



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Tesina de Grado de Licenciatura en Bioquímica

“Obtención de nanobodies que bloqueen la interacción de PD1 con PD-L1”

Diego Pérez Escanda

Tutor: Dr. Gualberto González-Sapienza

Co-tutora: Dra. Lucía Vanrell Majó

Cátedra de Inmunología, Instituto de Higiene, Facultad de
Química

Montevideo, Uruguay

Noviembre 2016

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Gualberto, por aceptarme en el laboratorio, por las enseñanzas y las horas de dedicación.

A mi co-tutora, Lucía, por las ideas aportadas para el trabajo, por las enseñanzas en el laboratorio y por su cariño.

A mis padres, por su apoyo constante durante toda la carrera y por permitirme alcanzar esta meta.

A Noe, por estar junto a mí y haberme enseñado mucho de lo que se hoy y por ser una excelente amiga y compañera de laboratorio.

A mis amigos de la carrera, los polis, y en especial a las BQss que me acompañaron durante toda la carrera, me soportaron en todas y fueron el ejemplo de esfuerzo.

A todos los integrantes de la Cátedra de Inmunología, en especial a los de la “casita del fondo” por crear un lindo ambiente de trabajo y siempre estar dispuestos a ayudar.

RESUMEN

PD-1 es un receptor de la superficie celular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y es expresado tras la activación, en células T, natural killers (NK) y células B. Los ligandos principales de PD-1 son PD-L1 y PD-L2. El primero es expresado en la superficie de un amplio rango de tipos celulares, y su expresión aumenta por la acción de citoquinas, en particular de INF- γ , por otro lado PD-L2 se expresa principalmente en células dendríticas (CD) y macrófagos. PD-1 es un receptor inhibitorio, y una de sus funciones principales es regular negativamente las respuestas exacerbadas mediadas por linfocitos T, siendo una de las causas del estado disfuncional que adquieren las células T en contextos crónicos. Justamente, se ha visto que en enfermedades como cáncer o infecciones virales crónicas, los linfocitos T adquieren dicho estado disfuncional mediante una señalización por distintos receptores inhibitorios incluyendo PD-1. Se conoce que las células tumorales sobre-expresan PD-L1 como mecanismo de evasión de la respuesta inmune, y el bloqueo de la interacción PD-1 con PD-L1 se ha explotado en terapia antitumoral. Recientemente la FDA ha aprobado los anticuerpos pembrolizumab y nivolumab anti-PD-1 para terapia antitumoral. Como alternativa al uso de anticuerpos convencionales, nuestro grupo ha comenzado a generar nanobodies (fragmentos recombinantes correspondiente al dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos, *Lama glama*) contra estos receptores. En este trabajo se describen las etapas iniciales llevadas a cabo para aislar nanobodies contra el PD-L1 de origen humano (hPD-L1), incluyendo la construcción de una biblioteca de nanobodies y la generación de reactivos para su selección.

Palabras clave

PD-1

PD-L1

Regulación respuesta de linfocitos T

Cáncer y enfermedades virales crónicas

VHHs, *nanobodies*

Bibliotecas de anticuerpos

Phage display

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN.....	1-20
1.1 Anticuerpos terapéuticos como terapias anti-tumorales.....	1-2
1.2 PD-1.....	2
1.3 PD-L1 y PD-L2: moléculas co-inhibitorias de linfocitos T.....	3-4
1.4 Función e importancia del eje PD-1:PD-L1.....	4-8
1.5 Rol del eje PD-1:PD-L1 en contextos crónicos.....	8-12
1.6 Receptores celulares reguladores de la inmunidad como blanco de terapias anti-tumorales.....	12-15
1.7 Anticuerpos monodominio como alternativa para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos.....	15-18
1.8 Fundamentos de <i>Phage Display</i>	18-20
1.9 Objetivos generales.....	20
1.10 Objetivos específicos.....	20
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	21-43
2.1 Buffers y soluciones.....	21
2.2 Medios de cultivo.....	21-22
2.3 Inmunización de la Llama y generación de la biblioteca de fagos filamentosos.....	22-26
2.3.1 Inmunización.....	22
2.3.2 Titulación de anticuerpos totales contra antígeno de inmunización...	22-24
2.3.3 Preparación de biblioteca de fagos filamentosos.....	24-26
2.3.4 Purificación de fagos.....	26
2.4 Cuantificación de biblioteca de fagos filamentosos.....	26-27
2.5 <i>Panning</i> y <i>screening</i>	27-38
2.5.1 Primer ronda del primer <i>panning</i>	28-29
2.5.2 Amplificación del <i>output</i>	30-31
2.5.3 Titulación del <i>output</i>	31
2.5.4 Segunda ronda del primer <i>panning</i>	31
2.5.5 Primer ronda del segundo <i>panning</i>	31-32

2.5.6	Segunda y tercer ronda del segundo <i>panning</i>	32
2.5.7	Producción de VHHs biotinilados.....	32-35
2.5.8	<i>Screening</i> de outputs en placa.....	35-36
2.5.9	Citometría de flujo.....	37
2.6	Transfección.....	37-43
2.6.1	Extracción de RNA y clonaje en vector de expresión eucariota.....	37-40
2.6.2	Optimización de la transfección de la línea celular HEK293 con GFP.....	40-42
2.6.3	Transfección de línea celular HEK293 con hPD-L1.....	42-43
3	RESULTADOS.....	44-66
3.1	Titulación de anticuerpos totales contra el antígeno de inmunización en suero de llama.....	44-45
3.2	Generación de biblioteca de fagos filamentosos.....	45-47
3.3	Selección de nanobodies específicos contra hPD-L1 y <i>screening</i>	47-51
3.3.1	Primer <i>panning</i>	47-48
3.3.2	Segundo <i>panning</i>	48-51
3.4	Clonaje de outputs en vector de expresión procariota pINQ-BtH6.....	51-52
3.5	Citometría sobre línea celular de expresión estable.....	52-55
3.6	Extracción de RNA, amplificación y clonaje del gen hPD-L1.....	56-58
3.7	Transfección transitoria de células HEK293.....	58-61
3.8	Citometría sobre células HEK-hPD-L1 transfectadas.....	61-65
3.9	Nueva ronda de <i>panning</i> sobre células HEK-hPD-L1 transfectadas.....	65-66
4	DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	67-68
5	GLOSARIO.....	69-71
6	REFERENCIAS.....	72-77

1 INTRODUCCION

1.1 Anticuerpos terapéuticos como fármacos anti-tumorales

El desarrollo de la tecnología de hibridomas a mediados de los 70' y posteriormente los métodos para humanizar los anticuerpos monoclonales, abrieron las puertas para el uso de los anticuerpos como fármacos. En el caso de las terapias anti-tumorales, los primeros anticuerpos terapéuticos estaban dirigidos contra receptores altamente expresados en el tumor, por ejemplo CD20, CD22, CD19, CD52 en tumores de origen linfocítico, o receptores de factores de crecimiento como EGFR, HER2, y HER3 en otros tumores^{1,2}. En los primeros tiene gran importancia la región constante (Fc), la cual es capaz de mediar la destrucción de células tumorales participando tanto en citotoxicidad dependiente del complemento (mediante reclutamiento de C1q), como en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos reclutando células asesinas naturales (NK), o a través de la opsonización para permitir la fagocitosis por neutrófilos y/o macrófagos. Por otra parte, para los factores de crecimiento es crítica la capacidad de los anticuerpos de neutralizar o bloquear la unión del receptor a su ligando, para impedir la señalización y así disminuir el crecimiento de las células tumorales³. Más recientemente, los avances en la caracterización del ambiente tumoral inmunosupresor y en particular el descubrimiento de las células T citotóxicas "exhaustas" en el mismo, fueron clave para el planteamiento de alternativas inmuno-terapéuticas que emplean anticuerpos monoclonales para tratar de revertir el ambiente inmunosupresor⁴. Estas alternativas buscan restituir el estado funcional de las células T citotóxicas permitiendo que sean ellas mismas las que ejerzan la acción tumoricida, como sucede durante la inmuno-vigilancia tumoral. Es por esta razón que en los últimos tiempos han cobrado gran importancia los anticuerpos dirigidos a bloquear la acción de receptores involucrados en la regulación

de la respuesta inmune, y en particular de células T. Entre los receptores moduladores de linfocitos T se encuentran CTLA-4, BTLA, LAG-3, TIM-3 y como objeto de estudio en esta tesina, PD-1 (y su ligando).^{5,6}

1.2 PD-1:

El *programmed cell death-1* (PD-1) es un receptor celular de la familia de las inmunoglobulinas codificado por el gen PDCD1 en su versión humana. La proteína resultante de la expresión de PDCD1 consta de 288 aminoácidos⁷ y posee tres dominios: un dominio de unión extracelular del tipo IgV en el N-terminal, un dominio transmembrana y en su extremo C-terminal, un dominio intracelular de señalización el cual contiene a su vez, un motivo inhibitorio basado en tirosina (ITIM) y otro motivo de cambio del inmunorreceptor basado en tirosina (ITSM)⁸. El receptor PD-1 se expresa generalmente en linfocitos T (LT), células NK, células T asesinas naturales (NKT), linfocitos B (LB) y algunas células de origen mieloide como pueden ser monocitos activados y ciertas poblaciones de células dendríticas (CDs)^{9,10}. El mismo puede interactuar con dos ligandos naturales, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC)^{11,12} atenuando las señales mediadas por fosforilación debidas a la unión de receptores estimuladores o activadores de dichas células, y consecuentemente regulando negativamente la activación celular. PD-1 es sobre-expresado tras la activación de las células T o B vírgenes mediada (en parte) por la unión del TCR o BCR a sus ligandos o mediante estimulación y exposición constante a distintos antígenos. Ciertas citoquinas como interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-15 (IL-15) e interleuquina-21 (IL-21), receptores tipo-toll (TLRs) e interferones (IFNs) pueden potenciar la expresión de PD-1 en células T. La expresión del mismo se encuentra en parte mediada por el reclutamiento del factor nuclear de células T activadas (NFATc1) al núcleo.^{13,14}

1.3 PD-L1 y PD-L2: moléculas co-inhibitorias de linfocitos T

PD-L1/L2 (*programmed cell death-ligand 1/2*) son glicoproteínas transmembrana de tipo I de la superfamilia de las inmunoglobulinas que actúan como moléculas co-inhibitorias de linfocitos T, las cuales al igual que PD-1, poseen 3 dominios: un dominio extracelular, uno transmembrana y otro citoplasmático¹⁵. PD-L1 es el principal ligando de PD-1 y está codificado por el gen CD274 en humanos. Puede encontrarse expresado sobre la superficie de células de origen tanto hematopoyético como linfocitos T, linfocitos B y CD8, pero también en células del endotelio vascular, células epiteliales, hepatocitos, células musculares, entre otras^{16,17}. Sin embargo, la expresión constitutiva de la proteína en la superficie en tejidos normales es rara, siendo inducida por estímulos inflamatorios, como citoquinas pro-inflamatorias, dentro de las cuales destaca el interferón gamma (IFN- γ)¹⁸. En contraste, la expresión de PD-L2 está restringida a células presentadoras de antígeno como CD8 y macrófagos, y a linfocitos TH2. Aunque PD-L1 es el ligando principal para PD-1, PD-L2 puede competir con éste debido a que la unión de PD-L2 con PD-1 es de una afinidad de entre 2 y 6 veces mayor que la afinidad de unión entre PD-1 y PD-L1¹⁹. Si ambos ligandos tuviesen el mismo nivel de expresión, probablemente PD-L2 sería una fuerte competencia de PD-L1 por PD-1. No obstante, la relevancia fisiológica de esta competencia no es del todo clara. El hecho de que PD-L2 sea expresado a niveles inferiores que PD-L1 hace que el último sea favorecido como el ligando principal de PD-1, a no ser durante las respuestas del tipo TH2 en donde la expresión de PD-L2 aumenta²⁰. Además de la unión con PD-1, ambos ligandos pueden interactuar con B7.1. En el caso de PDL-1, la interacción con B7.1 involucra una región diferente al sitio de unión con PD-1, y aunque inferior a la afinidad de la interacción CTLA4-B7.1, la interacción, PDL-1-B7.1 es de mayor afinidad que la interacción CD28-B7.1, y por tanto el PDL-1 expresado sobre LT podría actuar compitiendo

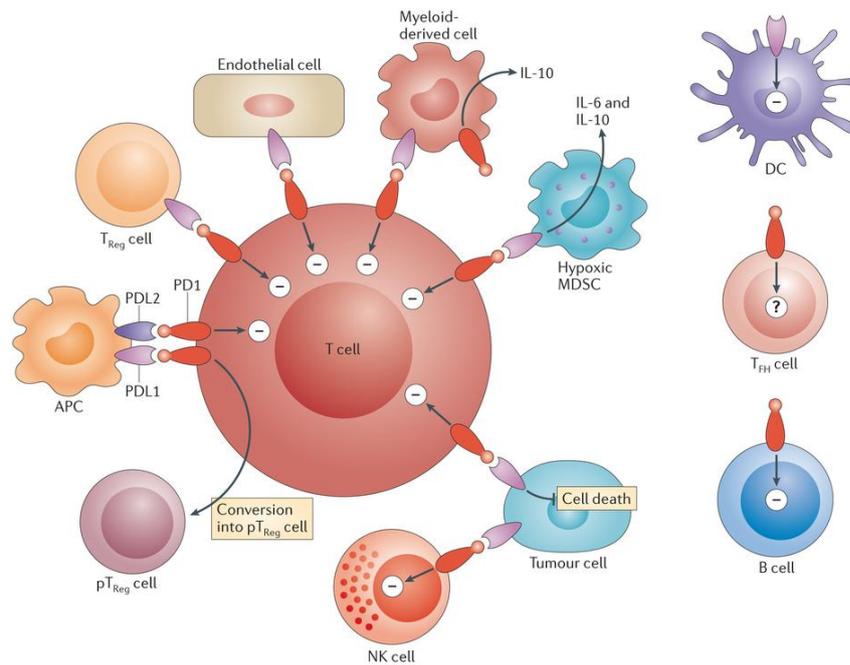
con la interacción B7.1-CD28, la cual es una señal de suma importancia para la activación de las células T ²¹.

1.4 Función e importancia del eje PD-1:PD-L1:

La activación y las funciones efectoras de las células T son rigurosamente controladas mediante una compleja red de señales positivas y negativas mediadas por moléculas co-estimuladoras y co-inhedoras, respectivamente. La señalización mediante moléculas co-inhedoras ayuda a prevenir respuestas inmunes desmesuradas tanto en duración como en intensidad²². Entre las moléculas co-inhedoras claves de los linfocitos T, se encuentran CTLA-4, el cual controla las etapas tempranas de la activación de estas células, y PD-1, el cual tiene un rol en la fase tardía y particularmente en situaciones de activación crónica de la respuesta T ⁶. En contexto fisiológico, la regulación mediante PD1:PD-L1 es de suma importancia para mantener la homeostasis del sistema inmune²³. Por un lado, impidiendo fenómenos de autoinmunidad mediante el control de la activación de células autorreactivas y la promoción del desarrollo y funcionalidad de las células T reguladoras, pero también limitando el posible daño vinculado a la activación exacerbada de los linfocitos efectoras^{24,25}. PD-1 cumple además un rol regulatorio tanto en la tolerancia periférica como en la selección tímica de linfocitos T, participando en la modulación de la selección positiva de los timocitos durante la transición de células doble negativas a la etapa CD4⁺CD8⁺ doble positiva²⁶. Se ha sugerido que la unión de PD-1 con PD-L1 durante el proceso de selección positiva de los timocitos inhibe las señales mediadas por TCR de esta manera reduciendo el número de timocitos que reciben señales estimuladoras del TCR para inducir su maduración²⁷. Por su parte, PD-1 es crítico en el proceso de tolerancia periférica, impidiendo el desarrollo de LT CD4⁺ y -CD8⁺ autorreactivos.

Se ha postulado que PD-1 puede directamente inhibir la aparición de células T autorreactivas durante la proliferación homeostática ya que se ha visto en un modelo murino, que el destino final de estas células (con alta expresión de PD-1) durante este proceso es la apoptosis²⁸. La importancia de estos receptores también se vincula al desarrollo y actividad de los linfocitos T reguladores (Tregs)²⁹. Las Tregs CD4⁺Foxp3⁺ expresan altos niveles de PD-1 en sus membranas, y numerosos estudios han confirmado que el eje PD-1:PD-L1 cumple un rol importante en la generación de estas células reguladoras²⁵. La unión de PD-L1 a sus receptores (PD-1 y posiblemente B7-1) en LT vírgenes induce la generación de Tregs, en parte inhibiendo la señalización mediante TOR/Akt. El rol de PD-1 en la generación de Tregs está parcialmente mediado por la activación de SHP1/2 intracelular y la consecuente reducción de la fosforilación de STAT1 favoreciendo de esta manera la expresión de Foxp3³⁰.

La interacción del receptor PD-1 expresado en células T efectoras con PD-L1 o PD-L2 expresados sobre la superficie de células presentadoras de antígenos (CPAs) (Ver **Figura I**) inhibe la funcionalidad de las mismas. Se ha visto que CPAs transfectadas con PD-L1/L2 son capaces de inhibir la respuesta de células T mientras que el bloqueo de PD-L1/L2 en células dendríticas u otras CPAs aumenta la capacidad de las mismas para estimular células T *in vitro*, en comparación con CPAs sin transfectar³¹. A su vez, LT deficientes en PD-1 son hiper-reactivos en comparación con LT normales. Estas interacciones de carácter inhibitorio participan tanto durante la migración de las células T hacia el sitio de inflamación como en la regulación de la respuesta en el propio tejido inflamado²⁴. No obstante, el rol principal de PD-1 es suprimir la actividad de células T efectoras.



Nature Reviews | Immunology

Figura I. Interacción de células del organismo con linfocito T mediante vía PD-1:PD-L1. En condiciones fisiológicas, en la periferia, y en respuesta a estímulos como el del IFN gama, distintas células expresan el ligando para PD-1 (PD-L1) como vía de control de la respuesta en linfocitos T. Extraída de Nguyen et al³².

La unión de PD-1 con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) atenúa las señales provenientes del TCR y otras señales coestimuladoras de carácter esencial para la activación de los LT. Cuando la cola citoplasmática del receptor PD-1 es fosforilada tras la unión del ligando, la fosfatasa SHP-2 (y posiblemente SHP-1) son reclutadas hacia el dominio ITSM de la cola citoplasmática, el cual se encuentra fosforilado permitiendo así la defosforilación de CD3zeta, SAP-70, PI3K y PKC θ , entre otras, que son proteínas esenciales en la activación de las células T²¹. Aunque el dominio ITIM de PD-1 es un dominio comúnmente encontrado en la mayoría de los receptores inhibitorios, la función exacta del mismo sobre la supresión de la respuesta inmune mediada por PD-1 no está del todo clara (Ver **figura II**).²¹ La señalización mediante PD-1 ejerce un gran

efecto en la producción de citoquinas por parte de las células T lo cual ayuda a limitar su actividad. La activación de PD-1 inhibe la producción de IFN- γ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), e IL-2 principalmente³³. La inhibición de esta última afecta directamente la capacidad de proliferación de los LT, mientras que la disminución de la producción de IFN- γ y TNF- α limita las funciones efectora de las células T. Pero además, PD-1 disminuye la expresión de los factores de transcripción BATF, GATA-3, Tbet y Eomes, los cuales también están asociados a la función efectora de estas células²⁰.

