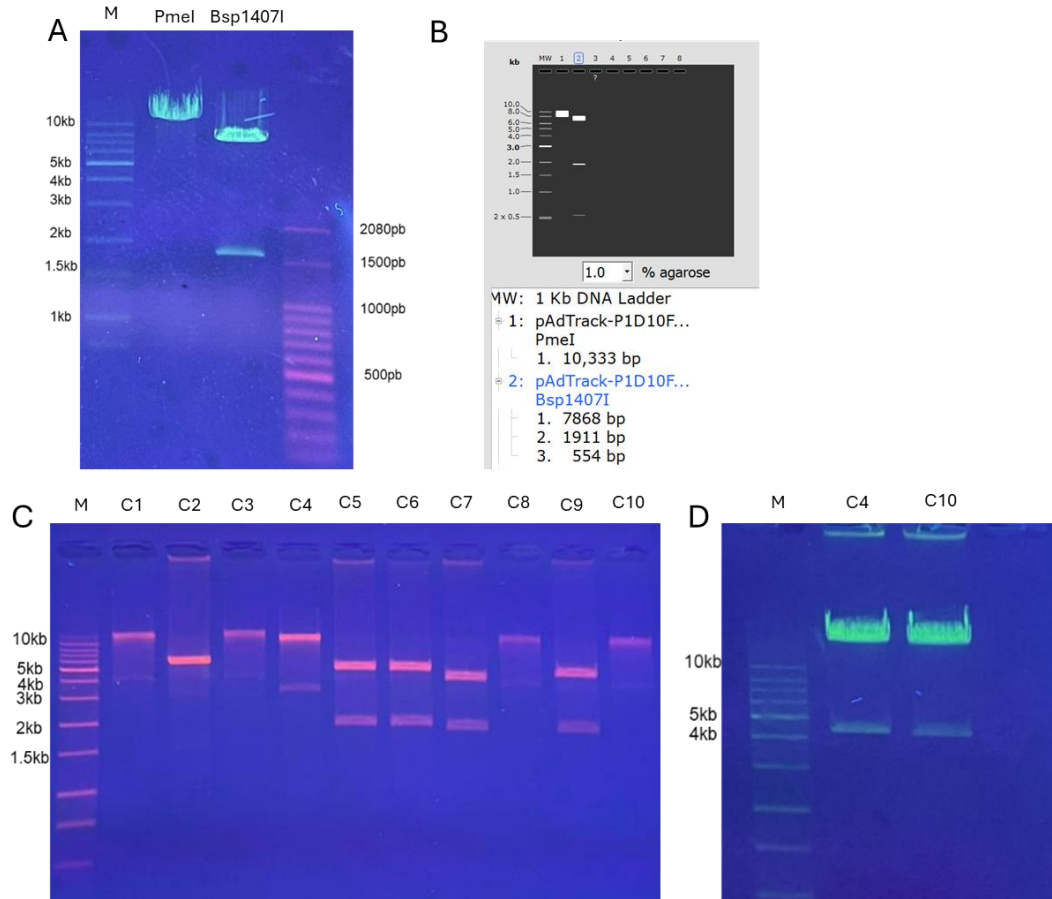


Figura 21. Confirmación del ADN plasmídico para la producción del adenovirus destinado a la expresión de la proteína P1D10 fusionada a la región Fc humana. (A) Digestión con dos endonucleasas de restricción (PmeI y Bsp1407I) para confirmar el clonamiento de la secuencia de P1D10 en el vector pAdTrack; (B) Imagen generada por el software SnapGene que indica las bandas esperadas utilizando las enzimas de restricción en el vector pAdTrack-P1D10-Fc; (C) ADN plasmídico obtenido de la recombinación del plásmido pAdTrack-P1D10-Fc con pAdEasy-1 en bacterias; (D) Linealización de los vectores purificados desde la cepa de *E. coli* DH5 α .

Tras la transfección con el vector linealizado con la endonucleasa de restricción PacI, las células del grupo control presentaron una mortalidad aproximada del 10%, mientras que las del grupo transfectado alcanzaron un 60%, según una evaluación visual cualitativa. La inserción del ADN puede afectar la

viabilidad pos-transfección; sin embargo, a lo largo del cultivo, las células se recuperaron, logrando alcanzar un 100% de confluencia y, posteriormente, se observó la formación del cometa (Fig. 22A).

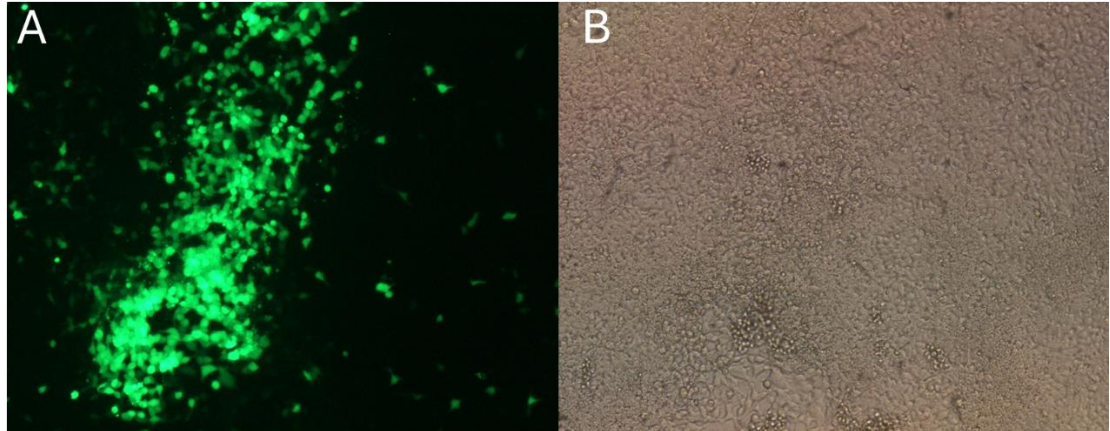


Figura 22. Confirmación de la infección con el adenovirus. (A) Campo oscuro con luz UV para la detección de la fluorescencia de GFP (pAdTrack-P1D10-Fc) en células HEK293A. (B) Campo claro para la visualización de la viabilidad celular.

5.12 Inducción de la lactancia en cabras

El protocolo de inducción de lactancia aplicado en las dos cabras fue exitoso y ambas iniciaron la producción de leche. Sin embargo, una de ellas redujo drásticamente su producción después del tercer día de lactancia, lo que hizo inviable su utilización en el experimento. Afortunadamente, la segunda cabra incluida en el protocolo mantuvo una lactancia estable y una buena producción diaria, de aproximadamente 600 ml/día.

El interior de la glándula mamaria fue lavado tres veces con solución salina y, posteriormente, se realizó la infusión del adenovirus a una concentración de 1×10^9 por mL, considerada adecuada para lograr una transducción eficiente y la obtención de cantidades significativas de proteína recombinante. Tras la infusión, se observó una reducción significativa en el volumen de leche, un efecto ya esperado para esta metodología.

El día posterior a la infusión (D1) no se realizó recolección, siguiendo la metodología descrita por Sánchez y colaboradores (2004). En D2, la producción fue de 120 ml y en los dos días siguientes, de aproximadamente 70 ml. Sin embargo, a partir de D5, la cabra mostró un aumento gradual en la producción de leche (Fig. 23).

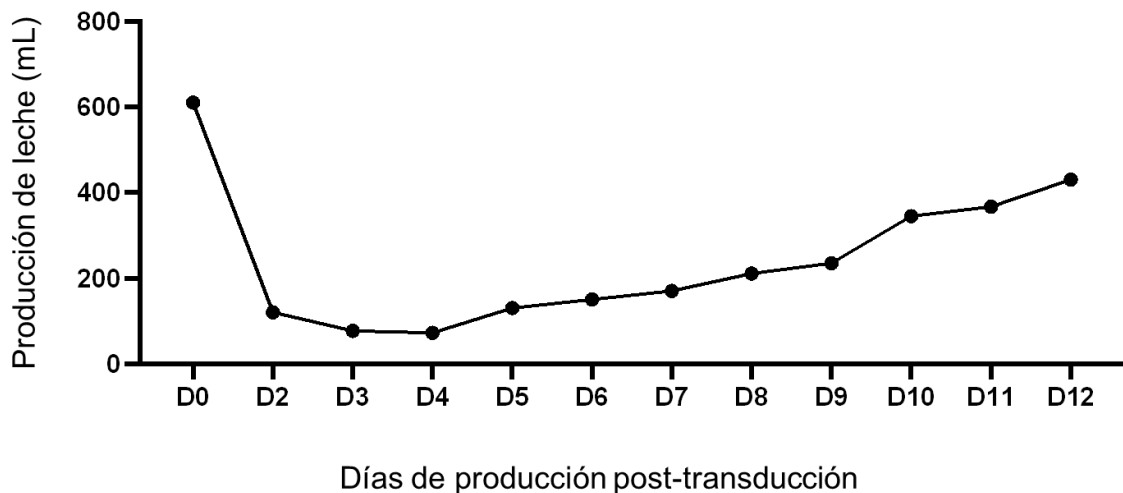


Figura 23: Evaluación de volúmenes de lactancia tras la infusión de adenovirus en la glándula mamaria de una cabra no transgénica.

Además, la leche recolectada diariamente fue analizada para determinar su perfil general utilizando el equipo Lactoscan (Milkotronic Ltd, Bulgaria). Los resultados de este perfil se presentan en la Tabla 10. Los valores de referencia fueron obtenidos de animales no transgénicos de nuestro rebaño, que fueron monitoreados durante toda la lactancia. Este control garantiza un análisis adecuado de los parámetros evaluados en nuestra situación particular, teniendo en cuenta el clima, la raza y la nutrición de los animales.

