



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LIC. EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL
"MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS: TECNOLOGÍA DE
ANTICUERPOS RECOMBINANTES"

ALUMNA: SUÁREZ MONTERO EVELIN DANIELA
MATRICULA 2152030158

ASESORA INTERNA: DRA. TOMASA VERÓNICA BARÓN FLORES
NO ECONÓMICO 26848

ASESOR EXTERNO: DR. DIEGO FRANCISCO HERNÁNDEZ RAMÍREZ
CÉDULA PROFESIONAL 10202127

LUGAR DE REALIZACIÓN: INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

FECHA DE INICIO: 10/12/21
FECHA DE TÉRMINO: 10/06/22

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Justificación	3
3. Objetivos	3
3.1 Objetivo general	3
3.2 Objetivos específicos	3
4. Metodología	3
5. Resultados	4
5.1 Tipos de anticuerpos monoclonales	4
5.2 Generación de Anticuerpos Monoclonales	6
5.2.1 Hibridomas	6
5.2.1.1 Inmunización del animal con el antígeno de interés.....	7
5.2.1.2 Obtención de células B esplénicas del animal inmunizado y obtención de células de mieloma	7
5.2.1.3 Fusión de las células B esplénicas con las células del mieloma	7
5.2.1.3.1 Métodos de fusión	8
a. Tecnología convencional (polietilenglicol)	8
b. Fusión por formación de cadenas de perlas.....	8
c. Radiación láser	9
d. Focalización de células (BCT; tecnología de hibridomas dirigida a células B)	9
5.2.1.4 Identificación y selección de los hibridomas específicos	10
5.2.1.5 Proliferación de hibridomas específicos	11
5.2.1.5.1 Identificación y selección de la clona de interés	11
5.2.1.5.1.1 Método estándar: Dilución limitante	11
5.2.1.5.1.2 Otros métodos	11
a. Análisis y procesamiento mediante láser (LEAP)	11
b. <i>ClonePix FL</i>	12
c. Conjugados de toxina-antígeno	12
5.2.1.6 Producción y Purificación de los anticuerpos monoclonales	12
5.3 Quimerización	13
5.4 Humanización	13
5.2.2 <i>Phage display</i> (expresión en fagos filamentosos)	15
5.2.2.1 Principio de <i>biopanning</i> o selección del fago	16
5.2.3 Transgénicos	17

5.2.3.1 Plantas transgénicas	18
5.2.4 Célula B única (<i>Single B cell</i>)	19
5.2.4.1 Identificación y aislamiento	19
5.2.4.2 Retrotranscripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa para células únicas (RT-PCR)	19
5.2.4.3 Clonación de células B únicas y tamizado de anticuerpos	19
5.2.4.4 Purificación	20
5.2.5 Otros métodos de generación de mAb's	20
5.2.5.1 Inmortalización por virus de Epstein-Barr (EBV)	20
5.2.5.2 Inmortalización por sobreexpresión de BCL-6 y BCL-XL	21
5.2.5.3 <i>HybriFree</i>	21
5.5 Anticuerpos de próxima generación	22
5.5.1 Anticuerpos biespecíficos	22
5.5.2 Terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T)	22
5.5.3 Anticuerpos conjugados	22
a. Anticuerpo-fármaco (ACF)	22
b. Anticuerpo-radionúclido	23
c. Inmunocitocinas	23
d. Inmunoliposomas	23
5.6 Aplicaciones	25
5.7 Farmacocinética	29
5.7.1 Absorción	29
5.7.2 Distribución	29
5.7.3 Metabolismo y eliminación de mAb's	30
5.8 Biosimilares	30
6 Conclusiones	31
7 Abreviaturas	32
8 Bibliografía	34

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLA

Figura 1. Estructura general de un anticuerpo	1
Figura 2. Tipos de anticuerpos e inmunogenicidad	5
Figura 3. Generación de anticuerpos monoclonales por medio de distintos métodos	6
Figura 4. ELISA indirecto	7
Figura 5. Método convencional basada en polietilenglicol	8
Figura 6. Fusión mediante perlas	8
Figura 7. Método basado en radiación láser.....	9
Figura 8. Tecnología de hibridomas dirigida a células B	10
Figura 9. Células en proceso de fusión	10
Figura 10. Selección de hibridomas con medio HAT	10
Figura 11. Alternancia de las CDR´s no humanas y las FR´s	14
Figura 12. <i>Phage display</i>	15
Figura 13. <i>Biopanning</i>	16
Figura 14. <i>Ying-Yang</i>	17
Figura 15. Generación de anticuerpos humanos en ratones transgénicos	18
Figura 16. Generación de anticuerpos mediante la clonación de células B únicas	20
Figura 17. Generación de anticuerpos monoclonales por medio de la sobreexpresión de BCL-6 y BCL-XL	21
Figura 18. Método <i>HybriFree</i>	21
Figura 19. Anticuerpos terapéuticos	23
Figura 20. Principales fragmentos recombinantes	25
Tabla 1. Anticuerpos recombinantes y su aplicación	26

1. Introducción

Los anticuerpos (Ac's) o inmunoglobulinas (Ig's) son moléculas glicoproteicas (90% péptidos, 10% carbohidratos) que forman parte de la respuesta inmune humoral, tienen la capacidad de reaccionar específicamente contra un antígeno o inmunógeno. Son sintetizadas por los linfocitos B, se encuentran presentes en el torrente sanguíneo y otros fluidos biológicos como: lágrimas, secreción en mucosas, saliva, líquido sinovial, líquido intersticial, etc. [Torres, 2020].

Su estructura general es en forma de "Y" (Fig. 1a) y consta de 4 cadenas polipeptídicas, dos de bajo peso molecular ~20 kDa denominadas cadenas ligeras (CL) y dos de alto peso molecular ~50 kDa llamadas cadenas pesadas (CP), que interactúan mediante puentes disulfuro en una región conocida como, región de la bisagra [Kindt, 2007]. Las CL pueden ser de isotipo lambda (λ) o kappa (κ), y las CP pueden ser de isotipo gamma (γ), delta (δ), alfa (α), mu (μ) o épsilon (ϵ). [Suárez, 2020] denominados IgG, IgD, IgA, IgM e IgE respectivamente. Además, algunas Ig's también se pueden dividir en subclases como la IgA (IgA1 e IgA2) e IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). [Mamani, 2011]

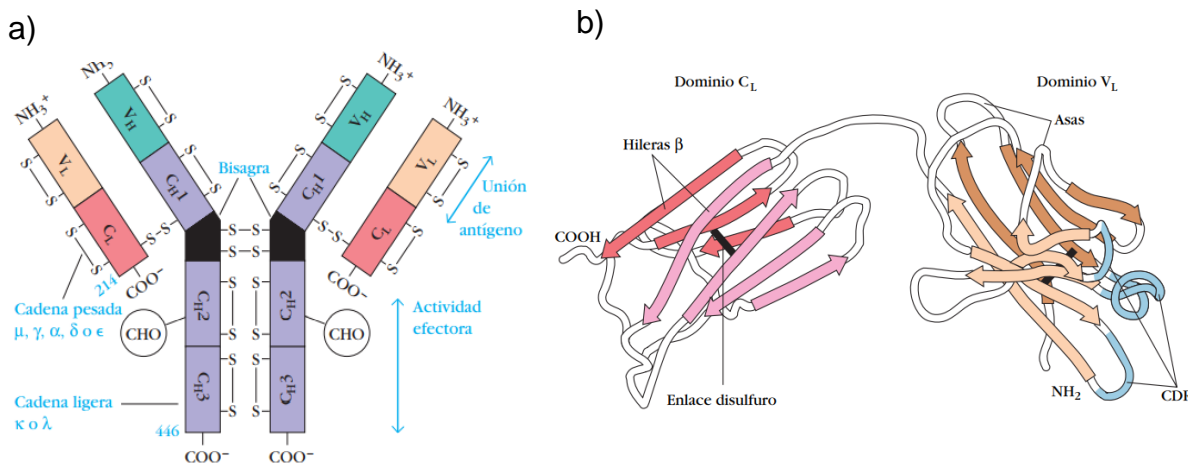


Figura 1. Estructura general de un anticuerpo. a) Estructura completa del anticuerpo; b) estructura secundaria del anticuerpo (dominios tipo inmunoglobulinas) [Kindt, 2007]

Por otro lado, las Ig's presentan dos fragmentos idénticos conocidos como Fab (fragmento de unión al antígeno; por sus siglas en inglés [*Fragment Antigen-Binding*]) que son los que reconocen al antígeno, y un fragmento que posee la propiedad de ser cristizable denominado Fc (fracción cristizable). Además, la presencia de los puentes disulfuro internos en las cadenas, da como resultado la obtención de dominios proteicos globulares tipo inmunoglobulina, característico de todos los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas [Bermúdez, 2019], compuestos de láminas β antiparalelas conservadas genéticamente (Fig. 1b). Por otra parte, existe una región hipervariable que

se genera por distintos procesos como la recombinación somática, el cambio de isotipo y la hipermutación somática denominada región o dominio variable, siendo está la que permite la unión al antígeno [Torres, 2020].

Debido a su capacidad de unión a antígenos específicos, los Ac's se han utilizado principalmente en el área diagnóstica, pronóstico y seguimiento, para la mayoría de las enfermedades, y en las últimas décadas, también se han utilizado para fines terapéuticos. Actualmente, se cuenta con una variedad de sistemas para su producción de forma recombinante, que van desde bacterias, levaduras, hongos filamentosos, líneas celulares de insectos o mamíferos, bacteriófagos, plantas y animales transgénicos. [Frenzel, 2013]. Gracias a este desarrollo se pueden obtener una gran cantidad de anticuerpos recombinantes con secuencias humanas, constituyéndose uno de los mayores avances en la medicina y siendo un principal componente de la industria farmacéutica [Langjahr, 2016]. Por ello que, el presente trabajo, pretende elucidar la generación, el desarrollo y avance científico en la utilidad de estos anticuerpos.

2. Justificación:

El proceso evolutivo y la aparición de nuevas variantes de diversos patógenos, así como la progresión de distintas enfermedades ha llevado a la medicina a una constante investigación y desarrollo de nuevas formas de diagnóstico y tratamiento, con el objetivo de fortalecer los servicios de salud. Bajo esta premisa, la investigación de tecnologías recombinantes surge como una respuesta al tratamiento de pacientes con diagnósticos poco favorables [Flores, 2019]. Actualmente los medicamentos biotecnológicos muestran un papel importante en el tratamiento de diferentes enfermedades, presentando ventajas respecto a los tratamientos convencionales (fármacos químicos) como la enorme disponibilidad y excelente perfil de seguridad [Ruiz, 2011]. Por estas razones, el presente trabajo analiza las diferentes metodologías en el desarrollo y aplicaciones de la tecnología de anticuerpos recombinantes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general:

Hacer una revisión sistemática del desarrollo y aplicaciones de medicamentos biológicos con tecnología de anticuerpos recombinantes.

3.2 Objetivos específicos:

- 1-. Realizar una búsqueda sistemática en bases de datos mediante palabras clave como: anticuerpos (recombinantes, monoclonales, policlonales, humanizados, quiméricos)
- 2-. Describir las características específicas de los anticuerpos recombinantes
- 3-. Analizar el desarrollo de medicamentos biológicos con tecnología recombinante para usos terapéuticos
- 4-. Describir el uso de tecnología de anticuerpos recombinantes en el tratamiento de enfermedades y otras posibles aplicaciones

4. Metodología:

Realizar una búsqueda sistemática de medicamentos que utilizan tecnología de anticuerpos recombinantes, en bases de datos como: *Scielo*, *Redalyc*, *Scopus*, *PubMed*, *Medline*, *ScienceDirect*, utilizando palabras clave como: anticuerpos (monoclonales, policlonales, humanizados, quiméricos, recombinantes). Se excluirán artículos que hayan sido publicados antes del año 2007 con el fin de presentar una información más actualizada

5. Resultados

5.1 Tipos de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales fueron desarrollados en 1975 por César Milstein y Georges Köhler en el Laboratorio de Biología Molecular de Cambridge (Reino Unido). Según su origen, los anticuerpos monoclonales (mAb's; del inglés *monoclonal antibodies*) se pueden clasificar y distinguir principalmente por su composición y antigenicidad como: murino, quimérico, humanizado y completamente humano (Fig. 2), cada uno con características en particular.

Anticuerpos murinos: son anticuerpos 100% de origen murino. Se pueden utilizar en terapia humana, sin embargo, han demostrado una baja eficacia en terapias prolongadas y a múltiples dosis en pacientes inmunocompetentes, debido a que pueden generar una respuesta inmune contra los mismos o una respuesta alérgica HAMA (*del inglés human anti-mouse antibody*); provocando su rápida eliminación en circulación e incrementando la posibilidad de sufrir anafilaxia [Langjahr, 2016]. El primer mAb terapéutico aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés) fue el muromonab-CD3 (*Orthoclone OKT3*) en 1986. Siendo este, un anti-CD3 (dirigido contra linfocitos T) funcionando como un inmunosupresor para el tratamiento al rechazo agudo en trasplante [Lu, 2020]

Anticuerpos quiméricos: son desarrollados combinando secuencias de la región variable murina (o de otra especie) con la región constante humana, conservando la especificidad y disminuyendo la inmunogenicidad. Sin embargo, pueden generar anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA; del inglés *human antichimeric antibodies*) en aproximadamente el 40% de los pacientes que se les administra estos Ac's [Santos, 2018]. El primer anticuerpo quimérico aprobado por la FDA, fue el abciximab (anti-GPIIb/IIIa) en 1994 y se utilizó para la inhibición de la agregación plaquetaria en enfermedades cardiovasculares.