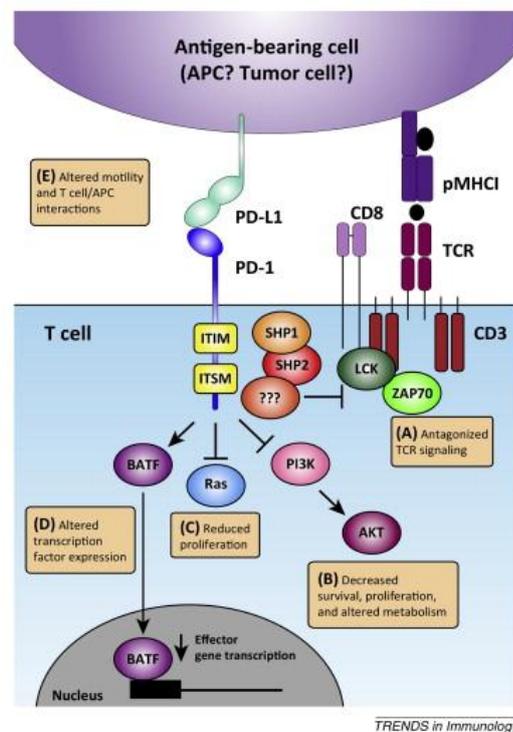


Figura II. Señalización intracelular de la vía PD1:PD-L1. Muestra interacción entre un linfocito T y una célula presentadora de antígenos o célula tumoral. Cuando PD-1 interactúa con PD-L1, las fosfatasa SHP2 y posiblemente SHP1 son reclutadas hacia el dominio ITSM de la cola citoplásmica de PD-1 desfosforilando proteínas vitales para la activación de la célula T. Extraído de Pauken et al³⁴.

Se ha visto que PD-1 participa además en la regulación de la activación de los linfocitos B³⁵, y como lo dice su nombre tiene un rol en la muerte celular programada de estas células. El efecto sobre linfocitos B puede estar directamente relacionado a la expresión de PD-1 en éstas células, o indirectamente relacionado a los efectos que cause PD-1 en células T. La interacción entre células T y B implica el reconocimiento de los complejos MHC-péptido por parte de LT colaboradores, los cuales estimulan la expansión de células B y su diferenciación a plasmocitos, participando por ende en los procesos de cambio de clase y maduración de la afinidad de los anticuerpos producidos por estas células. Si la actividad de la célula T colaboradora se encuentra afectada por la interacción de PD-1 con sus ligandos, éste no va a poder interactuar con el complejo MHC-péptido expresado en el LB y por ende no va a ser capaz de activar a estas células, impidiendo su diferenciación a plasmocitos. Por otra parte, se ha visto que durante la activación mediada por TLR-9 (Toll-like receptor-9) en células B, el bloqueo de la vía PD-1:PD-L1 promueve un incremento en la activación del linfocito, en su capacidad de proliferación y en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.³⁶

1.5 Rol del eje PD-1:PD-L1 en contextos crónicos

Como se ha mencionado anteriormente, PD-1 es un receptor inhibitorio que se encuentra expresado en células T, principalmente, en etapas avanzadas de la activación de las mismas³². Justamente, una de sus funciones principales es regular negativamente las respuestas exacerbadas mediadas por linfocitos T, controlando así la auto-reactividad. Así, ante la exposición al antígeno, los linfocitos T deficientes en PD-1 demuestran una tasa de proliferación aumentada en comparación con las células T con expresión normal de PD-1³⁷. En contextos crónicos, como lo son infecciones virales crónicas o cáncer, esto se manifiesta induciendo un estado especial, de “agotamiento”, que adquieren las células T. El estado de “agotamiento” de células T se

desarrolla de forma progresiva y esta principalmente caracterizado por la pérdida de las funciones efectoras del linfocito T³⁸. Las células T agotadas exhiben, a su vez, propiedades proliferativas alteradas y distintos requisitos de mantenimiento celular, debido a que sufren un desarreglo metabólico y poseen un estado transcripcional distinto al de las células T efectoras funcionales, lo que los lleva a su vez, a expresar receptores inhibitorios que regulan negativamente la respuesta³⁸. En los casos más extremos de infecciones virales crónicas, las células T anti-virales decrecen en número progresivamente hasta ser indetectables. Uno de los primeros signos de agotamiento en linfocitos T es la pérdida de la producción de interloquina-2 (IL-2)³⁸. A su vez, la producción de otras citoquinas, tales como el TNF-alfa, también es disminuida. Si bien la producción de IFN-gamma y posiblemente las funciones citotóxicas del linfocito T son resistentes a la inactivación, en los casos más severos de agotamiento, estas funciones también se pierden.³⁹ La expresión de receptores inhibitorios en los LT está relacionado fisiológicamente con procesos regulatorios. En el contexto de homeostasis inmune, los receptores inhibitorios co-evolucionaron con las moléculas estimuladoras para formar un complejo sistema compuesto de señales negativas y positivas mediando la estimulación a través del TCR. Esto permite realizar un fino control sobre la intensidad y potencia de activación de células T que juega un rol importante en la homeostasis, y en la preservación de los tejidos ante la autoinmunidad²². Como consecuencia, se ha visto que ratones deficientes en PD-1 desarrollan enfermedades autoinmunes como lupus o cardiomiopatías^{40,41}, y cuando los mismos son infectados con patógenos que establecen una infección crónica como LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica) o *Mycobacterium tuberculosis*, se desarrollan fuertes reacciones inmuno-patológicas que terminan con la muerte del ratón en cuestión de días o semanas^{40,42}. El “agotamiento” de células T mediado por la activación de PD-1 cumple un rol importante en infecciones persistentes. Si bien las células T “agotadas” son incapaces

de desplegar las actividades anti-virales asociadas con la capacidad efectora de estas células, de esta forma se limitan los efectos adversos de la hiper-activación de células T, como lo es el daño tisular mediado por una secreción sostenida de citoquinas pro-inflamatorias³⁹. Por otro lado la transición a un estado de “agotamiento”, permite mantener esta valiosa población de células T con capacidad de reconocimiento anti-viral que, aunque en forma disminuida, continúa ejerciendo una presión inmunológica sobre la infección, y que en ciertos contextos de evolución de la infección puede reactivarse.^{43,44}

En forma similar a lo que ocurre con los procesos virales crónicos, el fenómeno de “agotamiento” de células T también ocurre en cáncer. Las células cancerosas expresan neo-antígenos tumorales, o sobre-expresan antígenos normales, como consecuencia de su propia inestabilidad genética (alta tasa de mutación, crecimiento descontrolado, y desregulación a nivel epigenético)⁴⁵⁻⁴⁷. En etapas tempranas de la transformación celular, el sistema inmune adaptativo es capaz de reconocer estos neo-antígenos y de montar una eficiente respuesta inmune antitumoral. Esta respuesta está principalmente mediada por las células T citotóxicas, pero potenciada por la actividad de las células T CD4+. De hecho, se postula que muchos tumores son eliminados por estos mecanismos de inmunovigilancia⁴⁸, y no llegan a detectarse clínicamente⁴⁹. Sin embargo, dada la alta presión inmunológica selectiva sobre las células transformadas, eventualmente alguna variante celular transformada en estadíos tempranos escapa de la vigilancia tumoral al comenzar a expresar moléculas que “enmascaran” al tumor frente al sistema inmune, dejándolo incapaz de destruirla. Dentro de los múltiples mecanismos que se implementan en las células tumorales bajo dicha presión selectiva, se encuentra la desregulación de la expresión normal de PD-L1, que tiene como consecuencia su expresión en altos niveles y de forma constitutiva en la membrana celular. De esta manera, las células

citotóxicas activadas específicas de tumor, que reconocen neo-antígenos, son incapaces de ejercer su acción destructiva sobre la célula a la cual reconocen, ya que los altos niveles de señalización por la vía PD-1:PD-L1 inhiben la señalización por sus TCR, dejándolas en un estado de inactivación funcional⁵⁰. Cuando las células T activadas llegan al microambiente tumoral, secretan citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , lo que provoca la regulación a la alta de PD-L1 sobre la superficie de células cancerígenas⁵¹, por lo cual se genera un círculo vicioso, en el cual la sobre-expresión de PD-L1 en células tumorales, y PD-1 en linfocitos T se ven retroalimentada positivamente por la interacción entre ellas. Este es un claro mecanismo de escape tumoral en donde el tumor “evolucionó” en el contexto de la presión selectiva del sistema inmune, logrando evadir la respuesta anti-tumoral y creando así un microambiente tumoral apto para su crecimiento⁵⁰. No obstante, este estado disfuncional de las células T puede ser revertido, por ejemplo si las células dejan de recibir estímulos a través de PD-1. Es justamente esto lo que convirtió al bloqueo de la interacción de PD-1:PD-L1 en un blanco sumamente atractivo para la terapia anti-tumoral, lo que ha sido confirmado por el éxito de los anticuerpos anti PD-1 o PD-L1 recientemente aprobados por la FDA⁵ (ver **figura III**).

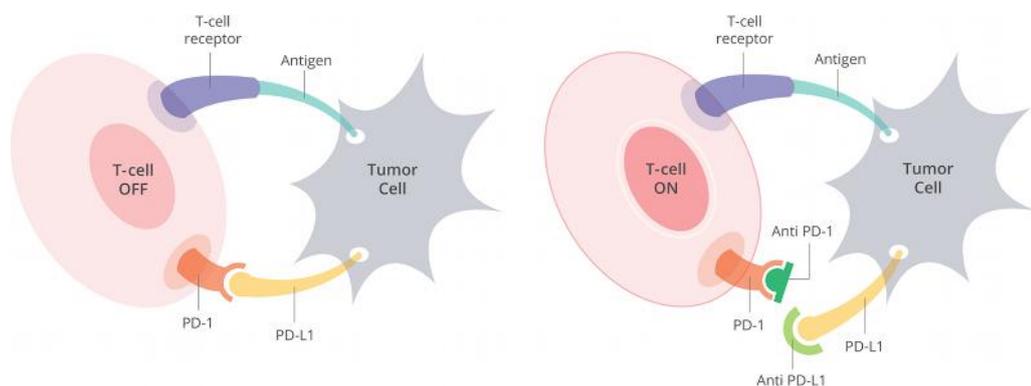


Figura III. Efecto de los anticuerpos bloqueantes tanto de PD-1 como de PD-L1 en linfocitos T. Cuando PD-1 expresado sobre la superficie del linfocito T interacciona con su ligando PD-L1 sobre una célula tumoral, el linfocito adquiere

un estado de “agotamiento”. Sin embargo, si un anticuerpo bloquea alguno de estos dos receptores (PD-1 o PD-L1), la célula T podrá adquirir su estado activo nuevamente. Extraída de Shin et al⁵².

1.6 Receptores celulares reguladores de la inmunidad como blanco de terapias anti-tumorales

Como se ha mencionado, los tumores evaden la respuesta inmune reclutando mecanismos de regulación, que en condiciones fisiológicas sirven para evitar el desarrollo de autoinmunidad y de daño tisular⁵³. Para esto, las células tumorales expresan ligandos para una variedad de receptores inhibidores que son expresados en las células T activadas, entre los que figuran CTLA-4, BTLA, LAG-3, TIM-3 y PD-1. CTLA-4 fue el primer target para ser usado en terapias anti-tumorales que regulan negativamente la respuesta inmune. Este receptor es regulado al alta durante la activación de células T, expresado tempranamente durante la respuesta, y su expresión amortigua esta activación mediante la competencia con CD28 por la unión de CD80 y CD86. Anticuerpos bloqueantes de CTLA-4 promueven la respuesta inmune no solo potenciando la activación de células T efectoras sino también interaccionando con otras células inmunes, por ejemplo provocando la inhibición de linfocitos T reguladores, los cuales poseen propiedades inmuno-supresivas⁵⁴. Sin embargo, la administración sistémica de anticuerpos bloqueantes de CTLA-4 no está exenta de potenciales efectos adversos relacionados con la exacerbación de diferentes respuestas inmunes. En pacientes en los que se ha administrado anticuerpos bloqueantes de este receptor, se ha visto que los efectos adversos constaron, principalmente de colitis e hipofisitis⁵⁵, ocasionados por la inducción de una inflamación de naturaleza autoinmune. Desgraciadamente, esta toxicidad no se co-relacionó con la obtención de un beneficio terapéutico, ya que muchos pacientes experimentaron efectos adversos sin actividad anti-tumoral⁵⁶.

Más recientemente, el desarrollo de agentes bloqueantes de la vía PD-1:PD-L1 ha surgido como una interesante alternativa al bloqueo de CTLA-4. Aunque podría ser utilizado para el tratamiento de infecciones virales crónicas⁵⁷, el tratamiento del cáncer ha sido el foco principal de atención de estos agentes.³² Entre estos es de destacar el anticuerpo terapéutico nivolumab contra PD-1 (Opdivo; BristolMyers Squibb/Ono Pharmaceuticals), el cual ha sido recientemente aprobado en Japón y EEUU, y el anticuerpo anti-PD1 pembrolizumab (Keytruda; Merck & Co.) también aprobado por la FDA en Estados Unidos para el tratamiento de melanoma metastásico. A esto se suma la reciente aprobación de atezolizumab (Tecentriq, Genentech), un anti-PD-L1 para el tratamiento del carcinoma urotelial.

En contraste a CTLA-4, PD-1 tiene una expresión reducida a células T activadas por lo que su bloqueo tendría una acción más restringida frente a CTLA-4 para las terapias antitumorales. Es por esta razón que se encuentran reportados más efectos adversos asociados al bloqueo de la vía de CTLA-4 que los asociados al bloqueo de la vía PD-1:PD-L1. Además, se ha visto que en pacientes con melanoma avanzado, la administración de anticuerpos que bloqueen la vía PD-1:PD-L1 han tenido mayor efectividad terapéutica que aquellos anti-CTLA-4. A su vez, también se encuentra reportado un mayor aumento en la supervivencia de los pacientes administrados con pembrolizumab (anti-PD-1) que con ipilimumab (anti-CTLA-4): 74% versus 58%⁶.

Como se explicó anteriormente, PD-1 se puede unir tanto a PD-L1 como PD-L2 y se ha visto que la unión a estos ligandos posee funciones distintas. Estos efectos biológicos distintos pueden contribuir a las diferencias en actividad y toxicidad de anticuerpos dirigidos a bloquear PD-1 o los dirigidos a bloquear PD-L1⁶. La inhibición de PD-L1 específicamente, en contrario a la inhibición de PD-1, bloquearía la vía PD-1:PD-L1 mientras que preservaría la interacción PD-1:PD-L2. Esto

tiene el potencial de proveer un bloqueo mas dirigido y por ende conlleva un menor grado de toxicidad⁵⁸, dado que se preserva la auto-tolerancia promovida por la interacción entre PD-1 y PD-L2. Por otro lado, como se ha comentado, PD-L1 interacciona tanto con CD80 así como con PD-1 de manera de inhibir la activación en células T, por lo que un bloqueo eficiente de PD-L1 podría teóricamente impedir además la regulación a la baja de linfocitos T dada por la interacción entre PD-L1 y CD80, y no solo en este tipo celular, sino también en otras células como es el caso de las dendríticas. Otra ventaja de la vía PD-1:PD-L1 respecto a la vía CTLA-4 es su potencial uso como biomarcadores. Una frustración importante que se ha manejado con los anticuerpos anti-CTLA-4 es la inhabilidad para predecir cuales pacientes son los más propensos a responder⁵⁹ y beneficiarse del tratamiento debido a los bajos niveles de expresión de CTLA-4 en forma inducible y el amplio espectro de expresión de sus ligandos. En contraste, la regulación a la alta de PD-1 en células T “agotadas” y del ligando PD-L1 en células cancerosas o células inmunes que infiltren el tumor, conlleva el potencial de identificar el grado con el que los pacientes podrían responder al bloqueo de PD-1:PD-L1⁶⁰.

Los anticuerpos anti-PD-1 administrado de forma sistémica, han demostrado revertir el estado disfuncional de células T (parcial o totalmente) en modelos animales y en ensayos clínicos, principalmente al utilizar estrategias combinadas de tratamiento⁶¹, como la co-administración con quimioterapia, con agentes de maduración de las células dendríticas, o con otros anticuerpos bloqueantes de receptores co-inhibidores^{32,62}. Al presente una estrategia muy promisoriosa es la combinación del bloqueo de PD-1 con el de CTLA-4. La inhibición de ambas vías teóricamente es capaz de inducir la proliferación de un mayor número de linfocitos T tempranamente durante la respuesta inmune, podría recuperar la actividad de aquellas células T que sufren un estado de inactivación y a su vez reducir la inmunosupresión mediada por

Tregs⁶³. Así por ejemplo, un estudio realizado en pacientes que padecían melanoma en etapas avanzadas combinó el anticuerpo nivolumab (anti-PD-1) con el ipilimumab (anti-CTLA-4). En este estudio, el 31% de los pacientes administrados con estos anticuerpos tuvieron >80% de mejora en el pronóstico de vida.⁶³ A pesar de que el bloqueo de ambas vías de control de la activación de células T es altamente deseable, la combinación de ambos tratamientos podría resultar altamente tóxica por lo que queda mucho por avanzar^{6,64}.

1.7 Anticuerpos mono-dominio como alternativa para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos

Si bien, la mayoría de los agentes utilizados para terapia anti-tumoral son anticuerpos convencionales, una interesante alternativa para el descubrimiento y generación de anticuerpos terapéuticos está vinculada a la existencia de un tipo especial de anticuerpos que carecen de cadena liviana y que tienen propiedades biofísicas excepcionales⁶⁵. Además de los anticuerpos convencionales, los camélidos (y también algunas especies de peces cartilagosos) presentan anticuerpos mono-dominio carentes de cadena liviana⁶⁶ (ver **figura IV**). El sitio de unión al antígeno presente en estos anticuerpos está formado únicamente por el dominio variable de la cadena pesada (VHH o nanobody), y aún así, la afinidad de unión es similar a la de los anticuerpos convencionales⁶⁷.

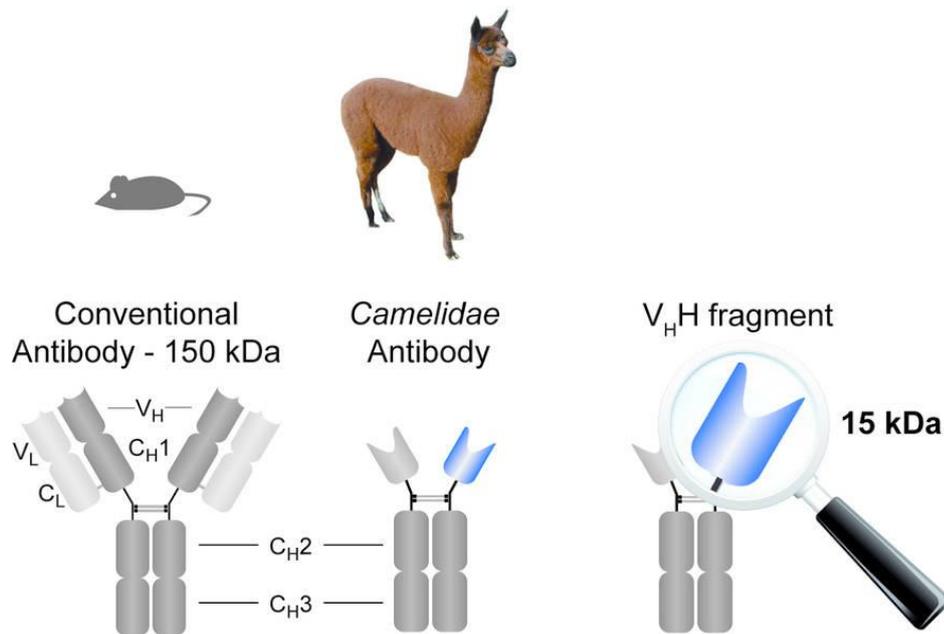


Figura IV. Diagrama esquemático de las estructuras de un anticuerpo convencional comparado con un anticuerpo de cadena pesada de llama.