Tabla 10. Características de la leche después de la infusión del adenovirus para expresión transitoria.

Parámetros	D0	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	Valor de referencia ± DE (Min y Máx)
Grasa	8,67	7,2	7,23	7,93	7,95	7,9	7,73	4,66	3,58	6,5	4,69	5,24	4,66 ± 0,47 (3,75 - 7,3)
Densidad	28,07	36,2	44,32	42,83	42,18	38,43	35,49	42,33	46,83	36,27	38,25	35,56	29,36 ± 0,16 (27,84 - 33,15)
Conductividad	6,27	4,87	4,72	3,91	3,81	3,82	4,08	4,27	3,98	3,69	4,44	4,16	5,18 ± 0,06 (4,61 - 5,66)
SSG	9,04	10,81	12,89	12,66	12,5	11,53	10,74	11,83	12,75	10,68	10,79	10,22	8,75 ± 0,16 (8,3 - 10,20)
Proteína	3,33	3,97	4,74	4,65	4,59	4,24	3,95	4,34	4,68	3,92	3,96	3,75	3,2 ± 0,06 (3,0 - 3,6)
Agua añadida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactosa	4,96	5,93	7,08	6,95	6,31	6,33	5,89	6,5	7,01	5,86	5,93	5,61	4,81 ± 0,08 (4,46 - 5,46)
Temp. de la muestra	22,6	34,8	32,1	31,2	23,6	30,9	29,2	27,9	15,8	20,9	17,2	18,1	24,75 ± 0,22 (22,22 - 27,47)
Sólidos	0,75	0,89	1,07	1,05	1,03	0,95	0,89	0,98	1,06	0,88	0,89	0,85	0,71 ± 0,01 (0,67 - 0,83)
pH	8,19	9,94	9,21	8,39	8,5	9,17	8,66	8,93	8,61	8,44	8,36	8,63	8,06 ± 0,32 (7,01 - 9,48)

Los resultados obtenidos a través del análisis con Lactoscan® mostraron alteraciones en los siguientes parámetros: densidad, SNF, proteína, lactosa y sólidos totales, en comparación con los animales del grupo control. Además, el incremento en la concentración de proteína podría estar relacionado con la expresión del anticuerpo en la glándula mamaria.

5.13 Expresión del nanoanticuerpo unido a la región Fc en glándula mamaria de cabras.

La infusión en la glándula mamaria se realizó tras dos lavados con PBS, empleando el virus a una concentración de 1×10^9 /ml. Posteriormente, la leche fue recolectada desde el segundo día posterior a la infusión (D2) hasta el día 12 (D12). La confirmación de la expresión del anticuerpo P1D10-Fc en la leche caprina se llevó a cabo mediante Western blot, tras los procesos de clarificación y eliminación de grasa, seguido por la purificación mediante cromatografía en una columna de proteína A (HiTrap Protein A HP, Cytiva). Se analizaron las muestras correspondientes a los días 3 y 4, observándose un mayor nivel de expresión en D3 (cromatograma del día 3 – Figura 24). La Figura 25 muestra las muestras en condiciones reductoras y no reductoras, utilizando como control positivo el anticuerpo monoclonal Avastin[®], el cual posee una región Fc de IgG humana.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian la presencia de anticuerpos bloqueadores de TNF- α , si bien en bajas concentraciones. Además, después del proceso de purificación, se observaron grandes cantidades de IgG caprina en las muestras. La expresión transitoria constituye una herramienta valiosa para la realización de ensayos piloto con nuevas moléculas; sin embargo, puede resultar en niveles reducidos de expresión proteica debido a diversos factores, tales como la titulación viral, la inmunidad del animal, el manejo o incluso las características intrínsecas de la proteína.

A pesar de la baja concentración alcanzada, los resultados indican que se logró la expresión del clon P1D10-Fc en la glándula mamaria, aunque serán necesarios futuros ajustes para optimizar los protocolos de purificación de la leche caprina.

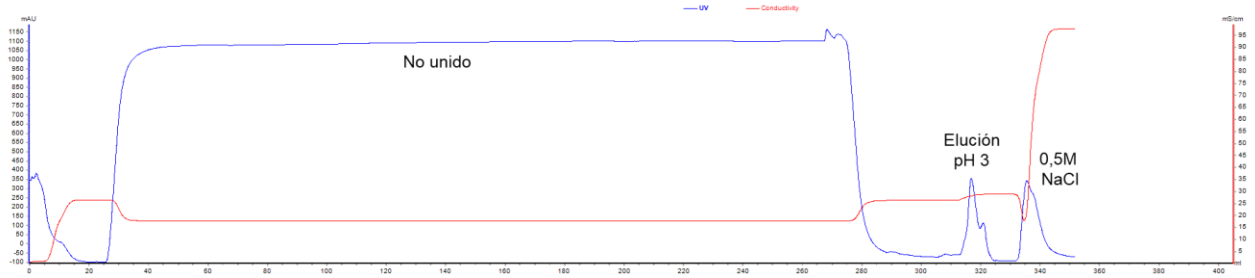


Figura 24. Cromatograma del día 3 post-infusión del adenovirus.

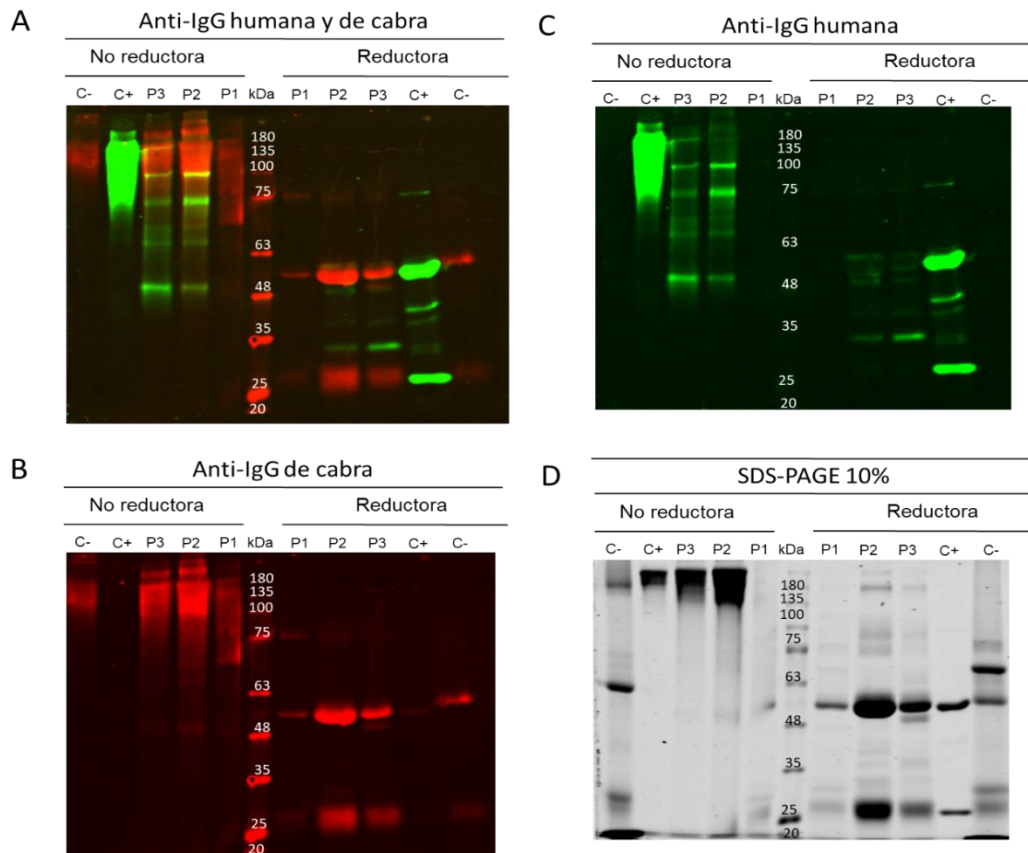


Figura 25. Identificación de la expresión de la proteína P1D10 unida a la región Fc de la IgG1 humana en condiciones reductoras y no reductoras. En el panel A se presenta un Western blot con anticuerpos anti-IgG caprina (rojo) y humana (verde). El panel B muestra un Western blot revelado con anticuerpo anti-IgG caprina, mientras que el panel C muestra el revelado con anticuerpo anti-IgG humana. El gel SDS-PAGE al 10% fue teñido con azul de Coomassie.

6. Discusión

Expresión y purificación de TNF- α humano y murino

El TNF- α desempeña un papel fundamental en varios procesos inmunológicos. Sin embargo, cuando esta molécula se encuentra desregulada, está directamente asociada con enfermedades inflamatorias y autoinmunes, afectando gravemente a las personas que padecen estos trastornos (Jang et al., 2021; Van Loo & Bertrand, 2023). La búsqueda de bloqueadores de TNF- α que permitan mejorar la calidad de vida de estos pacientes es fundamental y necesaria (Lim et al., 2018).

Actualmente, numerosos bloqueadores de TNF- α han sido aprobados por la FDA; sin embargo, Adalimumab se ha destacado internacionalmente, convirtiéndose en el medicamento con mayor recaudación desde su lanzamiento y superando los 200 mil millones de dólares en ventas. A pesar de ello, en los últimos años, Humira[®] ha perdido participación en el mercado debido a la expiración de su patente y al surgimiento de nuevos anticuerpos con la misma función (AbbVie, 2025).