Anticuerpos humanizados: en éstos, sólo los CDR (*del inglés, complementarity determining region*) de las CP y CL son de alguna especie distinta a la humana y el resto son secuencias humanas, siendo desarrollada por Gregory P. Winter en 1986 [Lu, 2020]. Con esta modificación, se disminuye en gran medida la inmunogenicidad de los mismos, ya que la respuesta a estos anticuerpos representa sólo un 9%. El primer mAb humanizado utilizado para tratamiento fue el daclizumab (anti-receptor de IL2) indicado para prevenir el rechazo al trasplante y fue aprobado por la FDA en 1997 [Santos, 2018].

Anticuerpos humanos: son totalmente humanos, ya que presentan el 100% de secuencias humanas [Langjahr, 2016]. Siendo el primer anticuerpo terapéutico el adalimumab, un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral α (TNF α) aprobado en 2002 por la FDA para el tratamiento de la artritis reumatoide. Inicialmente, su producción se dificultó debido a que no se lograba una línea celular estable, además de que, había preocupaciones sobre la inmunización humana. Sin embargo, con el desarrollo de nuevos métodos se ha logrado reducir considerablemente este inconveniente [Foltz, 2013].

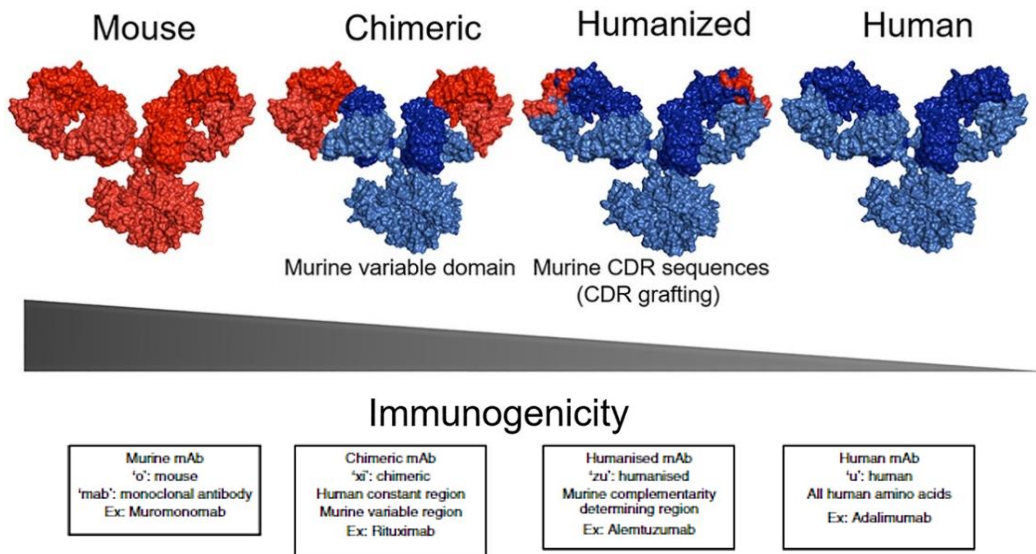


Figura 2. Tipos de anticuerpos e inmunogenicidad de los mismos [Santos, 2018]

De manera que con las técnicas para la humanización de anticuerpos se posibilitó el uso clínico de una nueva clase de biológicos dirigidos a otras enfermedades complejas (enfermedades autoinmunes y tumores), las cuales, requieren de tratamientos a largo plazo y dosis repetidas de los fármacos [Santos, 2018].

5.2 Generación de Anticuerpos Monoclonales

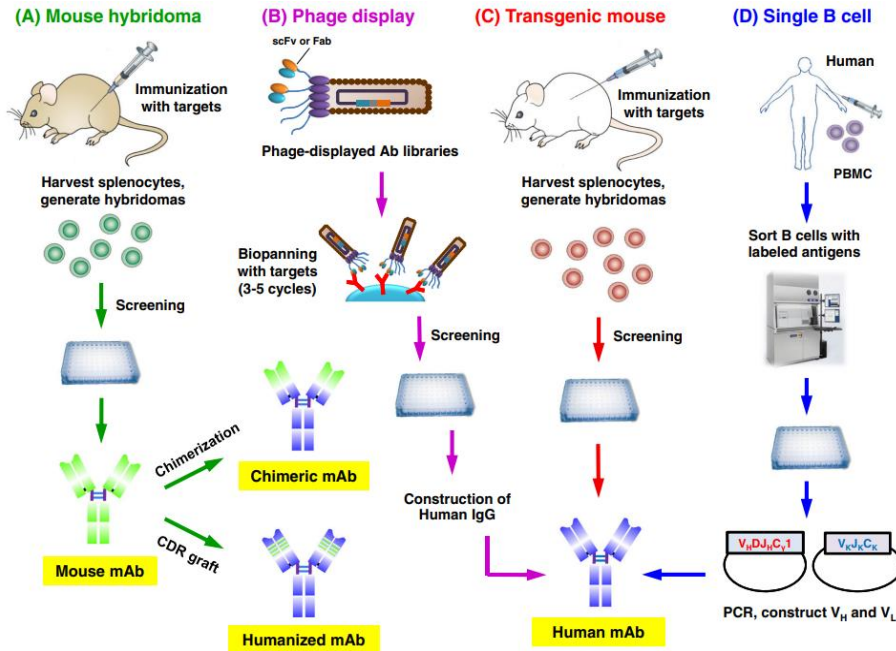


Figura 3. Generación de anticuerpos monoclonales por medio de distintos métodos. A) Tecnología de hibridomas B) *Phage display* C) Transgénicos D) *Single B cell* [Lu, 2020]

5.2.1 Hibridomas

La primera tecnología para la generación de mAb's fue los hibridomas, (Fig. 3A) desarrollados por Milstein y Köhler, donde se fusionan células de mieloma de ratón y células B esplénicas de otro ratón hiperinmunizado con el antígeno de interés [Foltz, 2013]. Sin embargo, actualmente se puede realizar esta técnica utilizando varias especies de animales como, por ejemplo, el conejo, la rata o la oveja [Hanack, 2016], realizando el siguiente procedimiento:

1. Inmunización del animal con el antígeno de interés
2. Obtención de células B esplénicas del animal inmunizado y obtención de células de mieloma
3. Fusión de las células B esplénicas con las células del mieloma
4. Identificación y selección de los hibridomas específicos
5. Proliferación de hibridomas específicos
6. Producción y Purificación de los anticuerpos monoclonales

5.2.1.1 Inmunización del animal con el antígeno de interés

Dependiendo de la especie animal a inmunizar y de las características del antígeno, se selecciona la vía de administración, las cuales pueden ser, vía oral, nasal, intramuscular, intravenosa, intracardiaca, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, etc. Originalmente, la inmunización se realizaba por vía intravenosa, pero es limitada, ya que no se daba una adecuada estimulación inmune, por ello, esta vía no es la más conveniente para la producción de los anticuerpos. [Lobato, 2009]. Por lo que, para mejorar la respuesta inmune, el antígeno se aplica a menudo con adyuvantes, que permiten amplificar la respuesta inmune, haciendo que el sistema inmune reacciona de manera rápida y eficaz, proporcionando una respuesta específica, con tiempos de inmunización que varían entre 4 y 12 semanas con varios refuerzos para mejorar la memoria inmunológica que conducen a la producción de anticuerpos específicos de alta afinidad. [Hanack, 2016].

5.2.1.2 Obtención de células B esplénicas del animal inmunizado y obtención de células de mieloma

Al cabo de unos días de la inmunización, se analizan los sueros de los animales inmunizados para detectar la presencia de anticuerpos específicos mediante un inmunoensayo indirecto ligado a enzimas (ELISA; por sus siglas en inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Para el ELISA (Fig. 4), se hacen varias diluciones del suero para encontrar la cantidad mínima de anticuerpo específico que reacciona contra el antígeno. Una señal positiva a una dilución de 1:5000 es suficiente para comenzar con la producción de anticuerpos monoclonales [Hanack, 2016]. Después, las células B (células sintetizadoras de anticuerpos) son extraídas del bazo del animal hiperinmunizado. Por otro lado, las células de mieloma son células derivadas de un linfoma de células B que no secretan inmunoglobulinas, se proliferan para obtener gran cantidad y poder realizar la fusión [Zhang, 2017]. Siendo las líneas de mieloma más utilizadas las X63-Ag 8.653 y Sp2/0-Ag 14 de la cepa de ratón BALB/c. [Medina, 2021]

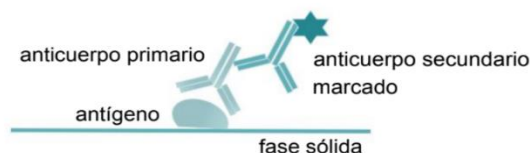


Figura 4. ELISA indirecto, técnica de detección para los anticuerpos de interés, en ella se coloca el antígeno con el que se inmunizó el ratón en una fase sólida y posteriormente se incuba con el suero de los animales inmunizados (anticuerpo primario) y se revela con un anticuerpo anti-Fc marcado con una enzima (anticuerpo secundario) [Hanack, 2016]

5.2.1.3 Fusión de las células B esplénicas con las células del mieloma

Una vez obtenidas las células B esplénicas y las células de mieloma, se hace la fusión de las mismas (Fig. 9). Para ello, existen varios métodos, el primero fue utilizando el virus

hemaglutinante de Japón (virus Sendai) pero se dejó de usar debido a su alta toxicidad [González, 2011]. Actualmente, se utilizan las siguientes metodologías:

5.2.1.3.1 Métodos de fusión:

a) Tecnología convencional (polietilenglicol)

La técnica más utilizada para la hibridación es con polietilenglicol (PEG), la cual, es un desestabilizador de membranas [Medina, 2021]. El protocolo es simple, pero es poco eficiente debido a la baja selectividad por falta de control de la fusión celular. Por consecuencia, se necesita más tiempo para realizarlo y para aislar los hibridomas. El punto de esta técnica es que la concentración de PEG debe ser lo suficientemente baja para no provocar una fusión celular inespecífica (Fig.5)

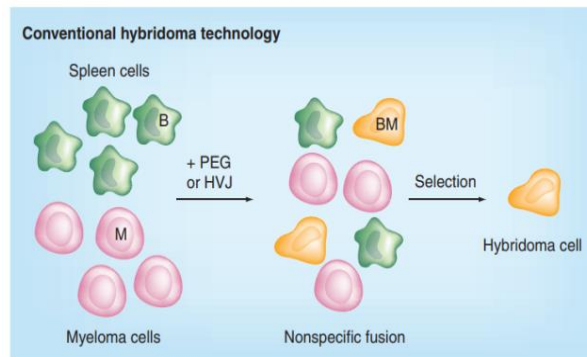


Figura 5. Método convencional, uso de polietilenglicol para la fusión de membranas entre los linfocitos B y las células de mieloma. B: linfocito B, M: célula de mieloma PEG: polietilenglicol, BM: Hibridoma [Tomita, 2011]

b) Fusión por formación de cadenas de perlas

En este método las células de mieloma y las células del bazo, forman una monocapa en las superficies de los electrodos cuando se aplica pulsos eléctricos y las células se fusionan generando así los hibridomas (Fig. 6). Este método aumenta la eficiencia de la fusión, pero también puede producir fusiones inespecíficas. Por ello, es imposible controlar la fusión de células únicas [Tomita, 2011]

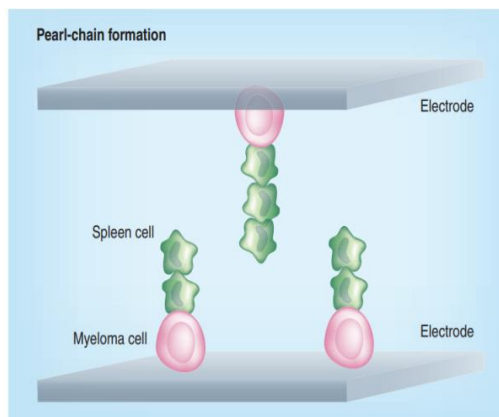


Figura 6. Fusión mediante perlas. Formación de monocapas y fusión por pulsos eléctricos [Tomita, 2011]

c) Radiación láser

Este procedimiento se realiza bajo un microscopio en donde un láser de atrapamiento hace que se transfiera un linfocito B hacia una célula de mieloma para que entren en contacto, posteriormente se irradia un rayo láser en la superficie de contacto de las dos células para lograr la fusión (Fig. 7). Sin embargo, se requiere de mucho tiempo para su realización ya que existen al menos 10^6 células de linfocitos B sensibilizados en un bazo de un ratón inmunizado. También es imposible discernir las células B específicas para la fusión con células de mieloma [Tomita, 2011]

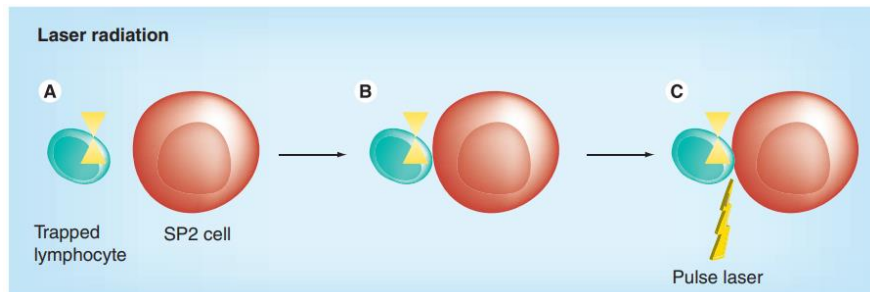


Figura 7. Radiación láser. Atrapamiento de una célula para que interacción con la célula del mieloma y la siguiente fusión con un láser desestabilizador de membranas [Tomita, 2011]