El anticuerpo convencional está formado por dos cadenas pesadas y dos livianas, en el cual el sitio de unión al antígeno está formado por los dominios V_H y V_L mostrados en la figura. El anticuerpo de cadena pesada está compuesto solamente por dos cadenas pesadas carentes del dominio C_H1, las cuales poseen un dominio variable (V_HH) encargado del reconocimiento del antígeno.

Los V_HHs, se expresan fácilmente en forma soluble en el periplasma de *E. coli* como fragmentos recombinantes denominados nanobodies. Sus niveles de expresión son mucho más altos que los fragmentos de anticuerpos convencionales, son en general mucho más robustos⁶⁸ y debido a su naturaleza de cadena simple resultan muy adecuados para la preparación de quimeras fusionándolos a distintos polipéptidos. Una ventaja esencial desde el punto de vista de su obtención es que la preparación de bibliotecas de expresión en fagos (*phage display*) de nanobodies se realiza con gran eficiencia. Esto es debido a que al momento de la construcción de bibliotecas, para los anticuerpos convencionales, el apareamiento original de la cadena pesada y la cadena liviana se pierde fácilmente en las etapas de amplificación y

clonado, debido a que son codificadas por genes distintos y la probabilidad de reencontrar el mismo apareamiento es muy baja. En cambio, para los VHHs, debido a su naturaleza de cadena simple, el fenómeno de “barajado” de los dominios variables livianos y pesados no ocurre, por lo que el mantenimiento de la especificidad original del anticuerpo mono-dominio se conserva y por ende este altamente representado en la biblioteca de VHHs, facilitando así su selección⁶⁹.

Por otro lado, el dominio VHH tiene alta similitud con el dominio variable de la familia VH3 de la cadena pesada de las inmunoglobulinas humanas, por lo que su inmunogenicidad es muy baja⁷⁰, haciéndolo de esta manera una herramienta apropiada para su uso en humanos. Sumado a esto, se han desarrollado estrategias para humanizar 12 de los 14 aminoácidos que difieren entre los VHHs de llama y el VH humano⁷¹.

Otra propiedad interesante de los nanobodies, es la existencia de un CDR3 largo y altamente flexible, lo que facilita la interacción con epítopes cóncavos. Esta topografía se encuentra típicamente en los sitios activos de enzimas o receptores^{72,73}, y es debido a esto que los nanobodies surgen como una poderosa herramienta para la selección de anticuerpos con capacidad antagonista/agonista de variados receptores, que permitan descubrir el potencial terapéutico de nuevos blancos. Esto, junto a sus ventajosas propiedades biofísicas y a la facilidad de selección y escalado de su producción, los convierte en una alternativa para la producción de anticuerpos terapéuticos⁷⁴. Por otro lado, su pequeño tamaño (aproximadamente 15 KDa) es una ventaja a ser explotada en terapias anti-tumorales, debido a que muchos tumores sólidos resultan inaccesibles para moléculas de gran tamaño como los anticuerpos convencionales. Particularmente en los casos en que el mecanismo predominante de su accionar sea como agentes neutralizantes.

Finalmente, los VHHs pueden ser utilizados como potentes herramientas de diagnóstico *in vivo*. Su pequeño tamaño que facilita su rápida biodistribución sumado a su posterior eliminación renal, así como el hecho de que pueden ser fácilmente conjugados a isótopos radioactivos, los convierte en excelentes herramientas para imagenología⁷⁵. Como fue mencionado anteriormente, al poder penetrar a lugares menos accesibles, los nanobodies serían más sensibles en la detección de pequeños tumores no detectables por otras técnicas. También podrían dar lugar a aplicaciones de diagnóstico *in vitro*, por ejemplo para determinar la expresión del receptor PD-L1 en biopsias de tumores por histoquímica, o por citometría en tumores hematológicos, pudiendo así discernir sobre qué tipos de tumores se expresan estos receptores y por lo tanto cuáles de ellos serían susceptibles a terapias que involucren el bloqueo de la interacción PD-1:PD-L1.

1.8 Fundamentos del *Phage Display*

Para realizar la selección de nanobodies, previamente se realiza una biblioteca de fagos mediante el clonado de los genes de los VHHs amplificados en el vector fagémido pComb3X (Ver **figura V**) el cual fue gentilmente cedido por el Dr. Barbas (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA). Como se observa en la **figura V**, este plásmido contiene dos sitios de corte distintos para la enzima de restricción Sfi I, de tal forma que el gen de los VHHs clonados queda fusionado a una de las proteínas de la cápside del bacteriófago. En este caso, el VHH se expresará sobre la proteína pIII de la cápside del bacteriófago de manera que queda expuesta hacia el exterior de la partícula viral. Este vector contiene dos tags para detección de la proteína en cuestión, los cuales se encuentran ubicados entre la secuencia de pIII y la del VHH. Dichos tags son un epítotope de hemaglutinina (HA) y un tag de seis histidinas (His6x). Cabe resaltar que el plásmido contiene hacia el N-terminal del VHH una secuencia de exportación al periplasma llamada OmpA. La transcripción

de los genes codificantes de los VHHs se encuentra bajo regulación del promotor del operón lac, el cual se induce en presencia de lactosa o un isómero de lactosa, como el isopropil-b-D-tiogalactósido (IPTG).

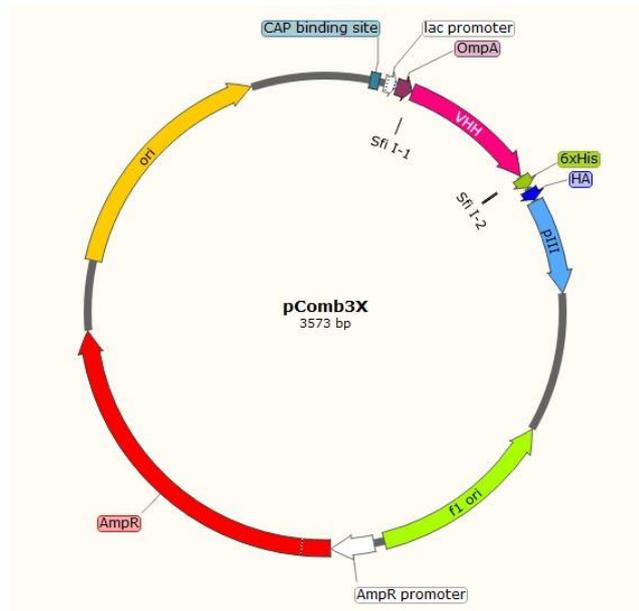


Figura V. Diagrama esquemático del vector pComb3X. La expresión del VHH se encuentra regulada por el promotor del operón lac, el cual es inducido en presencia de IPTG. El VHH se expresa asociado a una secuencia señal de localización periplasmática (OmpA), a dos tags (una cola de seis histidinas y un epítipo HA) y al dominio N-terminal de la proteína pIII de la cubierta del fago.

Al utilizar un vector del tipo fagémido, está implícito que por más que se transformen bacterias con dicho vector, la partícula viral no se producirá a menos que se co-infecte con un vector llamado fago *helper*, el cual permite el correcto empacamiento del DNA y formación de la cápside completa del bacteriófago. Es por esta razón que se electroporaron bacterias *E. coli* ER2738 (Lucigen Corporation) con el vector pComb3X y luego las mismas fueron expuestas a un proceso de infección por el fago *helper*, el cual proporciona el resto de las proteínas de la cápside, incluyendo pIII sin fusionar. Esto permite que cada fago producido exponga entre 2-3 fusiones de pIII-VHH. Una vez obtenida la partícula viral expresando los nanobodies fusionados a su cápside, se comienzan

las etapas de exposición al antígeno de interés permitiendo de esta manera seleccionar aquellos fagos (y por lo tanto aquellos VHHs) que reconozcan específicamente al blanco de interés.

1.9 Objetivo general

Es por estas razones mencionadas anteriormente, que en el marco de la tesina de grado se propone la obtención de nanobodies que bloqueen efectivamente la interacción de PD-1 con PD-L1 para su potencial aplicación en terapia anti-tumoral.

1.10 Objetivos específicos

- Inmunización de una llama y seguimiento del título de anticuerpos totales contra hPD-L1.
- Creación de una biblioteca de nanobodies expresados en fagos filamentosos obtenida a partir de la llama inmunizada.
- Selección de fagos que expresan nanobodies anti-hPD-L1.
- Clonación de los genes de los nanobodies seleccionados en vectores de expresión fuerte en procariontes.
- Expresión y purificación de diferentes nanobodies.
- Screening de clones mediante técnicas de ELISA y citometría de flujo.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Buffers y soluciones

- Buffer fosfato salino (PBS) 10X: 2 g KCl, 11 g Na₂HPO₄ y 80 g de NaCl en agua destilada c.s.p. 1 litro, pH=7,5.
- Buffer Tris-acetato (TAE) 50x: 242 g Tris base, 57,1 mL ácido acético glacial y 100 mL EDTA 0,5 M en agua MiliQ c.s.p. 1 litro, pH=8,0.
- Buffer de carga 6X para geles de agarosa: 0,7 mL TAE 50X, 1,5 mL glicerol y 12,5 mg azul de bromofenol en agua miliQ c.s.p. 5 mL
- Polietilenimina (PEI): Para solución stock 1mg/mL: Disolver polvo (#23966, Polysciences Inc) en agua MiliQ. Ajustar pH=7,0 con HCl y esterilizar mediante filtración (0,22 µm).
- Flow Cytometry Buffer (FCB): 1 % seroalbúmina bovina (BSA), 0,03 % azida de sodio, 25 mM HEPES, en PBS c.s.p 250 mL, pH= 7,4
- Sustrato para la enzima peroxidasa (PO) – revelado de ELISA: TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina): 200 µL solución 6 mg/mL de TMB (#T2885, Sigma Aldrich) en dimetilsulfóxido (DMSO), 50 uL de H₂O₂ 1% y 12,5 mL de buffer acetato 0,1 M pH=5,5.

2.2 Medios de cultivo

- Luria Bertani broth (LB): #L3152, Sigma Aldrich.
- Luria Bertani agar (LB agar): #L3027, Sigma Aldrich.
- Super Broth (SB): 30 g triptona (#T7293, Sigma Aldrich), 20 g extracto de levadura (#09182, Sigma Aldrich), 10 g MOPS (#M3183, Sigma Aldrich), en agua MiliQ c.s.p. 1 L, pH=7,0.
- Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC): 20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 0,5 g NaCl, en agua MiliQ

c.s.p. 1 L, pH=7,0. Luego de autoclavar, agregar 10 mL $MgCl_2$ 1 M y 20 mL de glucosa 1 M previamente filtrados.

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): 3,7 g $NaHCO_3$, 3,5 g glucosa, 100 mL suero fetal bovino (SFB), 10 mL antibiótico Pen-Strep en agua MiliQ c.s.p 1 litro, pH=7,4. Filtrar.

2.3 Inmunización de Llama y generación de una biblioteca de fagos

2.3.1 Inmunización

Cabe resaltar que la etapa de inmunización de la llama fue realizada previo al comienzo de la tesina de grado. Para esto, se inmunizó una llama hembra adulta con una línea celular derivada de células HEK293 (ATCC), la cual fue establamemente transducida con un lentivirus de forma de que la misma expresara constitutivamente el ligando hPD-L1 (origen humano) sobre su membrana (cortesía de la Dra. Gloria Aseguiolaza, Universidad de Navarra, España). La dosis utilizada para la inmunización fue de aproximadamente 60×10^6 células en PBS. A su vez, es importante destacar que la llama fue inmunizada con otra línea celular de ratón derivada de cáncer de colon llamada CT26 (ATCC) que expresa en forma importante el receptor mPD-1 (origen murino). El cronograma de inmunización constó de una primera dosis al día 0 seguido de dos dosis (boosters) separados por 30 días aproximadamente. Tres semanas luego de la última dosis se recolectaron 150 mL de sangre de la llama para generar la biblioteca correspondiente.

2.3.2 Titulación de anticuerpos totales contra antígeno de inmunización

La titulación de anticuerpos es de vital importancia para determinar si la llama inmunizada presentó respuesta contra el antígeno de interés.

En este caso, como se deseaba comprobar si la llama respondió a hPD-L1, se realizó la titulación contra un extracto de células provenientes de la línea de expresión estable mediante ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay -Ver **figura VI**). Para ello, se sensibilizó una placa de ELISA a 4°C overnight (ON) con 100 µl del extracto de células HEK293-hPD-L1, obtenido luego de lisar dichas células con un buffer de lisis. Se bloquearon los pocillos de la placa de ELISA con BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente, se incubó a 4°C con el suero obtenido de la llama inmunizada durante 60 minutos. El siguiente paso fue agregar un anticuerpo anti-llama producido en el laboratorio. Este anticuerpo reacciona no sólo con los anticuerpos del tipo monodominio, sino también con anticuerpos convencionales de llama, y por tanto el ELISA determina los anticuerpos anti-hPD-L1 totales de llama. Finalmente, para revelar se utiliza un anticuerpo comercial anti-ratón producido en conejo que se encuentra conjugado a la enzima peroxidasa. Cabe destacar que todas las incubaciones con anticuerpos o sueros (conteniendo anticuerpos) fueron realizadas a 4°C durante una hora en agitación y entre cada incubación se realizaron 3 rondas de lavados con un buffer consistiendo en PBS-Tween 0,05%. Luego se procedió a revelar el ensayo al agregar el TMB.

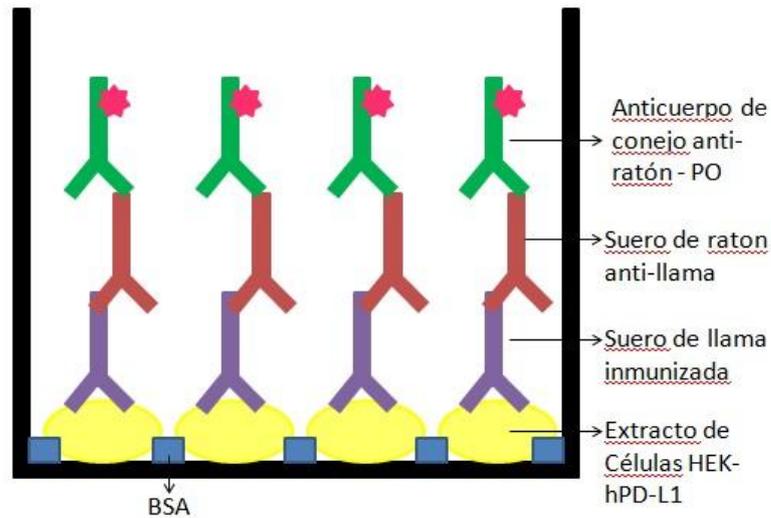


Figura VI .ELISA realizado para medir el título de anticuerpos totales. Se utilizó un extracto de células HEK-hPD-L1 de expresión estable y fue incubada con el suero de la llama inmunizada. Para la detección se agregó suero de ratón anti-llama y anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a peroxidasa. Para el revelado se utilizó TMB y se midió absorbancia a 450nm.

2.3.3 Preparación de la biblioteca

Los leucocitos mononucleares ($\sim 10^8$) se purificaron utilizando el principio de separación por gradiente de densidad mediante Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich). Luego, se realizó una extracción de RNA de estos leucocitos haciendo uso del reactivo TRIZOL (ThermoFisher), y se procedió a realizar una biblioteca de fragmentos de cDNA mediante la técnica de RT-PCR. Los fragmentos de DNA que codifican la variedad de VHHs fueron amplificados utilizando 4 cebadores directos distintos: VH1, VH3, VH4 y VHArgento y otro cebador reverso genérico (JH) (ver **tabla I**). Los cinco cebadores usados contienen en el extremo 5' de su secuencia un sitio de corte para la enzima Sfi I (subrayado en la tabla I) el cual es distinto entre cebadores directos y el reverso, lo que permite clonar los VHHs en forma dirigida en los vectores correspondientes.

Tabla I. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de los VHHs.

Cebador	Secuencia
VH1	5'CATGCCATGACTCGCGGCCAGGGCGGCCATGGCCCAGGTGC AGCTGGTGCAGTCTGG-3'
VH3	5'CATGCCATGACTCGCGGCCAGGGCGGCCATGGCCGAGGTGC AGCTGGTGGAGTCTGG-3'
VH4	5'CATGCCATGACTCGCGGCCAGGGCGGCCATGGCCCAGGTGC AGCTGCAGGAGTCGGG-3'
VHArgento	5'CGTGGATTGTTATTATCTGCGGCCAGGGCGGCCATGGCCGAT GTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG-3'
JH	5'CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACRGTGACCTG GGTCC-3'

Subrayado se encuentra el sitio de corte para la enzima Sfi I, el cual es distinto para los cuatro cebadores directos comparado al sitio del cebador reverso.

Los genes de los VHHs amplificados se clonaron en el vector fagémido pComb3X cedido por el Dr. Barbas (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA). Para esto, los productos de PCR y el vector pComb3X se digirieron con la enzima Sfi I, y los productos de las diferentes digestiones se analizaron en un gel de agarosa 1%. El DNA proveniente de las bandas correspondientes a los VHHs y al vector se eluyó de la agarosa y fue purificado utilizando un kit comercial (Thermo Scientific). Posteriormente se realizó la ligación de los VHHs con el vector en una relación 3:1 (inserto:vector) durante 4 horas a 22°C utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific). El producto de ligación fue purificado y concentrado por precipitación con

acetato de sodio/isopropanol, y fue electroporado en células *E.coli* ER2738. Las células transformadas se crecieron en 500 mL de SB-ampicilina hasta alcanzar una OD 0.4 UA, y se infectaron con el fago helper M13KO7, luego de 2 horas, se adicionó kanamicina (resistencia aportada por el fago M13KO7) y se crecieron toda la noche. En las condiciones utilizadas, en el proceso de electroporación se asume que cada bacteria es transformada con un solo plásmido, por lo que la misma producirá bacteriófagos que expresen fusionado a la proteína pIII, solamente un clon de VHHs de la biblioteca de fragmentos.

2.3.4. Purificación de fagos

El cultivo en el que se generaron los fagos fue centrifugado a 20000 g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante conteniendo los fagos se adicionó con 0,2 volúmenes de PEG-NaCl (polietilenglicol) y se incubó durante 2 h en hielo. Los fagos precipitados se separaron por centrifugación a 20000 g durante 15 minutos a 4°C. El pellet resultante fue resuspendido en 30 mL de PBS-BSA 3% y finalmente se realizó otra centrifugación a 20000 g durante 15 minutos y a 4°C a modo de descartar posibles restos de bacterias. La suspensión de fagos se suplementó con inhibidores de proteasas (Roche Life Sciences).

