



OBTENCIÓN DE NANOBODIES ESPECÍFICOS CONTRA ROR-1 Y AgB DE *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*

TESINA DE GRADO DE LA LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
ROMINA ALVEZ ROSADO

Tutor: Dr. Andrés González Techera | Co-tutor: Dr. Gualberto González-Sapienza

Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República | Junio 2018

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Andrés, por todas sus enseñanzas y su gran dedicación. Gracias por tu gran optimismo y estar siempre abierto a intercambiar ideas. Fue un placer trabajar contigo.

A mi co-tutor, Gualberto, por aceptarme en el laboratorio dándome la oportunidad de integrarme a este gran grupo de trabajo. Gracias por todas las ideas aportadas y las horas de dedicación.

A la Dra. Carmen Lorenzo, por aceptar corregir mi trabajo.

A toda la cátedra de Inmunología, llena de gente linda dispuesta ayudar en todo momento. En especial agradezco a la “casita del fondo”, un hermoso grupo que me brinda una mano siempre que lo necesité y de los cuales aprendí un montón.

A mi padre, por el apoyo incondicional desde el día cero, aunque no siempre entendiera lo que hacía. A mi madre, por siempre estar para escucharme, por los consejos y discusiones científicas. Gracias a ambos, si hoy llegué hasta acá es gracias a ustedes.

A mis hermanos, Valentina y Diego, por siempre estar, por comprenderme y bancarme. Y un gracias especial para Florencia, mi hermanita, por escucharme siempre que lo precisé.

A Gonzalo, quien estuvo a mi lado desde el comienzo, gracias por entender siempre mis prioridades, por bancarme semanas sin verme cuando tenía que estudiar, por soportar mi mal humor, pero sobre todo, por tantos años de amor.

A Giovanna, por el apoyo y el cariño durante todos estos años. Gracias también por la carátula más linda.

A mis amigos, toda esa gente linda que conocí en facultad y que hizo de ese lugar mi segunda casa. Gracias por los consejos, el apoyo y las experiencias nuevas, hicieron de ésta una de las mejores etapas de mi vida.

A Pedro, mi dos, con quien compartí toda la carrera y con quien quiero seguir compartiendo muchos años más de amistad. Gracias por acompañarme siempre, incluso hasta el otro lado del océano.

A todos ustedes, muchas gracias!!

RESUMEN

Los nanobodies o VHHs (dominios variables de los anticuerpos de cadena pesada presentes en camélidos) surgen como una herramienta con un importante potencial, dadas sus características estructurales y la disminución de costos y trabajo que implica la generación de bibliotecas de estas moléculas en comparación a aquellas que se preparan con fragmentos de anticuerpos clásicos. Es por esto que en los últimos años ha aumentado el interés de los investigadores en generar VHHs para su aplicación directa en diferentes áreas. Se realizó la obtención y selección de nanobodies específicos contra el marcador tumoral ROR1 (Receptor Tyrosine Kinase like Orphan Receptor) y el antígeno B de *Echinococcus granulosus* a partir de una biblioteca inmune en llama mediante la técnica PhageDisplay.

Se ha definido al receptor de superficie celular ROR1 como una diana promisoriosa para el tratamiento y diagnóstico de leucemia linfocítica crónica (CLL), ya que su expresión en tejidos adultos se restringe prácticamente a células B malignas, constatándose solo en pequeña proporción en tejido adiposo, páncreas y un sub-conjunto de células B intermediarias. A partir de la biblioteca se obtuvo una muy buena proporción de clones reactivos contra el ectodominio de ROR1 recombinante, sin embargo, se constató un importante sesgo durante la etapa de panning que derivó en la obtención de únicamente cuatro clones diferentes. Los mismos se produjeron y purificaron a partir de un vector de expresión fuerte en procariotas, pero desafortunadamente ninguno presentó reactividad por el antígeno nativo.

La echinococcosis quística (CE) es una enfermedad de carácter zoonótico mundial causada por el estado larval del parásito platelminto *Echinococcus granulosus*. El antígeno B (AgB) es una de las proteínas mayoritarias secretadas por el parásito contenida en el líquido hidático. Su estudio resulta de gran interés dado que se lo ha propuesto como el antígeno más específico para serodiagnóstico de CE en humanos y además es un importante inmunomodulador parasitario. A partir de la biblioteca de VHHs se obtuvieron 100% de clones positivos de los cuales se logró aislar cinco secuencias distintas. Dado un criterio bien definido se escogió un clon para la generación de una columna que permita la purificación del AgB desde líquido hidático. La columna logró la purificación del antígeno con buen nivel de pureza y en un único paso.

Palabras clave:

- Nanobodies o VHHs
- PhageDisplay
- Bibliotecas de anticuerpos
- *Echinococcus granulosus*
- Antígeno B
- Leucemia linfocítica crónica
- ROR1

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

6His	Cola de 6 histidinas
A280	Absorbancia a 280 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgB	Antígeno B
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
BSA	Seroalbúmina bovina
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
CE	Echinococcosis quística
CLL	Leucemia linfoide crónica
CRD	Dominio rico en cisteínas
DO	Densidad óptica
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. granulosus</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
<i>E. granulosus s.l</i>	<i>Echinococcus granulosus sensu lato</i>
ELISA	Del inglés: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FA	Fosfatasa alcalina
FNU	Fracción no unida
FZD	Dominio Frizzle
GL	Capa germinal
HcAbs	Anticuerpos de cadena pesada
HLBPs	Proteínas de unión a ligandos hidrofóbicos
HA	Hemaglutinina
Ig	Inmunoglobulina
KRD	Dominio Kringle
LH	Líquido hidático
LL	Capa laminar

mAb	Anticuerpo monoclonal
OmpA	Del inglés: <i>Outer membrane protein A</i>
ON	Del inglés: <i>overnight</i>
pAb	Anticuerpo policlonal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoritrina
PO	Peroxidasa
PRD	Dominio rico en prolina
ROR	Del inglés: <i>Receptor Tyrosine Kinase like Orphan Receptor</i>
ROR1-bt	ROR1-biotinilado
RTK	Del inglés: <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS
TKD	Dominio tirosina quinasa
UA	Unidades de absorbancia
ufc	Unidades formadoras de colonias
VHH	Dominio variable de cadena pesada de camélidos

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Nanobodies, una herramienta con gran potencial.....	1
1.2 Fundamentos de PhageDisplay	4
1.3 Antígeno B de <i>Echinococcus granulosus</i>, una lipoproteína clave en hidatidosis	7
1.3.1 Hidatidosis, una enfermedad re-emergente con alto impacto en nuestro país	7
1.3.2 Antígeno B como blanco de estudio de <i>Echinococcus granulosus</i>	8
1.3.3 Métodos de purificación de Antígeno B nativo.....	11
1.4 El papel emergente de ROR1 en leucemia linfoide crónica.....	12
1.4.1 ROR1, una proteína de expresión diferencial con gran impacto en Leucemia linfoide crónica ...	12
1.4.2 ROR1 como molécula blanco para el diagnóstico de Leucemia linfoide crónica.	15
1.4.3 ROR1 como molécula blanco para terapia antitumoral en Leucemia linfoide crónica.....	16
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo general	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Buffers y soluciones	21
3.2 Medios de cultivo.....	22
3.3 Inmunización y Evaluación de la respuesta inmune con generación de anticuerpos	22
3.3.1 Inmunización	22
3.3.2 Titulación de anticuerpos totales contra los antígenos de inmunización.....	23
3.4 Cultivo celular procariota.....	24
3.5 Selección de VHHs específicos contra antígenos de interés.....	24
3.5.1 Panning	24
3.5.2 Titulación de fagos	26
3.5.3 Amplificación del output de fagos	26
3.5.4 Screening desde pComb3X.....	27
3.6 Clonado del output a vector de expresión.....	28
3.6.1 Vectores de expresión.....	28
3.6.2 Clonado del output a vector de expresión	30
3.6.3 Clonado individual de VHHs al vector de expresión	31
3.6.4 Screening desde pINQ-H6HA:	31
3.7 Análisis de la reactividad por distintas subunidades de AgB	32

3.8 Secuenciación	32
3.9 Expresión de VHHs	32
3.9.1 Expresión de VHH a pequeña escala en diferentes condiciones.....	32
3.9.2 Expresión de VHH a gran escala	33
3.9.3 Expresión de VHH biotinilado a gran escala.....	33
3.10 Purificación de VHH por cromatografía de afinidad.....	34
3.11 Conjugación de VHH no biotinilado a columna de agarosa activada.....	34
3.12 Purificación de AgB desde líquido hidático a través de “columna conjugada”	34
3.13 Westernblot.....	35
3.14 Construcción de la “columna capturada”	35
3.15 Purificación AgB desde líquido hidático por columna “capturada”	36
3.16 SDS-PAGE	36
3.17 Evaluación de la construcción ROR1 recombinante por ensayo ELISA	36
3.18 Análisis de la funcionalidad de los VHHs purificados por ensayo ELISA	37
3.19 Cultivo celular	37
3.20 Citometría de flujo	38
3.20.1 Optimización del ensayo de citometría de flujo	38
3.20.2 Análisis de la reactividad de clones VHH anti-ROR1 nativo por citometría de flujo	38
3.21 Identificación de clones por patrón de digestión.....	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1 Obtención de nanobodies específicos contra AgB que permita su purificación por cromatografía de inmunoafinidad.	40
4.1.1 El título de anticuerpos totales refleja una buena respuesta contra AgB por parte de la llama inmunizada.....	40
4.1.2 La selección de nanobodies específicos contra AgB resultó en un 100% de clones positivos	40
4.1.3 No se evidenció pérdida de reactividad al clonar la totalidad del output a un vector de expresión	41
4.1.4 El panning contra AgB nativo permitió aislar cinco clones diferentes.....	44
4.1.5 Destaca el clon VHH-AgB1 en la expresión a pequeña escala frente al resto de clones candidatos	45
4.1.6 La expresión a gran escala y purificación del clon VHH-AgB1 rindió un VHH en cantidad y pureza satisfactoria.....	45
4.1.7 La conjugación del clon VHH-AgB1 se realizó con alta eficiencia.....	47
4.1.8 Columna “conjugada” y AgB: fácil obtención y buen nivel de pureza, aunque con bajo rendimiento.	47
4.1.9 Columna “capturada”, una alternativa para la purificación de AgB	49

4.1.9.1: El clon VHH-AgB1 en su versión biotinilada repite buenos rendimientos y pureza tras su expresión a gran escala.....	49
4.1.9.2 Se logró la construcción de la columna “capturada” adecuadamente.....	49
4.1.10 La columna “capturada” no resulta una buena alternativa para la purificación de AgB	50
4.2. Obtención de nanobodies específicos contra ROR1 funcionales en citometría de flujo.....	52
4.2.1 El título de anticuerpos totales refleja una buena respuesta contra ROR1 por parte de la llama inmunizada.....	52
4.2.2 El antígeno recombinante ROR1 es reconocido por dos anticuerpos comerciales utilizados como referencia	52
4.2.3 Línea celular A549 expresa cantidades significativas de ROR1 y puede ser utilizada para la identificación de clones VHH específicos.....	53
4.2.4 La selección de nanobodies específicos contra ROR1 resultó en un 80% de clones positivos en ELISA.....	55
4.2.5 El panning contra ROR1 permitió aislar cuatro clones diferentes, uno de ellos dominante	55
4.2.6 La reactividad contra ROR1 se mantiene tras el clonado del output al vector pINQ-H6HA	56
4.2.7 A pesar de secuenciar 20 nuevos clones no se identificaron nuevas secuencias	57
4.2.8 Los cuatro clones se produjeron y purificaron a gran escala.	57
4.2.9 Los cuatro clones anti ROR1 purificados mantienen su reactividad en ELISA pero no funcionan en citometría.....	59
4.3 Optimización de una metodología que permita identificar diferentes clones	61
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	64
6. BIBLIOGRAFÍA.....	67

1. INTRODUCCIÓN

En el proyecto enmarcado en esta tesina de grado se busca mediante la tecnología PhageDisplay seleccionar nanobodies (también llamados VHHs) específicos contra: a) el receptor ROR1 (Receptor Tyrosine Kinase like Orphan Receptor 1), un marcador tumoral de amplia distribución en distintas neoplasias, y b) antígeno B (AgB) de *Echinococcus granulosus*, una de las proteínas del parásito más estudiadas y que posee un marcado valor diagnóstico. Los VHHs presentan un abanico de propiedades que los sitúan como potentes herramientas en el área de investigación, biotecnología y medicina. A continuación se describirán las características más relevantes y ventajosas de estas proteínas y como su aplicación en dos áreas bien distintas se presentan promisorias.

1.1 Nanobodies, una herramienta con gran potencial

Los anticuerpos monoclonales (mAb) obtenidos a partir de hibridomas surgieron como herramientas con gran potencial para una alta gama de aplicaciones, ya que dada su alta especificidad tienen la capacidad de dirigir una acción determinada a un target bien definido. Sin embargo, su producción no solo es costosa y compleja, sino que muchas veces, pese a su robustez, los anticuerpos obtenidos no resultan estables ante las condiciones que implican el traslado y la conservación, derivando así en la falta de reproducibilidad de ensayos. Asimismo, contar con los hibridomas no significa poseer una fuente inagotable del mAb, ya que si por cualquier motivo los mismos se pierden, se pierde con ellos la posibilidad de generar el mAb correspondiente. Este es el caso del mAb EB7 anti-AgB, disponible en la Cátedra de Inmunología y corrientemente utilizado para la purificación de AgB, cuyo hibridoma productor no pudo ser recuperado a partir del stock congelado, perdiéndose así la capacidad de producirlo.

Como alternativa a los mAbs obtenidos de hibridomas, desde hace varios años se han comenzado a utilizar fragmentos de anticuerpos derivados de camélidos y algunos peces cartilaginosos, que tienen en circulación anticuerpos que difieren de la estructura heterotetramérica de los anticuerpos convencionales. Se trata de glicoproteínas homodiméricas que presentan una porción Fc igual a la de los anticuerpos convencionales de tipo IgG, pero que carecen de cadena liviana y del dominio CH1, y su sitio de unión al antígeno está conformado únicamente por el dominio variable de la cadena pesada[1], **Figura 1.1.** Estos anticuerpos se denominan anticuerpos de cadena pesada (HcAbs) y constituyen el 11-25% de los anticuerpos circulantes de los camélidos en Sudamérica[2]. La región variable de los HcAbs de camélidos se denomina VHH y presenta únicamente tres regiones CDRs, a diferencia de los anticuerpos convencionales en los que el paratópe está conformado por seis CDRs[3]. Pese a esto, se ha observado que la afinidad que exhiben los VHHs rivaliza con la que presentan los anticuerpos convencionales[4].