Este método junto con cadenas de perlas tiene ciertas ventajas sobre el método convencional con respecto a la frecuencia de fusión, pero aún no se logran controlar la fusión selectiva de un linfocito B específico con una célula de mieloma para generar únicamente células de hibridoma que secretan los anticuerpos deseados.

d) Focalización de células (BCT; tecnología de hibridomas dirigida a células B)

En este método lo primero que se hace es, la preselección del linfocito B sensibilizado con antígenos (el cual tiene receptores de inmunoglobulina). En segundo lugar, los linfocitos B seleccionados se ponen en contacto con las células de mieloma mediante una unión fuerte y específica, utilizando como puente la interacción biotina-avidina. Finalmente, los complejos de linfocitos B-células de mieloma se fusionan selectivamente mediante pulsos eléctricos (Fig. 8). Siendo estos pasos críticos para generar la producción selectiva de hibridomas contra los antígenos de interés. [Tomita, 2011]

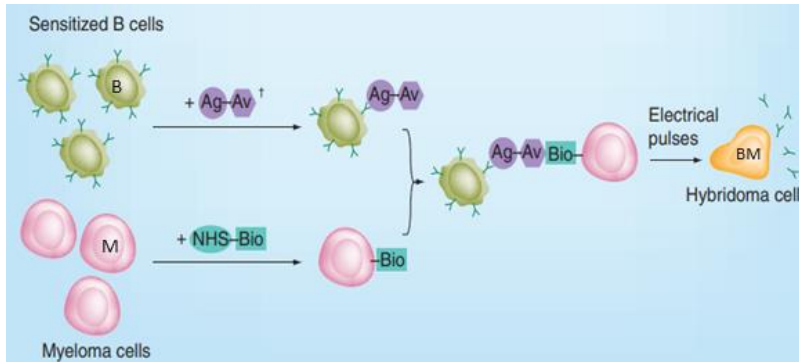


Figura 8. Tecnología de hibridomas dirigida a células B Interacción fuerte entre la biotina y la avidina para la posterior fusión entre linfocito B sensibilizado y la célula de mieloma B: linfocito B, M: célula de mieloma, BM: Hibridoma Ag: antígeno Av avidina Bio: biotina NHS: N-hidroxisuccinimida [Tomita, 2011]

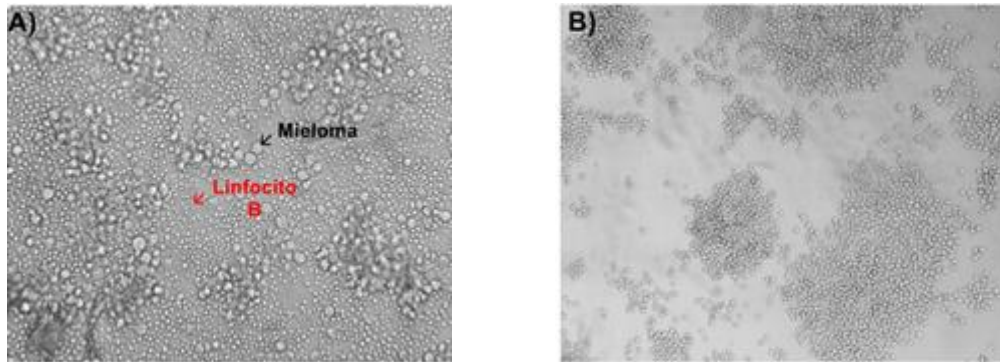


Figura 9. Células en proceso de fusión (imágenes reales) A) células de mieloma y linfocitos B. B) hibridomas en crecimiento [Medina, 2021]

5.2.1.4 Identificación y selección de los hibridomas específicos

Al momento de la fusión se pueden producir híbridos de linfocito B-mieloma, híbridos de dos células de mieloma o de dos linfocitos B. Es por esta razón que se someten a un proceso de selección, basado en la

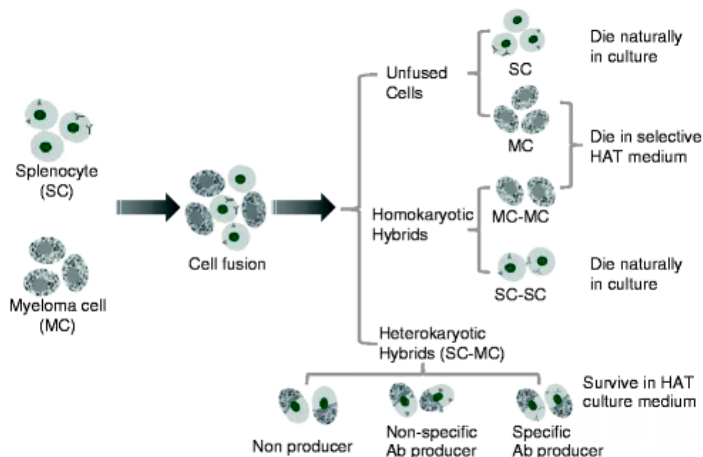


Figura 10. Selección de hibridomas con medio HAT [Zhang, 2012]

proceso de selección, basado en la deficiencia de hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT) y en algunos casos de timidina cinasa (TK) que son enzimas implicadas en la síntesis de ADN (Fig.10) en células de mieloma [Hanack, 2016]. Estas características inhabilitan a los mielomas para utilizar la vía alterna en la síntesis del ADN. Al cultivar las células fusionadas y adicionar el medio suplementado con HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina), solamente aquellos híbridos linfocito B-mieloma podrán

sobrevivir debido a que tendrán las enzimas HGPRT y TK aportadas por la célula B, que permitirán la síntesis de ADN por la vía alterna, ya que la aminopterina bloquea la síntesis de ADN de *novo*. [Medina, 2021]. Mientras que, la fusión de dos células B no ocasionan problema, debido a su vida media corta (aproximadamente 7 días).

Después de 14 días, el medio HAT se cambia con medio de cultivo nuevo y se identifican las clonas de hibridoma resultantes, siendo esto un paso laborioso, debido al resultado múltiple de diferentes clonas. Por lo que es necesario hacer semanalmente un tamizado de crecimiento y de producción hasta identificar y estabilizar a las mejores clonas productoras de anticuerpos.

5.2.1.5 Proliferación de hibridomas específicos

Una vez obtenidas las células de hibridoma, se siembran placas de 96 pozos y después de un crecimiento de 10 a 15 días [Hanack, 2016] los sobrenadantes de los cultivos se analizan por ELISA para detectar anticuerpos específicos; si el resultado es positivo, se procede a realizar la proliferación celular [Medina, 2021]. Para ello, se pueden utilizar distintos métodos de identificación y selección de la clona de interés:

1.2.1.5.1 Identificación y selección del clon de interés

5.2.1.5.1.1 Método estándar: Dilución limitante

Una vez que los resultados de la ELISA dan positivo, las células en los pozos se resuspenden, se diluyen y se transfieren en placas de 96 pozos, colocando una célula por pozo y se incuban durante 7 a 10 días y los sobrenadantes de los cultivos se analizan de nuevo con ELISA y si da resultados positivos, se repite el proceso de dilución limitada una o dos veces más para asegurar la monoclonalidad. Este método es laborioso y consume bastante tiempo, además de que las células productoras de anticuerpos específicos se pueden perder en el proceso. [Hanack, 2016].

5.2.1.5.1.2 Otros métodos

a) Análisis y procesamiento mediante láser (LEAP)

La tecnología LEAP, permite la destrucción de células de hibridoma no productoras de anticuerpos. Para esto, los hibridomas se cultivan en una matriz de captura en donde los anticuerpos secretados quedan atrapados en dicha matriz, después se cuantifican con un antígeno marcado con fluorescencia, se toman imágenes del cultivo y se identifica a los hibridomas que producen a los anticuerpos de interés, posteriormente, se eliminan por una serie de pulsos láser los hibridomas que no producen el anticuerpo de interés. Con esta metodología se ha encontrado un aumento en la productividad de 5 a 20 veces más, así como disminución significativa del nivel de heterogeneidad dentro de las líneas seleccionadas. [Hanack, 2016].

b) ClonePix FL

En esta tecnología, los hibridomas se cultivan en placas con medio semisólido que contiene anticuerpos o antígenos de captura marcados con fluorescencia, y el *ClonePix FL* permiten detectar las clonas secretoras de anticuerpo específico, así como, aquellas clonas que son las mejores en función de su forma, tamaño e intensidad de la fluorescencia. Después de la identificación, las selecciona y las coloca en placas de 96 pozos. Con este método se logra una identificación y aislamiento de un gran número de clonas en poco tiempo.

c) Conjugados con toxina-antígeno

Para este método, una vez que termina la selección por el medio HAT, se le agrega directamente al medio el antígeno de interés el cual está conjugado a una toxina. Este conjugado induce la muerte en todas las células de los hibridomas que no produzcan los anticuerpos específicos contra el antígeno de interés. Si el anticuerpo es específico la toxina se neutraliza, es decir, ya no será tóxica para la célula. El uso de este método evita los procedimientos de selección y clonación, lo que permite una generación mucho más rápida, fácil y económica de anticuerpos monoclonales [Messerschmidt, 2013]

Una vez seleccionadas las clonas, se procede a realizar una ELISA para corroborar la producción de anticuerpos específicos. Por otro lado, es necesario la isotipificación que es la caracterización de las inmunoglobulinas en términos de su isotipo, empleando anticuerpos anti-isotipos, posteriormente, los hibridomas se pueden criopreservar hasta su uso en nitrógeno líquido con suero de bovino fetal y 10% de dimetilsulfóxido [Amin, 2015; Foltz, 2013]

5.2.1.6 Producción y Purificación de los anticuerpos monoclonales

Aquellos hibridomas que resulten relevantes pueden ser proliferados masivamente *in vivo* o *in vitro* para obtener grandes cantidades de cada anticuerpo. La producción de anticuerpos monoclonales *in vivo* se basa, en que los hibridomas se inoculan por vía intraperitoneal en ratones generando tumores productivos. Al cabo de algunas semanas post-inoculación, los ratones muestran un abdomen voluminoso debido a que se le desarrollaron tumores y una gran cantidad de líquido de ascitis, el cual es rico en anticuerpos con la especificidad deseada. Una desventaja al hacer la producción *in vivo* es que, presenta contaminantes propios de la cavidad peritoneal del ratón. Además, el procedimiento *in vivo* no es aceptado en todos los países, es por eso que, también se pueden producir anticuerpos *in vitro* mediante la fermentación de cultivos de células de mamífero utilizando biorreactores y sistemas de cultivo de perfusión continua. [García, 2011]

La purificación del anticuerpo monoclonal a partir del líquido de ascitis se realiza por cromatografía de afinidad utilizando columnas de proteína A o G acoplados a sefaroza

(dependiendo de la subclase de IgG) o *HiTrap* (columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte para la purificación de proteínas a pequeña escala y alta resolución) [Medina, 2021; VWR, 2023]

Para determinar la concentración de proteínas totales es necesario utilizar algún método de cuantificación de proteínas [Amin, 2015]. Posteriormente, se puede realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida para verificar la pureza y después realizar algunas técnicas analíticas como *Dot Blot*, *Western Blot* o ELISA para comprobar una vez más su actividad biológica [Medina, 2021].

Por otro lado, el animal más utilizado es el ratón, pero, tiene un sistema limitado, ya que su bazo es pequeño. Normalmente se utilizan ratones endogámicos (que se aparean entre animales de la misma familia) lo que ofrece una menor diversidad de la respuesta inmune. Es por eso que, los investigadores han buscado más opciones como modelo animal, uno de ellos es el conejo, ya que tiene varias ventajas sobre otros animales: tiene un bazo más grande (contiene hasta 50 veces más linfocitos que el bazo del ratón), su repertorio es más amplio, la estructura de la Ig es más simple y su sistema inmune es robusto, lo que permite generar anticuerpos con mayor afinidad y especificidad. Además, es útil cuando se utilizan antígenos con inmunogenicidad débil. Además, ya se desarrolló una línea celular estable que permite la fusión para la generación de hibridomas de conejo (240E-W), lo que hace posible generar una gran cantidad de anticuerpos monoclonales (RabMAb). [Feng, 2011]

5.3 Quimerización

Debido a que, al inicio del desarrollo de los anticuerpos monoclonales fueron de origen murino, se llevó a cabo la quimerización de éstos, la cual fue desarrollada por Morrison y Boulliane a mediados de los años 80, reduciendo así la inmunogenicidad y potenciando las funciones efectoras del anticuerpo, manteniendo la especificidad y afinidad del mAb original. En ella se obtienen los genes de las regiones variables de la CL Y CP del hibridoma y se insertan en vectores de expresión que contienen los genes de las regiones constantes de la CP o CL humana, posteriormente son transfectados a líneas celulares de mamíferos para la producción y purificación del anticuerpo quimérico [Álvarez, 2013].