2. 4 Cuantificación de biblioteca de fagos filamentosos

Para poder cuantificar los fagos se partió de una alícuota de *E.coli* ER2738 competentes en 3mL de medio SB que se cultivaron en agitación a 37°C. Cuando el cultivo se encontró a una OD 0.4 UA, se tomaron 100 µL del mismo y se procedió a incubarlo durante 30 minutos a 37°C con 10 µL del sobrenadante resultante de la precipitación de fagos o distintas diluciones del mismo, permitiendo de esta manera el proceso de infección de las bacterias por parte de los bacteriófagos. En estas condiciones se asumió que cada bacteria es

infectada por un único bacteriófago. Posteriormente, se plaquearon distintas diluciones de la incubación anterior en placas de agar-ampicilina (resistencia proporcionada por el fagémido) y las mismas fueron incubadas ON a 37°C en estufa de cultivo. Al día siguiente se contaron las colonias crecidas y teniendo en cuenta los factores de dilución apropiados, se calculó la diversidad de la biblioteca generada.

2. 5 *Panning* y *screening*

La técnica de *panning* implica la selección de los fagos que expresan VHHs con especificidad por el antígeno de interés. Para ello se realizan sucesivas rondas de incubación de la biblioteca de bacteriófagos expresando la fusión VHH-pIII con el ligando contra el cual se desean obtener clones; luego se procede a lavar de modo de descartar fagos con uniones inespecíficas al ligando y finalmente se realiza una etapa de elución para obtener aquellos VHHs que reconocen de forma más afín al ligando deseado. Posteriormente se procede a realizar una amplificación de este sobrenadante infectando nuevamente bacterias con el *output* (resultado final del *panning*), de esta manera produciendo un mix de fagos que se encuentre enriquecido en aquellos fagos específicos que se desean seleccionar. Con esta muestra enriquecida se vuelve a realizar el proceso de *panning*, generalmente hasta 2 veces más, y finalmente es necesario realizar un *screening* de los fagos seleccionados para corroborar que los mismos efectivamente reconozcan al ligando deseado.

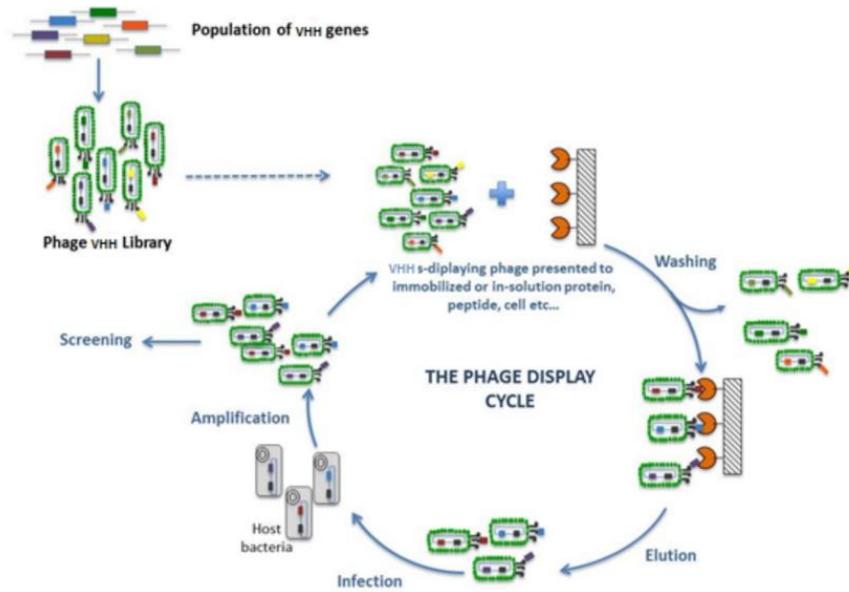


Figura VII. Panning o selección de fragmentos de anticuerpos. Luego de la creación de la biblioteca de fagos filamentosos (mediante clonaje de los genes codificantes para VHHs en el vector de tipo fagémido), se procede a incubar dichos fagos generados con el antígeno de interés. Posteriormente se realizan lavados y una etapa de elución en la que se obtienen VHHs específicos para el ligando de interés. Este output conteniendo los fagos seleccionados es amplificado y utilizado para realizar otra ronda de *panning*. Este ciclo generalmente se repite entre dos y tres veces. Para poder obtener los VHHs específicos de hPD-L1 se realizaron distintos *pannings* simultáneamente.

2.5.1 Primer ronda del primer panning

En el primer *panning*, para aislar VHHs específicos contra hPD-L1 se utilizó la línea celular estable HEK-hPD-L1, que expresa constitutivamente el receptor PD-L1 humano. Para esto se utilizaron 2×10^6 células por ronda de selección. Lo primero que se realizó fue una pre-incubación de la biblioteca de fagos con células HEK293 durante 60 minutos a temperatura ambiente y en rotación constante para eliminar aquellos fagos que reconocían específicamente a componentes presentes en la membrana de dichas células pero no a

hPD-L1. Esta etapa fue necesaria debido a que la llama fue inmunizada con la línea estable derivada de células HEK293, la cual a pesar de estar transducida para que exprese hPD-L1 en mayor representación que otros receptores celulares, también expresa proteínas propias para las cuales seguramente habrán VHHs que las reconozcan. Posteriormente, se centrifugaron las células a 500g durante 5 minutos para separar el pellet (en donde se encontraraban las células unidas a los fagos anti-HEK293), del sobrenadante (conteniendo fagos que no reconocen proteínas expresadas en la membrana de dichas células). Luego se procedió a incubar 2×10^6 células HEK-hPD-L1, en las mismas condiciones de la pre-incubación, con el sobrenadante (teóricamente desprovisto de fagos que reconocen componentes de células HEK293) resultante de la centrifugación anterior. Durante este paso, los bacteriófagos expresando VHHs que reconozcan a hPD-L1 se unirían a dicha proteína. Posteriormente, se realizaron tres tandas de tres lavados cada una con 1 mL de flow cytometry buffer (FCB) a temperatura ambiente para eliminar aquellos fagos que se unen inespecíficamente al ligando deseado. Finalmente, se procede a la etapa de elución de los VHHs seleccionados, la cual se realizó con tripsina (Sigma Aldrich). Para ello se incubó durante 30 minutos a 37°C con 100 uL de la enzima a 10mg/mL.. Esta reacción enzimática debe ser detenida para impedir que la tripsina degrade los VHHs y de mayor importancia, las proteínas del fago utilizadas para la infección (como lo es pIII), y para esto, se incubó con 10 uL a una concentración de 100 mg/mL de inhibidor de tripsina (Sigma Aldrich) durante 10 minutos a 37°C. La fracción de fagos eluída, llamada primer *output*, se utilizó para amplificar y cuantificar los bacteriófagos.

2.5.2 Amplificación del output

La etapa de amplificación tiene el fin de enriquecer la fracción eluída en aquellos fagos obtenidos luego de una ronda de selección, que teóricamente reconocerán con alta afinidad al ligando de interés. Para ello se volvió a realizar una etapa de infección de bacterias electrocompetentes *E.coli* ER2738, obteniendo de esta manera, un sobrenadante en el cual los fagos utilizados para infectar se encuentren mayormente representados. Este primer *output* amplificado es utilizado para realizar otra ronda de *panning* hasta obtener un segundo *output* el cual se encontrara mayormente enriquecido en aquellos fagos específicos, en este caso, contra hPD-L1. Para realizar esto, se incubaron 4µL de bacterias *E.coli* ER2738 en 2mL de medio SB a 37°C hasta que la DO de las mismas se encuentre en el rango 0,8-1,0 UA. Luego se procedió a realizar la infección de las células con los fagos, por lo que se incubaron con 200 uL del primer *output* durante 30 minutos a 37°C y sin agitación. Posteriormente, se tomaron los 2 mL de cultivo infectado con el *output* y éste fue incubado con 10 mL de medio SB, agregando a su vez 8 µL de ampicilina -1/3 de lo necesario- (resistencia proporcionada por el vector pComb3X); luego, se incubó en agitación durante una hora y se agregaron 16 µL de ampicilina, siendo posteriormente incubado durante 60 minutos a 37°C. La siguiente etapa fue infectar el cultivo con 50 µL de fago *helper* e incubar el mismo a 37°C durante 90 minutos. Posteriormente se agregó el antibiótico kanamicina (resistencia aportada por el fago *helper*) – como segundo método de selección- a una concentración final de 50 ng/mL y se incubó en agitación ON. Al día siguiente, el cultivo fue sometido a una centrifugación de 20000g durante 20 minutos, permitiendo así obtener un pellet conteniendo bacterias y un sobrenadante conteniendo fagos

amplificados. Este último fue utilizado para realizar una precipitación con PEG-NaCl como se describió anteriormente.

2.5.3 Titulación del output

Previamente a realizar el segundo *panning* es necesario cuantificar el primer *output*, lo que proporciona una medida de la cantidad de fagos que se obtuvieron, aunque no de la diversidad del mismo. Para ello, se incubaron varias alícuotas de 100uL de *E.coli* ER2738 con distintas diluciones seriadas del *output* a titular durante 30 minutos a 37°C y posteriormente fueron plaqueadas en placas de agar-ampicilina y cultivadas a 37°C ON. Al día siguiente se realizó el conteo de colonias crecidas y se calculó la cantidad de unidades formadoras de placa/mL (pfu/mL).

2.5.4 Segunda ronda del primer *panning*

En el primer *panning*, para las dos rondas de selección, se utilizó la línea estable HEK-hPD-L1. Al igual que en la primer ronda de selección, se realizó una pre-incubación del primer output con 2×10^6 células HEK293 en las mismas condiciones. Luego de la centrifugación, se procedió a incubar el sobrenadante de la misma con la línea celular HEK-hPD-L1, se realizaron los lavados correspondientes y se eluyó utilizando tripsina. El segundo *output* fue utilizado para titulación, amplificación y *screening* de clones positivos. Cabe resaltar que para este *panning* se realizaron solamente dos rondas de selección en células.

2.5.5 Primer ronda del segundo *panning*

El segundo *panning* incluyó una ronda en solución y dos rondas realizadas sobre células. Para realizar el *panning* en solución se utilizó la proteína hPD-L1 biotinilada (la biotinilación de la proteína fue previamente realizada por la Dra. Lucia Vanrell, integrante de la

Cátedra de Inmunología). Para esto, se incubaron 300 μL de la biblioteca de fagos filamentosos con 5 μg de hPD-L1 biotinilada en rotación durante 60 minutos a temperatura ambiente. En paralelo, una placa de ELISA fue sensibilizada con avidina. Posteriormente, se incubó la biblioteca en los pocillos de la placa a modo de capturar hPD-L1 biotinilada con la avidina utilizada para sensibilizar. Luego se realizaron 8 lavados con PBS-Tween 0,05% para remover aquellas uniones inespecíficas. Posteriormente se agregaron 100 μL de tripsina a 10 mg/mL como método de elución y fue incubado a 37°C en agitación. Posteriormente se neutralizó la enzima con un inhibidor de tripsina utilizando 10 μL del mismo a 100 mg/mL. Una vez terminado este proceso, fue llevada a cabo la amplificación de este primer *output* previo a realizar una segunda ronda de selección.

2.5.6 Segunda y tercer ronda del segundo panning

De igual manera que en el primer *panning*, la segunda y tercer ronda de selección fue realizada sobre células utilizando HEK-hPD-L1 transducidas establemente. Los pasos llevados a cabo durante la segunda y tercer ronda de selección son exactamente los descritos anteriormente.

2.5.7 Producción de VHHs biotinilados

De modo de facilitar el screening de nanobodies se decidió biotinilarlos ya que éste método se encuentra establecido como protocolo con gran efectividad en la Cátedra de Inmunología. Para esto, se tomaron los *outputs* correspondientes y se sometieron a una etapa de subclonado en el vector de expresión procariota pINQ-BtH6 (**figura VIII**). Para realizar esto se digirió tanto el *output* pComb3X-VHHs como el vector pINQ-BtH6 con la enzima Sfi I a 50°C durante 4 horas en un termociclador. Posteriormente se corrió un gel de agarosa 1%, se eluyeron los fragmentos correspondientes a los VHHs y al vector

pINQ-BtH6 digerido y se purificaron mediante un kit comercial (Thermo Fisher) para extracción de DNA en geles de agarosa. Luego se procedió a ligar los VHHs con este vector en una relación 3:1 de inserto:vector durante 60 minutos a 22°C utilizando la enzima T4 DNA ligasa.

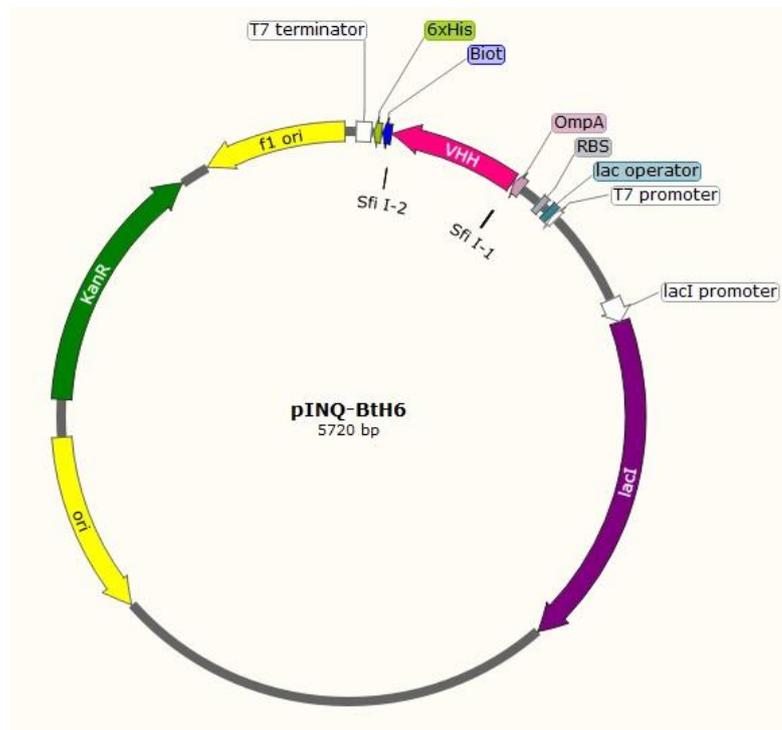


Figura VIII. Diagrama esquemático del cassette de expresión del vector pINQ-BtH6. El VHH clonado entre los sitios de corte no homólogos de Sfi I se expresa en forma soluble en el periplasma debido a la secuencia señal OmpA, y asociado a una señal de biotilación y a una cola de seis histidinas. La expresión del VHH está regulada por un promotor T7 inducible por IPTG.

Este vector fue creado en el laboratorio y es derivado del vector pET28a(+) (Novagen). Este último fue modificado con la adición de la señal de exportación al periplasma OmpA mencionada anteriormente, además de un tag de detección de 6 Histidinas hacia el extremo C-terminal de la proteína a expresar. El vector utilizado posee un gen

que codifica para la resistencia al antibiótico kanamicina y un promotor T7 inducible mediante IPTG. En ausencia de IPTG, el represor lac que se expresa a partir del gen lac I inhibe la expresión de la RNA polimerasa T7 y del gen *target* en dicho vector. La presencia de IPTG activa la transcripción de la RNA polimerasa T7 y esta transcribe el gen clonado en el vector. Este vector codifica además un péptido de 15 aminoácidos, entre el VHH y la cola de seis histidinas, que es un sustrato de la biotín ligasa de *E. coli*, BirA, que es la encargada de biotínilar el VHH cuando se expresa en presencia de biotina.

El vector ligado se electroporó en células competentes *E. coli* BL-21 DE3 que contenían el plásmido pCY-216, el cual permite la sobreexpresión de la biotín ligasa de *E. coli*. Esta cepa fue utilizada para la producción de VHHs biotínilados en forma soluble. Para ello, se electroporaron 25µL de bacterias BL-21-pBIR con 1 µL del output clonado en el vector pINQ-BtH6. Luego de la electroporación se le agregó 1 mL de medio de recuperación SOC y las mismas fueron incubadas a 37°C durante 60 minutos en agitación. Luego se realizaron distintas diluciones y se plaquearon las células transformadas en placas de LB agar-cloranfenicol-kanamicina. Se realizó la producción en bloque de 96 pocillos, eligiéndose 94 colonias al azar y siendo los dos pocillos restantes los controles negativos. Para esto, se tomaron las colonias seleccionadas, se las inoculó en 500uL de LB-cloranfenicol-kanamicina-arabinosa-biotina y fueron incubadas a 37°C en agitación. Se agregó arabinosa para inducir la expresión de la enzima BirA, y biotina, el sustrato de la misma. Una vez alcanzada una OD: 0,6 U.A. se agregó IPTG 3uM para iniciar la producción de los VHHs. Luego de las 4 horas de inducción con IPTG, las células son centrifugadas a 600g, resuspendidas en 500 uL de PBS-biotina e incubadas en sonicación durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, el sonicado se centrifugó a 6000g pudiendo obtener

un sobrenadante con los VHHs biotinilados. Para la purificación, los VHHs fueron transferidos del bloque original de producción a otro bloque de 96 pocillos el cual contenía columnas de Níquel-NTA (HisPur Ni-NTA 96-Well Spin Plates, Thermo Scientific). La misma fue lavada 10 veces con 200 μ L de PBS 1X para eliminar los componentes unidos de manera inespecífica al níquel. Para poder eluir el VHH fue necesario agregar un compuesto que compita por la interacción con el níquel y para esto se realizaron 3 lavados con un buffer de elución que consistía en PBS con 500 mM de imidazol. Los VHHs fueron eluidos y posteriormente guardados a -80°C .

2.5.8 Screening de outputs en placa

Luego de realizadas las rondas de *panning* correspondientes, es necesario hacer un *screening* de los clones obtenidos. Este *screening* es vital para confirmar que los VHHs seleccionados definitivamente sean específicos para el ligando deseado. Para realizar el *screening* en placa se tomaron 12 colonias de cada *panning* al azar, de esta manera realizando el *screening* para 24 clones presuntamente distintos, 12 del *panning* utilizando solamente células (*panning c/c*) y los 12 restantes del *panning* realizado en solución y sobre células (*panning s/c/c*). El primer análisis preliminar de los clones obtenidos fue realizado mediante un ELISA. Para ello, se tomó una placa de ELISA y se sensibilizó ON a 4°C con avidina. Al día siguiente se bloqueó la placa utilizando 350 μ L de PBS-BSA 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego de realizar 3 lavados con PBS-Tween 0,05% se procedió a incubar con 5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por pocillo de hPD-L1 biotinilada durante 60 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó cada pocillo con 100 μ L de los VHHs diluidos al medio (en PBS-BSA 1%) durante 60 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Para eliminar las interacciones inespecíficas entre las moléculas, se continuó realizando 8 lavados

con PBS-Tween 0,05%. Para el revelado se agregó un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (PO) en una dilución de 1/3000 y se incubó 60 minutos en agitación a temperatura ambiente. Luego de esto se realizaron 6 lavados con el mismo buffer de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo que no se unió. Luego se agregaron 200 uL de TMB. Para evitar la saturación y poder visualizar la reacción coloreada, es necesario detener la reacción. Esto se realizó mediante el agregado de 50 uL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 1M por pocillo.