Su estructura se compone de la asociación de tres monómeros unidos de manera no covalente, cada uno con aproximadamente 17,3 kDa, formando una estructura de aproximadamente 52 kDa (Horiuchi et al., 2010). La expresión funcional de esta molécula está directamente relacionada con la capacidad de formación del homotrímero, el cual resulta extremadamente sensible a los procesos de congelación y descongelación, comprometiendo así su estabilidad (Lee et al., 2015; Daub et al., 2019).

La expresión y purificación de TNF- α humano y murino siguieron las optimizaciones implementadas en estudios previos del laboratorio (Contreras, 2020). No obstante, en el presente trabajo se realizaron todas las fases de producción de TNF- α para ambas especies. Los ensayos con nanoanticuerpos contra TNF- α humano y murino fueron utilizados como estrategia para asegurar, mediante resultados previos, la capacidad de reconocimiento de los

nanoanticuerpos en ratones, con vistas a futuros estudios preclínicos en modelos animales. Se logró identificar actividad de ambos TNF- α en ensayos realizados en células L929, evidenciando que las moléculas recombinantes podían emplearse como dianas para una selección segura de los nanoanticuerpos.

Además, se observó una mayor mortalidad en las células tratadas con TNF- α murino (5,8 pg/ml) en comparación con el tratamiento con TNF- α humano (22,81 pg/ml). Esto podría atribuirse a que las células utilizadas en el ensayo son fibroblastos murinos, lo que demuestra una mayor interacción entre la molécula y el receptor, un fenómeno previamente descrito (Smith et al., 1986). A pesar de la diferencia encontrada en este estudio, los ensayos de toxicidad y el uso de anticuerpos para el bloqueo de TNF- α son ampliamente utilizados y bien establecidos en células L929 (Ishiwatari-Ogata et al., 2022).

Design y producción del nanoanticuerpo

El diseño del nanoanticuerpo a partir de una secuencia conocida, con modificaciones puntuales en las regiones CDR 1, 2 y 3 (Complementarity-Determining Regions) para aumentar la afinidad contra TNF- α , fue llevado a cabo. Las regiones CDR son fundamentales para el reconocimiento y la unión específica a los antígenos, siendo esenciales para las funciones terapéuticas de unión y bloqueo (Moutel et al., 2016). La variabilidad en los aminoácidos presentes en estas regiones favorece la identificación de candidatos robustos a fármacos dirigidos a diferentes objetivos terapéuticos.

Las modificaciones realizadas en este estudio tuvieron como objetivo obtener una biblioteca de nanoanticuerpos con alta variabilidad, pero sin comprometer la estabilidad de la molécula (McMahon et al., 2018). Asimismo, los codones seleccionados limitaron la inserción de cisteínas y aminoácidos hidrofóbicos en posiciones expuestas.

En estudios previos, la CDR3 fue modificada para contener 14 residuos, generando una región de reconocimiento más extensa que se pliega sobre el armazón del nanoanticuerpo y adopta una topología “convexa” (Moreno et al.,

2022). En la biblioteca utilizada en este estudio, se insertaron 10 residuos para formar una región de unión “cóncava”, con la CDR orientada hacia arriba (Contreras et al., 2023).

Los resultados de este trabajo demostraron que el diseño del nanoanticuerpo con regiones randomizadas permitió generar secuencias con variaciones en las regiones designadas como degeneradas.

Utilización de una biblioteca sintética para la selección de bloqueadores de TNF- α

El empleo de bibliotecas sintéticas ofrece varias ventajas en comparación con las bibliotecas obtenidas directamente de animales no inmunizados, denominadas naïve. Actualmente, las bibliotecas creadas mediante diferentes métodos pueden contener un alto número de variantes, alcanzando entre 10^{10} y 10^{11} diferentes variaciones de anticuerpos. En promedio, el 85% de los fagos presentan la proteína en su superficie, incluso en bibliotecas naïve, sintéticas y semisintéticas (Almagro et al., 2019).

Las bibliotecas naïve destacan por su capacidad natural de reconocimiento frente a diversos antígenos y, durante el proceso de selección clonal, atraviesan una etapa crucial de selección y eliminación de anticuerpos potencialmente perjudiciales para el organismo (Kenneth, 2014). Sin embargo, los avances tecnológicos en la tecnología de *phage display* y el desarrollo de nuevas bibliotecas sintéticas con diseños mejorados, especialmente en las regiones CDR, han permitido la generación de moléculas con alta capacidad terapéutica (Contreras et al., 2023).

El tamaño de la biblioteca está directamente relacionado con la afinidad; por ello, las bibliotecas universales con un gran repertorio de moléculas potenciales constituyen una herramienta extraordinaria para la búsqueda y selección de nuevos fármacos (Zhang, 2023).

Además del aspecto funcional, el uso de bibliotecas sintéticas presenta ventajas como: i) Evita el uso de animales en la experimentación; ii) Disminuye

los costos al no requerirse instalaciones para el manejo de animales; iii) Acelera la obtención de resultados, ya que la biblioteca sintética puede generarse fácilmente en condiciones de laboratorio, eliminando la necesidad de trabajar con muestras biológicas animales (Liu & Yang, 2022).

Uno de los aspectos centrales de este estudio fue la implementación de una nueva metodología basada en lavados exhaustivos para eliminar posibles clones con baja afinidad por TNF- α . La exposición de la biblioteca de nanoanticuerpos contra TNF- α , seguida de múltiples lavados, permitió la selección de clones totalmente distintos, evidenciando que esta técnica permite seleccionar clones con alta afinidad y diferencias en los aminoácidos degenerados. Esto pone de manifiesto que tanto la biblioteca como la metodología aplicada pueden generar diversidad incluso con pocas rondas de biopanning.

Secuenciación, identificación y purificación de los nanoanticuerpos expresados en el periplasma de cepas HB2151

Los resultados indican que todos los clones son diferentes entre sí en las regiones que fueron diseñadas para ser modificadas. Además de la secuenciación, se realizaron análisis para comprobar la correcta expresión de los nanoanticuerpos en bacterias. Se emplearon cepas HB2151, reconocidas por su capacidad para exportar proteínas al periplasma; el diseño de nuestra biblioteca incorpora un péptido señal que garantiza este direccionamiento adecuado.

Desde esta perspectiva, se logró la expresión periplásmica de 26 de los 27 clones en bacterias HB2151. Esta estrategia busca obtener proteínas de manera más eficiente, minimizando la presencia de contaminantes citoplasmáticos. El periplasma bacteriano es un compartimento celular único de las bacterias gramnegativas, situado entre la membrana interna y la membrana externa. En este espacio, el ambiente oxidativo favorece la formación de enlaces disulfuro, esenciales para la estabilidad estructural de ciertas proteínas. Además,

el espacio periplásmico presenta menor actividad de proteasas en comparación con el citoplasma, proporcionando así mayor estabilidad a las proteínas recombinantes (Taherian et al., 2019).

La purificación de estas proteínas obtenidas del periplasma también resulta más sencilla, ya que la lisis puede realizarse mediante choque osmótico para liberar el contenido periplásmico. Para los ensayos de expresión, se utilizó el tampón TES (Tris/EDTA/Sacarosa). El Tris mantiene el pH del medio para evitar daños y preservar la funcionalidad de las moléculas. El EDTA, un agente quelante de iones divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} , desestabiliza la membrana externa bacteriana rompiendo las interacciones de los lipopolisacáridos (LPS) sin afectar la membrana interna, permitiendo así la liberación selectiva del contenido periplásmico. La sacarosa, por su parte, genera un ambiente hipertónico que facilita la inducción del choque osmótico (Quan et al., 2013).

Producción de IgY para el reconocimiento de los nanoanticuerpos

Siguiendo el protocolo de Ghamghami et al. (2020) con modificaciones, obtuvimos un rendimiento de 0,1 mg/L, considerablemente inferior a los resultados reportados por el autor, quien alcanzó un rendimiento de 3,5 mg/L utilizando la cepa HB2151. Nuestro bajo rendimiento puede atribuirse a las modificaciones introducidas en el tampón de lisis bacteriana. Para evitar problemas de interferencia en la cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC), optamos por eliminar el EDTA de la solución de lisis, lo que repercutió de forma significativa en el rendimiento obtenido, aunque permitió una purificación sin interferencias en la cromatografía. A pesar de esta disminución en la cantidad, se logró purificar el pool de nanoanticuerpos producidos en bacterias, obteniendo una pureza superior al 90%.

El diseño de las proteínas recombinantes (nanoanticuerpos y todas las variantes de TNF- α) incorpora una cola de histidina (6xHis) para su purificación. Ante esta limitación en el rendimiento, fue necesario generar anticuerpos específicos para el reconocimiento de los nanoanticuerpos. Para ello, se

inmunizó gallinas de la raza Isa brown con el pool de nanoanticuerpos purificados, en combinación con el adyuvante ISA61. Se administraron tres dosis, cada una con la misma cantidad de proteínas nativas, y los intervalos entre aplicaciones fueron de aproximadamente 14 días. Solo se recolectaron los huevos tras la tercera aplicación, con el objetivo de obtener mayores cantidades de IgY específicas contra los nanoanticuerpos.

La producción de IgY es altamente eficiente, rentable y se ajusta a los principios de bienestar animal (reducción y refinamiento). A través de un método sencillo, ágil y económico, se pueden extraer grandes volúmenes de IgY a partir del huevo. Las inmunoglobulinas Y aviares comparten similitudes con las IgG de mamíferos, aunque se distinguen por los siguientes puntos: i) Las IgY contienen un dominio adicional en la cadena pesada; ii) Carecen de una región bisagra claramente definida; iii) Presentan en su estructura un oligosacárido exclusivo (Eriksson & Larsson, 2025).