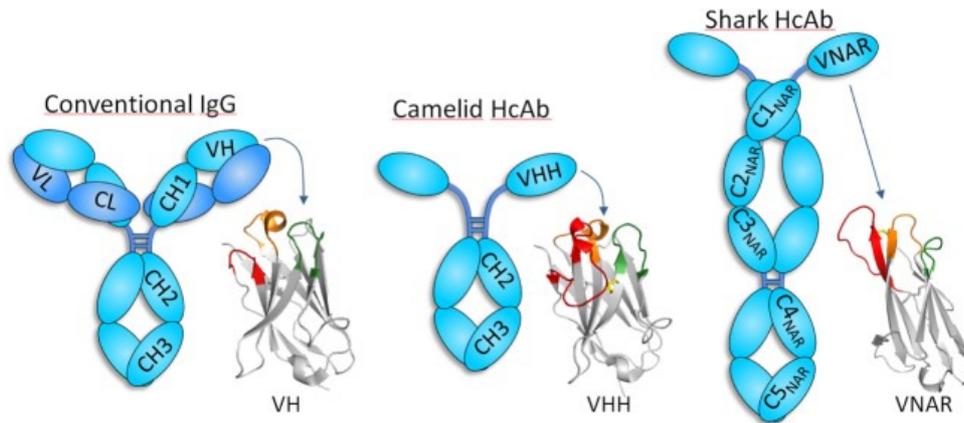


Figura 1.1. Diagrama representativo de anticuerpo convencional y anticuerpos de cadena pesada (HcAbs). Los anticuerpos convencionales están formados por una cadena pesada (celeste) y una cadena liviana (azul), mientras que los HcAbs se presentan desprovistos de cadena liviana, conformándose el sitio de unión a ligando únicamente por el dominio variable de la cadena pesada. Se muestra la organización del dominio variable de cadena pesada de cada uno de los anticuerpos [PDB IDs: 5WT9 (VH); 5TP3 (VHH); y 2COQ (V-NAR)]. CDR1, CDR2, y CDR3 están representados en naranja, verde y rojo, respectivamente, a excepción de V-NAR el cual carece de CDR2, y el color verde refiere a la región HV4 que algunas veces participa en la unión a antígeno. (Imagen obtenida de Gonzalez-Sapienza, G. et. al.; 2017)

Los VHHs presentan características que frente a los anticuerpos convencionales los sitúan como un gran rival con un amplio espectro de aplicaciones. Mediante análisis de secuencia[3, 5] y elucidación de la estructura cristalina[6] se han descrito varias características estructurales de los VHHs. Estas proteínas presentan una mayor solubilidad, consecuencia de cambios en aminoácidos conservados involucrados en la interacción hidrofóbica VH-VL por residuos hidrofílicos, además presentan residuos de cisteína no canónicas en los CDRs lo que aumenta su estabilidad, y una mayor frecuencia de puntos calientes de hipermutabilidad. Sumado a esto, el hecho de que presenten un CDR3 más largo amplía su capacidad de reconocimiento[5, 7]. Su pequeño tamaño (~15 kDa) junto a su paratope reducido con el CDR3 extendido, son características que hacen a los VHH capaces de acceder a epítopes que no son usualmente accesibles a los anticuerpos convencionales. El reconocimiento de epítopes cóncavos u ocultos (como lo son sitios activos de enzimas y epítopes crípticos virales), así como su alta capacidad de distinguir cambios conformacionales en una molécula, apareja consigo una importante gama de aplicaciones[6, 8, 9]. De hecho, nuevas aplicaciones surgen día a día para estas pequeñas proteínas, a priori se creía que los VHHs no eran capaces de interactuar con alta afinidad con haptenos dado que los mismos se unen a la hendidura hidrofóbica formada por las porciones variables de la cadena pesada y liviana[10], sin embargo, estudios recientes han descrito el aislamiento de VHHs de muy buena afinidad contra el hapteno metrotexato, en el cual se evidenció por resolución de estructuras cristalográficas que el reconocimiento se da mediante una estructura de tipo túnel[11]. Por otra parte, los VHHs presentan una robustez característica, propiedad deseable en cualquier anticuerpo y particularmente imprescindible cuando se los utiliza en ensayos que implican condiciones estrictas. Los VHHs mantienen su funcionalidad intacta pese a ser sometido a condiciones fisicoquímicas exigentes, como lo son bajas temperaturas durante períodos prolongados (almacenamiento durante meses a 4°C o -20°C), incubaciones a moderadas y altas temperatura y a la presencia de agentes químicos desnaturizantes en altas concentraciones[12]. Esta resistencia a la desnaturalización y el plegamiento eficiente

luego de ser sometidos a las diferentes condiciones mencionadas son producto del carácter hidrofílico aumentado que presentan y su identidad de monodominio. Más aun, su estabilidad puede ser mejorada mediante la introducción de residuos de cisteína en determinadas porciones que repercute en la formación de enlaces disulfuro adicionales[13, 14], presentándose en consecuencia resistentes a la degradación por pepsina o quimiotripsina[15].

Los VHHs tienen un importante potencial en el área terapéutica dada su baja inmunogenicidad, la capacidad de acceder a tejidos más fácilmente dado su pequeño tamaño, comportamiento estable, carencia de porción Fc que implica la no asociación de funciones efectoras, y una secuencia que comparte alto grado de identidad con la familia VH3 de humanos[16]. Asimismo, al fusionarlo a diversas moléculas se logran diferentes aplicaciones a target dirigidos, entre ellas está la localización intracelular por fusión a la proteína GFP[17], toxicidad dirigida a células cancerígenas por fusión a una droga o toxina[18], depleción de antígeno por fusión a dominio F-box que recluta la maquinaria de poliubiquitinación marcándolo para su degradación por el proteosoma[19], etc.

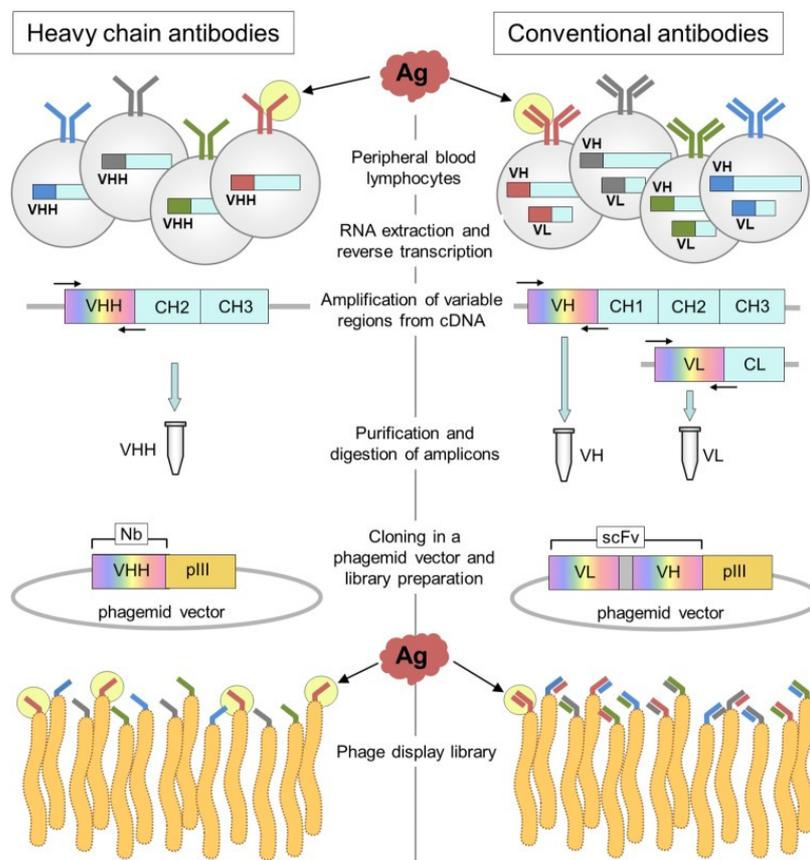


Figura 1.2. Diagrama representativo de la construcción de bibliotecas de Nanobodies y de anticuerpos convencionales. Los pasos principales en la generación de las bibliotecas de nanobodies (VHH) y de anticuerpos convencionales (scFv) se describen a la izquierda y a la derecha, respectivamente. La diferencia clave se produce durante la amplificación por PCR de las regiones del gen variable que se realiza por separado para los genes VH y VL. Al ensamblar el cassette VL-espaciador-VH que codifica el scFv, se mezclan los genes VL y VH, y el emparejamiento original de los dominios variables ligero y pesado ocurre solo a una frecuencia muy baja. (Imagen obtenida de Gonzalez-Sapienza, G. et. al.; 2017)

Más allá de las muy ventajosas características descritas, la que más destaca es la ausencia de barajado durante la construcción de la biblioteca, consecuencia de un sitio de

unión conformado únicamente por la cadena pesada, por lo que no es requerida la etapa de emparejamiento aleatorio de los dominios VH y VL para lograr la formación de un determinado sitios de unión[1], **Figura 1.2**. Este hecho, junto con su fácil manipulación, posiciona a los camélidos como animales de preferencia para la construcción de bibliotecas de moléculas de unión específica con altos rendimientos, requiriéndose una biblioteca de menor tamaño para lograr una buena representación del repertorio inmune original (5×10^6 para VHHs y $(5 \times 10^6)^2 = 2.5 \times 10^{13}$ para scFv)[20], en la que se encuentran moléculas con especificidad antigénica y afinidad de buena calidad.

Por otra parte, y no menos importante, es posible expresar los VHHs fácilmente y con un alto rendimiento en microorganismos[21, 22], líneas celulares animales y plantas[23]. Su producción en procariontes implica bajos costos y fácil manipulación, lo que junto con el resto de las características descritas, posiciona a los VHHs como una excelente opción a tener en cuenta en innumerables aplicaciones, ya que con tan solo contar con la secuencia de ADN de ~ 400 pb de aquel VHH seleccionado y estandarizado para su propósito previsto, es posible obtener una fuente renovable de la proteína, logrando así una eficiente reproducción del ensayo a través de los años y en cualquier laboratorio del mundo[1]. Esto también permite su intercambio mediante el envío “electrónico” de la secuencia y posterior síntesis, evitando así los costos e inconvenientes que implica el traslado de hibridomas o anticuerpos, puntos que vale resaltar, permiten remover obstáculos y fomentar el avance científico[1]. Por todas estas razones las bibliotecas de VHHs surgen como una fuente atractiva.

1.2 Fundamentos de PhageDisplay

La tecnología PhageDisplay, fue propuesta por primera vez en 1985 por G. P. Smith, teniendo un fuerte impacto al abrir una gran puerta para el desarrollo de nuevos enfoques[24]. Esta tecnología consta de la generación de una biblioteca, ya sea de fragmentos de anticuerpos o péptidos, que serán presentados en la superficie de bacteriófagos (fagos) a partir de la cual se llevará a cabo la selección de aquellas moléculas deseadas para un determinado propósito. La misma ha sido desarrollada para varios bacteriófagos (λ , T4 y T7)[24], sin embargo los más utilizados son los fagos filamentosos[25], destacando la clase Ff : f1, fd, M13 (denominada así por infectar bacterias a través de F-pili)[26]. Estos fagos, pertenecientes al género Inovirus, familia Inoviridae, típicamente infectan bacterias Gram-negativas, dentro de las cuales destaca *E. coli* como modelo a utilizar[24]. Su genoma consiste en ADN simple hebra circular, el cual se encuentra rodeado de una cápside proteica cilíndrica. Dentro del mismo se pueden identificar 11 genes, y sus productos se clasifican según su función: proteínas de cápside (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX), proteínas involucradas en la replicación del ADN (pII, pV, pX) y proteínas responsables del ensamblaje de la partícula viral (pI, pIV, pXI)[27]. La técnica se basa en el clonado de una secuencia de ADN foráneo en un sitio específico: en tándem al gen de una proteína de superficie, siendo pIII la utilizada habitualmente en el caso de los fragmentos de anticuerpos. Como resultado, se obtiene la secuencia aminoacídica foránea fusionada al extremo N-terminal de la proteína pIII en la superficie del fago, sin afectar la viabilidad de la partícula viral[28], **Figura 1.3**. La proteína pIII (406 aa), denominada proteína menor de la cápside, es incorporada a la cubierta del fago durante el ensamblaje. Esta proteína presenta 3 dominios separados por espaciadores de glicina, siendo el

dominio C el responsable del anclaje al virión, mientras que los dominios N1 y N2 son fundamentales para la infección de la bacteria vía F-pili[24].

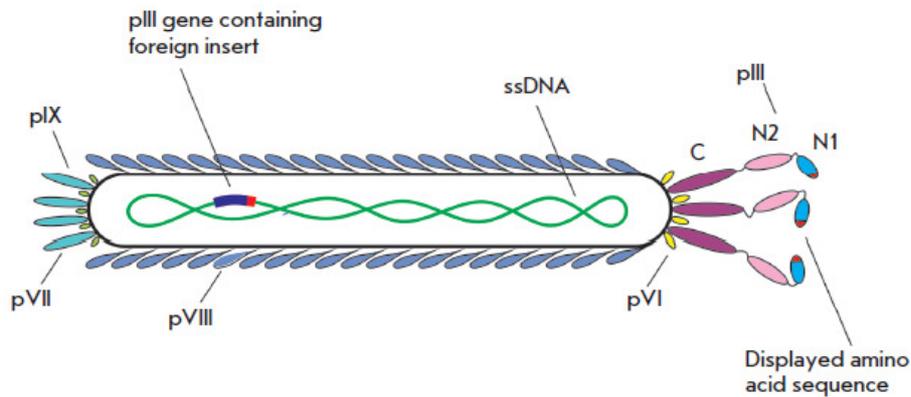


Figura 1.3. Estructura de un fago filamentoso presentando una secuencia aminoacídica foránea (indicada en rojo) fusionada a la proteína de superficie pIII. (Imagen obtenida de Nemudraya, A. et. al.; 2016).