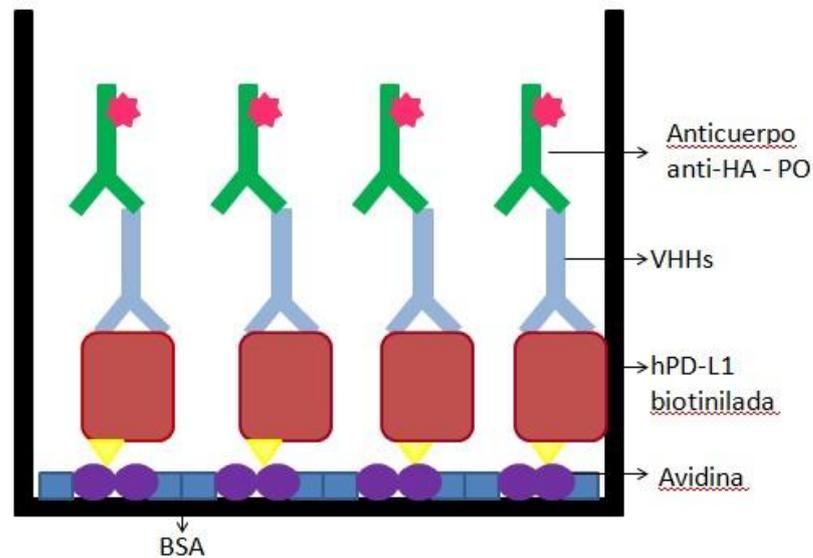


Figura IX. ELISA de captura para screening de VHHs en placa. Para esto se captura hPD-L1 biotinilada mediante la avidina (usada para sensibilización de la placa). Los VHHs que reconozcan a hPD-L1 serán detectados mediante el agregado de un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa. Para revelar la reacción se utiliza TMB y se mide absorbancia a 450nm.

2.5.9 Citometría de flujo

Para la citometría, se utilizó tanto la línea celular HEK transducida establemente con hPD-L1 como la generada mediante transfección (ver sección 2.6). Para ello, se colocaron aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células en tubos eppendorf de 1.5 mL y se incubaron durante una hora en hielo con los sobrenadantes conteniendo los respectivos nanobodies. Luego de esto, las células fueron centrifugadas a 500g por 10 minutos a 4°C y se procedió a lavar 3 veces con 500uL de flow-cytometry buffer (FCB). Para el revelado, se incubó durante 1 hora en hielo y en oscuridad con streptavidina conjugada a ficoeritrina (S-PE). Luego de esta incubación se realizaron dos lavados con FCB en similares condiciones y las células fueron centrifugadas a 500g durante 10 minutos y a 4°C. El sobrenadante fue descartado y se resuspendió el pellet celular en 300uL de FCB para poder ser visualizado en el citómetro de flujo. Como control negativo en la citometría se utilizaron células HEK293 debido a que este fue el “background” tanto de la inmunización, como del *panning*. Como control negativo se usó un VHH con especificidad hacia TL1-A, receptor no presente en las células utilizadas. Para determinar en nivel de expresión de hPD-L1 se utilizó un anticuerpo comercial IgG de ratón anti-hPD-L1 conjugado a ficoeritrina (eBioscience). Como control isotípico para este anticuerpo, se utilizó un IgG de ratón (eBioscience).

2.6 Transfección

2.6.1 Extracción de RNA y clonaje en vector de expresión eucariota

Para poder generar una línea derivada de células HEK293 mediante transfección previamente fue necesario obtener el gen codificante para hPD-L1. Para ello se tomaron 5×10^6 células HEK-hPD-L1 provenientes de la línea estable y se las sometió a una extracción de RNA. La misma fue realizada con el agente TRIZOL (ThermoFisher) siguiendo

el protocolo correspondiente. Posteriormente, se realizó una retrotranscripción (RT) y posterior PCR con cebadores específicos (Ver **Tabla II**) para amplificar el gen de hPD-L1, los cuales contaban hacia sus extremos 5' sitios de corte para las enzimas Not I (#R3189 NEB) y EcoRI (#R0101T NEB)- sitios en subrayado- lo que permitió el clonado dirigido de la proteína en cuestión en el vector de expresión deseado.

Cebadores	Secuencia
Rev-hPD-L1	5'AAAAAAG <u>CGGCCGCG</u> GATTACGTCTCCTCCAAA TGTGTATCAC-3'
Fwd-hPD-L1	5'AAAAAAG <u>AATTCATGAGGATATTTGCTGTCTTTAT</u> ATTCATGACC-3'

Tabla II. Cebadores diseñados para la amplificación del gen de hPD-L1.

El cebador reverso contiene en subrayado una secuencia de corte para la enzima Not I mientras que el directo contiene en subrayado una secuencia de corte para la enzima de restricción Eco RI. Esto permite el clonaje dirigido de la proteína en cuestión.

Luego de amplificar este cDNA, se realizó la digestión con EcoRI durante 3 horas a 37°C en un termociclador. Posteriormente, el producto de digestión fue purificado utilizando un kit comercial (Thermo Fisher) y el eluído del kit fue utilizado para realizar una digestión con NotI. Luego, se realizó el mismo proceso de purificación haciendo uso del kit comercial. En paralelo, se digirió el vector PEF-1/myc-His C con las mismas enzimas de restricción (Not I y Eco RI). Posteriormente, se ligaron inserto con vector en una relación molar de 3:1 de la misma forma descrita anteriormente. Éste, es un vector de expresión en células de mamífero el cual permite la sobre-expresión

de la proteína codificada en él (ver **figura X**). Este sistema contiene un promotor EF-1 α que permite la expresión constitutiva de la proteína. A su vez posee una secuencia codificante para la enzima betalactamasa que proporciona resistencia al antibiótico ampicilina (utilizado como método de selección a la hora de transformar bacterias para producir vector).

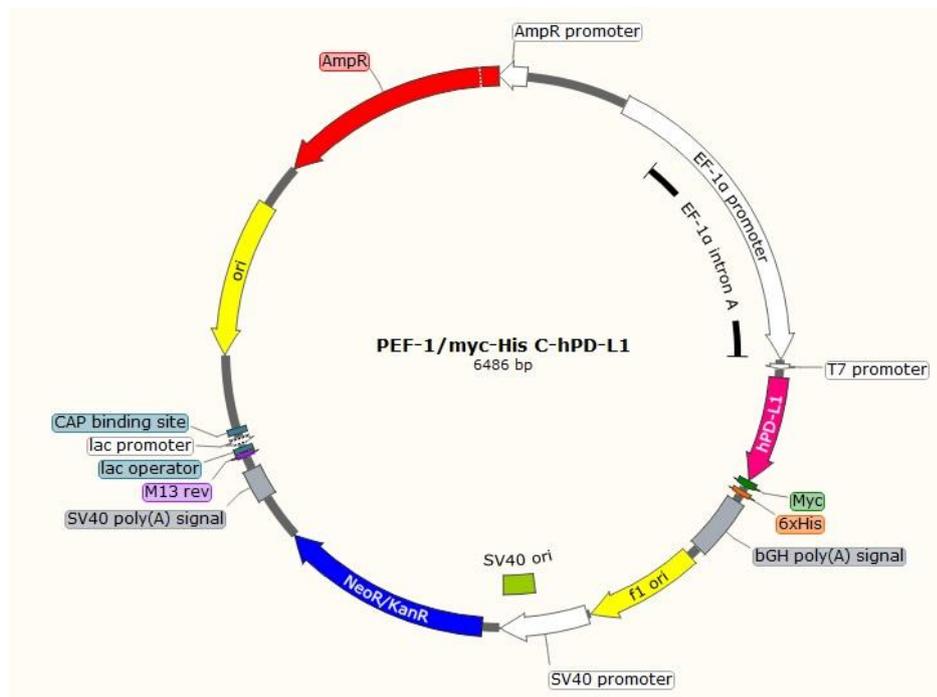


Figura X. Diagrama esquemático del cassette de expresión del vector PEF-1/myc-His C. La expresión de hPD-L1 se encuentra regulado por el promotor EF-1 α que permite la sobre-expresión de la proteína codificada en el vector. hPD-L1 se expresará sobre la membrana de las células transfectadas con dicho vector unido a un tag de seis histidinas y un epítipo myc.

Para obtener una cantidad suficiente del vector PEF-1/myc-His C conteniendo el inserto de hPD-L1, se utilizó el GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher) siguiendo el protocolo correspondiente. Para esto, se electroporó 1uL del vector ya ligado en 25 uL de células *E.Coli* ER2738 y posteriormente, estas fueron incubadas en 1mL de

medio de recuperación SOC a 37°C durante 1 hora en agitación. Finalmente, se plaquearon distintas diluciones en placas de agar-ampicilina y se dejaron ON a 37°C para permitir el crecimiento de colonias. Al día siguiente se tomó una colonia aislada y se realizó un cultivo “starter” en 3mL de LB-ampicilina ON a 37°C en agitación. Finalmente se siguió el protocolo correspondiente del kit de miniprep para obtener cantidades suficientes del plásmido en cuestión.

2.6.2 Optimización de la transfección de la línea celular HEK293 con GFP

Para transfectar se utilizó el agente de transfección polietilenimina (PEI), el cual actúa condensando el DNA en partículas cargadas positivamente que se unen a distintos residuos aniónicos sobre la superficie celular y son introducidos a la célula mediante endocitosis. Previamente a la transfección con hPD-L1 fue necesario optimizar el ratio PEI/DNA para obtener un buen porcentaje de células transfectadas minimizando la cantidad de reactivos utilizado. Para esto, se utilizó el vector comercial CMV-GFP (ver **figura XI**) el cual al igual que el PEF-1/myc-His C, es un vector de expresión en células de mamíferos.

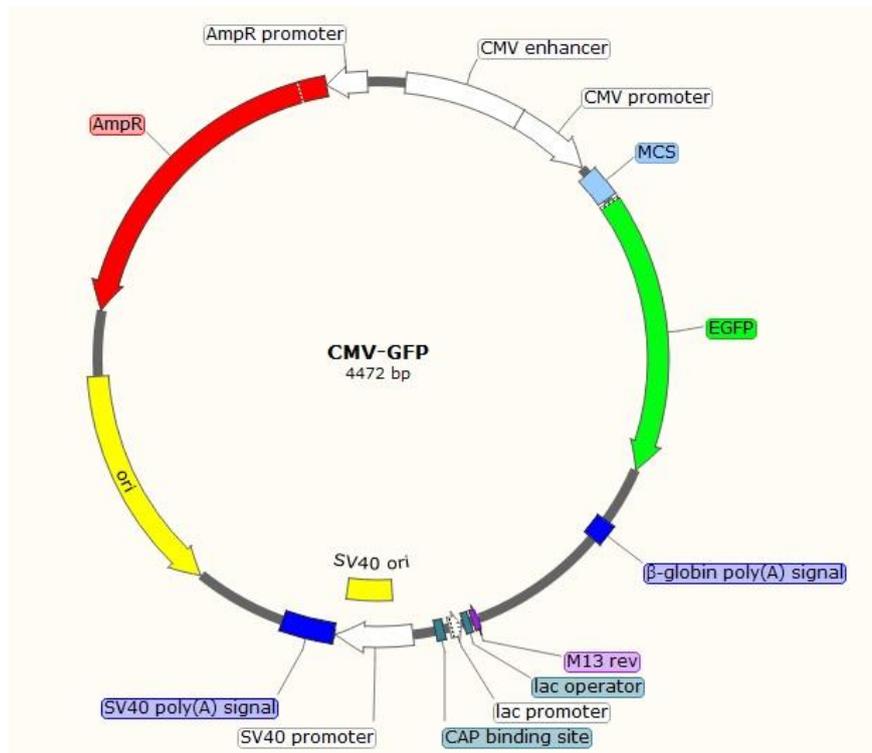


Figura XI. Diagrama esquemático del cassette de expresión del vector CMV-GFP. Este vector de expresión eucariota codifica para la proteína GFP. La producción de esta proteína esta mediada por un promotor fuerte de citomegalovirus.

Para la transfección con CMV-GFP se analizaron no solo distintos *ratios* de agente transfectante/DNA sino también distintas densidades de células sembradas para encontrar la condición óptima. Para ello, se utilizaron placas de 15cm en las siguientes condiciones:

N células	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
HEK293	PEI/DNA	PEI/DNA	PEI/DNA	PEI/DNA
5,0x10 ⁶	5	10	15	20
8,5x10 ⁶	5	10	15	20

Tabla III .Condiciones de transfección en placas de 15cm. Se transfectaron dos condiciones de cantidad de células (5,0x10⁶ y 8,5x10⁶) con cuatro distintos ratios de PEI/DNA (5,10,15 y 20).

Además de estas placas transfectadas con CMV-GFP, también se realizaron controles de toxicidad del agente usado para transfectar en los cuales no se adicionaba DNA además de un control de células sin transfectar. Este protocolo consiste en sembrar el número de células deseado sobre placas de 15cm en 20mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) con 10% suero fetal bovino (SFB, Sigma Aldrich) conteniendo L-glutamina (2mM) y el antibiótico Pen-Strep (1%) (ThermoFisher). Al día siguiente, se retiró medio y se le agregó medio nuevo sin SFB hasta un volumen final de 10ml de DMEM a una concentración de 2% de SFB. Esto se realizó ya que el suero puede inhibir el proceso de transfección. Luego se preparó la mezcla de PEI-DNA. Para ello se colocó la cantidad de PEI necesaria (dependiendo de la cantidad de DNA usada) sobre el DNA, éste fue vortexeado durante 30 segundos y la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir la formación de los complejos PEI-DNA. Una vez realizada la incubación se transfectaron las células mediante un goteo en círculos cubriendo toda la placa para maximizar la cantidad de células transfectadas y se colocaron en incubador a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de O₂. Posteriormente, entre 4-6 horas luego de realizada la transfección se agregaron 10mL de DMEM con 10% SFB a las células. Luego de pasadas 48 horas se puede considerar que las mismas se encuentran transfectadas y expresando cantidades considerables del ligando. Cabe resaltar que la transfección fue realizada a una densidad celular de 70 u 80% de la placa.

2.6.3 Transfección de línea celular HEK293 con hPD-L1

Una vez obtenida la cantidad suficiente de plásmido y haber optimizado la relación PEI/DNA se procedió a transfectar la línea celular HEK293 con PEF-1/myc-His C-hPD-L1 para producir una línea de expresión transitoria. En este caso, se utilizaron 30 ug del vector

PEF-1/myc-His C-hPD-L1 con 135 uL de PEI resultando un ratio PEI/DNA de 15. Luego de la incubación se siguió el protocolo explicado anteriormente.

3 RESULTADOS

3.1 Titulación de anticuerpos totales contra el antígeno de inmunización en suero de llama.

Durante la inmunización, la respuesta contra el extracto de las células HEK-hPD-L1 fue controlada midiendo la reactividad del suero extraído a los 15 días posteriores a cada inmunización, excepto para la última que se realizó a la semana, **figura XII**.

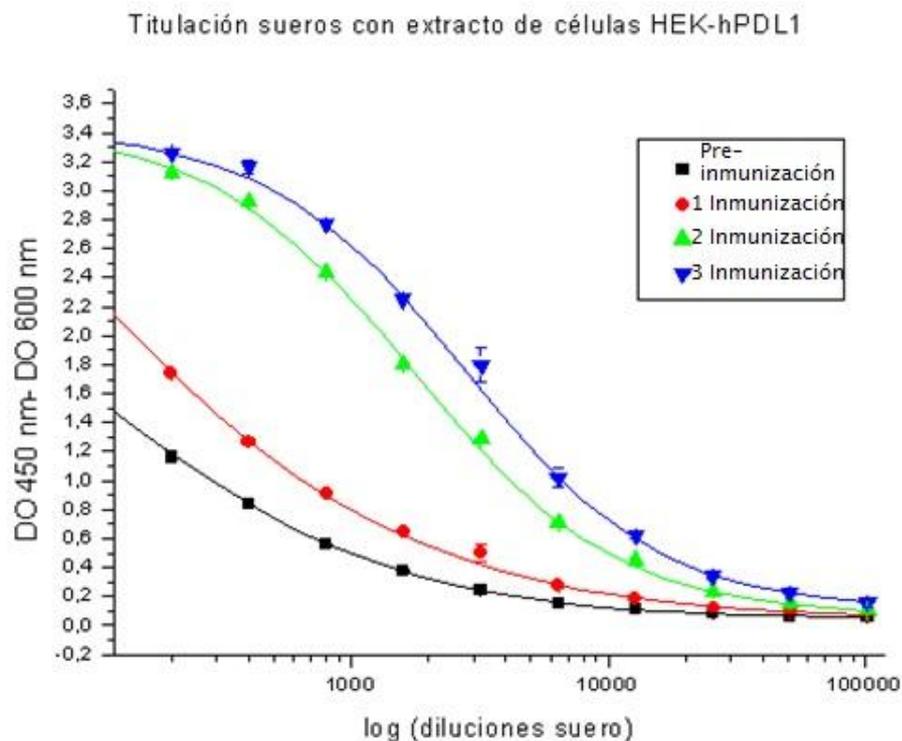


Figura XII. Curvas de titulación de anticuerpos en suero de llama contra un extracto de células HEK-hPD-L1. La reactividad de los sueros se midió en un ensayo de ELISA revelado con un anticuerpo de ratón anti-anticuerpos totales de llama, y un anti-ratón peroxidasa.

Observando la figura se concluye que la llama respondió efectivamente contra las células HEK-hPD-L1. Por otro lado no existe una diferencia remarcable en cuanto al título (definido como aquella dilución a la cual la máxima señal disminuye a la mitad) entre la penúltima y última

inmunización, que dieron títulos de 1736 y de 2457 respectivamente, por lo que se asume que inmunizaciones posteriores no aumentarían significativamente el título y por tanto se procedió preparar la biblioteca. No obstante, cabe recordar que en este ensayo se utiliza para la detección un anti-suero contra anticuerpos totales de llama y por tanto no se determina solamente el título de anticuerpos monodominios, sino de anticuerpos totales contra el extracto de células HEK-hPD-L1. Además, la respuesta medida es contra el extracto total no pudiendo sacarse conclusiones sobre la reactividad específica contra hPD-L1. A pesar de esto, dado que a esta altura no se disponía del antígeno como tal, se procedió a la construcción de la biblioteca.

3.2 Generación de la biblioteca de fagos filamentosos

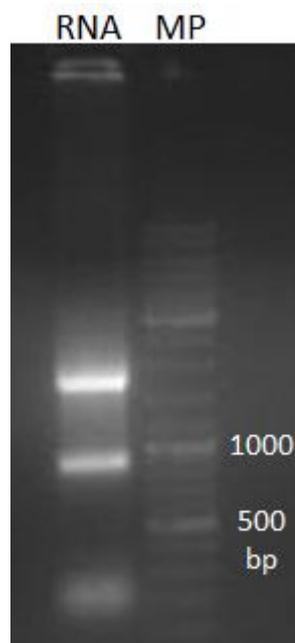


Figura XIII. Análisis de la integridad de RNA extraído. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, MP: marcador de tamaño molecular.

Para la preparación de la biblioteca se aislaron aproximadamente 10^8 leucocitos mononucleares y se extrajo el RNA. La **figura XIII** muestra que el RNA no presentaba signos de degradación. Si bien se nota un pequeño

smear, este no representa degradación de RNA sino que los distintos RNAm codificantes para las distintas proteínas celulares, que poseen tamaños diferentes generan este patrón. Posteriormente, se procedió a realizar la retrotranscripción del RNAm para sintetizar cDNA. A partir de este cDNA se amplificaron los genes de los VHH utilizando los cebadores descritos más arriba; esto es 4 cebadores de sentido *forward* o directo (VH1, VH3, VH4 Y VHArgento) y un cebador de sentido reverso (JH). Estos cebadores amplifican también los genes del dominio variable de la cadena pesada de los anticuerpos convencionales de la llama. Si bien esto no es un objetivo en sí mismo, no representa un problema dado el gran tamaño de la biblioteca a construir, y a que generalmente no son seleccionados durante el *panning* debido a su falta de solubilidad.