Además de la facilidad de obtención y extracción, se estima que entre el 2% y el 10% de los anticuerpos presentes en el huevo son específicos contra el antígeno utilizado para la inmunización, lo que hace de esta plataforma una alternativa sumamente interesante (Silva & Tambourgi, 2010). No obstante, algunos factores pueden influir en la cantidad de IgY producida, siendo la inmunogenicidad y el peso molecular de la proteína empleada factores determinantes (Grando et al., 2017).

Evaluación de la unión contra el TNF- α de los clones de nanoanticuerpos ligados a la proteína PIII del fago M13

Ante la dificultad metodológica para expresar y seleccionar los mejores clones mediante la extracción de proteínas del periplasma, optamos por una estrategia alternativa para identificar los clones más prometedores para su expresión en cepas HB2151. Inicialmente, se evaluaron todos los clones disponibles y, tras aplicar la metodología descrita, los resultados indicaron que el clon P1D10 presentaba mayor afinidad por el TNF- α humano. Sin embargo,

debido a la falta de estandarización en la titulación de fagos, se decidió producir y titular todos los candidatos bloqueadores del TNF- α , con el propósito de llevar a cabo un ensayo que midiera la unión mediante ELISA con fagos previamente titulados. Esta decisión permitió minimizar posibles errores que pudieran conducir a la selección incorrecta de un clon. A pesar de ello, la técnica de ranking de afinidad sigue siendo útil para una evaluación ágil de numerosos clones, sirviendo como base para experimentos futuros.

La prueba de ELISA es una herramienta consolidada para la evaluación de la unión de fagos a su antígeno diana, y se ha aplicado en diversos estudios con múltiples finalidades (Becker et al., 2015; Machera et al., 2023). En este trabajo, se titularon todos los clones, estandarizando la cantidad de fagos por pozo, lo que permitió seleccionar de manera objetiva los mejores clones tras analizar su afinidad tanto por el TNF- α humano como murino. La concentración de 1×10^8 fagos por pozo fue seleccionada basándose en pruebas previas, que demostraron que este valor proporcionaba una señal adecuada y confiable para el análisis de los resultados.

Expresión y purificación de los nanoanticuerpos en periplasma y citoplasma

La expresión de los nanoanticuerpos en el periplasma fue dirigida utilizando el péptido señal peBI. El periplasma bacteriano ofrece un ambiente oxidativo que favorece la formación de puentes disulfuro, permitiendo el correcto plegamiento de proteínas más complejas. Además, contiene chaperonas que asisten en la adquisición de la estructura terciaria adecuada de las proteínas (Latifi et al., 2015; Taherian et al., 2019). En contraste, el ambiente citoplasmático resulta reductor, lo que propicia un plegamiento incorrecto y la formación de cuerpos de inclusión (Karyolaimos & Gier, 2021).

Existen diferencias relevantes en el proceso de purificación según la metodología empleada para la obtención de proteínas. Cuando las proteínas se ubican en el periplasma, hay menor contaminación por otras biomoléculas

citoplasmáticas y el proceso de obtención suele ser más sencillo, mediante choque osmótico y ruptura de membrana (Ghamghami et al., 2020). Por otro lado, la purificación de proteínas expresadas y almacenadas en el citoplasma habitualmente es más compleja, comenzando con la lisis celular, que libera todas las moléculas, orgánulos y potenciales contaminantes en la misma solución. Los cuerpos de inclusión pueden aislarse fácilmente por centrifugación, pero, para su aprovechamiento, requieren procesos de desnaturalización y renaturalización, lo cual puede comprometer su estructura tridimensional y funcionalidad (Osgerby & Overton, 2023).

A pesar de los beneficios derivados de las condiciones oxidativas y la menor presencia de contaminantes, el rendimiento y la eficiencia en la producción de proteínas recombinantes en el periplasma suelen ser inferiores en comparación con su expresión citoplasmática. Esto se debe a la existencia de sistemas de expresión robustos y bien establecidos, como el promotor T7 en vectores pET, ampliamente utilizados en la literatura (Dantas et al., 2019; Contreras et al., 2020; Shilling et al., 2020).

Uno de los principales problemas de la expresión en el citoplasma bacteriano es la formación de cuerpos de inclusión. Varios factores contribuyen a la aparición de estos agregados proteicos, los cuales se originan principalmente por interacciones hidrofóbicas inespecíficas entre polipéptidos desordenados. Sin embargo, los avances tecnológicos han permitido desarrollar procesos para solubilizar estas proteínas (Slouka et al., 2018). Incluso, existe evidencia de que los cuerpos de inclusión pueden contener proteínas activas, por lo que han comenzado a explorarse como sistemas de administración proteica con liberación “lenta” (Seras-Franzoso et al., 2016).

No obstante, la expresión de proteínas solubles continúa siendo la estrategia más ventajosa, ya que minimiza las etapas requeridas para obtener la molécula pura. Se han desarrollado diversas metodologías para mejorar la solubilidad de proteínas recombinantes en bacterias, tales como la adición de

etiquetas, como la proteína de unión a maltosa (MBP) y el modificador pequeño similar a ubiquitina (SUMO).

La MBP es una proteína periplasmática de 43 kDa muy soluble en *E. coli*, que además muestra afinidad nativa por resinas de amilosa (Fox et al., 2001; Costa et al., 2014). La etiqueta SUMO, por su parte, es una proteína pequeña de unos 11 kDa, presente en levaduras y vertebrados, frecuentemente utilizada en ingeniería genética fusionada a la proteína de interés (Marblestone et al., 2006). El uso de la etiqueta SUMO ofrece ventajas sobre otros métodos de fusión, ya que permite la escisión específica de SUMO mediante la enzima ULP1, obteniendo la proteína diana libre, sin residuos de aminoácidos adicionales (Costa et al., 2014). Por tanto, esta metodología favorece la obtención de proteínas en mayor cantidad, con la conformación y funcionalidad adecuadas.

Se realizaron diversas pruebas para optimizar la producción de proteínas en el periplasma con vistas a la posterior purificación. Sin embargo, los diferentes procedimientos de purificación no lograron rendimientos elevados ni alta pureza del nanoanticuerpo, lo que llevó a optar por la síntesis de la secuencia en el vector pET29a, permitiendo así alcanzar mejores rendimientos y un mayor grado de pureza proteica.

Adenovirus para la producción transitoria de la proteína P1D10 unida a la región Fc humana.

La expresión del nanoanticuerpo P1D10 se llevó a cabo con éxito en bacterias, optando por producirlo fusionado a la región Fc de la IgG humana, con el objetivo de facilitar ensayos de afinidad, análisis de estabilidad y pruebas in vivo. Mediante el cultivo de aproximadamente 100 placas, se alcanzó un título viral de 1×10^9 partículas, utilizado para la infusión en la glándula mamaria, la cual permite inducir la expresión de la proteína a niveles apropiados para evaluaciones posteriores (Sánchez et al., 2004; Toledo et al., 2006). La expresión de la proteína de fusión fue confirmada por Western blot, evidenciando la presencia del nanoanticuerpo P1D10-Fc en la leche de cabras.

En líneas futuras de investigación, están previstos ensayos en animales con el fin de evaluar la actividad biológica del nanoanticuerpo, que, según nuestros resultados preliminares, presenta una capacidad de bloqueo contra TNF- α comparable a la de Adalimumab[®]. La expresión de anticuerpos monoclonales mediante la plataforma adenoviral constituye una estrategia bien establecida y eficaz para la validación y producción de moléculas recombinantes en la glándula mamaria (Sánchez et al., 2004; Toledo et al., 2006; Ramos et al., 2011; Salgado et al., 2015; Leiva et al., 2021).

La expresión de anticuerpos monovalentes, como es el caso del presente trabajo, puede tener aumentada su afinidad por el ligando mediante la repetición de su secuencia en una estructura bivalente, lo que proporciona una mayor capacidad de unión. Los anticuerpos monovalentes se disocian más fácilmente de su blanco en comparación con los bivalentes, por lo que resulta de interés producir el nanoanticuerpo P1D10-P1D10 unido a la región Fc de la IgG1 humana (Mattes, 2005).

Mercado de anticuerpos bloqueadores de TNF- α

El bloqueador de TNF- α Humira[®] fue, durante varios años, el medicamento más vendido a nivel mundial. Sin embargo, experimentó una marcada disminución en sus ingresos tras la entrada de biosimilares en el mercado global. La empresa responsable de su producción, AbbVie, ha enfrentado una competencia significativa desde 2023 debido a estos biosimilares, lo que resultó en una reducción del 41 % en los ingresos generados por Humira[®].

Algunos biosimilares se ofrecen a un precio hasta un 80% inferior en comparación con Humira[®], impactando de forma directa su cuota de mercado (Fig. 26) (Biosimilars, 2024). Los avances en biotecnología y en la optimización de procesos productivos han permitido el desarrollo de medicamentos a menor costo, aumentando la competitividad comercial y garantizando una calidad comparable a la del fármaco original.

Ante este contexto, el uso de biosimilares y de nuevos fármacos alternativos adquiere cada vez más relevancia, lo que facilita los procesos regulatorios y fomenta el desarrollo de tecnologías innovadoras que pueden contribuir a la producción y mejora de medicamentos biotecnológicos.