Como se mencionó anteriormente, la generación de bibliotecas de VHHs supone una gran ventaja. Los VHHs se obtienen fácilmente desde camélidos luego de implementarles un breve cronograma de inmunización seguido del clonado de los genes V, extraídos de linfocitos de sangre periférica, fusionados al gen de la proteína pIII en un vector fagémido con el cual se transforma células *E. coli*. La utilización de este vector implica la necesidad de infección con fago helper para la formación de las partículas virales, ya que los vectores fagémidos no codifican para el resto de las proteínas involucradas en la replicación y ensamblaje de los viriones. El fago helper a utilizar debe presentar la particularidad de poseer una señal de encapsidación del ADN disminuida frente a la que presenta el vector fagémido, a modo de favorecer la encapsidación del vector en las partículas virales. Además, la infección con este fago implica que la progenie viral que se obtiene sea híbrida, es decir que exhiba solo un cierto número de copias de la proteína pIII fusionada al VHH, poseyendo así la capacidad de infección a través de la proteína pIII sin fusionar[29]. Cabe destacar la correlación directa que existe entre el fenotipo y el genotipo de una partícula viral, expresando cada una de ellas una única molécula de VHH en su superficie codificada por la secuencia contenida en el vector. La selección del VHH deseado se lleva a cabo mediante un ensayo de *panning* in vitro en el cual son requeridos múltiples ciclos de: i) enfrentar biblioteca a un antígeno dado, ii) eliminación de fagos inespecíficos por lavados, iii) elución y amplificación de los fagos específicos, **Figura 1.4.** El antígeno utilizado puede presentarse en diferentes formatos incluyendo proteínas purificadas, proteínas o péptidos recombinantes, tejidos o células enteras[30].

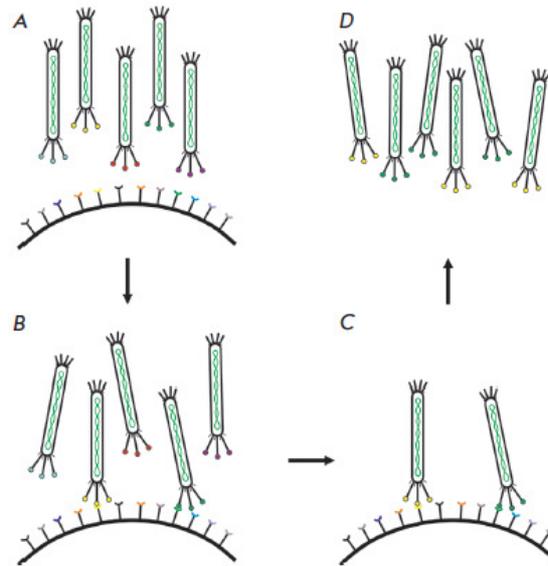


Figura 1.4: Representación esquemática del biopanning de una biblioteca en fagos filamentosos. A y B: incubación de la biblioteca con la molécula blanco, C: eliminación de los fagos no unidos por etapa de lavado, D: elución de los fagos unidos a la molécula blanco y amplificación. (Imagen obtenida de Zhao, A. et. al.; 2016).

En el vector fagémido pComb3X utilizado en este estudio, (cedido amablemente por el Dr. Barbas; The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) la expresión de la proteína pIII y por tanto también del VHH se encuentra regulada bajo el promotor *lac*. Además de las secuencias mencionadas, se destaca la presencia de la señal OmpA corriente arriba del VHH, la cual es responsable de dirigir el transporte del mismo al periplasma de la bacteria, y corriente abajo del VHH una cola de 6 histidinas (6His) seguida de un epítipo de hemaglutinina (HA), etiquetas ampliamente utilizadas en los procesos de purificación y detección, respectivamente. Asimismo, se destaca la presencia del marcador de resistencia al antibiótico ampicilina, **Figura 1.5.**

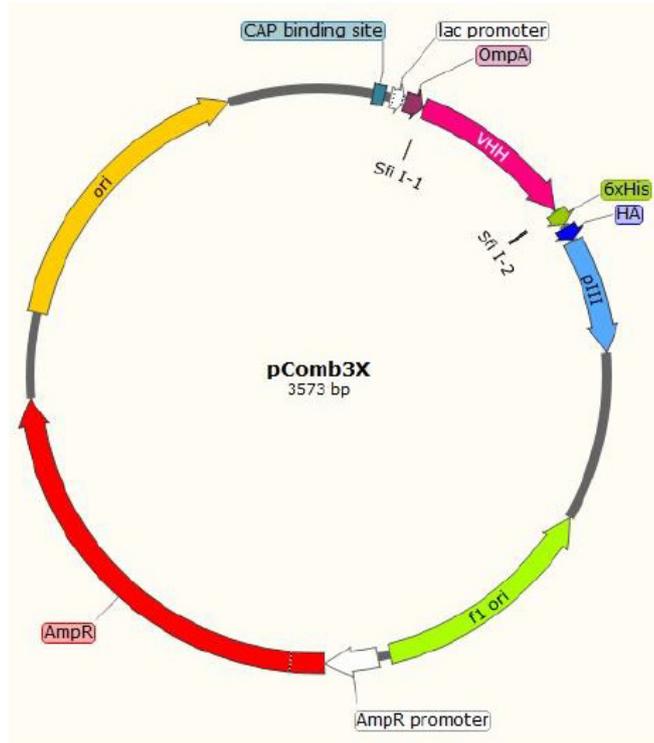


Figura 1.5. Esquema del vector pComb3X. Se observa la secuencia de VHH flanqueado por sitios SfiI y en tándem con la secuencia de la porción N-terminal de la proteína pIII. Su expresión se encuentra regulada por el promotor lac, inducible en presencia de IPTG. Se destaca la presencia de las etiquetas 6His y HA corriente abajo del VHH, la secuencia OmpA responsable de la exportación del VHH al periplasma y la resistencia a ampicilina (AmpR).

1.3 Antígeno B de *Echinococcus granulosus*, una lipoproteína clave en hidatidosis

1.3.1 Hidatidosis, una enfermedad re-emergente con alto impacto en nuestro país

La hidatidosis o echinococcosis quística (CE) es una enfermedad parasitaria crónica de carácter zoonótico mundial causada por el estado larval (metacestode) del parásito platelminto perteneciente al género *Echinococcus granulosus* sensu lato (*E. granulosus* s.l.)[31]. La cronicidad de esta enfermedad está fuertemente asociada al asintomatismo como consecuencia del lento crecimiento larval y, principalmente, a la excelente adaptación del parásito a su hospedero inmunocompetente[32]. La CE se caracteriza por la formación de quistes uniloculares que se establecen principalmente en órganos parenquimatosos de un amplio rango de especies animales, primordialmente en ungulados domésticos[31]. *E. granulosus* s.l. posee un ciclo de vida complejo que involucra hospederos intermediarios y hospederos definitivos[33] que hospedan diferentes estadios del parásito: el estadio adulto se observa en los hospederos definitivos, mientras que el estadio larval se presenta en los hospederos intermediarios[34], **Figura 1.6.** El ser humano es un huésped intermediario accidental en el ciclo reproductivo de esta tenia, ya que interrumpe el ciclo de vida del parásito. La infección en humanos está asociada a malas prácticas sanitarias y se produce cuando se ingiere en forma accidental agua y/o vegetales contaminados con huevos de *E. granulosus*[31].

Se considera a la hidatidosis un importante problema de salud pública ya que, si bien no presenta una alta mortalidad asociada, en muchas partes del mundo la enfermedad persiste con altas incidencias, y en algunas áreas es un problema re-emergente[35]. La cirugía es el tratamiento clásico para CE y si bien es curativa, la recurrencia de la enfermedad se ve asociada a esta práctica y no es aplicable en el caso que exista diseminación del quiste[32]. Por tal motivo se desarrollaron como terapias alternativas drogas antihelmínticas y drenaje percutáneo, sin embargo ambas metodologías reclaman ensayos más exhaustivos sobre en qué condiciones se debe proceder, así como su eficacia y efectos adversos[32]. Para el surgimiento de nuevas terapias u optimización de las ya existentes se requiere del conocimiento de la biología parasitaria de *E. granulosus*, y en este contexto el estudio del AgB adquiere gran importancia.

1.3.2 Antígeno B como blanco de estudio de *Echinococcus granulosus*

Como se mencionó, el estado larval de *E. granulosus* es el agente causal del quiste hidático, el cual se establece principalmente en hígado y pulmones. El quiste es una estructura unilocular llena de líquido (denominado líquido hidático, LH), limitada por una pared formada por una capa externa laminar (LL) y una capa interna germinal (GL). La capa laminar es acelular, permeable y rica en carbohidratos sintetizados por la capa germinal celular subyacente. Esta última es un sincitio que genera por reproducción asexual los protoscólices transformando al quiste en fértil. En ocasiones los protoscólices quedan en la cavidad de la hidátide recubiertos por una capa germinativa formando lo que se denomina vesículas hijas; a partir de los protoscólices es que se desarrollara el parásito adulto en el hospedero definitivo[36]. La estructura completa está rodeada por una capa de colágeno derivada del hospedador como consecuencia de la respuesta inflamatoria[37]. La hidátide rodeada por esta capa de colágeno es lo que se conoce como quiste hidático[36], **Figura 1.6**. La infección con *E. granulosus* al igual que otras infecciones por helmintos generan una respuesta efectora del hospedero de tipo Th2[36]. Sin embargo, gracias a moléculas del parásito moduladoras de la respuesta inmune, a estas respuestas efectoras se superponen fuertes respuestas reguladoras evidenciadas por una alta expresión local de IL-10, TGF- β , el reclutamiento de células T reguladoras y secreción de anticuerpos de isotipo IgG4[36]. Por tanto, la respuesta efectora que se monta no logra eliminar al parásito, estableciéndose así una infección crónica, reflejo de la gran adaptación del parásito a sus hospederos intermediarios.

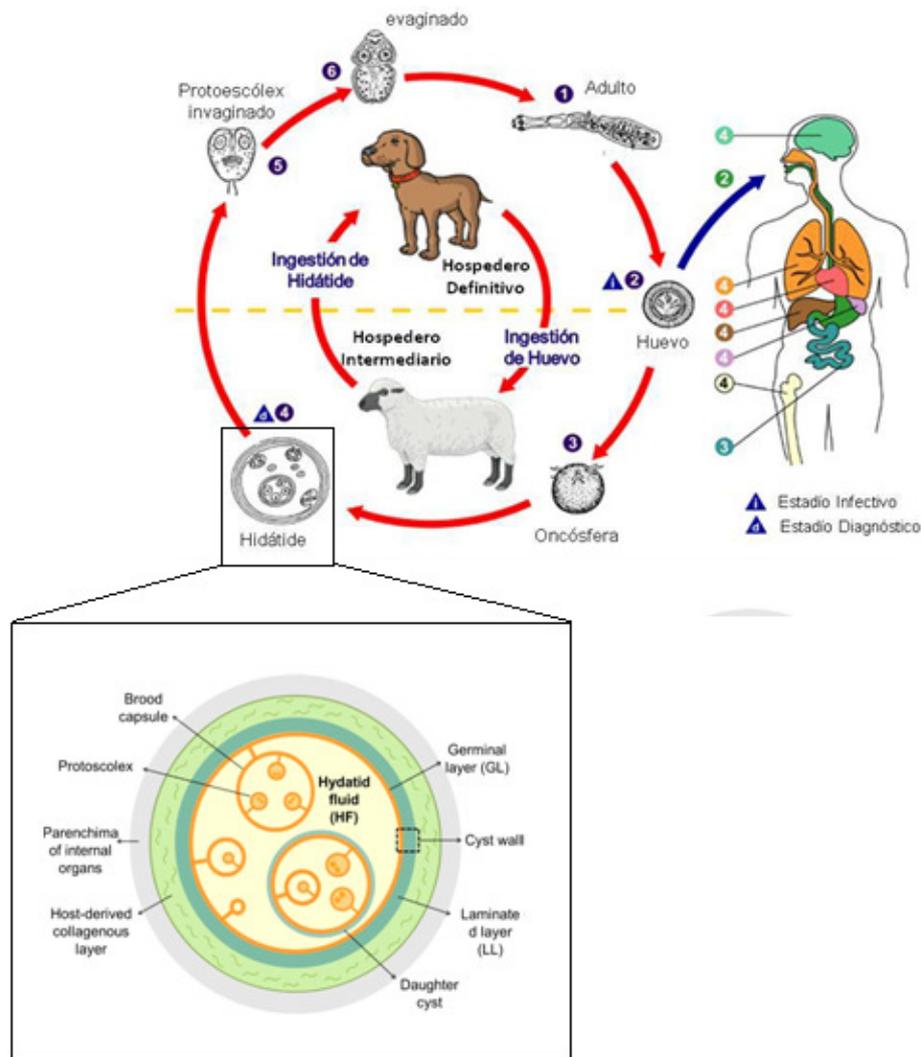


Figura 1.6. Ciclo de vida de *E. granulosus* y el quiste hidático. El estadio adulto del parásito es un gusano que habita el intestino delgado del hospedador definitivo, el cual libera en su materia fecal huevos embrionados que son ingeridos por el hospedero intermediario. Una vez en el intestino se produce la eclosión del huevo liberando la oncosfera que atraviesa las paredes intestinales y viaja hacia los órganos parenquimatosos en los que se establece. La oncosfera se desarrolla dando lugar a la hidátide que al alcanzar la madurez genera protoscolices. El ciclo de vida se completa cuando el hospedero definitivo ingiere vísceras de los hospederos intermediarios infectadas con quistes fértiles (que contienen protoscolices). En el intestino del hospedero definitivo los protoscolices se evaginan y se adhieren a la mucosa intestinal continuando su desarrollo hacia el estadio adulto. Se destaca el estadio hidátide a partir del cual se forma el quiste hidático tras generar una respuesta inflamatoria por parte del hospedero. (Imagen adaptada del sitio web Centers for Disease Control and Prevention de Estados Unidos (www.cdc.gov) y Silva, V. et. al.; 2015)

En el líquido hidático se observa una compleja mezcla de productos de excreción y secreción del parásito así como de moléculas del hospedador, principalmente albúmina e inmunoglobulinas[38, 39]. Una de las moléculas mayoritarias producida por el quiste es el antígeno B (AgB). Se trata de una lipoproteína de aproximadamente 200 kDa considerada el antígeno más específico del género *Echinococcus* para serodiagnóstico de CE en humanos[40, 41], y al mismo tiempo propuesto como componente inmunomodulador parasitario[42, 43], motivo por el cual el estudio de este antígeno resulta trascendente.