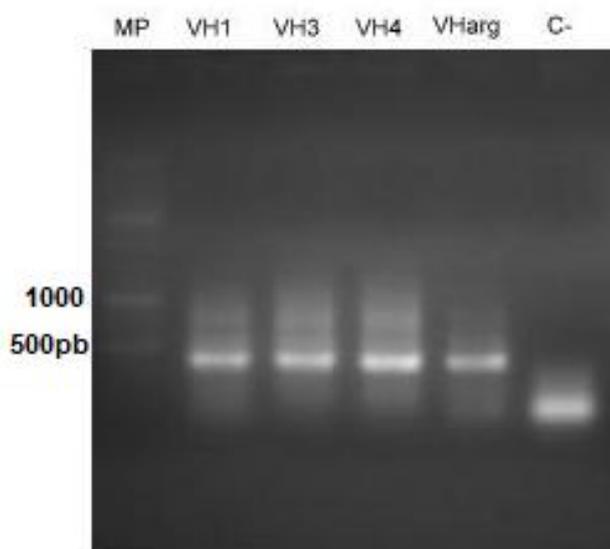


Figura XIV. PCR de VHHs con los diferentes cebadores. Gel de agarosa 1% conteniendo productos de PCR y sus respectivos controles. El revelado se realizó con bromuro de etidio.

Como se observa en la **figura XIV** en todos los carriles se visualizan bandas cercanas a los 500 pb correspondientes al producto resultante de PCR. Dado que los VHHs (y VHs) poseen un tamaño de entre 400 y 500 pares de bases, se concluye que tanto la retrotranscripción como la PCR

funcionaron correctamente. En el control negativo (C-) se omitió el cDNA, observándose solamente los cebadores. Para la preparación de la biblioteca se combinaron las 4 PCR independientes realizadas con los distintos cebadores, y estos productos se digirieron con Sfil y se clonaron direccionalmente en el vector pComb3X. La eficiencia de la ligación se verificó mediante pruebas de electroporación de células *E. coli* ER2738 supercompetentes en pequeña escala (ng de DNA). El criterio utilizado en este caso es que el número esperado de transformates (pfu) por μg de DNA debe ser $>1 \times 10^7$. Una vez confirmado este valor se procedió a realizar la ligación en gran escala utilizando 5 μg del producto de ligación purificado, obteniéndose 1×10^8 pfu. A partir de estas células, mediante infección con un fago *helper* se generó la biblioteca de fagos que expresan VHHs.

3.3 Selección de nanobodies específicos contra hPD-L1

3.3.1 Primer panning

Como se mencionó anteriormente en la sección de materiales y métodos, en la primera ronda de *panning* se pre-incubaron $1,5 \times 10^{12}$ partículas virales de la biblioteca generada con $2,0 \times 10^6$ células HEK293 (línea parental de la HEK293-hPD-L1) de modo de remover los fagos que tenían afinidad por componentes propios de estas células. Los fagos del sobrenadantes, se incubaron entonces con $2,0 \times 10^6$ células HEK293-hPD-L1. Luego del lavado los fagos se eluyeron con tripsina y se obtuvo un *output* de $1,7 \times 10^7$ pfu/mL. Este *output* se amplificó y se sometió a una segunda ronda de selección llevada a cabo de la misma forma que la primera, excepto que se eliminó la etapa de pre-adsorción en células HEK293. El título del segundo *output* fue de $0,8 \times 10^7$ pfu/mL. En ambos casos, se calculó el porcentaje de recuperación de fagos teniendo en cuenta el título del *input* (la biblioteca en la primera ronda de selección y el primer *output* amplificado en la segunda ronda) y en ambos caso se

verificó una recuperación de aproximadamente el 0,001%.

Lamentablemente, no se observó un aumento en la recuperación en la segunda ronda, lo cual indicaba que no se estaba produciendo el enriquecimiento esperado. De todas formas se procedió a realizar un análisis de la reactividad de algunos clones antes de proseguir. Para esto se prepararon 12 sobrenadantes de VHHs individuales directamente expresados desde el pComb3X, y se verificó su reactividad por ELISA usando como antígeno la proteína hPD-L1 biotinilada capturada con avidina y detectando la presencia del nanobody con el anticuerpo anti-HA peroxidasa. Como controles negativos se incluyó avidina, BSA. Lamentablemente ninguno de los clones dio lecturas positivas.

La primera estrategia de *panning* consistió de dos rondas de selección, ambas utilizando la línea celular de expresión estable de hPD-L1. Como se explicó en la sección anterior, para generar esta línea, las células HEK293 fueron transducidas establemente con un lentivirus codificante para hPD-L1, y esta misma línea fue la utilizada para realizar la inmunización. Desafortunadamente, a pesar de haberse pre-adsorbido con la línea HEK293 en la primera ronda de *panning*, es muy probable que los VHHs se hayan seleccionado contra moléculas de la superficie de estas células. De todas formas esta última hipótesis no se verificó por carecerse en ese momento de reactivos anti-HA con fluoróforos para estudiar la reactividad de los nanobodies por citometría sobre células HEK293, y en su lugar se procedió a realizar un nuevo *panning* incluyendo una ronda de selección con la proteína recombinante para forzar la selección de VHHs que reaccionaran con la misma.

3.3.2 Segundo *panning*

De la misma forma explicada anteriormente, se partió de la biblioteca generada y en la primer ronda de selección, la misma fue pre-incubada con $2,0 \times 10^6$ células HEK293 y posteriormente el sobrenadante de fagos

fue incubado con 5 µg de hPD-L1 recombinante biotinilado. Luego de 1 h se capturó hPDL-1 en placas cubiertas con avidina y se lavó exhaustivamente. Los fagos unidos al ligando se eluyeron alcanzándose un título de $4,4 \times 10^6$ pfu/mL. Este *output* fue amplificado y su título fue de $1,5 \times 10^{11}$ pfu/mL. Este amplificado fue utilizado para realizar una nueva ronda de *panning* sobre células, utilizando $2,0 \times 10^6$ células HEK293-hPD-L1. La razón de utilizar células y no continuar con la recombinante se debe a que la experiencia previa mostró con estos se aislaban clones que luego no reaccionaban con el receptor nativo. De todas formas, el *output* de fagos eluidos de estas células alcanzó un título de $1,6 \times 10^5$ pfu/mL, que fue bajo. Este segundo *output* fue amplificado y se realizó una ronda adicional de *panning* en iguales condiciones que la anterior, pero el título del tercer *output* se mantuvo en el mismo orden. La falta de aumento del título luego del segundo *panning* estaría indicando que nuevamente no se produjo un enriquecimiento en clones específicos para hPDL-1. En efecto, cuando se prepararon sobrenadantes de VHHs individuales y se verificó su reactividad por ELISA contra la hPD-L1 recombinante, los resultados fueron negativos.

A partir de estos resultados, surgió la idea de que posiblemente, la línea de expresión estable no se encontrara en las condiciones esperadas y haya, en cierta medida, perdido la expresión de hPD-L1 debido a distintas condiciones de estrés celular. Por ejemplo, a mayor tiempo de cultivo, es más probable que las células comenzaran a perder la expresión de hPD-L1 debido a la presión selectiva durante su desarrollo. En línea con esta hipótesis, es de notar que el lentivirus con el cual se transdujeron las células codificaba para la resistencia al antibiótico eucariota G418, pero nunca pudo ser usado porque las células se morían.

Dado que a esta altura, fue posible adquirir el anticuerpo comercial anti-hPDL-1 (conjugado a ficoeritrina) se procedió a verificar el nivel de expresión del receptor en la línea celular, **figura XV**. Como se observa en

esta figura, el nivel de expresión es muy moderado. Lamentablemente esto pudo afectar tanto la etapa de inmunización como el proceso de *panning*.

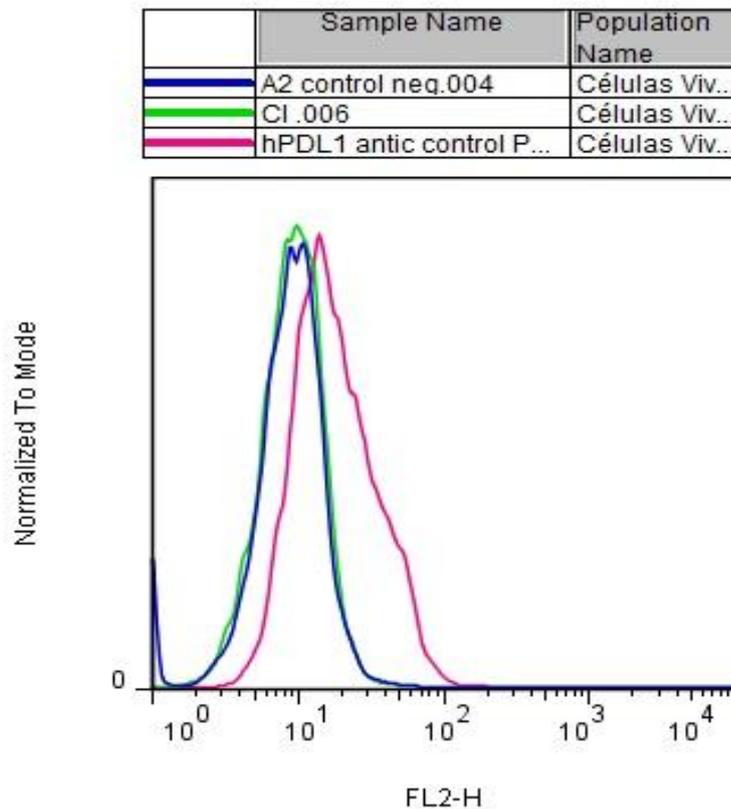


Figura XV. Histograma de expresión de hPD-L1 sobre línea celular estable.

El control positivo se realizó con el anticuerpo comercial anti-hPD-L1-PE (color rosa) y el control de isotipo correspondiente (verde y azul).

De todas maneras, aun habiéndose comprobado la baja expresión de PDL-1, se consideró que se justificaba verificar la reactividad de los clones aislados directamente sobre las células, dado que como se mencionó, los nanobodies pueden carecer de reactividad cruzada entre receptores recombinantes y nativos. A estos efectos se comprobó la reactividad de los clones seleccionados contra las células de expresión estable de hPDL-1 mediante citometría. Para esto, se subclonaron los

VHHs al vector de expresión procariota pINQ-BtH6 y se produjeron de forma biotinilada como se explica a continuación.

3.4 Clonaje de outputs en vector de expresión procariota pINQ-BtH6

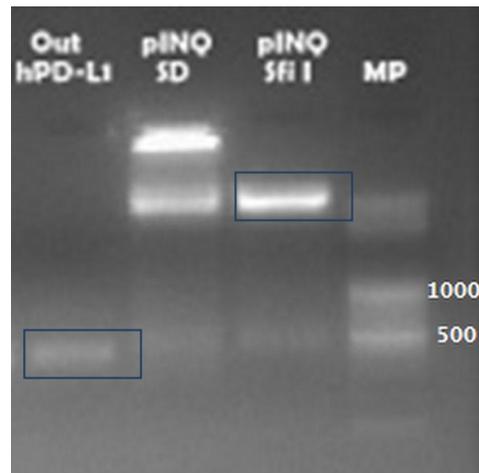


Figura XVI. Análisis de digestión del vector pINQ-BtH6 y un *output* (a modo representativo). Gel de agarosa 1% revelado con bromuro de etidio con productos de PCR digeridos con enzima Sfi I previo a la ligación de los *outputs* con vector pINQ-BtH6.

En la **figura XVI** se muestra el producto de la digestión tanto de uno de los *outputs* de hPD-L1 (a modo representativo) como del vector pINQ-BtH6 utilizando la enzima Sfi I, de modo de poder producir los VHHs como se explicó anteriormente en sección de materiales y métodos. En el primer carril del gel se cargó el DNA extraído de un *output* de hPD-L1 digerido con Sfi I, el cual se corresponde con el tamaño esperado, aproximadamente 500 pares de bases, siendo éste el peso molecular de los VHHs. En el segundo carril se observa el vector pINQ-BtH6 sin digerir, notándose las bandas correspondientes al plásmido en sus distintas formas. En el tercer carril visualiza el vector pINQ-BtH6 digerido con la enzima Sfi I. Luego de la digestión, las bandas que se señalan se purificaron, se procedió a ligar el inserto, y la mezcla de ligación se

electroporó en células BL21-pBIR que contenían el vector pCY-216. A partir de clones individuales procedió entonces a la producción de nanobodies biotinilados como se describe en la sección materiales y métodos.

3.5 Citometría sobre línea celular de expresión estable

Para reducir el número de experimentos, la citometría se realizó con *pools* de 5-6 clones de VHHs en un solo sobrenadante, el cual fue utilizado para la incubación con las células HEK293-hPD-L1. Para este *screening* se utilizaron VHHs tanto del primer *panning* sobre células (*c/c*), como del segundo *panning* que incluyó una ronda de selección con la proteína recombinante en solución y dos rondas sobre células (*s/c/c*). Si bien la mayoría de los *pools* de VHHs generaron señales negativas (similares al control negativo) para el reconocimiento de hPD-L1, algunos *pools* dieron lugar a una señal ligeramente positiva con respecto al control negativo. A modo representativo se muestra en las **figuras XVII** y **XVIII**, el *pool* 41-45 del *panning c/c* y el *pool* 46-48 del *panning s/c/c* respectivamente. En ambos casos la señal fue moderadamente positiva, pero menor a la obtenida con el anticuerpo de control positivo. Para comprobar si las señales relativamente bajas observadas en algunos *pools* de VHHs eran debido a su dilución, se prosiguió a producir de manera individual cada clon de aquellos *pools* del *panning c/c* y realizar otra citometría sobre las mismas células. Se escogieron los clones del *panning c/c* sobre los del *s/c/c* debido a que presentaron un corrimiento mayor.

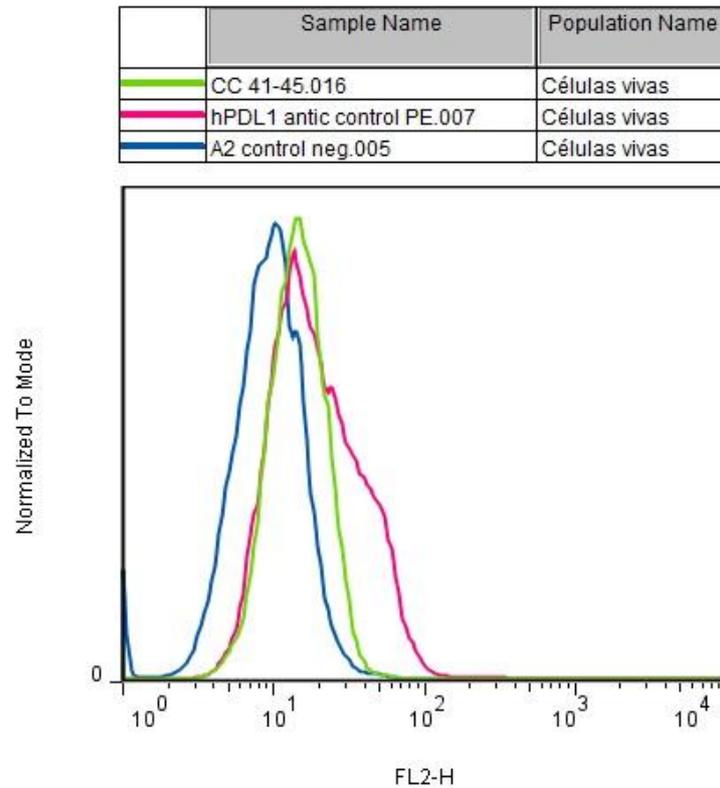


Figura XVII. Histograma de *screening* por citometría de flujo de clones anti-hPD-L1 obtenidos por *panning c/c*. El control positivo se realizó con el anticuerpo comercial anti-hPD-L1-PE (color rosa), como control negativo se usó un VHH (A2) anti-TL-1A (azul). El resultado para el *pool* 41-45 de VHH biotinilados se muestra en verde. Para el revelado de los VHHs se utilizó streptavidina conjugada a ficoeritrina (PE).

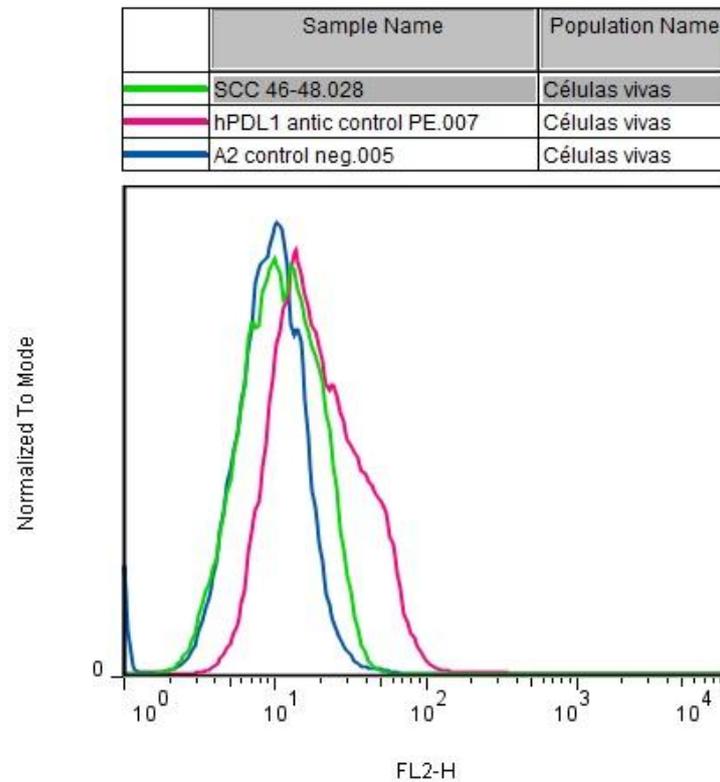


Figura XVIII. Histograma de *screening* por citometría de flujo de clones anti-hPD-L1 obtenidos por *panning s/c/c*. El control positivo se realizó con el anticuerpo comercial anti-hPD-L1-PE (color rosa), como control negativo se usó un VHH (A2) anti-TL-1A (azul). El resultado para el *pool* 46-48 de VHH biotinilados se muestra en verde. Para el revelado de los VHHs se utilizó streptavidina conjugada a ficoeritrina (PE).

El análisis individual de los VHH biotinilados de *pools* positivos, mostró que algunos de ellos reaccionaban con componentes de las células HEK-hPD-L1. En forma representativa, se muestra el resultado para el clon A11 obtenido del primer *panning (c/c)*, **figura XIX**. La intensidad de la señal del VHH A11 es incluso mayor a la obtenida utilizando el control positivo. Esto resultó llamativo debido a que el anticuerpo comercial reconoce con gran afinidad a hPD-L1 y se tituló previamente para usarlo a una dilución suficiente como para interactuar en su máxima capacidad. Cuando estos clones se probaron directamente sobre la línea HEK parental, no se observó reactividad alguna. Por tanto, estos resultados

lucían promisorios pero faltaba aún una confirmación adicional, dado que no se podía descartar la reactividad contra algún neo-componente distinto de hPD-L1 que podrían estar expresando las células HEK- hPD-L1 como resultado de la transformación con lentivirus. Para dirimir esta cuestión se procedió a generar una nueva línea celular de expresión transitoria hPD-L1, lo cual requirió previamente clonar el gen en un vector para llevar adelante la transfección.