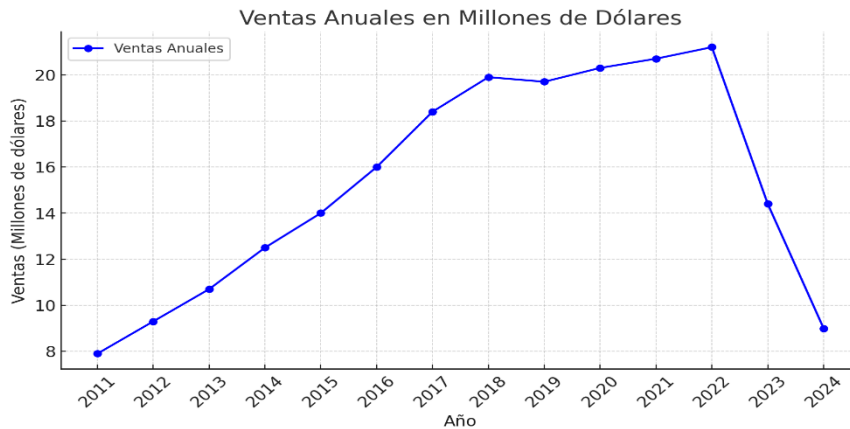


Figura 26. Evolución de las ventas anuales del medicamento HUMIRA entre 2011 y 2024. Se observa un crecimiento sostenido hasta 2022, año en que se alcanza el máximo de ventas, seguido de una caída pronunciada en 2023 y 2024.

Frente a los resultados obtenidos en este trabajo, la generación de nuevos nanoanticuerpos terapéuticos como P1D10 tiene una importancia estratégica, ya que estas moléculas pueden ofrecer ventajas en términos de especificidad y versatilidad. La producción de una versión bivalente del nanoanticuerpo P1D10, fusionada a la región Fc de la IgG1 humana, podría ampliar su capacidad de unión y su potencial de bloqueo, superando posiblemente el desempeño observado para la versión monovalente. En este sentido, ya validamos la expresión del vector correspondiente en células HEK293A, demostrando la viabilidad de producir esta nueva molécula. Como siguiente paso, se propone la expresión del nanoanticuerpo bivalente en leche de caprinos no transgénicos, con el fin de validar la producción a gran escala y evaluar sus efectos funcionales en modelos preclínicos, lo cual podría contribuir de manera significativa al avance de terapias basadas en nanoanticuerpos.

7. Conclusión

Los resultados nos permiten aceptar la hipótesis de trabajo. Los nanoanticuerpos sintéticos de tipo camélido seleccionados mediante un único ciclo de *biopanning* a partir de una biblioteca sintética randomizada de fagos demostraron capacidad de unión y actividad bloqueadora *in vitro* contra el rhTNF- α . El nanoanticuerpo P1D10 fue el clon más destacado, con una capacidad de unión al rhTNF- α ($KD = 138,6$ nM) y una potencia neutralizante ($IC_{50} = 3,68$ pM) comparable a la del anticuerpo comercial Adalimumab[®] ($IC_{50} = 2,31$ pM).

Estos hallazgos confirman que la estrategia aplicada es efectiva para la selección, expresión recombinante y caracterización de nanoanticuerpos con potencial terapéutico, consolidando así a estas moléculas como alternativas viables para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra TNF- α humano.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbady, A. Q., Al-Mariri, A., Zarkawi, M., Al-Assad, A., & Muyldermans, S. (2011). Evaluation of a nanobody phage display library constructed from a Brucella-immunised camel. *Veterinary immunology and immunopathology*, 142(1-2), 49-56.
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *Imunología celular e molecular* (9ª ed.). Elsevier.
3. AbbVie. AbbVie Reports Full-Year and Fourth-Quarter 2024 Financial Results. Disponible em: <https://investors.abbvie.com/static-files/db848c7a-c2f9-4805-9978-f4f714fcaa33>. Recuperado en 20 mar. 2025.
4. Alexander, E., & Leong, K. W. (2024). Discovery of nanobodies: a comprehensive review of their applications and potential over the past five years. *Journal of nanobiotechnology*, 22(1), 661. doi: 10.1186/s12951-024-02900-y. PMID: 39455963; PMCID: PMC11515141.
5. 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), 44. doi: 10.3390/antib8030044. PMID: 31544850; PMCID: PMC6784186.
6. Andretto, V., Dusi, S., Zilio, S., Repellin, M., Kryza, D., Ugel, S., & Lollo, G. (2023). Tackling TNF- α in autoinflammatory disorders and autoimmune diseases: from conventional to cutting edge in biologics and RNA-based nanomedicines. *Advanced drug delivery reviews*, 201, 115080.
7. Araújo, N. M., Rubio, I. G. S., Toneto, N. P. A., Morale, M. G., & Tamura, R. E. (2022). The use of adenoviral vectors in gene therapy and vaccine approaches. *Genetics and Molecular Biology*, 45, e20220079.

8. Atiqi, S., Hooijberg, F., Loeff, F. C., Rispens, T., & Wolbink, G. J. (2020). Immunogenicity of TNF-inhibitors. *Frontiers in immunology*, 11, 312.
9. Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A. C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye L., Lerouge P. (2003). Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha (1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology*. 13(6): 427-34.
10. Beatty, J. D., Beatty, B. G., & Vlahos, W. G. (1987). Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 100(1–2), 173–179. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90187-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90187-6)
11. Becker, M., Felsberger, A., Frenzel, A., Shattuck, W. M., Dyer, M., Kügler, J., ... & Hust, M. (2015). Application of M13 phage display for identifying immunogenic proteins from tick (*Ixodes scapularis*) saliva. *BMC biotechnology*, 15(1), 43.
12. BIOSIMILARS drive cost savings and achieve 53% market share across treatment areas. *Center for Biosimilars*, 2024. Recuperado en 15 de jul. 2025. <https://www.centerforbiosimilars.com/view/biosimilars-drive-cost-savings-and-achieve-53-market-share-across-treatment-areas>.
13. Bio-sourcing. (2025). Using nature to create affordable and sustainable human monoclonals. *Nature*. Recuperado en 15 de jul. de 2025. <https://www.nature.com/articles/d43747-025-00024-2>.
14. Black, R. J., Cross, M., Haile, L. M., Culbreth, G. T., Steinmetz, J. D., Hagins, H., ... & Majeed, A. (2023). Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990–2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*, 5(10), e594-e610.
15. Bobkov, V., Zarca, A. M., Van Hout, A., Arimont, M., Doijen, J., Bialkowska, M., ... & Smit, M. J. (2018). Nanobody-Fc constructs targeting chemokine receptor CXCR4 potently inhibit signaling and

- CXCR4-mediated HIV-entry and induce antibody effector functions. *Biochemical pharmacology*, 158, 413-424.
16. Calip, G. S., Patel, P. R., Adimadhyam, S., Xing, S., Wu, Z., Sweiss, K., ... & Chiu, B. C. H. (2018). Tumor necrosis factor-alpha inhibitors and risk of non-Hodgkin lymphoma in a cohort of adults with rheumatologic conditions. *International journal of cancer*, 143(5), 1062-1071.
 17. Castro-Santos, P., Moro-García, M. A., Medrano, C., Gutiérrez, M. A., Stange, L., & Díaz-Peña, R. (2017). Genética de la artritis reumatoide en Chile. *Rev. chil. reumatol*, 157-164.
 18. Chen, C., Garcia, Z., Chen, D., Liu, H., & Trelstad, P. (2025, December). Cost and supply considerations for antibody therapeutics. In *MAbs* (Vol. 17, No. 1, p. 2451789). Taylor & Francis.
 19. Chen, J. L., Lobo-Chan, A. M., Chan, R. V. P., & Bhat, P. (2019). Tumor necrosis factor-alpha inhibitory therapy for non-infectious autoimmune uveitis. In *Advances in the Diagnosis and Management of Uveitis*. IntechOpen.
 20. Ciolek, A. M., Arnall, J., Moore, D. C., Palkimas, S., Der-Nigoghossian, J., & Dane, K. (2022). Eptacog beta for bleeding treatment and prevention in congenital hemophilia a and B with inhibitors: a review of clinical data and implications for clinical practice. *Annals of Pharmacotherapy*, 56(7), 831-838.
 21. Collet, A., Guerrier, T., Sanges, S., Chépy, A., Sobanski, V., Launay, D., & Dubucquoi, S. (2025). Autoreactive B cells in autoimmune diseases: Mechanisms, functions and clinical implications. *Autoimmunity Reviews*, 103851.
 22. Contreras, M. A., Macaya, L., Neira, P., Camacho, F., González, A., Acosta, J., ... & Sánchez, O. (2020). New insights on the interaction mechanism of rhTNF α with its antagonists Adalimumab and Etanercept. *Biochemical Journal*, 477(17), 3299-3311.