El AgB pertenece a una familia cesto-específica de proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (HLBPs)[44]. Estos componentes hidrofóbicos representan

aproximadamente el 40-50% del complejo y consiste en una variedad de lípidos neutrales (mayormente triacilglicéridos, esteroides y ésteres de esteroides) y polares (principalmente fosfatidilcolina)[45], **Figura 1.7**. Dada la heterogeneidad lipídica que presenta el AgB y el hecho de que los cestodos han perdido la vía de biosíntesis de lípidos y esteroides[46], se ha propuesto que el AgB puede ser de suma importancia para el metabolismo lipídico del parásito, presentándose como un interesante blanco para terapia de CE. Asimismo, se ha propuesto que las HLBP pueden actuar como moléculas mensajeras cargando señales de lípidos que pueden jugar un rol en la activación celular y/o procesos de diferenciación involucrados en la adaptación del parásito al sistema inmune del hospedador; ensayos *in vitro* sugieren que AgB puede modular la respuesta del hospedero mediante regulación a la baja de neutrófilos, células dendríticas y linfocitos T[47-49]. El hecho de que el hospedero desarrolle una fuerte respuesta serológica contra el antígeno[50], refuerza esta teoría. Sin embargo, si el AgB alcanza los tejidos del hospedero y el mecanismo por el cual lo hace permanecen desconocidos. Las HBLP de AgB son cinco proteínas codificadas por una familia multigénica polimórfica denominadas B1-B5. Todas estas subunidades son ricas en α -hélice, presentan un peso de aproximadamente 8 kDa y la capacidad de oligomerizar. El análisis de AgB nativo desde líquido hidático, reveló además de la presencia del componente de 8 kDa, la aparición de oligómeros de 16, 24, y 32 kDa que disminuyen su abundancia a medida que aumentan su peso y en los cuales su asociación ocurre independiente de lípidos y puentes disulfuro. Todos los oligómeros están contruidos a partir de las distintas subunidades de 8 kDa y son responsables del patrón característico de AgB en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras[34], **Figura 1.7**.

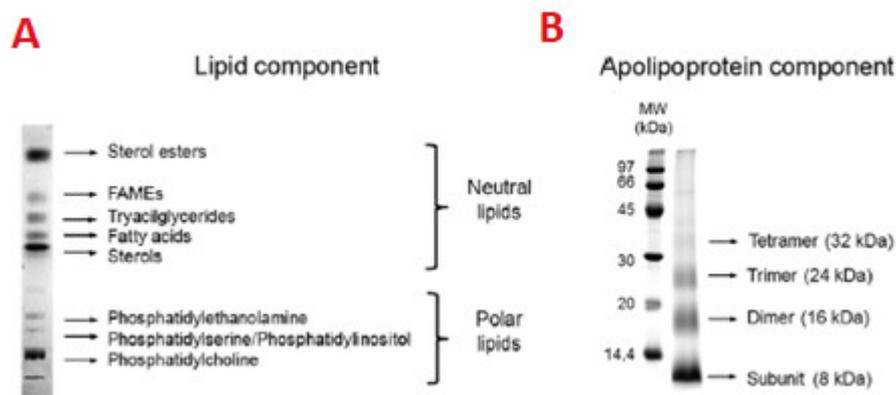


Figura 1.7. Patrón lipídico y proteico del AgB. **Figura 1.7A:** Composición lipídica visualizada mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento. Una amplia variedad de lípidos neutrales y polares se presentan en AgB. **Figura 1.7B:** Apolipoproteínas de AgB de 8 kDa y sus oligómeros de mayor peso molecular (16, 24 y 32 kDa) mediante SDS-PAGE. (Imagen adaptada de Silva, V. et. al.; 2015).

La heterogeneidad de los componentes apolipoproteicos de AgB (revelado por estudios proteómicos) es una de las características remarcables. Las cinco subunidades están compuestas por 65-71 aminoácidos. Su secuencia aminoacídica reveló una mayor similitud entre las subunidades B1, B3 y B5, mientras que las subunidades B2 y B4 revelaron mayor similitud entre ellas[34]. Por otra parte, se determinó a B1 como la apolipoproteína mayoritaria de AgB (determinado por electroforesis 2D en SDS-PAGE combinado con isoelectroenfoque)[45]. Dada la expresión diferencial de estas subunidades dependiendo del estadio del ciclo de vida del parásito y del tejido, así como la

unión diferencial de lípidos dependiendo de la subunidad en cuestión, se sugiere una especialización funcional de las mismas[36]. La estructura de AgB propuesta plantea que los lípidos más hidrofóbicos estarían secuestrados en el centro de la estructura, rodeados por una capa hidrofílica externa que contiene las subunidades del antígeno y lípidos anfipáticos (mayormente fosfolípidos y colesterol no esterificado), organización que permitiría explicar cómo es posible acomodar altas cantidades de lípidos en una sola partícula[34], **Figura 1.8**. Dada la relación entre la masa de lípidos y de proteínas y la masa molecular promedio del AgB, se propone una similitud con las lipoproteínas de vertebrados, específicamente con HDL₃[45].

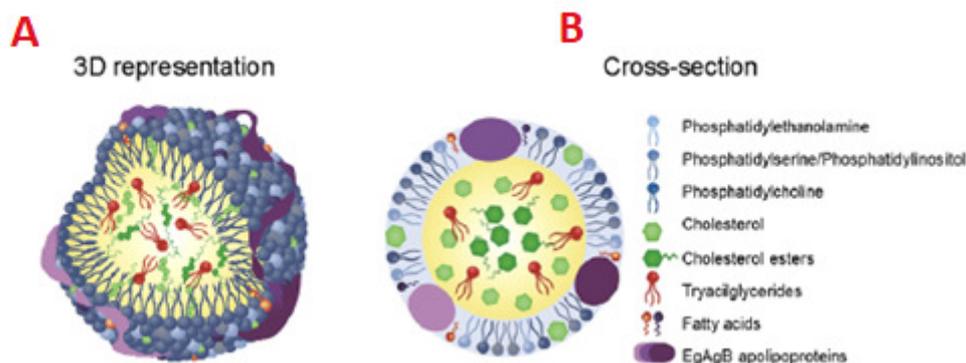


Figura 1.8. Modelo de la organización estructural del AgB. **Figura 1.8A:** Representación 3D de la organización estructural propuesta para AgB. **Figura 1.8B:** Representación esquemática de una sección transversal de AgB de acuerdo al modelo propuesto. El núcleo contiene la mayoría de los lípidos hidrofóbicos rodeados por una capa de fosfolípidos donde las apolipoproteínas están incrustadas. (Imagen adaptada de Silva, V. et. al.; 2015).

1.3.3 Métodos de purificación de Antígeno B nativo

Dado el importante rol de AgB en la capacidad del parásito de adaptarse a su hospedero y modular su respuesta inmune, resulta de alto interés estudiar esta molécula para lo cual es necesario un método bien optimizado que permita su purificación en estado nativo. En un principio la purificación de AgB desde líquido hidático en la Cátedra de Inmunología se realizaba mediante cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-sefarosa, seguido de cromatografía de inmunoafinidad utilizando el mAb EB7 específico para la subunidad B1[51]. Este método permitía la purificación de AgB con alta pureza en su conformación nativa. Desafortunadamente la pérdida del hibridoma secretor del mAb EB7, requirió de la optimización de un nuevo método de purificación que permitiera obtener al AgB con buen nivel de pureza y en su estado nativo a modo de estudiar su rol en la modulación de células inmunes. La metodología desarrollada acopló al paso inicial de fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa, tres rondas de ultracentrifugación en un gradiente de KBr, técnica ampliamente utilizada en la purificación de lipoproteínas plasmáticas[52]. Esta metodología permite la purificación de AgB nativo con un nivel de pureza estimada en el 90% (**Figura 1.9**), sin embargo, supone un arduo trabajo y los efectos inmunomoduladores que se obtuvieron no lograron reproducir aquellos obtenidos al utilizar AgB purificado por inmunoafinidad, probablemente como consecuencia de contaminantes minoritarios que no pudieron ser eliminados. En cuanto al rendimiento de este método, comúnmente se obtienen 4 mg de AgB por litro de líquido hidático.

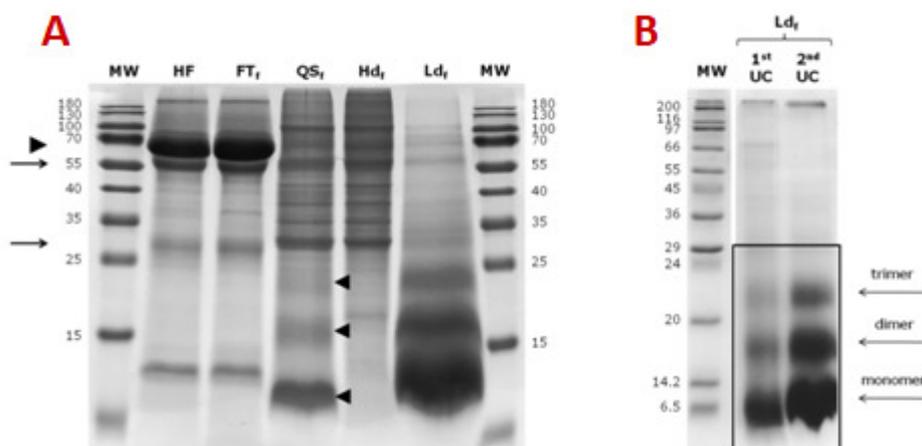


Figura 1.9. SDS-PAGE del proceso de purificación de AgB a partir de líquido hidático por método establecido en el laboratorio. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en condiciones reductoras y desnaturalizantes, teñido con azul de Coomassie. **Figura 1.9A:** Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa de LH_f y ultracentrifugación posterior en un gradiente de KBr; se denomina MW: marcador de peso molecular; HF: líquido hidático; QS⁻: fracción Q-Sefarosa negativa; QS⁺: fracción Q-Sefarosa positiva; Hd_f: fracción de alta densidad; Ld_f: fracción de baja densidad. Se señala con cabeza de flecha grande la albúmina (65 kDa), con flechas simples las inmunoglobulinas del hospedero (bandas con peso molecular de 55 y 25 kDa correspondientes a las cadenas pesadas y livianas de IgG, respectivamente), con cabeza de flecha pequeña la banda de 8 kDa y las bandas regularmente espaciadas correspondientes al monómero y oligómero del AgB, respectivamente. **Figura 1.9B:** Análisis de SDS-PAGE de la Ld_f obtenida mediante dos ronda de ultracentrifugación; se denomina 1st UC: primera ultracentrifugación; 2ed UC: segunda ultracentrifugación; se señala los diferentes oligómeros del AgB. (Imagen obtenida de Folle, A. et.al.; 2017).

Dados los hechos, la optimización de un método que permita obtener AgB con las cualidades con las que se obtenía tras su inmunopurificación y mediante un método que suponga un menor tiempo de trabajo, resulta de gran relevancia para el equipo de trabajo de la Dra. Ana Ferreira. Es así que se buscó realizar la fabricación de una columna de inmunoafinidad construida con nanobodies específicos contra AgB nativo, lo cual además supone una ventaja mayor, la capacidad de reproducir la columna las veces deseadas independizándose de la necesidad de mantener un clona.

1.4 El papel emergente de ROR1 en leucemia linfoide crónica

1.4.1 ROR1, una proteína de expresión diferencial con gran impacto en Leucemia linfoide crónica

En los últimos años la búsqueda de mejoras en las técnicas tanto de diagnóstico como de tratamiento para la leucemia linfoide crónica (CLL) ha tenido gran convocatoria, ya que los pacientes que padecen la enfermedad presentan una media de supervivencia de 2 a poco más de 10 años desde el momento del diagnóstico (dependiendo de la etapa y características de la enfermedad y del paciente), y las terapias aprobadas suponen un alto riesgo para el paciente[53]. CLL (según la clasificación WHO se denomina a CLL una enfermedad neoplásica únicamente de células B, mientras que las llamadas T-CLL fueron renombradas como leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL)) representa el 30% de las leucemias identificadas[54]. Se trata de una enfermedad neoplásica caracterizada por la acumulación de linfocitos B CD5⁺CD19⁺ no funcionales en sangre, médula ósea y tejidos

linfoides[55]. Los pacientes que padecen esta enfermedad, regularmente presentan hypogammaglobulinemia y una deficiencia inmune progresiva[56]. La CLL es el tipo de leucemia más común en adultos mayores en países occidentales, presentando mayor incidencia en hombres que en mujeres en una proporción 2:1. Además de la edad avanzada, existen otros factores de riesgo que predisponen al desarrollo de la enfermedad, entre ellos se encuentra la ascendencia caucásica e historial familiar de enfermedades malignas hematológicas. El curso clínico de la enfermedad es heterogéneo, muchos pacientes cursan una enfermedad indolente que no requiere tratamiento, mientras otros cursan una enfermedad agresiva[57]. A partir de estudios independientes del perfil de expresión génica de células B en CLL se reveló un panel de genes que se ve sobre-expresado en relación a las células B normales, destacando entre ellos el receptor tirosina quinasa de superficie celular ROR1[55], que por las propiedades que se describirán a continuación, resulta un interesante blanco para diseño de inmunoterapias y de técnicas de diagnóstico.

ROR1 y ROR2 son los únicos miembros de la familia ROR (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor) y comparten un 58% de su secuencia. Ambas son proteínas de 104 kDa, sin embargo, debido a modificaciones post-traduccionales de tipo N-glicosilación imprescindibles para su función, ROR1 se presenta como una proteína de 130 kDa[58]. La familia ROR está emparentada con la familia RTK, sin embargo exhiben ciertas características únicas que las sitúan como miembros de una familia separada de receptores[59]. Los miembros de la familia ROR comparten un diseño modular: presentan una región extracelular involucrada en la interacción receptor-ligando conformada por un dominio de Inmunoglobulina (Ig) y dos dominios ricos en cisteína (CRD) conocidos como dominio Frizzler (FZD) y dominio Kringle (KRD), además presentan una gran región transmembrana, y una región citoplasmática conformada por un dominio tirosina quinasa (TKD), y dominios ricos en Ser/Thr, y en prolinas (PRD)[55, 58, 59]. Esta familia es muy conservada, exhibe altos niveles de homología con ortólogos en diferentes especies. Los dominios FZD, KRD y TKD son característicos de todas las proteínas ROR, mientras que la arquitectura del resto de los dominios varía entre especies, **Figura 1.10**. Este nivel de conservación deja en evidencia su relevancia en el proceso evolutivo[60].