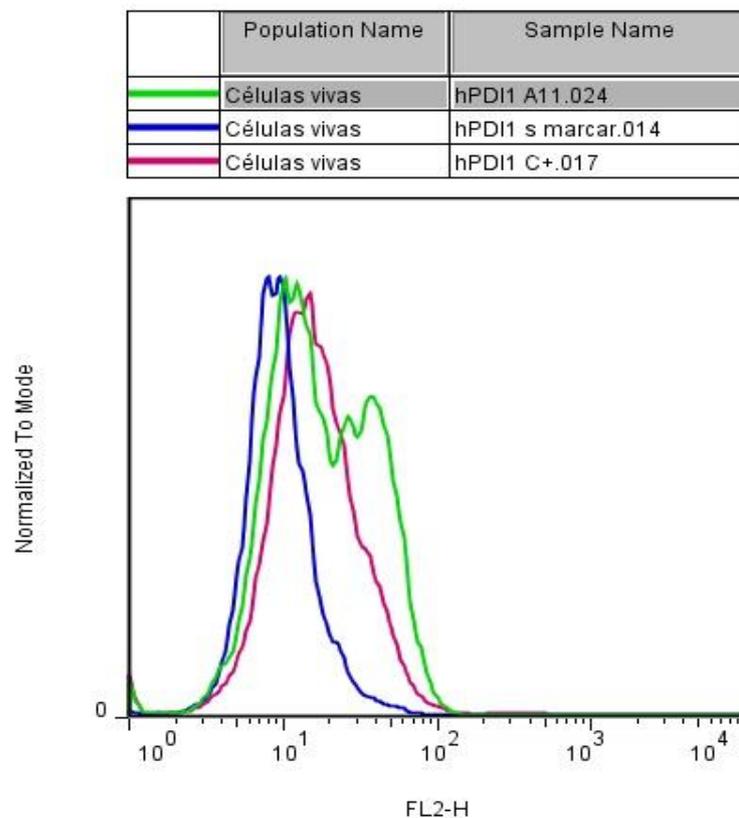


Figura XIX. Histograma de screening del clon A11 obtenido por panning c/c. El control positivo se realizó con el anticuerpo comercial anti-hPD-L1-PE (color rosa), como control negativo se usó un VHH (A2) anti-TL-1A (azul). El resultado para el VHH A11 se muestra en verde. Para el revelado de los VHHs se utilizó streptavidina conjugada a ficoeritrina (PE).

3.6 Extracción de RNA, amplificación y clonado del gen hPD-L1

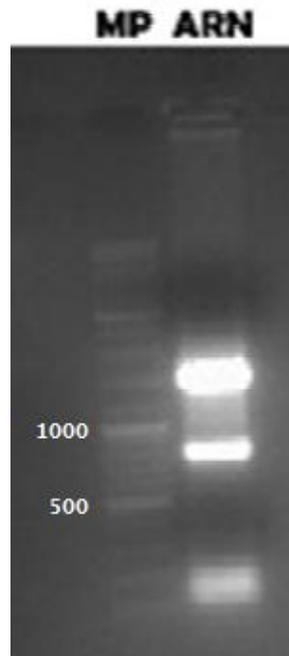


Figura XX. Análisis de integridad del RNA extraído. Gel de agarosa 1% con producto de extracción de RNA de células HEK- hPD-L1.

El gen de hPD-L1 clonó a partir de la línea HEK- hPD-L1. Una vez controlada la integridad del RNA (**figura XX**), se preparó el cDNA correspondiente y se amplificó el gen de hPD-L1 como se describe en materiales y métodos. El producto amplificado tuvo el tamaño esperado de aproximadamente 900 bp (**figura XXI**) que corresponde al gen completo del ligando, cuya secuencia aminoacídica y organización se muestra en la **figura XXII**.

Figura XXII. Esquema topológico y secuencia de la proteína hPD-L1. El código de color utilizado en la secuencia de aminoácidos es el mismo que se utiliza en el esquema topológico de hPD-L1. A la izquierda se muestran los dos dominios de la región extracelular del receptor (azul), y la interacción del dominio N-terminal con PD1 (rojo) (adaptado de Lin et al⁷⁶).

Posteriormente se procedió a clonar el gen de hPD-L1 en el vector PEF-1/myc-His C (PEF-1/myc-His C-PD-L1) tal y como fue explicado anteriormente en materiales y métodos. Para comprobar que la ligación fue efectiva se realizó una colony PCR sobre 10 de las colonias obtenidas de la electroporación. Nueve de estas dieron lugar al producto esperado, y a partir de una de estas se hizo una preparación de DNA para realizar la transformación de células HEK.

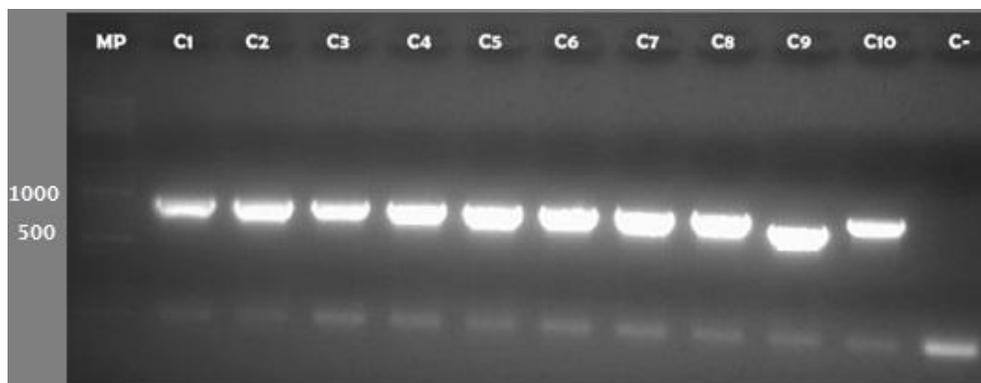


Figura XXIII .Análisis de productos de PCR de colonias transformadas con PEF-1/myc-His C-hPD-L1. Gel de agarosa 1% con productos de colony PCR de 10 colonias distintas provenientes de la ligación de hPD-L1 en el vector PEF-1/myc-His C. Revelado con bromuro de etidio.

3.7 Transfección transitoria de células HEK293

Previo a realizar las transfecciones con el vector PEF-1/myc-His C- hPD-L1, se llevó adelante una etapa de optimización utilizando el vector CMV-

GFP. Para esto se comparó la tasa de transfección de distintas densidades celulares ($5,0 \times 10^6$ y $8,5 \times 10^6$ células/placa) y distintas relaciones de agente transfectante/DNA para definir la condición óptima de transfección donde se utilizara la menor concentración de PEI posible (tanto para disminuir el estrés celular como para minimizar la cantidad de reactivo utilizado). En la **figura XXIV**, se observan las dos mejores condiciones obtenidas, tanto de cantidad de células sembradas utilizando una placa de 15cm como la relación PEI/DNA. Si bien se observa que ambas condiciones rinden un porcentaje de transfección muy similar, se eligió como óptima la condición de transfección de $8,5 \times 10^6$ células HEK293/ placa con una relación de PEI/DNA = 10 debido a que bajo el microscopio se pudo observar que las células transfectadas con un ratio de PEI/DNA = 20 se hallaban menos adheridas a la placa, encontrándose, por ende, más células muertas. Esta condición de transfección, como se muestra en la **figura XXIV**, exhibe un buen corrimiento de intensidad de la señal en FL1-H (canal de emisión de GFP) mientras se conserva un alto porcentaje de células vivas en el cultivo (resultado no mostrado). En este caso, el control negativo (gráfica en color azul) se realizó con células HEK293 sin transfectar. Habiendo hallado la condición óptima para transfectar, se procedió a realizar la transfección con PEF-1/myc-His C - hPD-L1 mediante el mismo procedimiento.

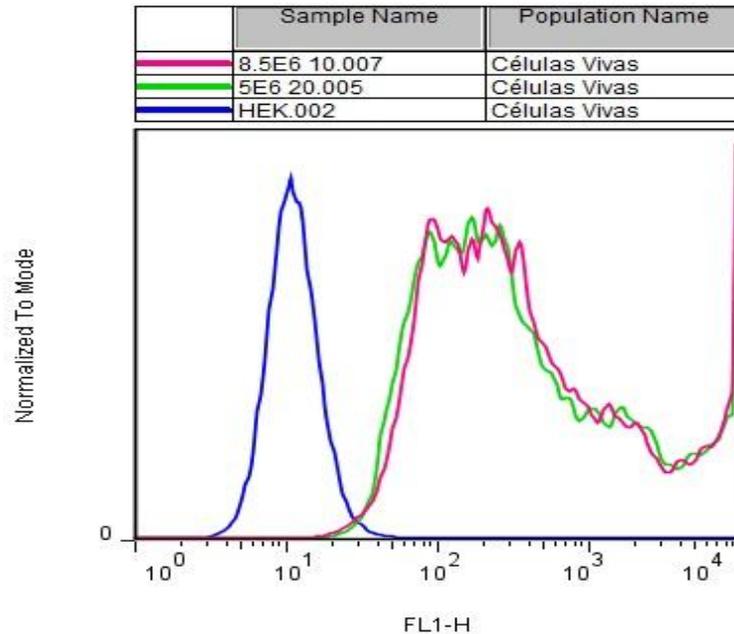


Figura XXIV Histograma de optimización de la transfección de células HEK con el vector CMV-GFP. Se representan las mejores condiciones de transfección con el agente transfectante PEI. Se midió expresión de GFP en el canal de fluorescencia FL-1.

Para la transfección con PEF-1/myc-His C -hPD-L1 se siguió el mismo procedimiento mencionado anteriormente. La eficiencia del proceso se analizó mediante citometría utilizando el anticuerpo comercial anti- hPD-L1 conjugado a ficoeritrina, encontrándose una alta expresión. Como esta herramienta iba a ser utilizada con frecuencia en el futuro, a modo de no tener variaciones y evitar realizar el proceso de transfección repetidas veces, se estudió la posibilidad de producirlas en gran escala y conservarlas a -80°C . Si bien los resultados no se muestran, el descongelado de estas células luego de varios días o semanas, no mostró variaciones significativas en la intensidad de la señal, concluyéndose que el congelado y descongelado del batch de células no afectaba los niveles de expresión de hPD-L1. Sobre esta base se realizó una preparación en gran escala de células, denominadas HEK/hPD-L1/high, que se alicuotó, congeló, y que de aquí en más se utilizó a lo

largo de este estudio. El control de expresión de hPD-L1 en estas células se muestra en la **figura XXV**.

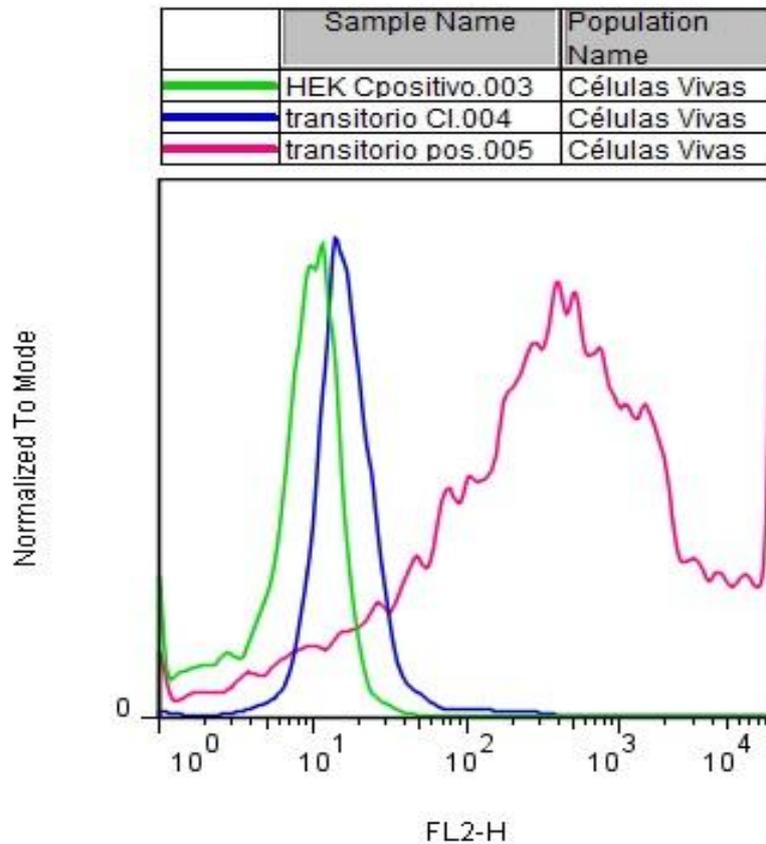


Figura XXV. Histograma de expresión de hPD-L1 en células HEK293 transfectadas (HEK/hPD-L1/high). En color rosa se observa el marcado de las células HEK/hPD-L1/high con el anticuerpo comercial anti- hPD-L1-PE, mientras que en verde y azul se observan los histogramas correspondientes a los controles negativos de células HEK + anticuerpo comercial anti- hPD-L1-PE y células HEK/hPD-L1/high + anticuerpo isotópico respectivamente.

3.8 Análisis de clones de VHHs contra células HEK/hPD-L1/high

Una vez obtenida esta herramienta, se decidió analizar la reactividad de los clones de VHH seleccionados previamente que no reaccionaban con

las células HEK, pero si lo hacían con la línea celular estable HEK- hPD-L1. Se eligieron los 3 clones que daban la mayor señal. En cuanto al clon A11 (**figura XXVI**), confirmando los resultados anteriores, se observó que no genera una señal positiva con las células HEK293 y sí un corrimiento moderado con la línea estable. Desafortunadamente, este corrimiento no se observa con las células HEK/hPD-L1/high que expresan cantidades mucho más altas de hPD-L1. Para el clon B1 (**figura XXVII**), esta vez no se observó un corrimiento significativo entre las señales generadas sobre las HEK- hPD-L1 estables y las HEK293, y tampoco con las HEK/hPD-L1/high por lo que igual se descarta que reconozca al ligando de PD-1. En cuanto al clon C7 (**figura XXVIII**), aunque en menor intensidad, la situación parece ser similar a la observada con el A11.

Estos resultados indicarían que los nanobodies A11 y C7 estarían reconociendo algún componente presente en la membrana de las células de expresión estable. Cabe recordar que las mismas fueron transducidas establemente con el lentivirus, y que estos vectores virales se integran al azar en el genoma de las células que infectan. Esto, puede distorsionar la expresión génica, pudiendo en algunos casos afectar genes vinculados a promotores celulares que lleven a la inhibición o sobre-expresión de distintos componentes celulares, y de esta forma podrían aparecer en la superficie celular proteínas que no están expresadas en la línea parental.

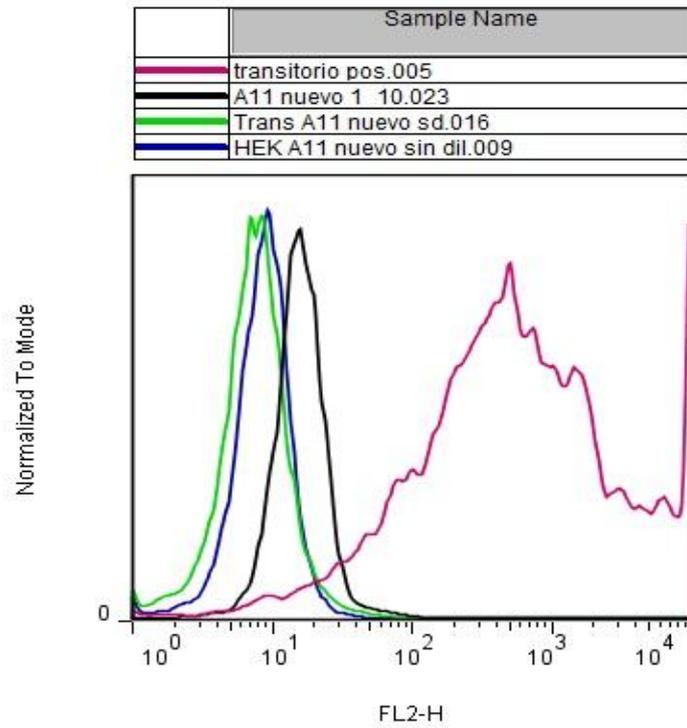


Figura XXVI Histogramas obtenidos con el VHH A11 biotinilado seleccionado por panning c/c. Reactividad contra células HEK (azul), células de expresión estable de hPD-L1 (negro) y células HEK/hPD-L1/high (verde). Para el revelado de los VHHs se utilizó streptavidina conjugada a ficoeritrina (PE). El resultado del control negativo (VHH anti-TLA-1) se omitió por simplicidad.

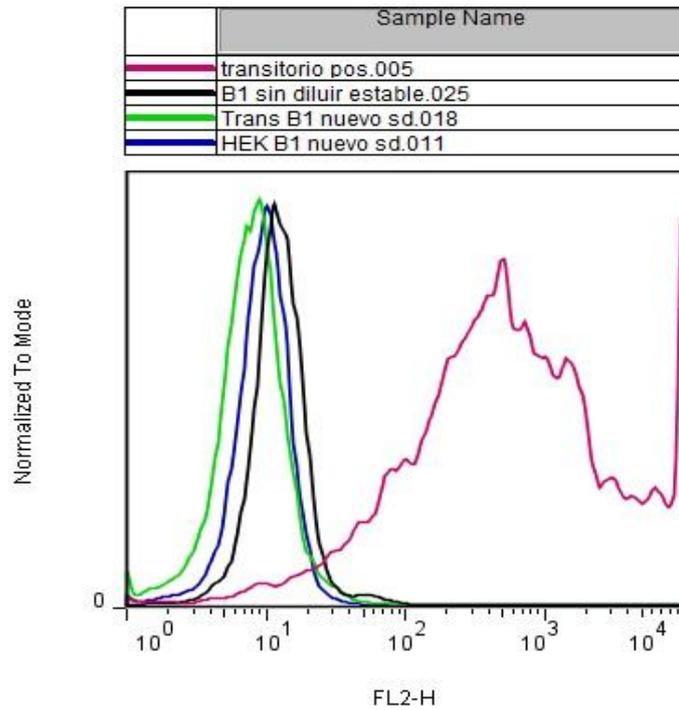


Figura XXVII Histogramas obtenidos con el VHH B1 biotinilado

seleccionado por panning c/c. Reactividad contra células HEK (azul), células de expresión estable de hPD-L1 (negro) y células HEK/hPD-L1/high (verde). Para el revelado de los VHHs se utilizó streptavidina conjugada a ficoeritrina (PE). El resultado del control negativo (VHH anti-TLA-1) se omitió por simplicidad.