5.4 Humanización

Uno de los problemas de los anticuerpos quiméricos es que aún contienen la región variable del anticuerpo del animal donde se desarrolló, y estas regiones normalmente son inmunogénicas y desencadenan la respuesta HACA. Por ello para reducir más esta respuesta, se desarrolló una técnica denominada injerto de CDR's [Foltz, 2013], donde sólo se trasplantan las CDR's no humanas, entre las FR's (*framework regions*, por sus siglas en inglés) del dominio variable humano, generando un dominio híbrido animal-humano [Álvarez, 2013]. De este modo, sólo son murinas las regiones hipervariables de las CL y CP [Torres, 2020], permitiendo que el anticuerpo mantenga la actividad de unión al antígeno blanco (Fig.11) [Lu, 2020]

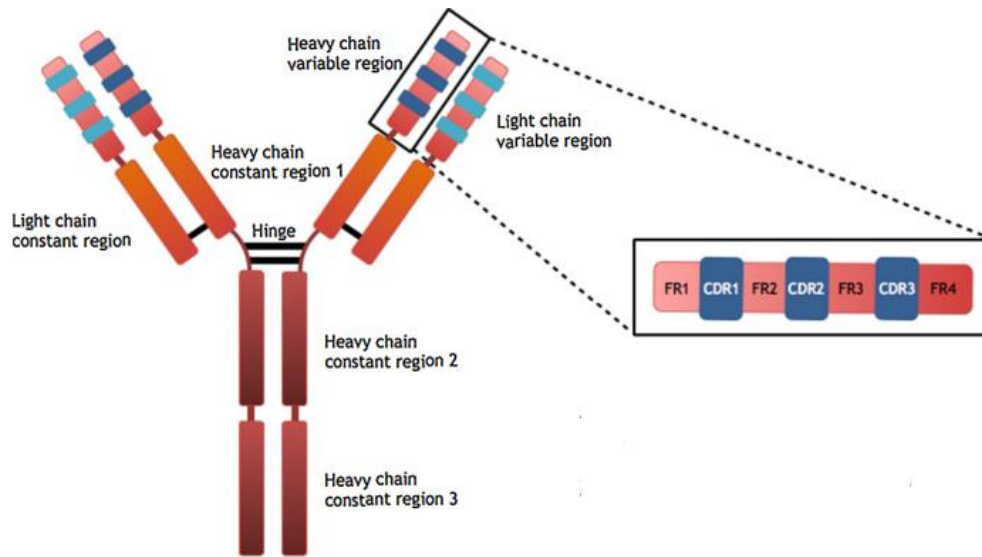


Figura 11. Alternancia de las CDR's no humanas (azul) y las FR's (rojas) dentro de las regiones variables de la CP y la CL del anticuerpo [Cappelletti, 2015]

No obstante, este proceso tiene algunas desventajas, ya que con frecuencia pueden conducir a una pérdida en la afinidad y/o cambio de la especificidad del anticuerpo, debido a la mala elección de las secuencias de CDR's, así como también de los FR's utilizados para el injerto y la identificación errónea de residuos estructurales correspondientes de diferentes especies. Para un buen diseño de estos anticuerpos las técnicas requieren una identificación precisa de las secuencias que se unirán, basándose en las secuencias y composición del antígeno [Dondelinger, 2018]. Actualmente se ha desarrollado un método computacional llamado *OptCDR* (Regiones determinantes de la complementariedad óptima). Este consiste en una selección de la combinación de estructuras canónicas de las CDR's (solo cadenas principales), luego se elige secuencias de aminoácidos para cada posición en las CDR's usando bibliotecas de rotámeros (posibles conformaciones de los CDR's) y se realizan miles de interacciones para refinar simultáneamente las estructuras principales y las secuencias de aminoácidos de las CDR's, generando bibliotecas de mutaciones más favorables para las CDR's [Tiller, 2015; Pantazes, 2010]. Otro método es la humanización guiada por linaje mutacional (MLG) para humanizar RabMAb mucho más fácilmente. La humanización por MLG es conceptual y técnicamente diferente del método de injerto CDR, porque se necesita un panel de anticuerpos bioactivos para la humanización en MLG, que es una ventaja de RabMAbs. [Feng, 2011].

Si bien, las técnicas de quimerización y humanización no son suficientes para mejorar la respuesta inmune, disminuyen en gran medida la inmunogenicidad, pero se han observado respuestas HAHA (del inglés; *human anti-humanized antibodies*) y en ocasiones hay disminución de la afinidad de la interacción Ag-Ac [Álvarez, 2013]. Por consiguiente, se han desarrollado otros métodos para la generación de anticuerpos monoclonales (Fig. 3B, 3C, 3D) como:

5.2.2 Phage display (expresión en fagos filamentosos)

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan y que pueden o no lisar bacterias (dependiendo si son líticos o lisogénicos, respectivamente) de manera específica, están compuestos de proteínas en su cápside y de material genético. Su genoma puede componerse de ADN o ARN. La estructura de los fagos, es determinada por sus proteínas de envoltura cuya función principal es proteger su material genético [Segundo, 2010]. Por ello, se pueden utilizar para la expresión de proteínas externas en su cápside. Utilizando esta propiedad se pueden generar anticuerpos mediante la técnica de *Phage display* desarrollada por George P. Smith en 1985.

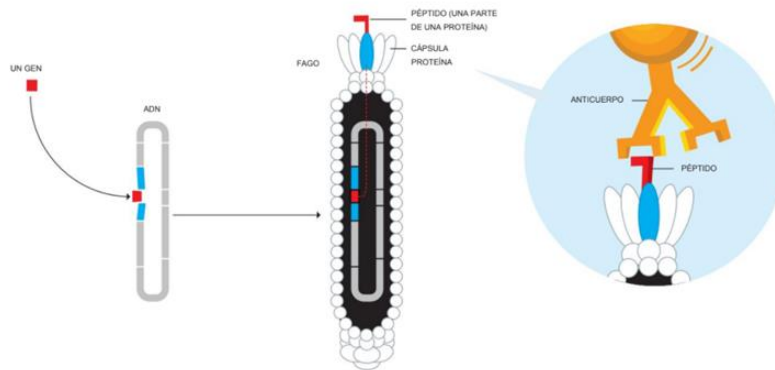


Figura 12. *Phage display*. En ella se inserta un gen dentro del genoma de fago, para posteriormente expresarse en la cápside del mismo (fenotipo y genotipo físicamente vinculados) en el caso de anticuerpos se expresan los scFv (fragmentos variables de cadena sencilla). [RACS, 2018]

Esta tecnología se logra con base a la copia genética de fragmentos de inmunoglobulina (fragmentos variables) y al uso de técnicas de biología molecular para diversificar *in vitro* los paratopos de los anticuerpos [Zhang, 2017]. Consiste en que el ADN que codifica para una proteína específica se empaqueta dentro de tal manera que la proteína se exprese en su cápside [RACS, 2018]. Dicho de otra manera, el fenotipo y el genotipo del fago están físicamente vinculados, debido a que el gen que codifica la proteína a expresar se empaqueta dentro del mismo virión como un ADN externo y los péptidos o proteínas mostrados se expresan en fusión con la proteína de la cápside del fago (Fig. 12). Este enlace genotipo-fenotipo asegura que se obtendrán partículas de fago idénticas del mismo clon [Bazan, 2012; Adams, 2014], permitiendo la creación de bibliotecas que contienen hasta 10^{11} variantes. [Lu, 2020]. Los normalmente usados para esta técnica son fagos filamentosos (f1, fd, M13) y la mayoría de los anticuerpos o péptidos se expresan en las proteínas pIII o pVIII del fago. La primera se encuentra en la punta del fago con 3 a 5 copias y la segunda, es la proteína principal de la cubierta del fago y se produce casi en 3000 copias, por lo que se utiliza para mejorar la señal de detección cuando el anticuerpo presentado en el fago se asocia con el antígeno [Bazan, 2012].

5.2.2.1 Principio de *biopanning* o selección del fago

Se basa en ciclos repetidos de incubación, lavado, amplificación y selección del fago. La molécula blanco se inmoviliza en un soporte sólido ya sea en placas de microtitulación, membranas de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*, por sus siglas en inglés), matriz de columna o inmuntubos, perlas magnéticas e incluso en células enteras [Bazan, 2012], posteriormente la biblioteca de fagos se incuba un periodo de tiempo en el soporte sólido, luego se hacen múltiples lavados para eliminar los fagos no unidos, enseguida se eluyen a pH bajos los fagos unidos a sus péptidos blanco, se neutralizan y se usan para infectar *E. coli* y obtener una biblioteca enriquecida (amplificada). Estos pasos se vuelven a repetir de 3 hasta 5 veces y así lograr la actividad de unión deseada (*biopanning*) (Fig. 13). Esta técnica permite obtener anticuerpos con mayor afinidad y producir nuevas combinaciones de variables pesadas y variables ligeras no presentes en los ratones inmunizados. [RACS, 2018] En la actualidad la tecnología de expresión de *phage display* representa una importante alternativa del desarrollo de anticuerpos para el campo diagnóstico e investigación, ya que permite diseñar y seleccionar *in vitro*, péptidos y/o proteínas de interés [Hernández, 2007]

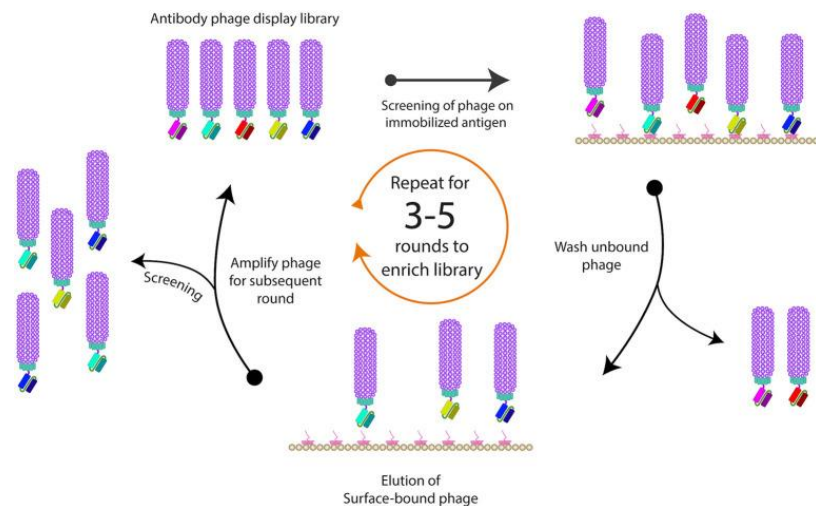


Figura 13. *Biopanning*. Se realiza entre 3 a 5 rondas de selección del fago de interés, para enriquecer la cantidad de fago con el scFv específico al antígeno [Alfaleh, 2020]

Pero, esta técnica tiene algunos inconvenientes, como la solubilidad, pureza, estabilidad del anticuerpo cuando se expresa de forma soluble (no unido al fago), otro es el método de selección donde también se observan los problemas anteriores, pero en el antígeno [Rosano, 2014]. Por ello, es necesario modificar el procedimiento para una mejor selección de afinidad contra el antígeno, al cual se le denomina método “*Yin-yang*” (Fig. 14). El cual es un método que utiliza la selección negativa y positiva, donde la primera tiene como objetivo eliminar los aglutinantes no deseados y la segunda permite la selección de los aglutinantes específicos, lo que permite que las clonas de fagos

restantes seleccionen anticuerpos que tengan afinidad hacia epítopos específicos. [Foltz, 2013; Woo, 2019]

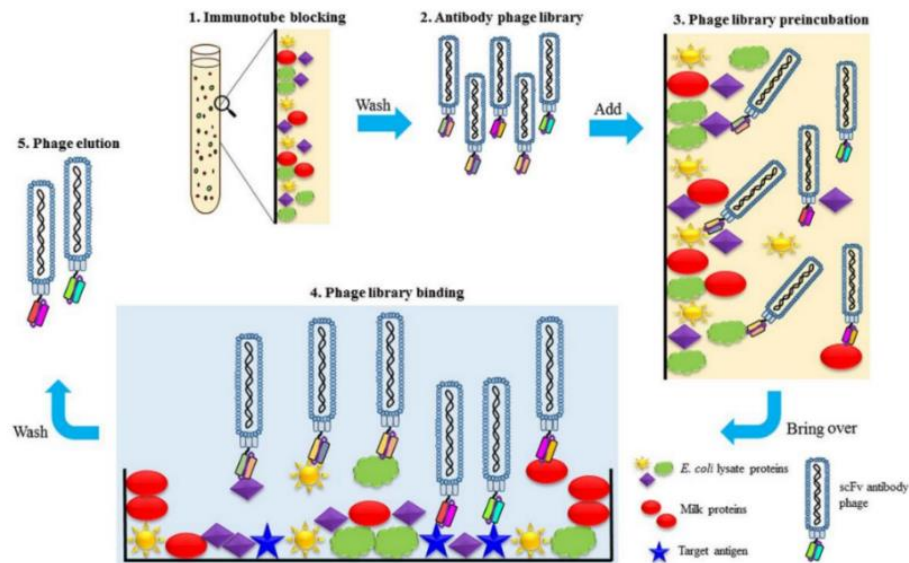


Figura 14. *Ying-Yang*. 1) Bloqueo de la superficie sólida con lisados de *E. coli*; 2) Adición de la biblioteca de fagos; 3) Pre-Incubación; 4) Incubar los fagos pre-incubados con el antígeno; 5) Lavar y eluir los fagos con enzimas (tripsina) [Woo, 2019]

5.2.3 Transgénicos

Por medio de la tecnología *knock out* (desactivación de la expresión génica), se puede anular la capacidad de un ratón de reordenar los *loci* de CP Y CL de la línea germinal. Estos ratones no pueden producir células B y por lo tanto tampoco Ig's. Sin embargo, la capacidad de producir células B y anticuerpos puede restablecerse mediante la introducción de *loci* funcionales para Ig's de la línea germinal murina. [Langjahr, 2016; Kindt, 2007]

Debido a que los *loci* Ig de la línea germinal humana completos son secuencias largas de ADN, sólo pueden introducirse segmentos parciales de los mismos y en consecuencia no todos los elementos de estos podrán expresarse.

