

Resumen

Una de las principales causas de mortalidad por enfermedades infecciosas a nivel mundial es la sepsis. La interleucina-17A (IL-17A) y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) participan en la amplificación de la respuesta inflamatoria y representan dianas moleculares de interés para el desarrollo de herramientas de reconocimiento. Sin embargo, la disponibilidad de nanoanticuerpos específicos contra estas proteínas continúa siendo limitada. En este trabajo se expresaron IL-17A y MIF en *Escherichia coli* SHuffle® T7 Express, estableciéndose como condición de producción una inducción a $DO_{600nm}=0,6$ con 0,5 mM de IPTG durante 3 h a 37 °C, maximizando su rendimiento como cuerpos de inclusión. Las proteínas fueron solubilizadas con urea y β -mercaptoetanol, purificadas mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). La purificación a pH 8 incrementó la recuperación de ambas proteínas respecto a pH 6, mientras que la renaturalización con un sistema basado en L-arginina favoreció la recuperación de IL-17A y MIF. No obstante, la inestabilidad estructural de las proteínas renaturalizadas impidió su utilización en los ensayos de inmunoselección. Las moléculas fueron empleadas como antígenos en condiciones desnaturalizantes y reductoras a una ronda de *biopanning* con elución competitiva, seguida de *phage*-ELISA. Aplicando un criterio de selección basado en una relación de unión específica ≥ 3 para IL-17A y ≥ 2 para MIF, se identificaron ocho clones fagemídicos específicos contra IL-17A y dos contra MIF. Este estudio validó el empleo de IL-17A y MIF recombinantes como antígenos para la selección de nanoanticuerpos mediante *phage display*.

Palabras clave: sepsis, IL-17A, MIF, nanoanticuerpos, *phage display*

Abstract

Sepsis is one of the leading causes of mortality from infectious diseases worldwide. Interleukin-17A (IL-17A) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) are key mediators of the inflammatory response and represent promising molecular targets for the development of recognition molecules. However, the availability of nanobodies specifically targeting these proteins remains limited. In this study, recombinant IL-17A and MIF were expressed in *Escherichia coli* SHuffle® T7 Express under optimized induction conditions OD_{600nm}=0,6, 0.5 mM IPTG, 37 °C for 3 h, maximizing protein production as inclusion bodies. The recombinant proteins were solubilized using urea and β-mercaptoethanol and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Purification at pH 8 improved the recovery of both proteins compared with pH 6, while a refolding system supplemented with L-arginine enhanced the recovery of IL-17A and MIF. Nevertheless, the structural instability of the refolded proteins prevented their use in immunoselection assays. Therefore, the recombinant proteins were employed as antigens under denaturing and reducing conditions in a single round of competitive elution biopanning followed by *phage* ELISA. Using a specific binding ratio threshold of ≥3 for IL-17A and ≥2 for MIF, eight *phagemid* clones specific for IL-17A and two specific for MIF were identified. This study validated the use of recombinant IL-17A and MIF as antigens for nanobody selection by *phage display*.

Keywords: *sepsis, IL-17A, MIF, nanobodies, phage display*