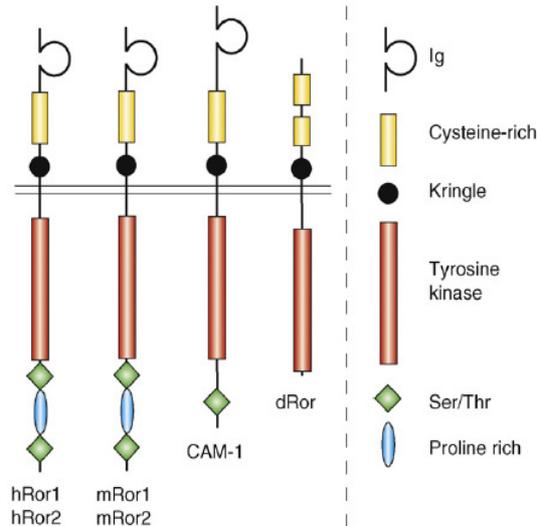


Figura 1.10. Estructura de las proteínas de la familia ROR en diferentes especies. Organización de los dominios de las proteínas ROR en humanos (hROR1, hROR2), ratón (mROR1, mROR2), *C. Elegans* (CAM-1) y *Drosophila* (dROR). El dominio extracelular (ECD) N-terminal se encuentra por encima de la línea que representa la membrana plasmática, mientras que el dominio intracelular (ICD) se encuentra por debajo de esta. (Imagen obtenida de Green, J. et. al.; 2008).

Las proteínas ROR están íntimamente involucradas en el desarrollo esquelético, cardiorespiratorio y neurológico durante la embriogénesis,[58]. Debido a su rol crucial en procesos fisiológicos, y al igual que como sucede con el resto de las RTK, la disfunción en estas proteínas causa severos defectos en el desarrollo y enfermedades de tipo cáncer. Sin embargo, mientras que mutaciones en ROR2 se encuentran asociadas a defectos esqueléticos, la presencia de mutaciones en ROR1 no se ha asociado a ninguna enfermedad, no obstante, su sobre-expresión se vincula a CLL[60]. El gen que codifica para ROR1 se encuentra en la región cromosomal 1p31.3, una región en la que no se constatan aberraciones asociadas a la presencia de enfermedades hematológicas[61]. De hecho, los niveles de expresión de ROR1 no se asocian a aberraciones genéticas, si no que se deben a una regulación epigenética[62]. Como consecuencia de su rol fundamental durante el desarrollo embrionario, tanto ROR1 como ROR2 presentan una expresión espacio-temporal bien definida. Ensayos Northernblot y de hibridación in situ demostraron la expresión de ARNm-ROR1 y ARNm-ROR2 en tejidos embrionarios de ratas y ratones[63, 64], sin embargo, su expresión cesó en tejidos posnatales y se ausentó de la mayoría de los tejidos maduros, a excepción de tejidos como páncreas, pulmón y un subconjunto de intermediarios de células B en donde se observa una expresión a bajo nivel[65]. Su ausencia en células normales no sólo se constata en individuos sanos, también se observó al estudiar diferentes poblaciones sanguíneas de pacientes CLL incluyendo células B no malignas, resultando nuevamente en la expresión restringida a las células B-CLL[66], **Figura 1.11.**

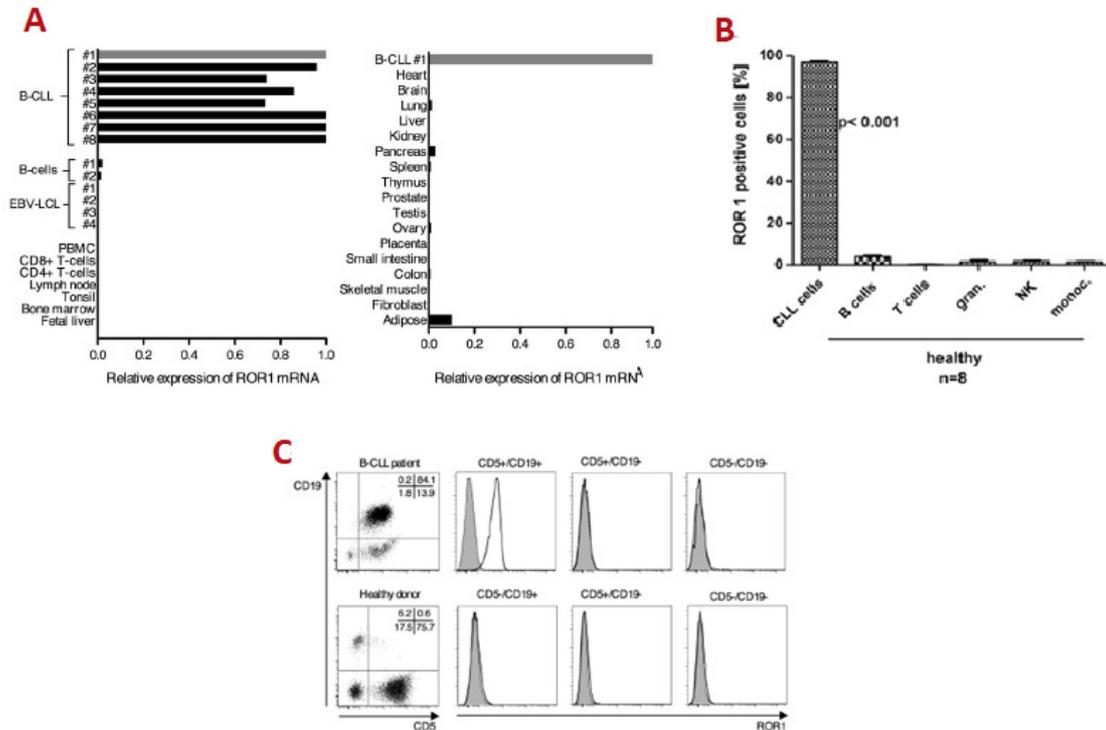


Figura 1.11. Expresión de ROR1 en células B-CLL y un panel de tejidos hematopoyéticos y no-hematopoyéticos sanos. Figura 1.11A: Se analizó por RT-qPCR la expresión de ARNm-ROR1. Se tomó como referencia la muestra B-CLL#1, y la expresión relativa de ROR1 fue comparada con GAPDH como gen housekeeping. **Figura 1.11B:** Análisis de la expresión de ROR1 en células sanguíneas sanas por citometría de flujo (n=8). Los componentes celulares fueron distinguidos por apropiados marcadores de superficie. La expresión de ROR1 difiere significativamente ($p < 0.001$). **Figura 1.11C:** Análisis por citometría de flujo de la expresión de ROR1 en la superficie de PBMCs obtenidos de pacientes CLL (n=10) y donadores sanos (n=4). Se utilizó un pAb específico (histograma blanco) comparado con un control isotópico (histograma gris). (Imagen adaptadas de Hudecek, et. al.; 2010. Uhrmacher, et. al.; 2011).

1.4.2 ROR1 como molécula blanco para el diagnóstico de Leucemia linfocítica crónica.

Constatada entonces la correlación que existe entre la expresión de ROR1 y el padecimiento de CLL, se ha propuesto a esta molécula como blanco para diagnóstico de la enfermedad. Actualmente las técnicas de diagnóstico de CLL constan de evaluaciones de hemogramas y hemocultivos, y caracterización del fenotipo inmune de las células circulantes en sangre[53]. Los hemocultivos de pacientes CLL revelan alta densidad de pequeños linfocitos con un estrecho citoplasma que rodea el borde celular y un núcleo denso con cromatina parcialmente agregada y sin nucléolo reconocible. Su fenotipo distintivo consta de los marcadores de superficie: CD5, CD19, CD20, CD23, e inmunoglobulina de superficie con restricción de cadena liviana presentes en una determinada proporción[53]. En adición se realizan exámenes que permiten evaluar el grado de avance de la enfermedad, siendo la constatación de citopenias característica de pacientes con enfermedad avanzada. Sin embargo, recientemente se ha reconocido que los sistemas de estadificación clínicos de Rai o Binet no permiten por si mismos estimar un pronóstico certero para pacientes que se encuentran en etapas tempranas de la enfermedad[53]. A raíz de este hecho han surgido numerosos ensayos que permiten un mejor pronóstico en cuanto a respuesta al tratamiento, supervivencia libre de progresión y supervivencia general de pacientes con CLL. Hasta el momento, uno de los mejores predictores es el estado mutacional del gen IgVH. Genes no mutados de IgVH en células

CLL corresponden a un peor pronóstico de la enfermedad, presentando una supervivencia de 6 a 9 años contra 24 años en aquellos pacientes que presentan células malignas con mutaciones somáticas en estos genes[67, 68]. Si bien el resultado de este estudio es significativamente confiable, el ensayo supone un elevado costo tanto a nivel monetario como práctico, lo que deriva en su exclusión de las prueba de rutina. Además del estado mutacional del gen IgVH, la expresión de ZAP-70, una tirosina quinasa esencial para la señalización de células T pero ausente en células B normales, es otro marcador de pronóstico de la enfermedad. Su expresión aumenta aproximadamente 5 veces en pacientes con genes IgVH no mutados, lo que se co-relaciona con un tipo de CLL más agresiva[69].

A priori la utilización de ROR1 como blanco de diagnóstico se presenta prometedora. No solo se expresa de manera uniforme y prácticamente restringida en células malignas, sino que además se ha comprobado que su expresión no cesa sino hasta que las células son eliminadas, por lo que aun bajo tratamiento, si existen células malignas residuales las mismas podrían detectarse mejorando el seguimiento del paciente[66]. Dados los altos costos de realizar diagnósticos a través del estado mutacional de IgVH, sería beneficioso encontrar una co-relación entre el pronóstico de la enfermedad con el nivel de expresión de ROR1, así como también con la progresión de la enfermedad. Pese a que varios estudios han reportado dichas correlaciones[62, 66], muchos otros han refutado las mismas[55, 65]. Por último, cabe destacar que ciertos estudios realizados mediante RT-PCR y citometría de flujo han revelado la expresión de ROR1 en células malignas de pacientes con otros linfomas no-Hodgkin[66, 70], aunque el nivel de su expresión en cada una de estas neoplasias se presenta controversial. En conclusión, a priori ROR1 se presenta como un prometedor blanco para diagnóstico de CLL, por lo que la generación de anticuerpos específicos contra éste resulta una herramienta de gran potencial, sin embargo aún queda mucho por profundizar en este receptor.

Si bien existen distintos mAbs anti-ROR1 comerciales que son útiles para este tipo de técnicas, la posibilidad de contar con VHH anti-ROR1 surge como una alternativa muy atractiva, no sólo por poder producirlos a costos considerablemente menores, sino también debido a que al carecer los VHHs de región Fc son particularmente adecuados para ser utilizados en citometría de flujo, lo que generaría una ventajosa herramienta diagnóstica.

1.4.3 ROR1 como molécula blanco para terapia antitumoral en Leucemia linfocítica crónica.

A diferencia de la mayoría de las enfermedades malignas donde la principal incógnita es cómo tratar, en CLL la mayor cuestión a resolver es cuándo comenzar el tratamiento. El motivo de esta interrogante es consecuencia del balance costo-beneficio que suponen las terapias actuales contra CLL. Las mismas no solo no son curativas sino que además acarrear serios efectos adversos provocados por los medicamentos e inmunosupresión, por lo que la evaluación de los beneficios que podrían obtenerse tras iniciar un tratamiento debe ser bien estudiada en cada caso particular[71]. La decisión de iniciar un tratamiento se basa en el estado y actividad de la enfermedad y del padecimiento de síntomas. Por este motivo únicamente en pacientes con CLL en estado Rai III o IV o Binet B o C, o en pacientes con evidencia clara de rápida progresión de la enfermedad, se procura

que los beneficios que se pueden alcanzar con el tratamiento sean superiores a los costos que este implica, traduciéndose en un aumento de la sobrevida. Los pacientes en etapas tempranas de la enfermedad (Rai 0-II, Binet A y B) generalmente no son tratados[53]. Una vez determinada la necesidad de aplicar un tratamiento, para la elección del mismo se tienen en cuenta ciertos aspectos del paciente como son la edad, la presencia de comorbilidades y marcadores pronósticos de CLL, ya que los tratamientos de primera línea se comprenden dentro de las denominadas quimioterapias, las cuales están fuertemente asociada a efectos adversos desfavorables especialmente en pacientes de avanzada edad o con morbilidades, población característica de la enfermedad[72]. En base a estos factores entonces se puede optar por un tratamiento más o menos agresivo, pero todos comprenden la administración de agentes anti-mitóticos de efecto sistémico, que pueden administrarse en combinación o no con otros agentes[73]. Si bien la respuesta que se induce tras la administración de esta droga es completa y de alta duración, su utilización tiene ciertas restricciones ya que es contraindicativo en pacientes con enfermedades autoinmunes pre-existentes. Se ha evidenciado la inducción de anemia hemolítica autoinmune en aproximadamente el 10% de los pacientes, neutropenias de grado 3 o 4 en el 71% de los pacientes jóvenes y supresión de la inmunidad mediada por células T. Además de estos efectos que comprometen la inmunidad del individuo, se ha evidenciado también el desarrollo de resistencia a la droga[71]. Muchas veces el uso único de quimioterapia logra una remisión completa de la enfermedad, pero en ocasiones su uso debe ser combinado con otros tipos de tratamiento como radioterapia o cirugía[74]. Es por esto que es necesario el desarrollo de nuevas terapias que traten la enfermedad y que reduzcan los efectos secundarios. Particularmente, para contar con tratamientos alternativos a ser aplicados en pacientes que presentan una enfermedad no avanzada, lo que podría prevenir el desarrollo de la misma.

La llegada de los anticuerpos terapéuticos surgió como una terapia alternativa para un gran número de enfermedades, destacando en cáncer. Actualmente existen dos mAbs aprobados por la FDA para el tratamiento de CLL, destacando Rituximab. Este mAb fue aprobado por la FDA en 1997 para el tratamiento de linfoma no-Hodgkin[71] y actualmente se utiliza como terapia de primera línea. Se trata de un mAb IgG1 quimérico murino/humano que presenta reconocimiento por CD20, una fosfoproteína glicosilada presente en todas las células B. Se ha reportado una tasa de respuesta del 7 al 35%, sin embargo la misma se presenta parcial y de corta duración. Debido entonces a que raramente se alcanzan respuestas completas y que la remisión es breve, su administración se realiza frecuentemente en combinación con quimioterapia[73]. El otro mAb aprobado para su uso en CLL es Alemtuzumab, un mAb IgG1 totalmente humanizado de segunda línea específico contra CD52, una glicoproteína presente en linfocitos maduros. Su uso fue aprobado por la FDA en 2001 para pacientes con CLL que fallaron en la terapia previa con Fludarabine (un antimetabolito ampliamente utilizado en linfomas y leucemias), sin embargo, a pesar de que se constató una actividad superior al Rituximab, dada su toxicidad asociada se lo está intentando retirar del mercado[55, 73] y suplantarlo por mAbs anti CD20 con menores requerimientos para su activación, como es el caso de Ofatumumab, un mAb humanizado de tipo II aprobado en 2009 por la FDA para su uso en CLL refractaria. A pesar de que los tratamientos con estos mAbs han significado importantes progresos en cuanto a la supervivencia libre de progresión y supervivencia general a corto plazo, la mayoría de los pacientes ha presentado reincidencia o

desarrollado resistencia al tratamiento[73]. Sumado a esto, a consecuencia de que la diana de estos mAbs son moléculas que se encuentran tanto en células malignas como en células sanas, se observa una disminución de la actividad del mAb y un aumento de su toxicidad.