Para resolver este problema, Isao Ishida y sus colaboradores generaron un cromosoma humano artificial (HAC) que porta los *loci* humanos completos de las CP y CL, el cual se introduce en células madre embrionarias derivadas de ratones *knock out*. Las células embrionarias modificadas se inyectan en blastocitos y se transfirieren a ratones madre

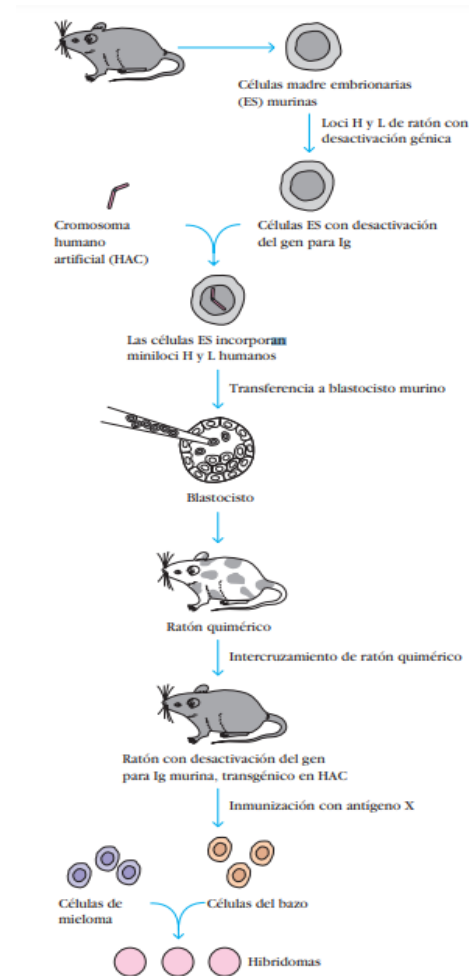


Figura 15. Generación de anticuerpos humanos en ratones transgénicos. Inserción de secuencias de CP y CL en ratones, usando cromosomas artificiales humanos [Kindt, 2007]

sustitutas, lo que permite generar ratones quiméricos. Después se hace un entrecruzamiento de ratones quiméricos y se inmunizan con el antígeno de interés para producir solamente anticuerpos con secuencias humanas. Una vez inmunizado el ratón transgénico con el HAC, se lleva a cabo la tecnología de hibridoma, para obtener únicamente los anticuerpos de interés (Fig. 15) [Kindt, 2007].

Recientemente se han realizado mejoras significativas con la derivación de líneas transgénicas de ratas y ratones que, después de la inmunización, producen fácilmente diversos anticuerpos de alta afinidad con la misma eficiencia que los animales silvestres. Algunas líneas existentes de ratones transgénicos son: *HuMAb Mouse* o *UltiMAb Mouse*, *Xeno-Mouse*, *TransChromo Mouse* y *VelocImmune Mouse*. [Brüggemann, 2014]

Entre los mAb's derivados del *HuMAbMouse*, algunos se usan para el estudio de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, *ustekinumab* (IgG1/kappa humano) que se une a las citoquinas, especialmente a las subunidades p40 de IL-12 e IL-23, bloqueando la señalización proinflamatoria para aliviar la inflamación. Así mismo, el ratón *VelocImmune* es un ratón quimérico transgénico de segunda generación y ha producido cuatro fármacos aprobados. Cabe mencionar que los costos de las líneas de ratones transgénicos son bastante caros, por ejemplo, *AstraZeneca* pagó más de \$ 120 millones por algunas parejas reproductoras de ratones *VelocImmune* [Lu, 2020]

5.2.3.1 Plantas transgénicas

El uso de células de mamíferos modificadas con técnicas ADN recombinante tiene la ventaja de producir compuestos idénticos a los naturales, sin embargo, cultivar estas células es muy costoso y se puede realizar solamente en una escala limitada. Por lo que, una opción es la utilización de plantas transgénicas para producir proteínas con fines farmacéuticos, industriales y veterinarios, las cuales tienen muchas ventajas sobre los animales transgénicos. Por ejemplo, tienen un gran potencial productivo, son fáciles de

procesar, baratos para producir y pueden ser más seguros debido a la ausencia de patógenos que infecten las células animales y humanas. Siendo sus productos denominados planticuerpos [Rodríguez, 2013] y la mayoría de estos son expresados en el tabaco, aunque también se ha utilizado la papa, soya, alfalfa, arroz y trigo. La principal ventaja de usar hojas (como el tabaco y alfalfa) para producir los anticuerpos es el rendimiento [Gómez, 2002]

5.2.4 Célula B única (*Single B cell*)

Otra tecnología que se puede usar para la generación de anticuerpos totalmente humanos es el sistema de aislamiento de células secretoras de inmunoglobulinas (Fig. 16) [Langjahr, 2016] que permite el muestreo directo del repertorio inmune de una sola célula B, evitando el paso ineficiente de la fusión de hibridomas y mantiene el emparejamiento natural de CP y CL. Además, esta técnica tiene altos perfiles de afinidad, especificidad y estabilidad de mAb's. [Zhang, 2017]

Para la obtención de *single B cell* se siguen los siguientes pasos:

5.2.4.1 Identificación y aislamiento

Las células B únicas se pueden aislar de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o de tejidos linfoides de un individuo convaleciente o vacunado mediante micromanipulación, microdisección por captura con láser o por selección de células marcadas por fluorescencia (FACS) [Lu, 2020; Smith, 2009]

5.2.4.2 Retrotranscripción reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para células únicas

Una vez realizada la clasificación, se realiza una amplificación directa de cada CP y CL de cada célula B con RT-PCR, para obtener la mayor cantidad de secuencias [Zhang, 2017]

5.2.4.3 Clonación de células B únicas y tamizado de anticuerpos

Los genes son clonados y expresados de forma recombinante en células de mamíferos o sistemas bacterianos. En el caso de que se realice en mamíferos, la expresión de las Ig's es completa (anticuerpo normal), mientras en sistemas bacterianos (*v.g. E. coli*) se expresa como fragmentos de unión a antígenos (Fab). Por otro lado, existe un sistema para identificar de manera temprana y rápida las clonas con alta afinidad y especificidad al antígeno de interés: el sistema es un chip, el cual permite atrapar anticuerpos secretados a través de una superficie recubierta con anticuerpos contra las Ig, por lo tanto, se utiliza para identificar y recuperar células secretoras de anticuerpos específicos, además de que lo hace con un alto rendimiento (hasta 234,000 células individuales) [Jin, 2009]

5.2.4.4 Purificación

Después de la generación de mAb's se hace la purificación y evaluación de los mismos, mediante un ELISA. Las tecnologías de células B únicas han evolucionado rápidamente en los últimos años por su simplicidad y por el número pequeño de células y con una alta eficiencia en la obtención de mAb's específicos de una manera rápida [Sino Biological, 2023]. Sin embargo, estas tecnologías tienen algunos retos por superar como el marcaje de antígenos, la configuración de la selección de antígenos (v.g. monómero o dímero) y el diseño de conjuntos de cebadores, los cuales son consideraciones importantes para la generación exitosa de mAb's.

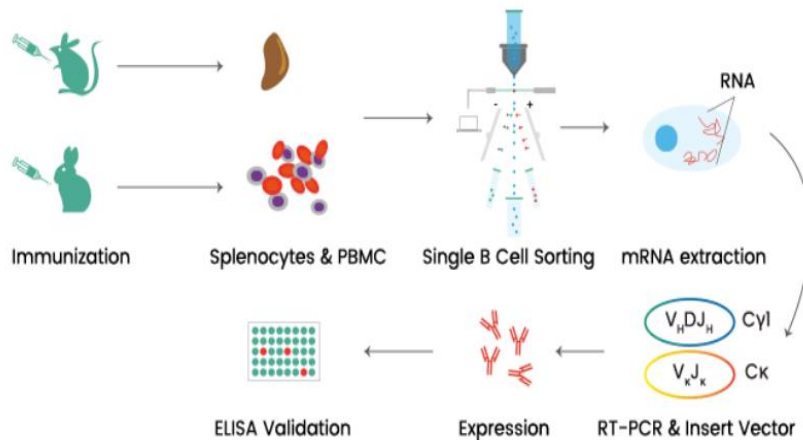


Figura 16. Generación de anticuerpos mediante la clonación de células B únicas [Sino Biological, 2023]

5.2.5 Otros métodos de generación de mAb's

5.2.5.1 Inmortalización por virus de Epstein-Barr (EBV)

Existen otros métodos para inmortalizar células B humanas, uno de ellos es mediante el uso del virus de Epstein-Barr (EBV), el cual es un virus que inmortaliza eficientemente a casi todos los linfocitos B y permite la producción de anticuerpos monoclonales humanos de los isotipos IgM, IgG, IgA e IgE específicos de cualquier individuo siempre y cuando los linfocitos se deriven de un donante que haya estado expuesto al antígeno correspondiente pero, esta limitación podría superarse si se desarrollaran sistemas *in vitro* de sensibilización específica de antígeno. Sin embargo, un problema es que, la mayoría de linfocitos B en sangre son de isotipo IgM, por lo que se recomienda enriquecer los linfocitos que expresan IgG o agotar las células positivas para IgM antes de la infección con EBV [Steinitz, 2014]

5.2.5.2 Inmortalización por sobreexpresión de *BCL-6* y *BCL-XL*

En este caso, la inmortalización es por medio de la sobreexpresión de *BCL-6* y *BCL-XL*. Se sabe que las células plasmáticas son células diferenciadas e incapaces de proliferar, mientras que, el *BCL-6* y *BCL-XL* inhiben la diferenciación terminal de los linfocitos B a células plasmáticas. Por ello, al aumentar la expresión de *BCL-6* y *BCL-XL* se evita la diferenciación a células plasmáticas. Por tanto, las células se expanden rápidamente por respuesta a citocinas incluidas IL-4, IL-10 e IL-21; siendo esta última citocina la que induce los títulos de anticuerpos más altos (Fig. 17) [Kwakkenbos, 2010; Kwakkenbos, 2016]

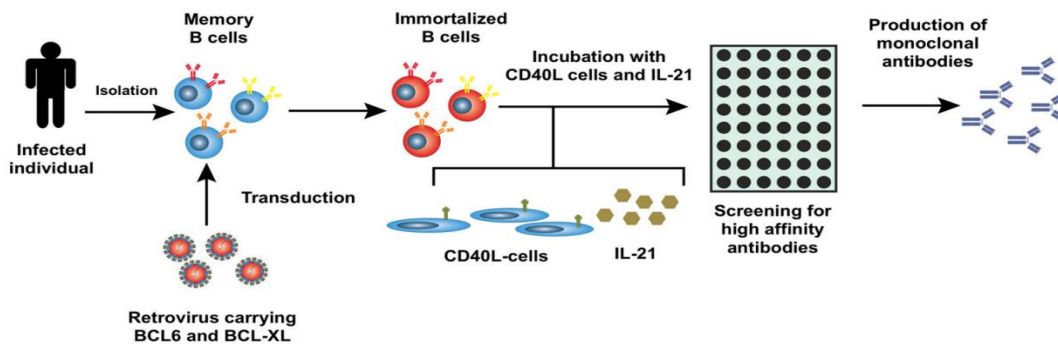


Figura 17. Generación de anticuerpos monoclonales por medio de la sobreexpresión de *BCL-6* y *BCL-XL* [Kwakkenbos, 2016]

5.2.5.3 HybriFree

Otro método utilizado en la producción de mAb's es el *HybriFree*, el cual es simple e incluye cuatro pasos: 1) captura de células B específicas con matriz sólida cargada de antígeno, 2) amplificación de ADNc codificantes de VH y VL, 3) construcción de una biblioteca combinatoria de VH-VL en el sistema de expresión de mamíferos y 4) determinación de combinaciones de VH-VL (Fig. 18) [Zhang, 2017; Kivi, 2016]

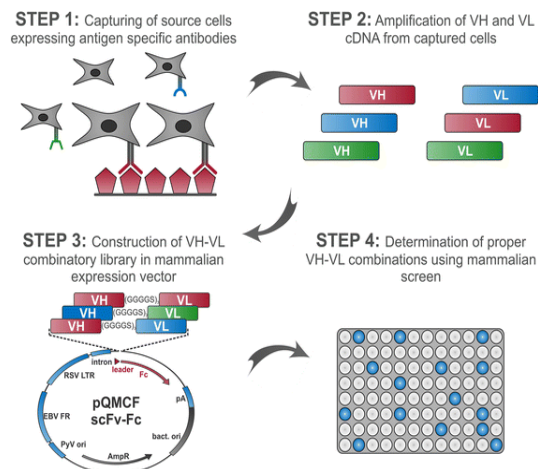


Figura 18. Método *HybriFree* [Kivi, 2016]

5.5 Anticuerpos de próxima generación

Existe una nueva generación de anticuerpos monoclonales en las que se le realizan modificaciones adicionales para mejorar su valor terapéutico (Fig. 19), como son:

5.5.1 Anticuerpos biespecíficos: éstos actúan en dos blancos diferentes a la vez. Para lograr la biespecificidad se requiere de métodos para combinar varias secuencias en un solo anticuerpo y se puede mejorar drásticamente su actividad optimizando algunos aspectos como: mejorar la función efectora al atacar células inmunes específicas además del objetivo terapéutico, mejorar la biodisponibilidad de anticuerpos a diferentes órganos al atacar proteínas de transporte, aumentar la especificidad para células patógenas al dirigirse a dos antígenos de la superficie celular en lugar de solo uno y mejorar la solidez y persistencia de la actividad terapéutica al bloquear dos vías biológicas diferentes. [Tiller, 2015]

El primer anticuerpo biespecífico aprobado para uso clínico fue *catumaxomab* (*Removab*) en Europa en 2009 [Lu, 2020]. El cual posee dos regiones variables (RV) diferentes (uno capaz de unir a un linfocito T y el otro a un marcador tumoral) y una región constante (RC) pudiendo unirse a tres tipos de células en forma simultánea [Langjahr, 2016]. Se utilizó para tratar tumores sólidos en pacientes con ascitis maligna (está dirigido contra el CD3 y EpCAM). Sin embargo, fue retirado del mercado, por los efectos adversos que producía [Renz, 2023; Shepard, 2017]. Otro tipo de anticuerpos biespecíficos es el tipo (*BiTE*) que consisten en direccionar a los linfocitos T citotóxicos hacia el tumor, con la finalidad de que estos se activen por proximidad y destruyan a las células tumorales; son capaces de unirse a la célula tumoral y al linfocito T en forma simultánea [Langjahr, 2016]. El *blinatumomab* es un anticuerpo en formato scFv (*single chain Fragment variable*; Fragmento variable de cadena sencilla) biespecífico, el cual, es un activador de células T (*BiTE*) que se dirige a CD3 y CD19 para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) [Gökbuget, 2018]. Hasta el 2019, se reportaron más de 85 anticuerpos biespecíficos en ensayos clínicos, aproximadamente el 86 % de los cuales están en evaluación como terapias contra el cáncer [Labrijn, 2019]

5.5.2 Terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T): CAR significa receptor de antígeno quimérico y cuando se inserta el gen en las células T de los pacientes se convierten en células CAR-T. Estas células reprogramadas pueden dirigirse a un marcador de cáncer específico en las células T, de modo que las células modificadas se dirijan a las células cancerosas y las eliminen [NOVARTIS, 2023]

5.5.3 Anticuerpos conjugados:

- a) **Anticuerpo-fármaco (ACF):** son anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales, los cuales transportan fármacos citotóxicos (moléculas pequeñas) a las células cancerosas. Estos anticuerpos contienen tres elementos esenciales: el anticuerpo monoclonal acarreador, el fármaco citotóxico y un enlazador que une

a ambos [Melgarejo, 2020]. Por ello para obtener anticuerpos efectivos se debe tomar en cuenta la química del enlazador y la conjugación, así como la ubicación y el número de moléculas de fármaco unidas [Tiller, 2015]. Actualmente, más del 8 % de todos los mAb's aprobados son ACF [Santos, 2018].

- b) anticuerpo-radionúclido:** El anticuerpo también se puede conjugar con un radionúclido para la radioterapia, más específicamente al sitio del tumor. La radioinmunoterapia (RIT) permite la entrega de una alta dosis de radiación terapéutica a las células cancerosas, minimizando así el daño a las células normales [Larson, 2015].
- c) Inmunocitocinas:** es la fusión de una citocina seleccionada con un anticuerpo, lo que mejora la especificidad de administración.
- d) Inmunoliposomas:** el sitio de unión del anticuerpo se escinde de la región constante y posteriormente se conjuga con diferentes sistemas de administración de nanofármacos (fármacos liposomales) para proporcionar una orientación más específica [Lu, 2020]

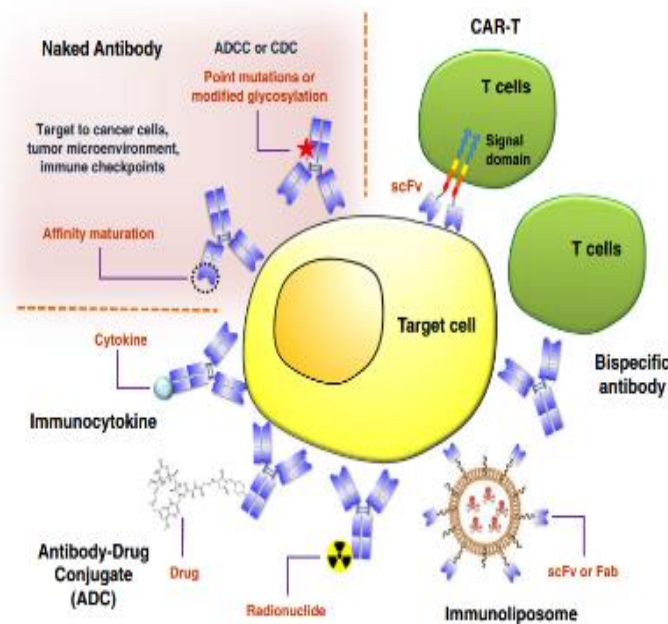


Figura 19. Anticuerpos terapéuticos. Se pueden dividir en dos grandes categorías: anticuerpos desnudos y anticuerpos que con ayuda de tecnología adicional mejoran su eficacia terapéutica. [Lu, 2020]

Recientemente con la ayuda de la tecnología recombinante se han diseñado anticuerpos que no poseen las características estructurales naturales, pero buscan mantener la alta especificidad y selectividad. [Santos, 2018]. Así surgieron numerosos anticuerpos recombinantes como *Fabs*, *scFvs*, diacuerpos y anticuerpos de dominio único (*sdAbs*) como VHH, el dominio variable del nuevo receptor de antígeno de tiburón (VNAR) y receptores de linfocitos variables (VLR) de los cuales, ninguno de estos fragmentos posee la región constante [Ahangarzadeha, 2020].

En los *scFv*, se fusionan las regiones variables de las CP y CL mediante la inserción de secuencias peptídicas flexibles (*linkers*) entre las regiones, los cuales permiten el apareamiento intramolecular de ambos dominios. [Álvarez, 2018; Langjahr, 2016]. Siendo estos más fáciles y menos costosos de fabricar debido a la falta de glicosilación y al tamaño relativamente pequeño, permitiendo el uso de procariotes como sistema de expresión. Tener un tamaño pequeño permite penetrar de mejor manera a los tejidos y tumores blanco en comparación con los mAb's de tamaño completo. Además de no tener región constante, no son estables y en consecuencia se degradan rápido en el cuerpo. Para resolver este problema la conjugación con albúmina o la PEGilación, son una opción para alargar su vida media, aunque resulta un proceso costoso. Otro inconveniente de no contar con región constante es que, solo efectúan una acción terapéutica uniéndose al ligando, por lo que, no inducen funciones efectoras mediadas como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). [Nelson, 2010]

Por otro lado, los fragmentos recombinantes de un tamaño inferior a 60 kDa se han utilizado como modelo base para generar múltiples tipos de anticuerpos, como lo son los anticuerpos multivalentes denominados mAb's de tercera generación, los cuales presentan varios sitios de unión a blancos (Fig. 20). La unión multivalente reduce la constante de disociación (*off rates*), y aumenta el tiempo de retención del Ac unido al Ag. [Álvarez, 2018]

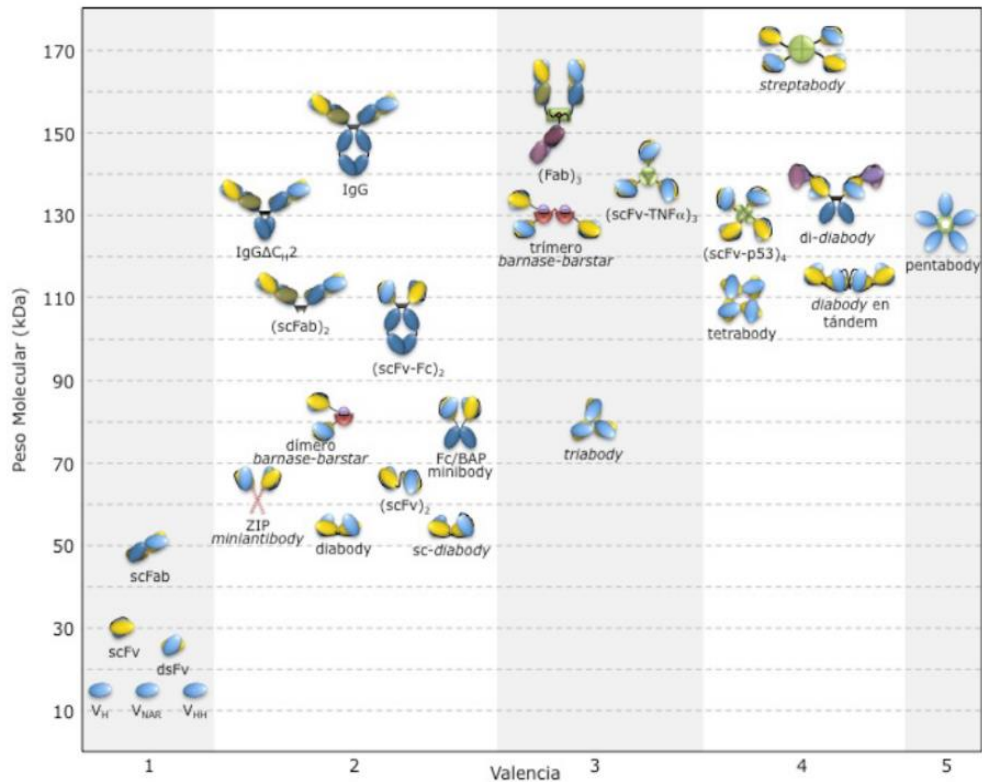


Figura 20. Principales fragmentos recombinantes derivados de anticuerpos según su peso molecular (kDa) y su valencia [Álvares, 2013]

5.6 Aplicaciones

La ingeniería genética posibilitó el desarrollo de anticuerpos recombinantes utilizados para el diagnóstico y tratamiento de un gran número de enfermedades, tales como el cáncer, enfermedades respiratorias, autoinmunes, genéticas, dermatológicas, hematológicas, así como para trasplantes de órganos, enfermedades cardiovasculares, del sistema nervioso central, enfermedades infecciosas como VIH y enfermedades oftalmológicas como la degeneración macular, hepáticas y otras. [Langjahr 2016; Santos, 2018]. Aunque la mayoría son indicados principalmente para el tratamiento contra cáncer y enfermedades autoinmunes. [Brüggemann, 2014]. A continuación, se muestra una tabla en donde se presentan algunos mAb's, la cual nos indica el blanco al que se dirigen, qué tipo de anticuerpo es y su indicación terapéutica, para algunas enfermedades (Tabla 1).

Tabla 1. Anticuerpos recombinantes y su aplicación

mAb	Blanco	Tipo de anticuerpo	Indicación
Cáncer			
Alemtuzumab	CD52	Humanizado	Leucemia linfocítica crónica
Bevacizumab	VEGF	Humanizado	CCR, cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma de células renales
Brentuximab	CD30	Quimérico	Linfoma anaplásico de células grandes cutáneo o sistémico
Cetuximab	EGFR	Quimérico	CCR, cáncer de células escamosas que afectan a la cabeza y el cuello
Ibritumomab	CD20	Murino	Linfoma no Hodgkin (LNH)
Ipilimumab	CTLA-4	Humano	Melanoma
Ofatumumab	CD20	Humano	LLC, LNH folicular
Panitumumab	EGFR	Humano	CCR
Pertuzumab	HER2	Humanizado	Cáncer de mama
Rituximab	CD20	Quimérico	LNH, LLC
Tositumomab	CD20	Murino	LNH
Trastuzumab	HER2	Humanizado	Cáncer de mama, gástrico y esofágico
Pembrolizumab	PD-1	Humanizado	Carcinoma pulmonar no microcítico
Blinatumomab	CD3, CD19	Bíespecífico	LNH, leucemia linfoblástica aguda (LLA)
Catumaxomab	CD3, EpCAM y M Φ	Triespecífico	Carcinomas EpCAM positivos
Enfortumab vedotin	nectina-4	humano conjugado	Cáncer de vejiga
Sacituzumab govitecan	Trop-2	Humanizado conjugado	Cáncer de mama triple negativo irresecable o metastásico (CMTNm)
Tafasitamab	CD19	Humanizado	Linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG)
Oportuzumab monatox	EpCAM	scFv	Cáncer de vejiga
Omburtamab	CD276	Murino radiomarcado	Tumores metastásicos del sistema nervioso central (SNC)
Edrecolomab	EpCAM	murino	Cáncer colorrectal
Enfermedades autoinmunes, inflamatorias y alérgicas			
Adalimumab	TNF α	Humano	Artritis reumatoide (AR), espondilitis anquilosante (AS), psoriasis, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica (PsA)
Basiliximab	CD25	Quimérico	Prevención del rechazo de órganos
Belimumab	BLYS soluble	Humano	Lupus eritematoso sistémico (LES)