23. Contreras, M. A., Serrano-Rivero, Y., González-Pose, A., Salazar-Uribe, J., Rubio-Carrasquilla, M., Soares-Alves, M., ... & Moreno, E. (2023). Design and construction of a synthetic nanobody library: testing its potential with a single selection round strategy. *Molecules*, 28(9), 3708.
24. Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., Haard, H. D., Lauwereys, M., Casteels, P., ... & Rottiers, P. (2006). Formatted anti-tumor necrosis factor α VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54(6), 1856-1866.
25. Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology*, 5, 63.
26. Crenshaw, B. J., Jones, L. B., Bell, C. R., Kumar, S., & Matthews, Q. L. (2019). Perspective on adenoviruses: epidemiology, pathogenicity, and gene therapy. *Biomedicines*, 7(3), 61.
27. Crisostomo, L., Soriano, A. M., Mendez, M., Graves, D., & Pelka, P. (2019). Temporal dynamics of adenovirus 5 gene expression in normal human cells. *PLoS One*, 14(1), e0211192.
28. Croft, M., Salek-Ardakani, S., & Ware, C. F. (2024). Targeting the TNF and TNFR superfamilies in autoimmune disease and cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 23(12), 939-961.
29. Cronstein, B. N., & Aune, T. M. (2020). Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(3), 145-154.
30. Damelang, T., Brinkhaus, M., van Osch, T. L., Schuurman, J., Labrijn, A. F., Rispen, T., & Vidarsson, G. (2024). Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions. *Frontiers in immunology*, 14, 1304365..
31. Dantas, R. C., Caetano, L. F., Torres, A. L. S., Alves, M. S., Silva, E. T. M. F., Teixeira, L. P. R., ... & Tavares, K. C. S. (2019). Expression of a

- recombinant bacterial l-asparaginase in human cells. *BMC Research Notes*, 12(1), 794.
32. Das, P. K., Sahoo, A., & Veeranki, V. D. (2024). Recombinant monoclonal antibody production in yeasts: challenges and considerations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 266, 131379.
 33. Daub, H., Traxler, L., Ismajli, F., Groitl, B., Itzen, A., & Rant, U. (2020). The trimer to monomer transition of Tumor Necrosis Factor-Alpha is a dynamic process that is significantly altered by therapeutic antibodies. *Scientific reports*, 10(1), 9265.
 34. Davis, A., & Robson, J. (2016). The dangers of NSAIDs: look both ways. *The British journal of general practice*, 66(645), 172.
 35. Davydova, E. K. (2022). Protein engineering: advances in phage display for basic science and medical research. *Biochemistry (Moscow)*, 87(Suppl 1), S146-S167.
 36. De Stefano, L., Pallavicini, F. B., Mauric, E., Piccin, V., Vismara, E. M., Montecucco, C., & Bugatti, S. (2023). Tumor necrosis factor- α inhibitor-related autoimmune disorders. *Autoimmunity Reviews*, 22(7), 103332.
 37. De Vlieger, D., Ballegeer, M., Rossey, I., Schepens, B., & Saelens, X. (2018). Single-domain antibodies and their formatting to combat viral infections. *Antibodies*, 8(1), 1.
 38. Echelard, Y., Meade, H., & Ziomek, C. (2006). Production of recombinant therapeutic proteins in the milk of transgenic animals.
 39. Eiers, A. K., Vettorazzi, S., & Tuckermann, J. P. (2024). Journey through discovery of 75 years glucocorticoids: evolution of our knowledge of glucocorticoid receptor mechanisms in rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 83(12), 1603-1613.
 40. Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C. A., Hu, B., Jin, C., & Flavell, R. A. (2013). Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours,

immune cells and microorganisms. *Nature Reviews Cancer*, 13(11), 759-771.

41. Eriksson, M., & Larsson, A. (2025). Avian antibodies as potential therapeutic tools. *Antibodies*, 14(1), 18.
42. Farrugia, M., & Baron, B. (2016). The role of TNF- α in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells. *Journal of clinical and translational research*, 2(3), 84.
43. Feldmann, M., & Maini, S. R. N. (2008). Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunological reviews*, 223(1), 7-19.
44. Ferreira, J. F., Mohamed, A. A. A., & Emery, P. (2016). Glucocorticoids and rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics*, 42(1), 33-46.
45. Fischer, R., Kontermann, R. E., & Pfizenmaier, K. (2020). Selective targeting of TNF receptors as a novel therapeutic approach. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 401.
46. Fischer, S., Handrick, R., & Otte, K. (2015). The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology advances*, 33(8), 1878-1896.
47. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Sevenfact. Silver Spring, MD: U.S. Food and Drug Administration, [s.d.]. Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/sevenfact>. Consulta en: 4 ago. 2025.
48. Fox, J. D., Kapust, R. B., & Waugh, D. S. (2001). Single amino acid substitutions on the surface of Escherichia coli maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Science*, 10(3), 622-630.
49. Frenzel, A., Schirrmann, T., & Hust, M. (2016, October). Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. In *MABs* (Vol. 8, No. 7, pp. 1177-1194). Taylor & Francis.

50. Gamkrelidze, M., & Dąbrowska, K. (2014). T4 bacteriophage as a phage display platform. *Archives of microbiology*, 196(7), 473-479.
51. Gao, Y., Zhang, Y., & Liu, X. (2024). Rheumatoid arthritis: pathogenesis and therapeutic advances. *MedComm*, 5(3), e509.
52. Gavin, W. (2014, October). ATryn®: 1st GE (genetically engineered) animal success story for production of a human recombinant pharmaceutical. In *BMC Proceedings* (Vol. 8, No. Suppl 4, p. O4). London: BioMed Central.
53. Xia, B., Kim, A. R., Liu, F., Han, M., Stoneburner, E., Makdissi, S., Francesca, C., Mohr, E. S., Aaron, R. M., Norbert, P., Perrimon, N. (2025). Phage-displayed synthetic library and screening platform for nanobody discovery. *eLife*, 14, RP105887.
54. Goyal, A., Cusick, A. S., & Thielemier, B. (2023). ACE Inhibitors.[Updated 2022 Jul 12]. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.*
55. Ghamghami, E., Abri Aghdam, M., Tohidkia, M. R., Ahmadikhah, A., Khanmohammadi, M., Mehdipour, T., ... & Baradaran, B. (2020). Optimization of Tris/EDTA/Sucrose (TES) periplasmic extraction for the recovery of functional scFv antibodies. *AMB Express*, 10(1), 129.
56. Ghlichloo, I., & Gerriets, V. (2019). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).
57. Goldman, E. R., Anderson, G. P., Conway, J., Sherwood, L. J., Fech, M., Vo, B., ... & Hayhurst, A. (2008). Thermostable llama single domain antibodies for detection of botulinum A neurotoxin complex. *Analytical chemistry*, 80(22), 8583-8591.
58. Grando, T. H., Baldissera, M. D., de Sá, M. F., do Carmo, G. M., Porto, B. C. Z., Aguirre, G. S., ... & Monteiro, S. G. (2017). Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. *Journal of immunological methods*, 449, 56-61.

59. Hadam, J., Aoun, E., Clarke, K., & Wasko, M. C. (2014). Managing risks of TNF inhibitors: An update for the internist. *Cleve Clin J Med*, *81*(2), 115-127.
60. Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A., & George, A. J. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature reviews Drug discovery*, *9*(4), 325-338.
61. Hassany, A. E., Tharwat, S., Mansour, M., & Enein, A. F. (2024). TNF- α in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: correlation with sonographic parameters: a cross-sectional study. *Egyptian Rheumatology and Rehabilitation*, *51*(1), 22.
62. Haudek, S. B., Taffet, G. E., Schneider, M. D., & Mann, D. L. (2007). TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *The Journal of clinical investigation*, *117*(9), 2692-2701.
63. Hay, A. N., Farrell, K., Leeth, C. M., & Lee, K. (2021). Use of genome editing techniques to produce transgenic farm animals. *Recent advances in animal nutrition and metabolism*, 279-297.
64. Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H., & McDermott, M. F. (2019). Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research*, *8*, F1000-Faculty.
65. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, *49*(7), 1215-1228.
66. Hu, Y., Sun, Y., Gu, J., Yang, F., Wu, S., Zhang, C., ... & Wang, S. (2021). Selection of specific nanobodies to develop an immuno-assay detecting *Staphylococcus aureus* in milk. *Food Chemistry*, *353*, 129481.
67. Hua, C., Buttgereit, F., & Combe, B. (2020). Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: current status and future studies. *RMD open*, *6*(1).
68. Huang, L., Reekmans, G., Saerens, D., Friedt, J. M., Frederix, F., Francis, L., ... & Van Hoof, C. (2005). Prostate-specific antigen immunosensing

based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosensors and bioelectronics*, 21(3), 483-490.

69. Hussain, A., Tarahomi, T., Singh, L., Bollampally, M., Heydari-Kamjani, M., Kesselman, M. M., & Bollampally, M. K. (2021). Cardiovascular risk associated with TNF alpha inhibitor use in patients with rheumatoid arthritis. *Cureus*, 13(9).
70. Hwang, H., Kim, M., Kim, Y., Hinterdorfer, P., Lee, J. H., & Ko, K. (2024). Recent innovations in Baculovirus-insect cell expression Systems for Therapeutic Protein Production. *Entomological Research*, 54(12), e70008.
71. Hwang, Y. G., & Moreland, L. W. (2014). Induction therapy with combination TNF inhibitor and methotrexate in early rheumatoid arthritis. *Current rheumatology reports*, 16(5), 417.
72. İncir, İ., & Kaplan, Ö. (2024). Escherichia coli as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production. *Protein Expression and Purification*, 219, 106463.
73. Ingegnoli, F., Castelli, R., & Gualtierotti, R. (2013). Rheumatoid factors: clinical applications. *Disease markers*, 35(6), 727-734.
74. Ishiwatari-Ogata, C., Kyuuma, M., Ogata, H., Yamakawa, M., Iwata, K., Ochi, M., ... & Fujii, Y. (2022). Ozoralizumab, a humanized anti-TNF α NANOBODY $\text{\textcircled{R}}$ compound, exhibits efficacy not only at the onset of arthritis in a human TNF transgenic mouse but also during secondary failure of administration of an anti-TNF α IgG. *Frontiers in Immunology*, 13, 853008.
75. Jahnich, N., & Arkwright, P. D. (2023). Regional risk of tuberculosis and viral hepatitis with tumor necrosis factor-alpha inhibitor treatment: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1046306.
76. Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., ... & Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