La molécula ideal para su utilización como diana en terapias anti-cáncer debe presentar ciertas particularidades, destacando la sobreexpresión o expresión restringida en células malignas y, preferentemente, el desempeño de un rol crítico para el crecimiento y supervivencia de éstas. ROR-1 cumple con ambas condiciones, no solo presenta un patrón de expresión restringido y uniforme en células B-CLL, sino que además la evidencia lo presenta como un factor crucial para la transformación y supervivencia de las células malignas. Es por todo esto que en los últimos años han aumentado los esfuerzos en profundizar en el papel que cumple esta molécula y en la creación de mAbs específicos.

El término “huérfano” que describe a la familia ROR, se debe a que por mucho tiempo no había sido posible elucidar con claridad los ligandos y la vía de señalización de esta familia. Por fortuna, estas incógnitas se esclarecieron, revelando el rol central de las proteínas ROR en la regulación de señales Wnt, una vía de señalización fuertemente involucrada en la regulación del desarrollo embrionario. Esta evidencia es apoyada por la similitud constatada entre los dominios ricos en cisteínas (CRD) de las proteínas ROR y los dominios CRD de unión a Wnt en receptores Frizzled, lo que sugiere una interacción entre las glicoproteínas Wnt y los dominios CRD de ROR[60]. Además, experimentos independientes han identificado a Wnt5a como ligando de ROR1[56, 58, 75], se trata de una glucoproteína miembro de la familia Wnt que presenta un importante papel durante el desarrollo[60]. Si bien la función de ROR1 en la célula no ha sido del todo definida, hay evidencia que lo presenta como un inhibidor de la apoptosis en las células B-CLL[61, 76, 77]. En la **Figura 1.12** se observa uno de los tanto estudios en el cual se muestra como la ausencia de ROR1 deriva en un aumento en el porcentaje de apoptosis celular. Estos resultados junto con el hecho de que ROR1 es una de las cuatro quinasas de supervivencia más importantes, sugieren a ROR1 como un buen blanco para inmunoterapia[78].

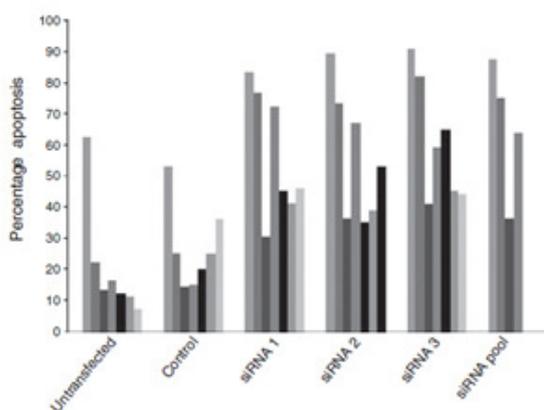


Figura 1.12. Silenciamiento de ROR1 resultó en la apoptosis de células CLL. Células CLL fueron transfectadas con siARN-ROR1 y analizadas para apoptosis por citometría de flujo (n=6). El porcentaje de células apoptóticas (Anexina-V o Anexina-V/ioduro de propidio doble positivo) es representado en el eje Y. Cada barra representa un paciente CLL. La diferencia entre las células sin transfectar o el control de transfección respecto a las células transfectadas con siARN fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.05-0.001$; estudio con datos pareado, dos colas T-test). (Imagen obtenida de Choudhury, A. et. al; 2010)

La distribución tumor-específica de ROR1 lo ha potenciado como blanco de acción para los anticuerpos terapéuticos. En relación a este punto, se ha estudiado su capacidad para internalizar los anticuerpos dirigidos contra este receptor. Diferentes estudios han revelado que existe una internalización parcial (30-45%) mediante endocitosis de los anticuerpos que lo contactan cuando la misma ocurre a 37°C[79], **Figura 1.13**. La internalización de moléculas de unión a superficie es un punto clave para el diseño de inmunoterapias mediante anticuerpos conjugados a toxinas o drogas que median citotoxicidad.

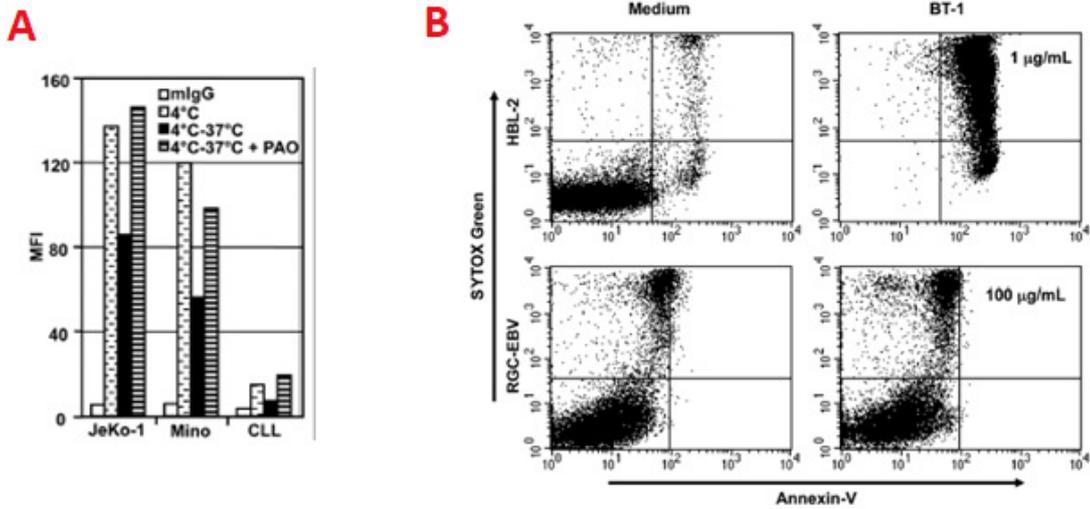


Figura 1.13. ROR1 puede mediar la internalización de anticuerpos específicos conjugados. **Figura 1.13A:** Dos líneas celulares ROR1 positivas (JeKo-1y Mino), así como células CLL fueron incubadas con 1 µg/mL del anticuerpo 2A2-IgG durante 1 hora a 4°C. Las células no fueron permeabilizadas y la detección de anticuerpo en superficie se realizó con anticuerpo anti-ratón conjugado a DyLight-649. Las barras blancas indican el control incubado con mIgG, el resto de las barras indican subsecuentes incubaciones a 37°C y en presencia y ausencia de PAO (inhibidor químico de endocitosis). **Figura 1.13B:** La línea celular HBL-2 ROR1 positiva y la línea RGC-EBV ROR1 negativa fueron cultivadas en ausencia (solo medio) o presencia de 1 µg/mL y 100 µg/mL de la toxina BT-1, respectivamente. Las células apoptóticas se detectaron mediante tñido con Anexina-V. (Imagen adaptada de Baskar, et. al.; 2012).

En base a todo lo descrito y a los antecedentes con otros mAbs aprobados por la FDA, se han realizado varios estudios vinculados a la generación y estudio de actividad de mAbs anti-ROR1 contra células CLL[58, 61, 77-79]. Una vez más, si bien los mAbs convencionales dominan las aplicaciones en inmunoterapia, la disponibilidad de VHHs contra ROR1 podría representar una variante que permita el diseño de nuevos formatos, lo cual se vería facilitado por su gran homología con la familia VH3 de dominios variables humanos. Dada su característica de operar como dominios de reconocimiento, los VHHs podrían ser fácilmente conjugados a moléculas que medien la citotoxicidad de las células tumorales, o bien podrían ser utilizados para la generación de anticuerpos biespecíficos que recluten células T citotóxicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Obtención de nanobodies contra el antígeno B de *Echinococcus granulosus* para su purificación a partir de líquido hidático, y nanobodies contra el marcador tumoral ROR1 para aplicaciones en citometría de flujo.

2.2 Objetivos específicos

- Selección de fagos que expresen VHHs anti-AgB.
- Clonado de los genes de los VHHs seleccionados en vectores de expresión fuerte en procariotas.
- Expresión, selección y purificación de VHHs anti-AgB
- Conjugación covalente del VHH anti-AgB seleccionado en columna de agarosa activada.
- Purificación de AgB por cromatografía de afinidad a partir de líquido hidático.
- Selección de fagos que expresan VHHs anti-ROR1.
- Clonado de los genes de VHHs seleccionados a un vector de expresión fuerte en procariotas
- Expresión, selección y purificación de VHHs anti-ROR1
- Ensayo de funcionalidad de los VHHs anti-ROR1 en citometría de flujo

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 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 salino (TBS) 10X:** 60,6 g Tris y 87,6 g NaCl en agua ultrapura de tipo 1 c.s.p 1 litro, pH= 7.6.
- **Sustrato para la enzima peroxidasa (PO) – revelado de ELISA:** 200 µL solución 6 mg/mL de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina) en DMSO (dimetilsulfóxido), 50 µL de H₂O₂ 1% y 12.5 mL de buffer acetato 0.1 M pH=5.5.
- **Buffer Tris-acetato (TAE) 50x:** 242 g Tris base, 57.1 mL ácido acético glaciado y 100 mL EDTA 0.5 M en agua MilliQ.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.
- **Buffer de carga 6x para SDS-PAGE:** 0.35 M Tris-Cl, 10% SDS, 30% v/v glicerol, 0.175 mM azul de bromofenol y 0.1 M DTT (ditiotreitolo).
- **Buffer de corrida 10x para SDS-PAGE:** 30.2 g Tris base, 144 g Glicina y 10 g SDS en agua destilada, c.s.p 1 litro.
- **Solución colorante para la tinción con azul de Coomassie:** 30.2 g Tris base, 144 g Glicina y 10 g SDS en agua destilada, c.s.p 1 litro.
- **Solución decolorante para la tinción con azul de Coomassie:** 5% metanol, 7.5% ácido acético glaciado, 87.5% H₂O destilada.
- **Buffer de lavado para cromatografía de afinidad**
 - **Buffer de lavado A:** NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, en agua MilliQ, pH=8. Filtrar por 0.22 µm.
 - **Buffer de lavado B:** NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM, en agua MilliQ, pH=8. Filtrar por 0.22 µm.
- **Buffer de transferencia para Western blot:** 2.9 g Tris Base, 1.4 g glicina, 187 mg SDS, 100 mL metanol, en agua destilada c.s.p 500 mL.

- **Sustrato para la enzima fosfatasa alcalina (AP)- revelado de Western blot:** 66 μ L NBT 5% (Nitrobluetetrazolium) en dimetilformamida 70% y 33 μ L BCIP(5-bromo, 4-cloro, 3-indol fosfato) 5% en dimetrilformaida 100%, en 10 mL de buffer fosfatasa alcalina.
- **Buffer fosfatasa alcalina:** 175 mg NaCl, 3.634 g Tris, 143 mg $MgCl_2$ deshidratado, en agua destilada c.s.p 300 mL.
- **PBS-Tripsina-EDTA:** Tripsina 0.12%, EDTA 0.02%, en PBS 1X. Filtrar por 0.22 μ m.
- **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. Filtrar por 0.22 μ m y almacenar a 4 °C.

3.2 Medios de cultivo

- **Luria Bertani broth (LB; SigmaAldrich).**
- **Luria Bertani agar (LB agar; Sigma Aldrich).**
- **SuperBroth (SB):** 30 g triptona (Sigma Aldrich), 20 g extracto de levadura (Sigma Aldrich), 10 g MOPS (Sigma Aldrich), en agua MiliQc.s.p. 1 L, pH=7.0.
- **SuperOptimalbrothwithCataboliterepression (SOC):** 20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 0.5 g NaCl, en agua MiliQc.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, 10 gDMEM (Sigma Aldrich), 100 mL suero fetal bovino (SFB), 10 mL antibiótico-antimicótico (, Sigma Aldrich), en agua MiliQc.s.p 1 litro, pH=7.4. Filtrar por 0.22 μ m.
- **HAM'S F-12** (Capricorn Scientific).

3.3 Inmunización y Evaluación de la respuesta inmune con generación de anticuerpos

3.3.1 Inmunización

Se inmunizó una llama hembra adulta del Parque Lecocq con los antígenos ROR1 humano recombinante y AgB nativo. El antígeno ROR1 recombinante fue construido por el equipo de investigación del Dr. Pablo Opezzo del Institut Pasteur de Montevideo con quien se trabaja en colaboración. La construcción abarca la porción comprendida entre los aminoácidos 30 y 406, lo que corresponde a la totalidad del ectodominio del receptor ROR1, (Uniprot Q01973). El antígeno ROR1 con el que se inmunizó, a diferencia de aquel

con el que se realizaron todos los pasos posteriores de este trabajo, presenta fusionado al ectodominio de ROR1 la porción Fc de IgG1 humana y entre ambos un sitio de corte para la 3C proteasa, **Figura 3.1**. La proteína fue expresada en células HEK-293 (human embryo kidney), por lo que el antígeno se encuentra glucosilado. Por otra parte, el AgB nativo fue proporcionado por la Dra. Ana Ferreira perteneciente a la Cátedra de Inmunología de Facultad de Química/Ciencias con quien también se trabaja en colaboración.