Canakinumab	IL-1 β	Humano	Síndromes periódicos asociados a la criopirina
Certolizumab pegol	TNF α	Humanizado (fragmento Fab)	AR, y la enfermedad de Crohn
Golimumab	TNF α	Humano	AR, AS, PsA
Infliximab	TNF α	Quimérico	Enfermedad de Crohn, AR, AS, PsA, colitis ulcerosa
Natalizumab	Integrina- α 4	Humanizado	Esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn
Omalizumab	IgE	Humanizado	Asma alérgica y la urticaria crónica
Rituximab	CD20	Quimérico	Enfermedades linfoproliferativas y autoinmunes.
Tocilizumab	IL-6R	Humanizado	AR, la artritis idiopática juvenil sistémica (sJIA)
Ustekinumab	P40 de IL-12 e IL-23	Humano	Psoriasis, PsA
Narsoplimab	MASP-2	Humano	Tratamiento de HSCT-TMA
Anifrolumab	IFN-1	Humano	Lupus eritematoso Sistémico
Clenoliximab	CD4	Quimérico	AR
Risankizumab	IL-23	humanizado	Tratamiento de la psoriasis
Enfermedades infecciosas			
Palivizumab	Proteína F	Humanizado	virus sincitial respiratorio
Raxibacumab	Toxina de <i>Bacillus anthracis</i>	Humano	Profilaxis y el tratamiento del carbunco inhalado
Ibalizumab	CD4		Virus de inmunodeficiencia humana
Motavizumab	Proteína F	Humanizado	Virus sincitial respiratorio
Nirsevimab	Proteína F	Humano	Virus sincitial respiratorio
Sevirumab	CMV	humano	Infecciones por citomegalovirus en pacientes con sida.
Leronlimab	CCR5	humanizado	Virus de inmunodeficiencia humana
Diridavumab	hemaglutina	humano	Tratamiento de la influenza A
ALX-0171	Proteína F	nanocuerpo trimérico	Virus sincitial respiratorio
Rabimab	Proteína G	2 anticuerpos monoclonales murinos	Profilaxis posterior a la exposición a la rabia.
Leronlimab	CCR5	Humanizado	Virus de inmunodeficiencia humana

REGNEB3	GP1,2	3 anticuerpos monoclonales humanos	Infecciones por <i>Ébolavirus Zaire</i>
REGN-COV2	Proteína spike	2 anticuerpos monoclonales humanos	COVID-19
Siltuximab	IL-6	quimérico	Castleman multicéntrica (ECM)
Trasplantes de órganos			
Basiliximab	CD25	Quimérico	Profilaxis del rechazo agudo en trasplante renal alogénico de novo
Daclizumab	subunidad Tac de CD25	Humanizado	Profilaxis del rechazo agudo
Cardiología			
Abciximab	Glicoprot. IIb/IIa	Quimérico Fab	Intervención coronaria percutánea
Evolocumab	PCSK9	Humano	Hipercolesterolemia
Alirocumab	PCSK9	Humano	Hipercolesterolemia
Neurológicos			
Erenumab	CGRP	Humano	Profilaxis de la migraña
Galcanezumab	CGRP	Humanizado	Profilaxis de la migraña
Crenezumab	oligómeros de β -amiloide	Humanizado	Alzheimer
Otros			
Dupilumab	IL-4R α	Humano	Dermatitis atópica
Obiltoxaximab	antígeno protector (PA)	Quimérico	Profilaxis del ántrax
Teprotumumab	IGF-1R	Humano	Enfermedad ocular tiroidea activa de moderada a grave
Brolucizumab	VEGF	Humanizado scFv	Degeneración macular asociada a la edad neovascular exudativa
Ranibizumab	VEGF	Humanizado	Degeneración macular asociada a la edad
Romozumab	Esclerostina	Humanizado	Osteoporosis en mujeres
Eculizumab	proteína del complemento C5	Humanizado	Síndrome hemolítico urémico, enfermedades inflamatorias crónicas, infección por VRS

Como se mencionó anteriormente existen cinco isotipos de anticuerpos, pero la mayor parte de los anticuerpos monoclonales son de isotipo IgG porque tienen la mejor capacidad efectora de ADCC y CDC [Kaneko, 2011] Siendo la IgG1, la subclase de IgG preferida para el desarrollo de tratamientos y representa el mayor porcentaje de los mAb's en uso clínico, seguido de IgG4 e IgG2, con una vida media en suero de estas 3 subclases de ~23 días. La inmunoglobulina que presenta las funciones efectoras ADCC y CDC más potentes es la IgG3, sin embargo, esta subclase de IgG no se utiliza debido a su vida media relativamente corta, respecto a las otras, aproximadamente de 2 a 6 días. Además, tiene la bisagra más larga, lo que complica su procesamiento [Santos, 2018]. Por otra parte, la IgM casi no se utiliza debido a su estructura, ya que poseen diez sitios de unión a antígenos para una eliminación rápida de patógenos, pero como consecuencia no son de alta avidéz. [Hanack, 2016].

5.7 Farmacocinética

5.7.1 Absorción

Las mejores vías de administración para los mAb's, son la vía intravenosa (IV), la subcutánea (SC), y ocasionalmente la intramuscular (IM). La vía oral casi no se utiliza debido a que los mAb's son rápidamente degradados por las enzimas proteolíticas o desnaturalizados por el pH ácido del estómago, además su penetración a través del epitelio intestinal es limitada y como consecuencia tienen una baja biodisponibilidad. Por vía intramuscular o subcutánea, la absorción se lleva a cabo a través del sistema linfático, ya que este sistema tiene una alta porosidad, sin embargo, el proceso de intercambio entre el líquido linfático y el sistema vascular es lento, por lo que, la absorción puede durar horas o incluso días. Por otro lado, se ha demostrado que por vía subcutánea o intramuscular la máxima concentración de los anticuerpos monoclonales se alcanza transcurridos 1-8 días y la biodisponibilidad varía entre el 50 y 100% [Serra, 2018]. Algunos factores específicos que pueden afectar la absorción son la carga eléctrica, la formulación, el tamaño, la dosis total, la concentración del mAb administrado y la afinidad por el receptor Fc neonatal (*FcRn*) aunque este último mínimamente [Ryman, 2017].

5.7.2 Distribución

La extravasación de los mAb's puede darse por transporte de convección, difusión pasiva o endocitosis mediada por receptor. Siendo el transporte conectivo el principal mecanismo de difusión de anticuerpos en los tejidos, el cual se produce gracias al gradiente de presión presente entre el torrente sanguíneo y los tejidos, y depende del gradiente de presión osmótica y la naturaleza de los poros paracelulares (diámetro, número, forma). [Serra, 2018].

Otros factores que influyen en la distribución de mAb's a órganos o tejidos son: las características específicas de fármacos, como su afinidad de unión a antígenos blanco, la tasa de internalización, hidrofilia y carga [Kamath, 2016], así como también las

características específicas de tejidos como la estructura de la membrana y el flujo sanguíneo [Ovacik, 2018; Boswell, 2010]

5.7.3 Metabolismo y eliminación de mAb's

Existen varias vías de aclaramiento para el metabolismo y la eliminación de mAb's. Una es el aclaramiento no específico, que es a través de la endocitosis no específica y proteólisis por parte del hígado y el sistema reticuloendotelial (RES), por lo que las inmunoglobulinas son eliminadas mediante su degradación a péptidos y aminoácidos más pequeños. La otra vía es el aclaramiento específico o mediada por el objetivo, en la que después de que los mAb's se unen a un antígeno específico ya sea soluble o unido a membrana, se internalizan y catabolizan a través de la degradación lisosomal como un complejo antígeno-anticuerpo. Este proceso de aclaramiento disminuye con la saturación del objetivo que a su vez es dependiente de la dosis, en y por encima del nivel de dosis de saturación, la eliminación mediada por el objetivo se vuelve insignificante, y la eliminación del anticuerpo está mediada en gran medida a través de la vía FcRn.

Por otra parte, al interactuar el FcRn con la IgG provoca su retorno a la circulación, evitando su rápida degradación por parte de los lisosomas [Serra, 2018; Casellas, 2019]. Los anticuerpos tienen un tiempo de vida en circulación larga, que suele durar de 2 a 4 semanas [Shepard, 2017], por lo que la vida media de los mAb's se incrementa en función del grado de humanización del propio anticuerpo, en el orden creciente murino, quimérico, humanizado y completamente humano [Casellas, 2019].

Otros factores que pueden afectar la eliminación de mAb's son: las propiedades químicas como la hidrofobicidad, la carga, el punto isoeléctrico y patrones de glicosilación, además de las características del paciente como: el tamaño corporal, los polimorfismos genéticos, la medicación concomitante, las comorbilidades y su estado de enfermedad. Aunque por lo general, los mAb's administrados sistémicamente tienen perfiles de farmacocinética bifásicos en circulación, es decir, una fase de distribución relativamente rápida, seguida de una fase de eliminación más lenta. [Ovacik, 2018; Kamath, 2016]

5.8 Biosimilares

Con la expiración de patentes de una gran parte de los anticuerpos terapéuticos, se ha permitido el desarrollo de los denominados anticuerpos biosimilares. Estos son producidos por un fabricante diferente al del desarrollador farmacéutico, pero utiliza sus propios bancos celulares, procesos y métodos analíticos. Por lo que no son idénticos al producto de referencia, aunque tengan las mismas secuencias. [Santos, 2018]. De modo que para que las agencias reguladoras aprueben un anticuerpo biosimilar se debe demostrar que no existe diferencias clínicamente significativas en pureza, seguridad y potencia, en comparación con el producto de referencia. Sin embargo, con frecuencia se encuentran diferencias en el patrón de glicosilación, pero también se debe demostrar

que son clínicamente irrelevantes. [Langjahr, 2016]. Se espera que esta clase de productos, debido a su menor precio, permita una mayor penetración en el mercado

6. Conclusiones

A lo largo de la historia, el surgimiento de diversos patógenos, así como la aparición de distintas enfermedades, ha llevado al ser humano en busca de la cura o el tratamiento más favorable, por lo que está en constante investigación y desarrollo de nuevas formas de diagnóstico y tratamiento. Gracias al avance científico y a una mejor comprensión de las enfermedades, surgieron medicamentos biológicos los cuales utilizan tecnología de ADN recombinante, pudiéndose ajustar a casi cualquier blanco terapéutico. Estos medicamentos llamados mAb's presentan numerosas ventajas en comparación a otros medicamentos biológicos, siendo específicos, afines, con un excelente perfil de seguridad y una muy buena biodisponibilidad, además de que pueden disponer de moléculas modificadas o combinaciones de partes de distintas moléculas. El diseño y la arquitectura de los mAb's, año tras año mejora perfeccionando los métodos y las técnicas de producción para así optimizar sus propiedades y permitir una mayor supervivencia y una mejor calidad de vida de los pacientes.

7. Abreviaturas

Ac's	Anticuerpos
Ig	Inmunoglobulina
CL	Cadena ligera
CP	Cadena pesada
Fab	Fragmento de unión al antígeno
Fc	Fragmento cristalizable
LMB	Laboratorio de Biología Molecular
mAb	Anticuerpo monoclonal
HAMA	Anticuerpo humano anti-ratón
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
HACA	Anticuerpos antiquiméricos humanos
CDR	Región determinante de la complementariedad
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
ELISA	Inmunoensayo indirecto ligado a enzimas
PEG	Polietilenglicol
BCT	Focalización de células B
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
TK	Timidina cinasa
HAT	Hipoxantina, aminopterina y timidina
LEAP	Análisis y procesamiento mediante láser
RabMAb	Anticuerpos monoclonales de conejo
FR	Región marco
OptCDR	Regiones determinantes de la complementariedad óptima
MGL	Humanización guiada por linaje mutacional
HAHA	Anticuerpos humanos antihumanizados
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
ssDNA	ADN de una sola cepa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
VH	Región Variable de cadena pesada
VL	Región variable de cadena ligera
HAC	Cromosoma humano artificial
WT	Tipo natural o silvestre
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
FACS	Clasificador de células activadas fluorescentes
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
EBV	Virus de Epstein-Barr
IL	Interleucina
RV	Región Variable
RC	Región Constante
EpCAM	Molécula de adhesión de células epiteliales
BiTE	Acopladores biespecíficos de células T
ScFV	Anticuerpos de cadena sencilla
CD	Cúmulos de diferenciación
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
CAR-T	Células T con receptor de antígeno quimérico
ACF	Anticuerpos conjugados a fármacos
RIT	Radioinmunoterapia
sdAbs	Anticuerpos de dominio único
VHH	Región variable de la cadena pesada
VNAR	Nuevo receptor de antígeno variable de tiburón
VLR	Receptores de linfocitos variables????

ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento
kDa	Kilodalton
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
EIT	Ensayo electroinmunotransferencia
LLC	Leucemia linfocítica crónica
CCR	Cáncer colorrectal
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
LNH	Linfoma no Hodgkin
CTLA-4	Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico
HER-2	Receptor-2 de factor de crecimiento epidérmico humano
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
Trop-2	Antígeno 2 de la superficie celular del trofoblasto
CMTNm	Cáncer de mama triple negativo irresecable o metastásico
LDLBG	Linfoma difuso de linfocitos B grandes
SNC	Sistema nervioso central
AR	Artritis reumatoide
AS	Espondilitis anquilosante
PsA	Artritis psoriásica
LES	Lupus eritematoso sistémico
BLyS	Estimulador de linfocitos B
IL	Interleucina
sJIA	Artritis idiopática juvenil sistémica
MASP2	Proteasa 2 asociada a la proteína de unión a manosa
HSCT-TMA	Microangiopatía trombótica asociada al trasplante de células madre hematopoyéticas
IFN	Interferón
CMV	Citomegalovirus
CCR5	Quimiocina receptora de tipo 5
GP	Glicoproteína
ECM	Castleman multicéntrica
PCSK9	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
PA	Antígeno protector
VRS	Virus sincitial respiratorio
IV	Intravenosa
SC	Subcutánea
IM	Intramuscular
C _{máx}	Concentración máxima
FcRn	Receptor neonatal para el Fc
RES	Sistema reticuloendotelial
PK	Farmacocinética

8. Bibliografía

Torres, A. (2020). **Anticuerpos recombinantes como herramientas en neurobiología: producción y caracterización de anticuerpos monoclonales recombinantes para detectar proteínas sinápticas.** [Tesis de posgrado en biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia]. 1-2.