- in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2719.
77. Jaroszewicz, W., Morcinek-Orłowska, J., Pierzynowska, K., Gaffke, L., & Węgrzyn, G. (2022). Phage display and other peptide display technologies. *FEMS microbiology reviews*, 46(2), fuab052.
78. Jin, B. K., Odongo, S., Radwanska, M., & Magez, S. (2023). NANOBODIES®: a review of generation, diagnostics and therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5994.
79. Kaduševičius, E. (2021). Novel applications of NSAIDs: Insight and future perspectives in cardiovascular, neurodegenerative, diabetes and cancer disease therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6637.
80. Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews rheumatology*, 12(1), 49-62.
81. Karyolaimos, A., & de Gier, J. W. (2021). Strategies to enhance periplasmic recombinant protein production yields in *Escherichia coli*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 797334.
82. Keam, S. J. (2023). Ozoralizumab: first approval. *Drugs*, 83(1), 87-92.
83. Kothari, M., Wanjari, A., Acharya, S., Karwa, V., Chavhan, R., Kumar, S., ... & Patil, R. (2024). A comprehensive review of monoclonal antibodies in modern medicine: Tracing the evolution of a revolutionary therapeutic approach. *Cureus*, 16(6).
84. Laev, S. S., & Salakhutdinov, N. F. (2015). Anti-arthritic agents: progress and potential. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(13), 3059-3080.
85. Laible, G., Cole, S., Brophy, B., Maclean, P., How Chen, L., Pollock, D. P., ... & Meade, H. M. (2020). Transgenic goats producing an improved version of cetuximab in milk. *FASEB BioAdvances*, 2(11), 638-652.
86. Latifi, A. M., Khajeh, K., Farnoosh, G., Hassanpour, K., & Khodi, S. (2015). The Cytoplasmic and periplasmic expression levels and folding of

- organophosphorus hydrolase enzyme in *Escherichia coli*. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(12), e17790.
87. Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., & Laustsen, A. H. (2018). Basics of antibody phage display technology. *Toxins*, 10(6), 236.
88. Lee, J. E., Kim, S. Y., & Shin, S. Y. (2015). Effect of repeated freezing and thawing on biomarker stability in plasma and serum samples. *Osong public health and research perspectives*, 6(6), 357-362.
89. Leiva-Carrasco, M. J., Jiménez-Chávez, S., Harvey, D. J., Parra, N. C., Tavares, K. C., Camacho, F., ... & Toledo, J. R. (2021). In vivo modification of the goat mammary gland glycosylation pathway. *New Biotechnology*, 61, 11-21.
90. Lexchin, J. (2020). Affordable biologics for all. *JAMA Network Open*, 3(4), e204753-e204753.
91. Li, T. T., Yang, J. H., Jiang, M. J., Cui, H. P., Yang, X. M., Lu, X. L., & Liu, A. Q. (2024). Fusing a novel anti-CTLA-4 nanobody to the IgG1 Fc region strengthens its ability to induce CD8+ T cell-mediated immune responses against solid tumors. *International Journal of Nanomedicine*, 12311-12321.
92. Lim, H., Lee, S. H., Lee, H. T., Lee, J. U., Son, J. Y., Shin, W., & Heo, Y. S. (2018). Structural biology of the TNF α antagonists used in the treatment of rheumatoid arthritis. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 768.
93. Liu, B., & Yang, D. (2022). Easily established and multifunctional synthetic nanobody libraries as research tools. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1482.
94. Liu, H., & Timko, M. P. (2022). Improving protein quantity and quality—the next level of plant molecular farming. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1326.
95. Ma, X., & Xu, S. (2013). TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Biomedical reports*, 1(2), 177-184.

96. Machera, S. J., Niedziółka-Jönsson, J., Jönsson-Niedziółka, M., & Szot-Karpinska, K. (2023). Determination of the Dissociation Constant for Polyvalent Receptors Using ELISA: A Case of M13 Phages Displaying Troponin T-Specific Peptides. *ACS omega*, *8*(29), 26253-26262.
97. MacNeil, K. M., Dodge, M. J., Evans, A. M., Tessier, T. M., Weinberg, J. B., & Mymryk, J. S. (2023). Adenoviruses in medicine: innocuous pathogen, predator, or partner. *Trends in molecular medicine*, *29*(1), 4-19.
98. Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. U. N., & Butt, T. R. (2006). Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein science*, *15*(1), 182-189.
99. Mariette, X., Matucci-Cerinic, M., Pavelka, K., Taylor, P., van Vollenhoven, R., Heatley, R., ... & Emery, P. (2011). Malignancies associated with tumour necrosis factor inhibitors in registries and prospective observational studies: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases*, *70*(11), 1895-1904.
100. Martins, L. T., Neto, S. G., Tavares, K. C. S., Calderón, C. E. M., Aguiar, L. H., Lazzarotto, C. R., ... & Bertolini, M. (2016). Developmental outcome and related abnormalities in goats: comparison between somatic cell nuclear transfer-and in vivo-derived concepti during pregnancy through term. *Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")*, *18*(4), 264-279.
101. Martins, L. T., Tavares, K. C. S., Teixeira, L. P. R., Lopes, F. D. M., Gaudêncio Neto, S., Calderón, C. E. M., ... & Bertolini, L. R. (2015). Production of recombinant therapeutic proteins in genetically engineered animals: the dawn of a new era. McMahon, C., Baier, A.S., Pascolutti, R. *et al.* Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 289–296 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0028-6>.

102. Mattes, M. J. (2005). Binding parameters of antibodies: pseudo-affinity and other misconceptions. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54(6), 513-516.
103. Melo, A. T., Campanilho-Marques, R., & Fonseca, J. E. (2021). Golimumab (anti-TNF monoclonal antibody): where we stand today. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(6), 1586-1598.
104. Monzani, P. S., Adona, P. R., Long, S. A., & Wheeler, M. B. (2021). Cows as bioreactors for the production of nutritionally and biomedically significant proteins. In *Recent Advances in Animal Nutrition and Metabolism* (pp. 299-314). Cham: Springer International Publishing.
105. Moreno, E., Valdés-Tresanco, M. S., Molina-Zapata, A., & Sánchez-Ramos, O. (2022). Structure-based design and construction of a synthetic phage display nanobody library. *BMC Research Notes*, 15(1), 124.
106. Morrison, C. (2019). Nanobody approval gives domain antibodies a boost. *Nat Rev Drug Discov*, 18(7), 485-487.
107. Moutel, S., Bery, N., Bernard, V., Keller, L., Lemesre, E., De Marco, A., ... & Perez, F. (2016). NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *Elife*, 5, e16228.
108. Murali, V. K., Ornelles, D. A., Gooding, L. R., Wilms, H. T., Huang, W., Tollefson, A. E., ... & Garnett-Benson, C. (2014). Adenovirus death protein (ADP) is required for lytic infection of human lymphocytes. *Journal of virology*, 88(2), 903-912.
109. Kenneth, M. (2014). *Imunobiologia de Janeway*. ed. *Porto Alegre, Brasil: Artmed*.
110. Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual review of biochemistry*, 82(1), 775-797.
111. Nguyen, V. K., Hamers, R., Wyns, L., & Muyldermans, S. (1999). Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the

entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Molecular immunology*, 36(8), 515-524.

112. Osgerby, A., & Overton, T. W. (2023). Approaches for high-throughput quantification of periplasmic recombinant proteins. *New Biotechnology*, 77, 149-160.
113. Papatthanasidou, S., Rickelt, S., Soriano, M. E., Schips, T. G., Maier, H. J., Davos, C. H., ... & Capetanaki, Y. (2015). Tumor necrosis factor- α confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. *Nature medicine*, 21(9), 1076-1084.
114. Patel, J. P., Srinivasa, N. K. K., Gande, A., Anusha, M., Dar, H., Baji, D. B., & Baji, D. B. (2023). The role of biologics in rheumatoid arthritis: a narrative review. *Cureus*, 15(1).
115. Pobezinskaya, Y. L., & Liu, Z. (2012). The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle*, 11(5), 871-876.
116. Prantner, A. M., Yin, C., Kamat, K., Sharma, K., Lowenthal, A. C., Madrid, P. B., & Scholler, N. (2018). Molecular imaging of mesothelin-expressing ovarian cancer with a human and mouse cross-reactive nanobody. *Molecular pharmaceuticals*, 15(4), 1403-1411.
117. Probert, L. (2015). TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, 302, 2-22.
118. Quan, S., Hiniker, A., Collet, J. F., & Bardwell, J. C. (2012). Isolation of bacteria envelope proteins. In *Bacterial cell surfaces: methods and protocols* (pp. 359-366). Totowa, NJ: Humana Press.
119. Radner, H., & Aletaha, D. (2015). Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview. *Wiener medizinische wochenschrift*, 165(1), 3-9.
120. Rainsford, K. (2007). Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Inflammation in the pathogenesis of chronic diseases: the COX-2 controversy*, 3-27.