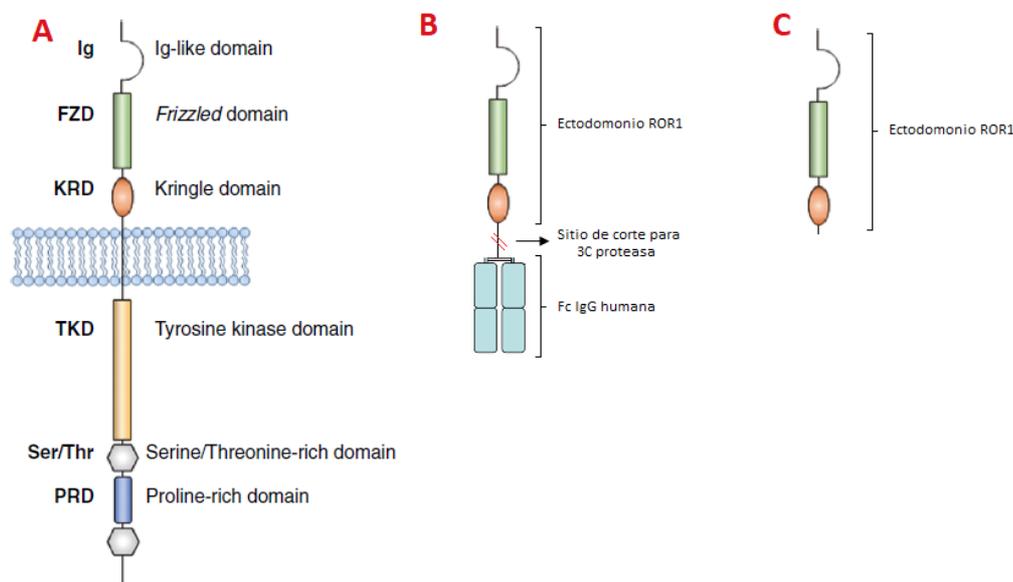


Figura 3.1. Diagrama de los diferentes antígenos ROR1 recombinantes. **Figura 3.1A:** Diagrama del antígeno ROR1 nativo donde se especifican sus dominios extra e intracelulares. **Figura 3.1B:** Diagrama representativo de la construcción del antígeno ROR1 utilizada para realizar la inmunización, la misma consta del ectodominio completo de ROR1 fusionado a la porción Fc de IgG humana separados por un sitio de corte para la 3C proteasa. **Figura 3.1C:** Diagrama representativo de la construcción del antígeno ROR1 utilizada durante los diferentes ensayos realizados en este trabajo (a excepción de la inmunización), la misma consta del ectodominio completo de ROR1. (Imagen adaptada de Borchering N. et. al.; 2014).

La inmunización se realizó en presencia del adyuvante AIF (adyuvante incompleto de Freund), administrando 400 µg de AgB y 1 mg de ROR1 por dosis. El cronograma de inmunización consistió en una primera inmunización (priming) seguida de un refuerzo (booster) a los 30 días. Tres semanas luego de la última dosis se recolectó 150 mL de sangre del animal a partir de la cual se generó la biblioteca procediendo tal como se describe en [80].

3.3.2 Titulación de anticuerpos totales contra los antígenos de inmunización

La titulación de anticuerpos totales contra los diferentes antígenos se realizó en pocillo de ELISA sensibilizado con 100 µL del antígeno correspondiente a una concentración de 10 µg/mL a 4°C durante 16-20 hs (ON), tras lo cual se bloqueó con 300 µL PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37°C. Luego de realizar una serie de lavados de los pocillos con PBS-Tween 0.05%, se incubó en presencia del suero de la llama inmunizada correspondiente al día 0 (Pre-inmunización), Priming y Booster en diluciones seriadas al tercio, y posteriormente con un anticuerpo anti-llama producido en ratón, el cual permitió revelar la presencia tanto de aquellos anticuerpos monodominio, como de los anticuerpos convencionales que surgieron en respuesta al antígeno. Finalmente, el revelado resultó del agregado de una solución de suero naive de llama correspondiente al día 0 y anticuerpo

anti-ratón hecho en conejo conjugado a peroxidasa (PO) con posterior agregado del sustrato-PO, lo que derivó en el desarrollo de una reacción colorimétrica que se detuvo con 50 μL de H_2SO_4 (ácido sulfúrico). Todas las incubaciones con anticuerpos y suero fueron llevadas a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación, y entre cada una de ellas se realizaron 5 rondas de lavados con PBS-Tween 0.05%. La lectura de la placa de ELISA se realizó en el equipo FLUOstar OPTIMA a 450nm. En la **Figura 3.2** se puede apreciar un diagrama representativo del ensayo.

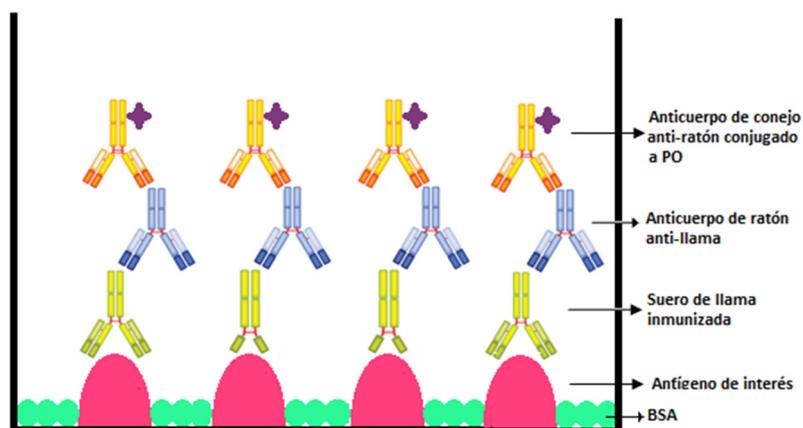


Figura 3.2. Esquema del ensayo de ELISA realizado para titular presencia de anticuerpos totales contra los antígenos deseados en el suero de la llama inmunizada. Se observa un diagrama representativo de la interacción de anticuerpos convencionales y monodominio presentes en el suero de llama con el antígeno sensibilizado en el pocillo. Esta interacción se reveló a través del agregado del anticuerpo primario anti-llama hecho en ratón y del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a PO. El ensayo se realizó de igual manera tanto para la titulación de anticuerpos totales anti-ROR1 como para anti-AgB.

3.4 Cultivo celular procariota

Los diferentes ensayos realizados requieren de la realización de cultivos líquidos de diferentes cepas de bacterias *E. coli*. Según la cepa bacteriana el medio de cultivo y el antibiótico utilizado. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C y 250 rpm el tiempo necesario hasta alcanzar la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ óptima requerida para el ensayo, a no ser que se especifique lo contrario.

3.5 Selección de VHHs específicos contra antígenos de interés

3.5.1 Panning

El proceso se inició con la sensibilización de los pocillos con 100 μL del antígeno de interés a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ON a 4°C, tras lo cual se realizó el bloqueo con 300 μL de PBS-BSA 3% (SigmaAldrich) durante 30 minutos a 37°C. Una vez finalizada esta etapa, se incubó con 100 μL de la biblioteca de fagos filamentosos (en la primera ronda), o 100 μL del *output* amplificado de la ronda de *panning* anterior (en sucesivas rondas) durante 1 hora a 4°C con agitación. Luego de la incubación con los fagos se realizó una etapa de lavados exhaustiva que constó de 8 lavados de 5 minutos de duración cada uno con PBS-Tween 0.05% estéril. Finalmente, se llevó a cabo la elución de los fagos que expresaron VHHs específicos contra el antígeno mediante el agregado de 100 μL de una solución de Tripsina (SigmaAldrich) a 10 mg/mL en TBS, incubando durante 30 minutos a

37°C. El eluido se recolectó y se neutralizó con 10 μ L de una solución de inhibidor de tripsina (SigmaAldrich) a 100 mg/mL en TBS. Los fagos eluidos en la primera ronda constituyen el *primer output*, del cual se partió para las sucesivas rondas de selección. La selección de aquellos VHHs específicos contra el AgB se desarrolló tal como se explicita, realizando la sensibilización de la placa con el antígeno nativo, **Figura 3.3**. Sin embargo, para la selección de los VHHs reactivos contra ROR1, dado que se ha constatado en reiteradas ocasiones la desnaturalización de antígenos de bajo peso molecular cuando estos se adsorben a la placa, se utilizó el sistema de interacción avidina-biotina para la adsorción de ROR1. Esto implicó la sensibilización de los pocillos con 0.5 μ g de avidina y la adsorción de 1 μ g de ROR1 biotinilado (ROR1-bt) luego del bloqueo, además de un paso de pre-adsorción de la biblioteca en pocillos sensibilizados con avidina (0.5 μ g) y bloqueados con PBS-BSA 3%, previo a incubar con ROR1-bt. El resto de los pasos se realizaron tal como se explicitó para el AgB, **Figura 3.4**

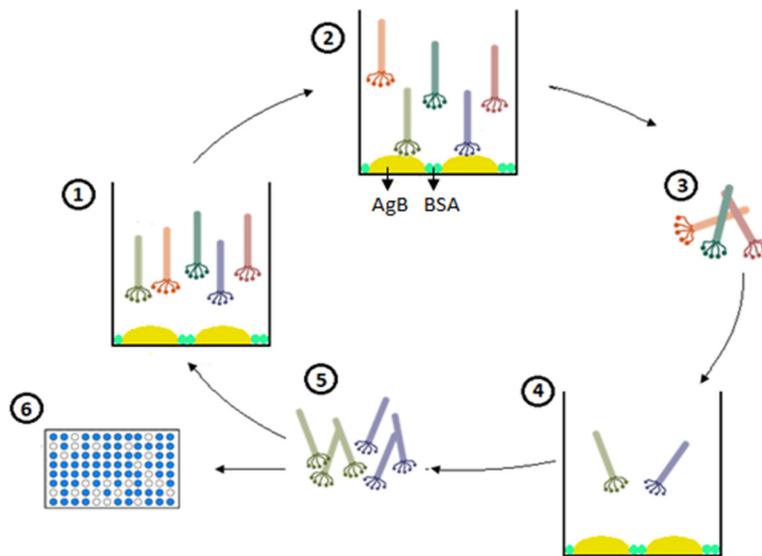


Figura 3.3. Diagrama de selección de nanobodies específicos contra AgB. Se incubó la biblioteca de fagos filamentosos en presencia de AgB y BSA (1 y 2), aquellos fagos que no presentaron reconocimiento por el antígeno fueron eliminados en los lavados (3), mientras que los fagos que reconocieron al antígeno fueron eluidos (4) y amplificados (5) para ser sometidos a otra ronda de selección o a un screening (6) en el caso del *output* final.

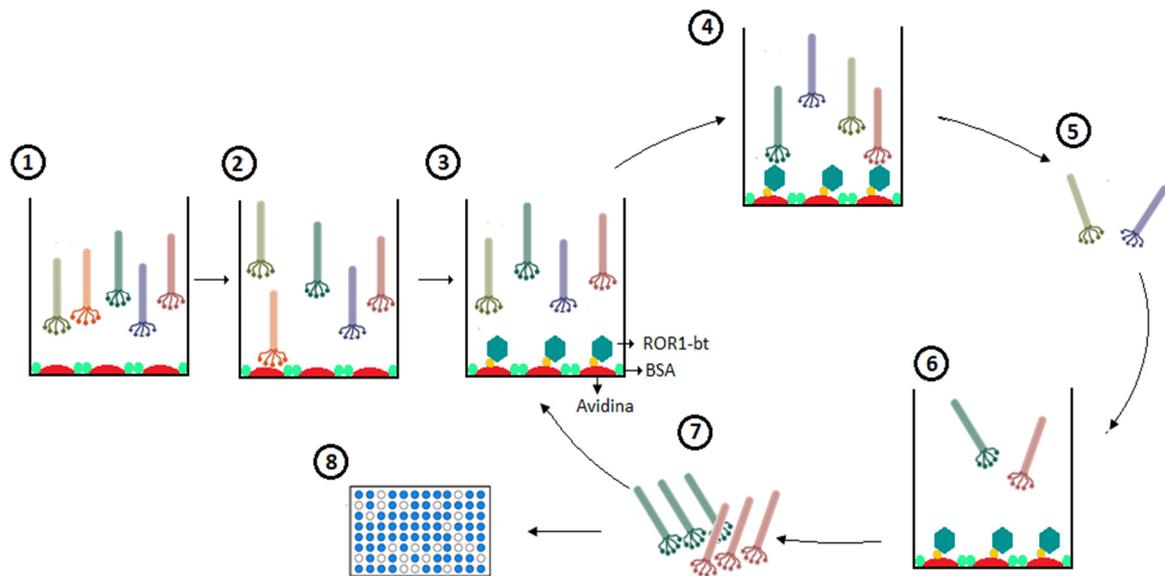


Figura 3.4. Diagrama de selección de nanobodies específicos contra ROR1. Se incubó la biblioteca de fagos filamentosos en presencia de avidina y BSA (1), los fagos que no presentaron reconocimiento por estas proteínas (2) se incubaron en un pocillo en presencia de avidina, BSA y ROR1-bt (3 y 4). Aquellos fagos que no interactuaron con el antígeno fueron eliminados en los lavados (5), mientras que los fagos que reconocieron al antígeno fueron eluidos (6) y amplificados (7) para ser sometidos a otra ronda de selección o a un screening (8) en el caso del *output* final.

En todos los casos se realizaron dos rondas de selección, de manera que el primer *output* obtenido fue amplificado y sometido a una segunda ronda de *panning*, lo que derivó en el enriquecimiento de aquellos fagos que expresaban los VHs específicos contra el antígeno de interés.

3.5.2 Titulación de fagos

La titulación es un procedimiento que debe realizarse tras la obtención de cada *output*. Se incubaron alícuotas de 100 μL de bacterias *E. coli* ER2738, procedentes de un cultivo líquido en medio SB-tetraciclina con una $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0,8-1$ UA, con diluciones seriadas del *output* durante 30 minutos sin agitación. Las diferentes diluciones fueron plaqueadas en placas LB agar-ampicilina y cultivadas ON. Al día siguiente se realizó el conteo de colonias crecidas y el cálculo correspondiente, determinando así el valor de unidades formadoras de colonias/mL (ufc/mL).

3.5.3 Amplificación del output de fagos

Alícuotas de 2 mL de bacterias *E. coli* ER2738 se infectaron con 100-300 μL del *primer output*, procediendo de igual forma a la descrita para la titulación. Una vez infectado, el cultivo de 2 mL se creció en 10mL final de medio SB-ampicilina a 33 $\mu\text{g/mL}$ durante 1 hora a 37°C, 250 rpm, luego de lo cual se agregó la cantidad restante de ampicilina hasta llegar a una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$, incubándose en iguales condiciones otros 60 minutos. Finalizado este período, se agregó 10-20 μL de fago helper M13K07 (10^{12} pfu/ML; PharmaciaBiotec) y se incubó en las condiciones mencionadas durante 90 minutos. Por último, se agregó kanamicina a 40 $\mu\text{g/mL}$, y se incubó el cultivo ON. Al día siguiente el cultivo se centrifugó a 12000g durante 20 minutos a 4°C, a modo de obtener en el precipitado las células del cultivo y en el sobrenadante los fagos. Éste último se recolectó e

incubó durante 1 hora en hielo con 0.2 volúmenes de una solución de PEG 20% y NaCl 2.5M, lo que permitió la precipitación de los fagos al someterlo a una ronda de centrifugación en las condiciones mencionadas. Esta vez los fagos constituyeron el precipitado, el cual se resuspendió en 1 mL de PBS-BSA 3% estéril y se centrifugó a 12000g, 10 minutos, 4°C. El sobrenadante obtenido constituye entonces el *output* amplificado.