Kindt, T. Goldsby R. Osborne, B. (2007). **Inmunología de Kuby.** Recuperado 8 Enero 2024 [Inmunologia de Kuby \(wordpress.com\)](http://www.inmunologia.dekuby.wordpress.com)

Suárez, P. (2020). **Aplicaciones clínicas de los anticuerpos recombinantes.** [Tesis de posgrado en Farmacia. Universidad de Sevilla], 4

Mamani, Y. (2011). **Inmunoglobulinas.** Rev Act Clín. Vol. 13. 663-666

Bermúdez, K. Hidalgo, G. Sánchez, B. Mora, J. (2019). **Anticuerpos monoclonales bioespecíficos: desarrollo, producción y uso como terapia anticancerígena.** Rev Méd Univ Costa Rica. Vol. 13 (1), 11-29.

Frenzel, A. Hust, M. Schirrmann, T. (2013). **Expression of Recombinant Antibodies.** Frontiers in Immunology, 4

Langjahr, P. Sotelo, P. (2016). **Presente y futuro de los anticuerpos recombinantes terapéuticos.** Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.; 14(2):110- 21

Flores, J. García, H. Morales, E. Islas, C. (2019). **Usos de anticuerpos monoclonales en medicina.** TEPEXI Boletín Científico de la Escuela Superior Tepeji del Río.; 11: 25-28

Ruiz, S. Sulleiro, E. Calvo, G. (2011). **Medicamentos biotecnológicos; from dream to reality.** ELSEVIER 9(3):85-88

Lu, R. Hwang, Y. Liu, I. Lee, C. Tsai, H. Li, H. Wu, H (2020). **Development of therapeutic antibodies for they treatment of diseases.** Biomedical Science. 27:1

Santos, M. Quintilio, W. Manieri, T. Tsuruta, L. Moro, A. (2018). **Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, 54

Foltz, I. Karow, M. Wasserman, S. (2013). **Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know.** American Heart Association. 127(22), 2222–2230.

Hanack, K. Messerschmitt, K. Listek, M. (2016). **Antibodies and Selection of monoclonal antibodies**. *Protein Targeting compounds*, 11-22

Lobato, B. Rivera, N. Rodríguez, V. Rodríguez, P. Callejas, F. Cervantes, M. Morales, C. Aguilar, H. Arenas, D. Moreno, J. Barrientos, C. Bueno, S. Carmona, D. Lozano, E. Rodríguez, L. Caballos, N. Lara, C. León, G. Mendoza, D. González, S. Juárez, E. (2009). **Optimization of protocols for production of polyclonal antibodies: an exercise of educational innovation**. *Rev. Med. Universidad Veracruzana*, 9(2):5-12

Zhang, Z., Liu, H., Guan, Q., Wang, L. Yuan, H. (2017). **Advances in the Isolation of Specific Monoclonal Rabbit Antibodies**. *Frontiers in Immunology*, 8

Medina, Y. Mata, O. Lloret, L. Manzo, Anabelle. Cortés K. (2021). **Production of murine monoclonal antibodies using hybridoma technology**. *Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM 45: 59-69*

González, A. Díaz, F. (2011). **César Milstein: 35 años de anticuerpos monoclonales**. *Inmunología*. 30(1), 0–33.

Tomita, M. y Tsumoto, K. (2011). **Hybridoma technologies for antibody production**. *Immunotherapy*, 3(3), 371–380

Zhang, C. (2012). **Tecnología de Hibridomas para la Generación de Anticuerpos Monoclonales**. *Métodos y protocolos de anticuerpos*, 117–135.

Messerschmidt, K. y Heilmann, K. (2013) **Toxin–antigen conjugates as selection tools for antibody producing cells**. *Journal of Immunological Methods* 387: 167–172

Amin, N. Reyes, F. Camacho, F. Otero, O. Cuello, M. Núñez, D. Fernández, S. García, L. (2015). **Obtención de un anticuerpo monoclonal murino que reconoce al polisacárido capsular Vi de Salmonella Typhi**. *VacciMonitor*, 24(2):57-63

García Merino, A. (2011). **Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos**. *Neurología*, 26(5), 301–306.

VWR. (s.f). **Cation exchange chromatography columns, HiTrap SP HP**. Recuperado 8 Enero 2024 <https://es.vwr.com/store/product/2991820/hitrapm-ion-exchange-prepacked-columns#>

Feng, L. Wang, X. Jin, H. (2011). **Rabbit monoclonal antibody: potential application in cancer therapy**. *Am J Transl Res* 3(3):269-274

Álvarez, A. (2013). **Generación y caracterización de anticuerpos multivalentes y multiespecíficos basados en dominios de trimerización derivados del colágeno humano**. Tesis doctoral. Departamento de bioquímica, universidad autónoma de Madrid.

- Cappelletti, F. Clementi, N. Mancini, N. Clementi, M. Burioni, R. (2015). **Virus-induced preferential antibody gene-usage and its importance in humoral autoimmunity**. *Seminars in Immunology*, 27(2), 138–143.
- Dondelinger, M. Filée, P. Sauvage, E. Quinting, B. Muyldermans, S. Galleni, M. Vandevenne, M. (2018). **Understanding the Significance and Implications of Antibody Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition**. *Frontiers in Immunology*, 9: 2278
- Tiller, K. Tessier, P. (2015). **Advances in Antibody Design**. *Annu Rev Biomed Eng*, 17(1), 191–216.
- Pantazes, R. Maranas, C. (2010). **OptCDR: a general computational method for the design of antibody complementarity determining regions for targeted epitope binding**. *Protein Engineering, Design & Selection* vol. 23 no. 11 pp. 849–858
- Segundo A., Hernández B. López V., y Torres A. (2010). **Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia)**. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(3),17-26
- Real Academia Sueca de Ciencias [RACS] (2018). **Antecedentes científicos del Premio Nobel de Química 2018**. EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS DE UNIÓN.
- Bazan, J. Całkosiński, I. Gamian, A. (2012). **Phage display A powerful technique for immunotherapy**. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8:12, 1829–1835.
- Adams, J. Sidhu, S. (2014). **Synthetic antibody technologies**. *Current Opinion in Structural Biology* 2014, 24:1–9
- Hernández, D. (2007). **Caracterización inmunoquímica de anticuerpos anti B2GP-1 en formato scFv de una paciente con síndrome de SaFP y estudio de su capacidad patogénica en un modelo murino**. Tesis de maestría. UNAM.
- Alfaleh, M. Alssab, H. Mahmoud, A. Alkayyal, A. Jones, M. Mahler, S.Hashem, A. (2020) **Phage display derived monoclonal antibodies: From bench to Bedside**. *Frontiers in Immunology*. 11:1986
- Rosano, G. Ceccarelli, E. (2014). **Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges**. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Woo, P. Lim, T (2019). **Development of a Phage Display Panning Strategy Utilizing Crude Antigens: Isolation of MERS-CoV Nucleoprotein human antibodies**. *Scientific Reports*, 9(1).
- Brüggemann, M. Osborn, M. Ma, B. Hayre, J. Avis, S. Lundstrom, B. Buelow, R. (2014). **Human Antibody Production in Transgenic Animals**. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 63(2), 101–108.

Rodríguez, M. Pujo, M. Pérez, L. Gavilondo, J. Garrido, G. Ayala, M. Pérez, M. Bequet, M. Cabrera¹, G. Ramos, O. Hernández, I. González, G. Huerta V. Sánchez, B. Mateo, C. Triguero, A. Mendoza, O. Freyre, F. Borroto, C. (2013). **Transgenic plants of *Nicotiana tabacum* L. express aglycosylated monoclonal antibody with antitumor activity.** *Biotechnología Aplicada*, 30:157-16 No.2

Gómez, M. (2002). **La producción de vacunas y otros compuestos farmacéuticos en plantas transgénicas.** *Revista de la Sociedad Química de México*, Vol. 46, Núm. 3 (2002) 264-270

Smith, K. Garman, L. Wrammert, J. Zheng, N. Capra, J. Ahmed, R. Wilson, P. (2009). **Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen.** *Natural protocols*, 4(3), 372–384.

Jin, A. Ozawa, T. Tajiri, K. Obata, T. Kondo, S. Kinoshita, K. Muraguchi, A. (2009). **A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood.** *Nature Medicine*, 15(9), 1088–1092.

Sino Biological, (s.f.). **Descubrimiento de anticuerpos de células B individuales.** [Tecnologías de anticuerpos de células B individuales | Sino Biológico \(sinobiological.com\)](https://www.sinobiological.com) (11, 02, 2023)

Steinitz, M. (2014). **Production of Human Monoclonal Antibodies by the Epstein–Barr Virus Method.** *Human Monoclonal Antibodies*: vol. 1060, 111–122.

Kwakkenbos, M. Diehl, S. Yasuda, E. Bakker, A. Van Geelen, C. Lukens, M. ... Beaumont, T. (2010). **Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming.** *Nature Medicine*, 16(1), 123–128.

Kwakkenbos, M. Helden, P. Beaumont, T. y Spits, H. (2016). **Cultivos estables a largo plazo de células B autorrenovables y sus aplicaciones.** *Reseñas inmunológicas*, 270(1), 65–77.

Kivi, G. Teesalu, K. Parik, J. Kontkar, E. Ustav, M. Noodla, L. Männik, A. (2016). **HybriFree: a robust and rapid method for the development of monoclonal antibodies from different host species.** *BMC Biotechnology*, 16(1).

Renz, M. Dorigo, O. (2023). **Inmunoterapia en neoplasias malignas ginecológicas.** ELSEVIER (Ed). *Oncología ginecológica clínica DiSaia y Creasman*. (pp. 506-520). <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/catumaxomab>

Shepard, H. Phillips, G. Thanos, C. y Feldmann, M. (2017). **Avances en la terapia con anticuerpos monoclonales y proteínas relacionadas.** *Medicina clínica*, 17(3), 220–232.

Gökbuget, N. Dombret, H. Bonifacio, M. Reichle, A. Graux, C. Faul, C. Diedrich, H. Topp, M. Brüggemann, M. Horst, H. Havelange, V. Stieglmaier, J. Wessels, H. Haddad, V. Benjamin, J. Zugmaier, G. Nagorsen, D. Bargou, R. (2018). **Blinatumomab para la enfermedad residual**

mínima en adultos con leucemia linfoblástica aguda precursora de células B. Sangre. *The American Society of Hematology*, 131 (14): 1522–1531.

Labrijn, A. Janmaat, M. Reichert, J. Parren, P. (2019). **Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline.** *Nature Reviews Drug Discovery*.

NOVARTIS. (s.f). **Desarrollando hoy el futuro de la terapia con células CAR-T.** Recuperado el 20 de Marzo del 2024 <https://www.novartis.com/es-es/investigacion-y-desarrollo/areas-terapeuticas/terapia-celular-y-genica/desarrollando-hoy-el-futuro-de-la-terapia-con-celulas-car-t>

Melgarejo, G. Pérez, S. Medina, E. Velasco, M. (2020). **Anticuerpos conjugados a fármaco: la nueva generación de terapias biotecnológicas contra el cáncer.** *Gaceta médica de México*, 156(3), 229-236.

Larson, S. Carrasquillo, J. Cheung, N. Press, O. (2015). **Radioimmunotherapy of human tumours.** *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 347–360.

Ahangarzadeha, S. Payandehb, Z. Arezumandc, R. Shahzamanid, K. Yariane, F. Alibakhshif, A. (2020) **An update on antiviral antibody-based biopharmaceuticals.** *International Immunopharmacology*, 86, 106760.

Álvarez L. (2018). **Generación de nuevas estrategias con anticuerpos monoclonales.** *Nuevas perspectivas en inmunoterapia*, 11.

Nelson, A. L. (2010). **Antibody fragments mAb's.** *Landes Bioscience* 2(1), 77–83

Kaneko, E. Niwa, R. (2011). **Optimization of therapeutic antibody function.** *BioDrugs* 25, 1–11

Serra, J. Morell, A. Castañeda, S. (2018). **Interacciones farmacológicas de los anticuerpos monoclonales.** *Medicina Clínica*, 151(4), 148–155.

Ryman, J. Meibohm, B. (2017). **Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies.** *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*.

Kamath, A. (2016). **Translational pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies.** *Drug Discovery Today: Technologies*, 21-22, 75–83.

Ovacik, M. y Lin, K. (2018). **Tutorial sobre farmacocinética de anticuerpos monoclonales y sus consideraciones en el desarrollo temprano.** *Ciencias Clínicas y Traslacionales*; 11 (6): 540-552.

Boswell, C. Tesar, D. Mukhyala, K. Theil, F. Fielder, P. y Khawli, L (2010). **Effects of Charge on Antibody Tissue Distribution and Pharmacokinetics**. *Bioconjugate chemistry*, 21 (12), 2153–2163.

Casellas, M. Padullés, M. Santacana E. Padullés, A. Colom, H. (2019). **Farmacocinética de los anticuerpos monoclonales**. *El Farmacéutico Hospitales*. 2019; 215: 15-21