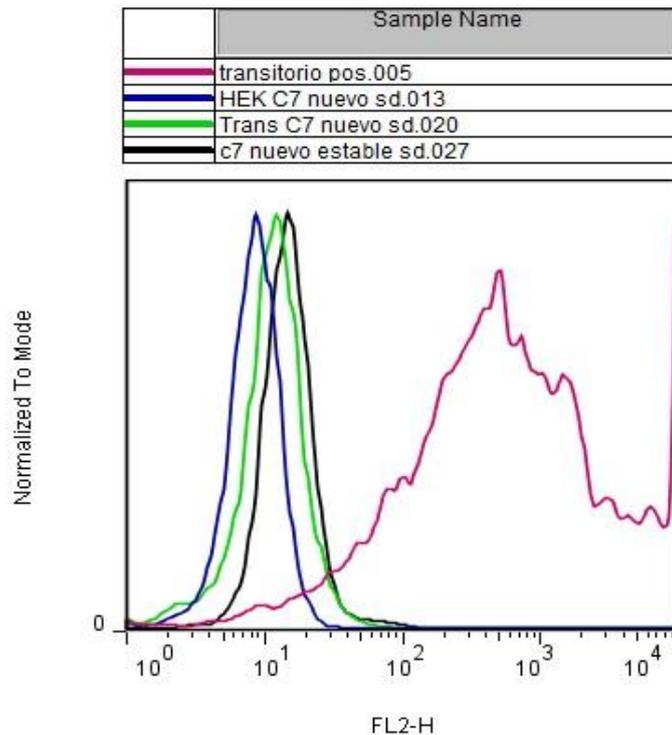


Figura XXVIII Histogramas obtenidos con el VHH C7 biotinilado

seleccionado por panning c/c. Reactividad contra células HEK (azul), células de expresión estable de hPD-L1 (negro) y células HEK/hPD-L1/high (verde). Para el revelado de los VHHs se utilizó streptavidina conjugada a ficoeritrina (PE). El resultado del control negativo (VHH anti-TLA-1) se omitió por simplicidad.

3.9 Nueva ronda de *panning* sobre células HEK- hPD-L1 transfectadas

Como último recurso, debido a que se contaba con el stock de células HEK- hPD-L1 de expresión transitoria y se había comprobado que al ser descongeladas los niveles de expresión del ligando se mantenían, se procedió a descongelar alícuotas y realizar una ronda de selección de VHHs (con anterior pre-incubación con línea parental HEK293) siguiendo el mismo procedimiento detallado para los *panning* con células.

Posteriormente se analizó la reactividad de los clones seleccionados y

para nuestra sorpresa, los resultados fueron similares a las rondas de selección anteriores, indicando que los bajos niveles de expresión del ligando en la línea estable utilizada en la inmunización, no fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpos significativa contra este componente.

4 DISCUSION Y CONCLUSIÓN

Teniendo en consideración lo discutido anteriormente, si bien se detectaron clones reactivos contra las células usadas en la inmunización, ninguno resultó reconocer de forma específica a hPD-L1. Hay varias razones que pueden explicar este resultado. Para comenzar, ante el fracaso inicial utilizando exclusivamente rondas de *panning* contra la línea celular estable, en la segunda estrategia se decidió alternar la selección con la proteína recombinante. En ambos casos no se observó enriquecimiento y la evaluación de los clones se realizó inicialmente por ELISA con la proteína recombinante. En el proceso de producción de la proteína recombinante, esta puede adquirir una conformación diferente de la nativa, o carecer de modificaciones post-traduccionales, por lo que en el momento de la selección, los VHHs que reconocían al receptor en su conformación nativa podrían no reconocer a la proteína recombinante. Lo cual no es ilógico, teniendo en cuenta que el reconocimiento de los VHHs es muy dependiente de la conformación del antígeno⁷⁷, y que la llama fue inmunizada con los receptores en forma nativa expresados sobre células HEK293.

Aunque estas consideraciones son válidas, el resto de los resultados obtenidos parecería indicar que el principal problema fue la baja expresión de hPD-L1 en la línea celular utilizada en la inmunización, por lo que no se habrían generado VHHs contra este receptor. Lo cual quedó evidenciado porque tampoco pudieron aislarse VHH anti hPD-L1 utilizando las células HEK/hPD-L1/high. Lamentablemente, esto se evidenció en etapas avanzadas del trabajo cuando accedimos al anticuerpo anti-hPD-L1 para citometría, y cuando ya se había generado la biblioteca de VHH, que implica un gran esfuerzo. De todas formas, nuestro trabajo arrojó interesantes enseñanzas. Así por ejemplo, queda claro que el diseño experimental de pre-adsorción de la biblioteca es muy eficiente para remover los clones reactivos contra la línea parental

utilizada en la inmunización. Lo cual se evidencia debido a que los VHHs que se obtuvieron reconocían específicamente ligandos que no estaban presentes en las células HEK. Estos “neo-ligandos” parecerían haber sido originados por la forma en la que se generó esa línea celular mediante transducción con un lentivirus, que como se ha comentado puede provocar cambios significativos en la expresión génica de la línea generada.

Otra importante contribución de este estudio fue el proceder al clonado del gen de hPD-L1 en un vector para expresión eucariota y optimizar las condiciones para su transfección dando lugar a la producción de células con alta expresión del este ligando. Sumando a esto, se logró demostrar que estas células podían producirse en gran escala y conservarse a -80°C por extensos períodos, lo cual tiene una enorme importancia práctica para llevar adelante el aislamiento y la caracterización de anticuerpos contra este ligando, pero que podría en el futuro aplicarse igualmente otros receptores.

En resumen, este trabajo generó conocimiento, experiencia local y herramientas para la generación de nanobodies utilizando células transfectadas. De hecho, los avances y contribuciones de esta tesina de grado, y también los fracasos, permitieron a otro integrante del laboratorio de la Cátedra de Inmunología, rediseñar las estrategias de selección y utilizando una biblioteca preparada a partir de un llama inmunizada con el hPD-L1 recombinante, seleccionar una serie de VHHs específicos para hPD-L1, y caracterizarlos al disponerse de las células HEK/hPD-L1/high generadas en este trabajo.

5 GLOSARIO

Biblioteca de fagos filamentosos: Preparaciones de fagos filamentosos que expresan en su superficie proteínas o péptidos de secuencia variable y contienen DNA codificante para dichas secuencias en su genoma viral plasmídico modificado.

Especificidad: Capacidad de un anticuerpo (a los efectos de este trabajo) de reconocer un antígeno y no interactuar con otros.

Fago *helper*: Fago cuyo genoma plasmídico provee a las células de las proteínas de la cápside viral así como de pIII sin fusionar, pero tiene una señal de encapsidación menos eficiente que el fago *wild type*. Se utiliza para generar partículas de fagos recombinantes en una primera instancia al construir una biblioteca (ya que el genoma recombinante de estos fagos no contiene toda la información genética para codificar la cápside viral) infectando bacterias previamente transformadas con los plásmidos virales recombinantes. También se utiliza para amplificar poblaciones de fagos de interés (por ej.: de un *output*), infectando bacterias previamente infectadas con dicha población.

***Input*:** Población de fagos que se incuban con una molécula de interés para seleccionar aquellos con especificidad por la misma en una ronda de *panning*. Puede corresponder a la biblioteca intacta (si se trata de una primera ronda de *panning*) o a un amplificado de un *output* de una ronda de *panning* anterior.

***Output*:** Población de fagos eluida de una determinada ronda de *panning* contra una molécula de interés.

***Output Amplificado*:** Población de fagos obtenida de un *output* de una ronda de *panning* que fue amplificada o replicada, mediante infección de bacterias permisivas con el *output* y posterior infección con un fago *helper*. De esta manera, cada partícula viral obtenida de un *output* se

replica varios órdenes de magnitud para poder realizar otra ronda de *panning*.

Panning o “selección”: metodología utilizada para seleccionar específicamente, a partir de una biblioteca de fagos, aquellas variantes que interaccionan con una molécula de interés. Usualmente consiste en varias rondas consecutivas de selección. Cada ronda consta de la incubación de la biblioteca (o *output* amplificado) con la molécula de interés, lavados para quitar la fracción de fagos inespecífica para dicha molécula, y la elución de los fagos que interaccionaron específicamente con la molécula de interés. A dicha población de fagos específicos se le denomina *output* de la ronda de *panning*.

Phage display (“presentación en fagos”): técnica de laboratorio utilizada para el estudio de interacciones proteína-proteína, proteína-péptido, proteína-DNA, etc, basada en el uso de bacteriófagos (virus que infectan bacterias) que permiten conectar físicamente proteínas expresadas en su cápside, con la información genética que las codifica. En esta técnica, un gen codificante para una proteína (ej: un VHH) o péptido de interés se fusiona con el gen de una proteína de la cápside viral manipulando el genoma viral plasmídico, y tras la producción del fago se consigue que éste presente la proteína de interés al exterior de la partícula consiguiendo conectar genotipo con fenotipo. Estos fagos pueden entonces ser incubados contra otras proteínas, péptidos o secuencias de DNA, con el fin de detectar la interacción entre la proteína que se muestra y las otras moléculas. Usualmente se utilizan bibliotecas de proteínas o péptidos en fagos para realizar selección de variantes que interaccionen con moléculas de interés.

Reactividad: En un ensayo de ELISA reactividad se refiere al reconocimiento de un anticuerpo por el analito que se ensaya. Así, el

término “**reactividad cruzada**” se refiere al reconocimiento de moléculas diferentes al analito para el cual se desarrolló en primera instancia.

Screening: Estudio de una población de fagos en el cual se buscan aquellos específicos por la molécula de interés. Generalmente se incuban clones aislados de fagos (o VHHs en el caso de este trabajo) detectando la unión de este y su antígeno mediante un anticuerpo conjugado específico de la cápside viral (o de un epítotope al cual el VHH está fusionado en este caso). De esta forma se pueden seleccionar aquellos fagos o VHHs específicos por la molécula de interés, y conocer su secuencia gracias al acoplamiento entre proteína-secuencia de DNA que existe en la metodología de *phage display*.

Título de una preparación de fagos: cantidad de fagos por mililitro. Se calcula mediante la infección de bacterias con diferentes diluciones de la preparación de fagos, y plaqueando dichas bacterias en placas de agar con el antibiótico para el cual el genoma viral plasmídico otorga resistencia. Se asume que una colonia solamente puede ser infectada por un fago (ya que existen mecanismos que inhiben la infección posterior por otro de la biblioteca, aunque no del fago *helper*), por lo cual el número de colonias contadas representa el título de la preparación al expresarlo por mL de la misma.

6 REFERENCIAS

1. Weiner, L., Surana, R. & Wang, S. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. **10**, 317–327 (2012).
2. Cheson, B. D. & Leonard, J. P. Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. 613–626 (2008).
3. Vanneman, M. & Dranoff, G. Antibody therapy of cancer. **12**, 237–251 (2014).
4. Chames, P., Regenmortel, M. Van, Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies : successes , limitations and hopes for the future. 220–233 (2010). doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x
5. Li, X., Hu, W., Zheng, X., Zhang, C. & Du, P. Emerging immune checkpoints for cancer therapy. 1–8 (2015). doi:10.3109/0284186X.2015.1071918
6. Buchbinder, E. I. & Desai, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. **39**, 98–106 (2016).
7. Finger, L. R. *et al.* The human PD-1 gene : complete cDNA , genomic organization , and developmentally regulated expression in B cell progenitors. **197**, 177–187 (1997).
8. Chemnitz, J. M. *et al.* SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. (2015). doi:10.4049/jimmunol.173.2.945
9. Agata, Y. *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. **8**, 765–772 (1996).
10. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. (2008). doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
11. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **2**, 261–268 (2001).
12. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1 , a third member of the B7 family , co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. 1365–1369 (1999).
13. Kinter, A. L. *et al.* The Common γ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 ? Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. 1–9 (2008).

14. Oestreich, K. J., Yoon, H., Ahmed, R. & Boss, J. M. NFATc1 Regulates PD-1 Expression upon T Cell Activation 1. (2008).
15. Leite, K. R. M. *et al.* PD-L1 expression in renal cell carcinoma clear cell type is related to unfavorable prognosis. *Diagn. Pathol.* **10**, 189 (2015).
16. Liang, S. C. *et al.* Regulation of PD-1 , PD-L1 , and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. 2706–2716 (2003). doi:10.1002/eji.200324228
17. Eppihimer, M. *et al.* Expression and Regulation of the PD-L1 Immunoinhibitory Molecule on Microvascular Endothelial Cells. **9**, 133–145 (2013).
18. Terawaki, S. *et al.* IFN- α Directly Promotes Programmed Cell Death-1 Transcription and Limits the Duration of T Cell-Mediated Immunity. (2015). doi:10.4049/jimmunol.1003208
19. Chen, L. & Azuma, M. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. **307**, 672–677 (2003).
20. Rozali, E. N., Hato, S. V, Robinson, B. W., Lake, R. A. & Lesterhuis, W. J. Programmed Death Ligand 2 in Cancer-Induced Immune Suppression. **2012**, (2012).
21. Zheng, P. & Zhou, Z. Human Cancer Immunotherapy with PD-1 / PD - L1 Blockade. **7**, 15–18 (2015).
22. Speiser, D. E. Inhibitory receptors beyond T cell exhaustion. **6**, 1–14 (2015).
23. Fife, B. T. & Pauken, K. E. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. **4**, 45–59 (2011).
24. Riella, L. . . , Paterson, A. . . , Sharpe, A. . . & Chandraker, A. Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. **12**, 2575–2587 (2013).
25. Loise, F. . . , Sage, P. . . & Sharpe, A. . . The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. 219–242 (2011). doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.The
26. Blank, C. *et al.* Absence of Programmed Death Receptor 1 Alters Thymic Development and Enhances Generation of CD4/CD8 Double-Negative TCR-Transgenic T Cells. (2016). doi:10.4049/jimmunol.171.9.4574
27. Keir, M. E., Latchman, Y. E., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. NIH Public Access. **175**, 7372–7379 (2009).

28. Lin, S., Peacock, C. D., Bahl, K. & Welsh, R. M. Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. **204**, (2007).
29. Press, D. Treg cells in the peripheral blood of lung cancer patients. 1831–1833 (2015).
30. Amarnath, S. *et al.* The PDL1-PD1 Axis Converts Human Th1 Cells Into Regulatory T Cells. **3**, 1–26 (2011).
31. Latchman, Y. E. *et al.* PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells , antigen-presenting cells , and host tissues negatively regulates T cells. **101**, (2004).
32. Nguyen, L. T. & Ohashi, P. S. Clinical blockade of PD1 and LAG3 — potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 45–56 (2014).
33. Li, J. *et al.* PD-1/SHP-2 inhibit Tc1/Th1 phenotypic responses and the activation of T cells in the tumor microenvironment. **75**, 508–518 (2016).
34. Pauken, K. E. & Wherry, E. J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer Kristen. **36**, 265–276 (2016).
35. Tomayko, M. & Shlomchik, M. J. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. **11**, 535–542 (2010).
36. Thibult, M., Mamessier, E., Gertner-dardenne, J. & Pastor, S. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. **25**, 129–137 (2012).
37. Nishimura, H., Nose, M. & Honjo, T. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. **11**, 141–151 (1999).
38. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Publ. Gr.* **15**, 486–499 (2015).
39. Kahan, S., Wherry, J. & Zagac, A. T Cell Exhaustion During Persistent Viral Infections. 180–193 (2016).
doi:10.1016/j.virol.2014.12.033.T
40. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **439**, 1–6 (2006).
41. Frebel, H. *et al.* Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice. **209**, 2485–2499 (2012).

42. Lázár-molnár, E. *et al.* Programmed death-1 (PD-1)–deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. **107**, (2010).
43. Klenerman, P. & Hill, A. T cells and viral persistence : lessons from diverse infections. **6**, 873–879 (2005).
44. Yi, J. S., Cox, M. A. & Zajac, A. J. T-cell exhaustion : characteristics , causes and conversion. **2**, 474–481 (2010).
45. Shen, Z. Genomic instability and cancer : an introduction. 1–3 (2011).
46. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **11**, (2011).
47. Locasale, J. W. & Cantley, L. C. Altered metabolism in cancer. 8–10 (2010).
48. Swann, J. B. & Smyth, M. J. Immune surveillance of tumors. **117**, 1137–1146 (2007).
49. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. 1–14 (2007). doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x
50. He, J., Hu, Y., Hu, M. & Li, B. Development of PD-1 / PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Nat. Publ. Gr.* 1–9 (2015). doi:10.1038/srep13110
51. Spranger, S. *et al.* Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. **18**, 1199–1216 (2013).
52. Shin, D. S. & Ribas, A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy : what ' s here , what ' s next ? *Curr. Opin. Immunol.* **33**, 23–35 (2015).
53. Zou, W. & Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 467–477 (2008).
54. Moreno, B. H. & Ribas, A. ligand-1 therapy in different cancers. *Br. J. Cancer* **112**, 1421–1427 (2015).
55. Lord, J. D. *et al.* NIH Public Access. **55**, 1396–1405 (2011).
56. Bertrand, A., Kostine, M., Barnetche, T., Truchetet, M. & Schaefferbeke, T. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies : systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 1–14 (2015). doi:10.1186/s12916-015-0455-8

57. Gardiner, D. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled assessment of BMS-936558, a fully human monoclonal antibody to programmed death-1 (PD-1), in patients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One* **8**, e63818 (2013).
58. Ott, P. A., Hodi, F. S. & Robert, C. CTLA-4 and PD-1 / PD-L1 Blockade : New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients CTLA-4 and PD-1 / PD-L1 Blockade : New Immunotherapeutic. 5300–5309 (2013). doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0143
59. Yuan, J. *et al.* Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. 2189–2199 (2014). doi:10.1056/NEJMoa1406498
60. Squibb, B. & Sharp, M. Biomarkers for the Clinical Use of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Non–Small-Cell Lung Cancer A Review. (2016). doi:10.1001/jamaoncol.2016.0639
61. Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. **207**, 2187–2194 (2010).
62. Jing, W. *et al.* Combined immune checkpoint protein blockade and low dose whole body irradiation as immunotherapy for myeloma. 1–15 (2015). doi:10.1186/s40425-014-0043-z
63. Callahan, M. K., Postow, M. A. & Wolchok, J. D. CTLA-4 and PD-1 pathway blockade : combinations in the clinic. **4**, 1–6 (2015).
64. Tsai, K. K. & Daud, A. I. Nivolumab plus ipilimumab in the treatment of advanced melanoma. *J. Hematol. Oncol.* 10–13 (2015). doi:10.1186/s13045-015-0219-0
65. Ghahroudi, M. A., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R. & Muyldermans, S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* **414**, 521–526 (1997).
66. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446–8 (1993).
67. van Der Linden, R. H. *et al.* Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 37–46 (1999).
68. Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: Current status. *Rev. Mol. Biotechnol.* **74**, 277–302 (2001).

69. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775–797 (2013).
70. Aetselier, P. D. E. B. & Evets, H. R. EFFICIENT TUMOR TARGETING BY SINGLE-DOMAIN ANTIBODY FRAGMENTS OF CAMELS. **462**, 456–462 (2002).
71. Vincke, C. *et al.* General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J. Biol. Chem.* **284**, 3273–84 (2009).
72. Schmitz, K. R., Bagchi, A., Roovers, R. C., Bergen, P. M. P. Van & Ferguson, K. M. Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains. *Structure* **21**, 1214–1224 (2013).
73. Lauwereys, M. *et al.* Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.* **17**, 3512–3520 (1998).
74. Wesolowski, J. *et al.* Single domain antibodies : promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. 157–174 (2009). doi:10.1007/s00430-009-0116-7
75. Chakravarty, R., Goel, S. & Cai, W. Nanobody : The ‘ Magic Bullet ’ for Molecular Imaging ? **4**, (2014).
76. Lin, D. Y. *et al.* The PD-1 / PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. **105**, 3011–3016 (2008).
77. Pardon, E. *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology *Els.* **9**, 674–693 (2015).