121. Ramos, O. S., Carratalá, Y. P., Puerta, S. G., Pereira, N. C. P., Amarán, L. S., Chaves, S. P. J., & Alonso, J. R. T. (2011). Dual promoter lentiviral vector generates transgenic mice expressing E2-CSFV glycoprotein in their milk, but impairs early identification of transgenic embryos. *Theriogenology*, *75*(7), 1280-1289.
122. Rizk, S. S., Moustafa, D. M., ElBanna, S. A., Nour El-Din, H. T., & Attia, A. S. (2024). Nanobodies in the fight against infectious diseases: repurposing nature's tiny weapons. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(7), 209.
123. Rolski, F., & Błyszczuk, P. (2020). Complexity of TNF- α signaling in heart disease. *Journal of clinical medicine*, *9*(10), 3267.
124. Ruggiero, A., Villa, C. H., Bander, E., Rey, D. A., Bergkvist, M., Batt, C. A., ... & McDevitt, M. R. (2010). Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(27), 12369-12374.
125. Ruiz, A., Palacios, Y., Garcia, I., & Chavez-Galan, L. (2021). Transmembrane TNF and its receptors TNFR1 and TNFR2 in mycobacterial infections. *International journal of molecular sciences*, *22*(11), 5461.
126. Ruiz-López, E., & Schuhmacher, A. J. (2021). Transportation of single-domain antibodies through the blood–brain barrier. *Biomolecules*, *11*(8), 1131.
127. Salauddin, M., Saha, S., Hossain, M. G., Okuda, K., & Shimada, M. (2024). Clinical application of adenovirus (AdV): a comprehensive review. *Viruses*, *16*(7), 1094.
128. Saleem, M. Z., Jahangir, G. Z., Saleem, A., Zulfiqar, A., Khan, K. A., Ercisli, S., ... & Saleem, A. (2024). Production Technologies for Recombinant Antibodies: Insights into Eukaryotic, Prokaryotic, and Transgenic Expression Systems. *Biochemical Genetics*, 1-40.

129. Salgado, E. R., Montesino, R., Jiménez, S. P., González, M., Hugues, F., Cabezas, O. I., ... & Toledo, J. R. (2015). Post-translational modification of a chimeric EPO-Fc hormone is more important than its molecular size in defining its in vivo hematopoietic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(9), 1685-1693.
130. Sánchez, O., Toledo, J. R., Rodríguez, M. P., & Castro, F. O. (2004). Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. *Journal of Biotechnology*, 114(1-2), 89-97.
131. Saurin, S., Meineck, M., Erkel, G., Opatz, T., Weinmann-Menke, J., & Pautz, A. (2022). Drug candidates for autoimmune diseases. *Pharmaceuticals*, 15(5), 503.
132. Schoonooghe, S., Laoui, D., Van Ginderachter, J. A., Devoogdt, N., Lahoutte, T., De Baetselier, P., & Raes, G. (2012). Novel applications of nanobodies for in vivo bio-imaging of inflamed tissues in inflammatory diseases and cancer. *Immunobiology*, 217(12), 1266-1272.
133. Schroeder Jr, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2), S41-S52.
134. Seras-Franzoso, J., Sánchez-Chardi, A., Garcia-Fruitós, E., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2016). Cellular uptake and intracellular fate of protein releasing bacterial amyloids in mammalian cells. *Soft Matter*, 12(14), 3451-3460.
135. Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications biology*, 3(1), 214.
136. Shirafkan, F., Hensel, L., & Rattay, K. (2024). Immune tolerance and the prevention of autoimmune diseases essentially depend on thymic tissue homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 15, 1339714.

137. da Silva, W. D., & Tambourgi, D. V. (2010). IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology*, 135(3-4), 173-180.
138. Singh, J. A. (2022). Treatment guidelines in rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 48(3), 679-689.
139. Slouka, C., Kopp, J., Spadiut, O., & Herwig, C. (2019). Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing?. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(3), 1143-1153.
140. Smith, R. A., Kirstein, M., Fiers, W., & Baglioni, C. (1986). Species specificity of human and murine tumor necrosis factor. A comparative study of tumor necrosis factor receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 261(32), 14871-14874.
141. Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315-1317.
142. Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B. (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 388:2023-2038.
143. Song, B. P. C., Ch'ng, A. C. W., & Lim, T. S. (2024). Review of phage display: A jack-of-all-trades and master of most biomolecule display. *International journal of biological macromolecules*, 256, 128455.
144. Su, B., Xu, H., Xie, G., Chen, Q., Sun, Z., Cao, H., & Liu, X. (2021). Generation of a nanobody-alkaline phosphatase fusion and its application in an enzyme cascade-amplified immunoassay for colorimetric detection of alpha fetoprotein in human serum. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 262, 120088.
145. Taherian, E., Mohammadi, E., Jahanian-Najafabadi, A., Moazen, F., & Akbari, V. (2019). Cloning, optimization of periplasmic expression and purification of recombinant granulocyte macrophage-stimulating factor in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Advanced Biomedical Research*, 8(1), 71.

146. Tavares, K. C. S., Dias, A. C. D. O., Lazzarotto, C. R., Gaudencio Neto, S., de Sá Carneiro, I., Ongaratto, F. L., ... & Bertolini, L. R. (2016). Transient expression of functional glucocerebrosidase for treatment of Gaucher's disease in the goat mammary gland. *Molecular biotechnology*, 58(1), 47-55.
147. The Business Research Company. (2025). *Monoclonal antibodies global market report*. <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/monoclonal-antibodies-global-market-report> Recuperado en 16 de mayo de 2025.
148. Thomas, S. S., Borazan, N., Barroso, N., Duan, L., Taroumian, S., Kretzmann, B., ... & Furst, D. E. (2015). Comparative immunogenicity of TNF inhibitors: impact on clinical efficacy and tolerability in the management of autoimmune diseases. A systematic review and meta-analysis. *BioDrugs*, 29(4), 241-258.
149. Toledo, J. R., Sánchez, O., Seguí, R. M., García, G., Montañez, M., Zamora, P. A., ... & Cremata, J. A. (2006). High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *Journal of biotechnology*, 123(2), 225-235.
150. Tourdot, S., Vazquez-Abad, M. D., Cox, D. S., Cai, C. H., Wang, K., Zhang, W., & Lepsy, C. (2025). Antidrug antibodies to adalimumab do not associate with immunologically related adverse events. *Frontiers in Immunology*, 15, 1457993.
151. Tran, L. H., Graulus, G. J., Vincke, C., Smiejkowska, N., Kindt, A., Devoogdt, N., ... & Guedens, W. (2022). Nanobodies for the early detection of ovarian cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(22), 13687.
152. U.S. Food and Drug Administration. (2018). *Humira (adalimumab)* [Package insert]. Recuperado el 20 de julio de 2025, de https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/125057s410lbl.pdf

153. Van Der Vlist, M., Kuball, J., Radstake, T. R., & Meyaard, L. (2016). Immune checkpoints and rheumatic diseases: what can cancer immunotherapy teach us?. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(10), 593-604.
154. Van Loo, G., & Bertrand, M. J. (2023). Death by TNF: a road to inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 23(5), 289-303.
155. Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520.
156. Walsh, G., & Walsh, E. (2022). Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nature biotechnology*, 40(12), 1722-1760.
157. Wang, L., Wang, F. S., Chang, C., & Gershwin, M. E. (2014, August). Breach of tolerance: primary biliary cirrhosis. In *Seminars in liver disease* (Vol. 34, No. 03, pp. 297-317). Thieme Medical Publishers.
158. Wang, L., Wang, F. S., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of internal medicine*, 278(4), 369-395.
159. Wang, Y., Zhao, S., Bai, L., Fan, J., & Liu, E. (2013). Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *BioMed Research International*, 2013(1), 580463.
160. Wang, W. C., Sayedahmed, E. E., & Mittal, S. K. (2022). Significance of preexisting vector immunity and activation of innate responses for adenoviral vector-based therapy. *Viruses*, 14(12), 2727.
161. Wanner, N., Eden, T., Liaukouskaya, N., & Koch-Nolte, F. (2021). Nanobodies: new avenue to treat kidney disease. *Cell and Tissue Research*, 385(2), 445-456.
162. Watson, N., & Al-Samkari, H. (2022). Eptacog beta, a novel recombinant factor VIIa, for the treatment of hemophilia. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 58(3), 105-116.

163. SM Wold, W., & Toth, K. (2013). Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Current gene therapy*, 13(6), 421-433.
164. Xiao, M., Zheng, Q., Popa, P., Mi, X., Hu, J., Zou, F., & Zou, B. (2025). Drug molecular representations for drug response predictions: a comprehensive investigation via machine learning methods. *Scientific Reports*, 15(1), 20.
165. Xue, J. C., Hou, X. T., Zhao, Y. W., & Yuan, S. (2025). Biological agents as attractive targets for inflammatory bowel disease therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1871(3), 167648.
166. Yang, J., Lin, S., Chen, Z., Yang, F., Guo, L., Wang, L., ... & Lu, G. (2023). Development of a bispecific nanobody conjugate broadly neutralizes diverse SARS-CoV-2 variants and structural basis for its broad neutralization. *PloS Pathogens*, 19(11), e1011804.
167. Zhang, Y. (2023). Evolution of phage display libraries for therapeutic antibody discovery. In *MAbs* (Vol. 15, No. 1, p. 2213793). Taylor & Francis.
168. Zhang, J., Du, C., Pan, Y., Zhang, Z., Feng, R., Ma, M., & Wang, T. (2024). Optimization of a novel expression system for recombinant protein production in CHO cells. *Scientific Reports*, 14(1), 24913.
169. Zhang, Z., Gao, X., Liu, S., Wang, Q., Wang, Y., Hou, S., ... & Zhang, Y. (2025). Global, regional, and national epidemiology of rheumatoid arthritis among people aged 20–54 years from 1990 to 2021. *Scientific Reports*, 15(1), 10736.
170. Zhao, Z., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2022). Viral vector-based gene therapies in the clinic. *Bioengineering & translational medicine*, 7(1), e10258.
171. Zheng, B., Liu, M., Dai, D., Shang, Y., Dou, X., Liu, B., ... & Luo, D. (2024). Safety of TNF- α inhibitors: A real-world study based on the US

FDA Adverse Event Reporting System Database. *Medicine*, 103(29),
e39012.