3.5.4 Screening desde pComb3X

Se seleccionaron al azar 10 colonias *E. coli* ER2738 aisladas en placas de LB agar-ampicilina procedentes de la cuantificación del *segundo output*. Las mismas se crecieron en medio líquido SB-ampicilina a 100 µg/mL hasta $DO_{600nm} = 0.5$ UA, tras lo cual se indujo la expresión de los VHHs mediante el agregado de 1 mM IPTG (Goldbiotechnonology), y se incubó a 37°C, 250 rpm, ON. Posteriormente, se centrifugó 1 mL del cultivo a máxima velocidad durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante (correspondiente al medio de cultivo), fracción en la cual se encuentra el VHH. El screening se desarrolló en pocillos de ELISA sensibilizados con 0.2 µg del antígeno correspondiente, ON a 4°C, posteriormente bloqueados con PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37°C; tal como se explicó anteriormente, en el caso de la detección de VHHs específicos contra ROR1, luego del bloqueo es requerida una fase adicional que implica el agregado de 0.4 µg de ROR1-bt. Los antígenos en cuestión se enfrentaron durante 1 hora a 100 µL del medio de cultivo de los 10 clones seleccionados, incubación que se desarrolló a temperatura ambiente y bajo agitación. Luego de realizada una serie de lavados, la presencia de los VHHs se reveló tras el agregado de 100 µL de una dilución 1/3000 en PBS-Tween 0.05% del anticuerpo anti-HA-PO (Roche), durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación. Realizados los lavados correspondientes, se agregó 100 µL de la solución sustrato-PO y se incubó durante aproximadamente 15 minutos, la cual se detuvo mediante el agregado de 50 µL de H₂SO₄. La lectura de la placa de ELISA se realizó en el equipo FLUOstar OPTIMA a 450nm. En la **Figura 3.5** se puede apreciar un diagrama representativo del ensayo. De forma paralela se realizaron los blancos correspondientes (se enfrentó el medio de cultivo de los distintos clones a las soluciones de bloqueo y avidina, según corresponda).

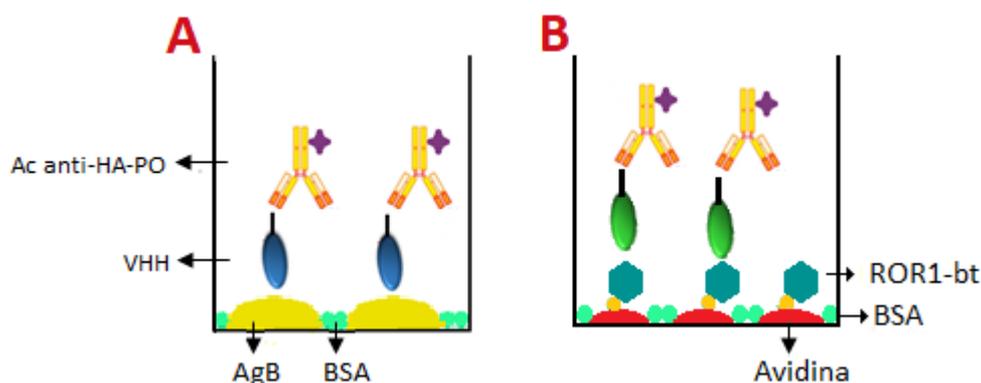


Figura 3.5. Screening de clones reactivos contra los antígenos de interés. Se esquematiza el reconocimiento de AgB (**Figura 3.5A**) y ROR1-bt (**Figura 3.5B**) por parte de diferentes VHHs ensayados, revelando su interacción mediante la utilización de un anticuerpo anti-HA-PO.

3.6 Clonado del output a vector de expresión

Confirmada la presencia de clones reactivos contra el antígeno de interés en los *output* obtenidos, en cada caso se clonó la totalidad del segundo *output* a un vector de expresión fuerte en procariontes. Esto permite además la fusión del VHH a secuencias de interés. Se utilizó el vector pINQ en sus diferentes versiones.

3.6.1 Vectores de expresión

Existen dos versiones del vector de expresión pINQ, ambos derivados del vector pET28a(+) (Novagen). La versión denominada pINQ-H6HA, presenta dos etiquetas: una cola de 6 Histidinas (6His) seguida de un epítipo de hemaglutinina (HA), **Figura 3.6**, mientras que la versión pINQ-BtH6, además de la etiqueta 6His, presenta previo a ésta una secuencia que codifica para el péptido de 15 aminoácidos GLNDIFEAQKIEWHE al cual la enzima biotina-ligasa BirA cataliza la unión de una molécula de biotina, **Figura 3.7**. Este sistema permite la biotilación de la proteína de interés de forma dirigida y controlada, ocurriendo una única vez en un sitio determinado (entre el extremo C-terminal de la proteína y la cola de 6 histidinas), evitando así una posible interferencia en el reconocimiento del ligando. Además, en cualquiera de sus dos versiones, el vector pINQ presenta corriente arriba del sitio de clonado una señal OmpA, la cual es responsable de dirigir el transporte de la proteína blanco (proteínas clonada en el vector) al periplasma de la bacteria, y como marcador de selección resistencia al antibiótico kanamicina.

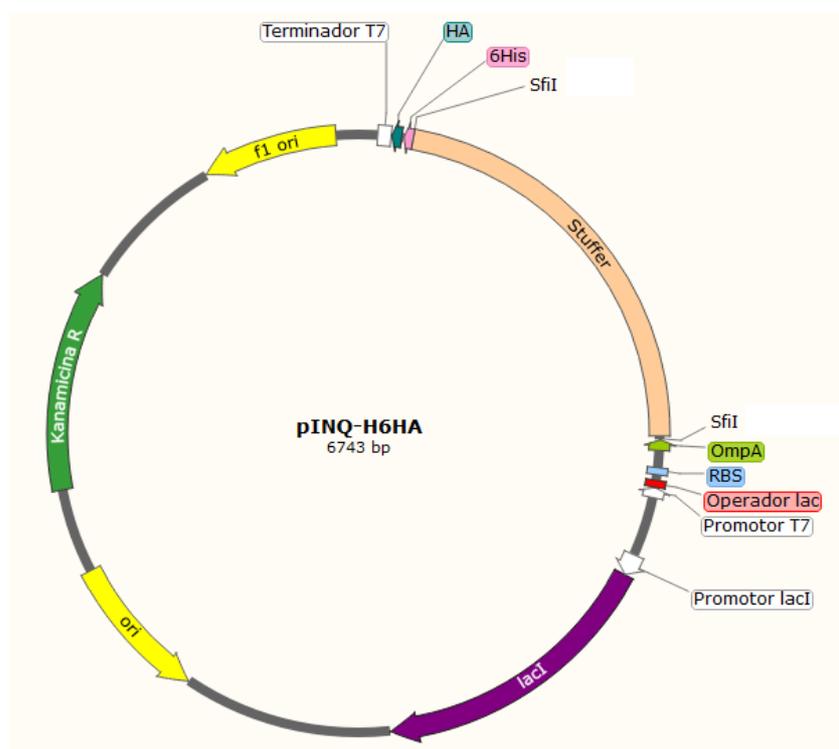


Figura 3.6. Esquema del cassette de expresión del vector pINQ-H6HA. Se observa el fragmento stuffer flanqueado por sitios SfiI entre los cuales posteriormente se clonaran los VHHs. Se destaca la presencia de las etiquetas 6His y HA corriente abajo del fragmento stuffer, la secuencia OmpA responsable de la exportación del VHH al periplasma y la resistencia a kanamicina que presenta el vector. La expresión del VHH se encuentra regulada por el promotor T7 inducible con IPTG.

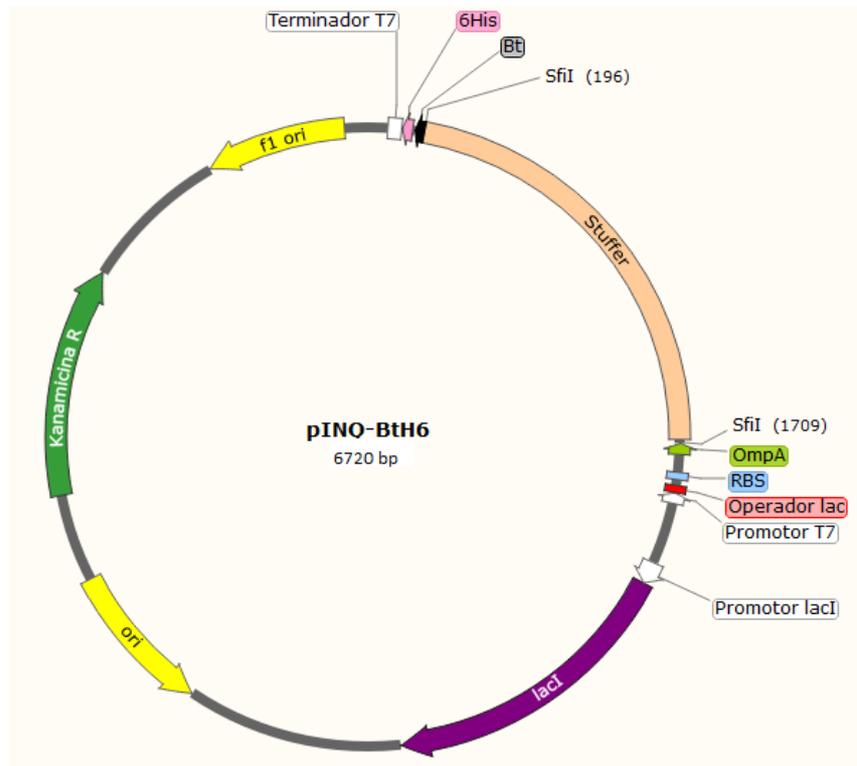


Figura 3.7. Esquema del cassette de expresión del vector pINQ-BtH6. Se observa el fragmento stuffer flanqueado por sitios SfiI entre los cuales posteriormente se clonaran los VHHs. Se destaca la presencia de las etiquetas Bt, 6His corriente abajo del fragmento stuffer, la secuencia OmpA responsable de la exportación del VHH al periplasma y la resistencia a kanamicina que presenta el vector. La expresión del VHH se encuentra regulada por el promotor T7 inducible con IPTG.

En cuanto al sistema de expresión, como derivado del vector pET, el plásmido pINQ presenta un promotor T7lac (promotor T7 y operador lac, corriente abajo), y además codifica para el represor lacI. Este vector se transforma en la cepa celular *E. coli* BL21-DE3, la cual cuenta con la secuencia codificante para la T7 ARN polimerasa integrada en su genoma bajo la regulación del promotor lacUV5 y el operador lac. Asimismo contiene en su genoma la secuencia codificante para el represor lacI. De esta forma, en ausencia de inductor, el represor lacI se verá interactuando con su operador, evitando así la expresión de la proteína de interés, tanto de forma directa, al unirse a su operador en el vector pINQ, como de forma indirecta, al unirse a su operador en el genoma, reprimiendo así la expresión de la T7 ARN polimerasa, enzima encargada de transcribir la proteína blanco. Este doble sistema de represión asegura la ausencia de expresión del gen blanco como consecuencia de la expresión basal de la T7 ARN polimerasa, ocurriendo la expresión de la proteína blanco solo en presencia de un inductor como lo es el IPTG. En presencia de IPTG, el represor lacI se ve imposibilitado de unirse a su operador, permitiendo así la transcripción de la T7 ARN polimerasa por parte de la polimerasa hospedera y la consecuente transcripción de la secuencia blanco mediante la T7 ARN polimerasa, **Figura 3.8**. La expresión de una proteína recombinante por parte de bacterias *E. coli* puede interferir en el normal funcionamiento de la célula afectando su crecimiento y el establecimiento del plásmido. Por tal motivo y con el fin de contar con un sistema de regulación fino evitando la expresión basal de esta proteína “tóxica”, el cultivo se desarrolla en presencia de glucosa, ante la cual la expresión de todas aquellas proteínas

que se encuentran bajo el control del promotor *lac* no podrá desarrollarse. Llegado el momento de llevar a cabo la expresión, se extrae la glucosa y se adiciona el inductor.

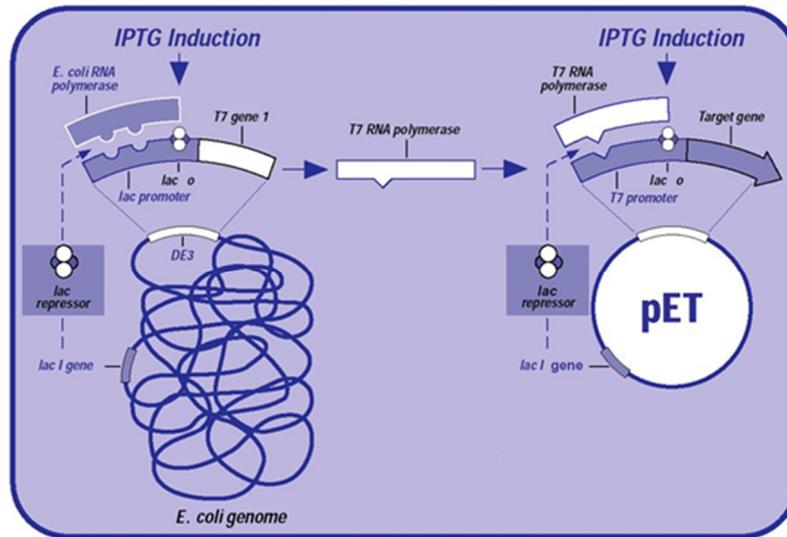


Figura 3.8. Sistema de expresión pET. En ausencia del inductor IPTG, el represor lacI, que se expresa a partir tanto del genoma de la bacteria como del vector pET, se encuentra unido a su operador en el genoma bacteriano impidiendo la expresión de la T7 ARN polimerasa, y en el plásmido inhibiendo la expresión del gen blanco. (Imagen adaptada de Novagen Catalog, p. 24, 1995 (Novagen, USA)).

3.6.2 Clonado del output a vector de expresión

El clonado del *output* se llevó a cabo en el vector de expresión pINQ-H6HA. El mismo se desarrolló mediante la amplificación por reacción de PCR de la región flanqueada entre los sitios SfiI presentes en el vector pComb3X, lo que corresponde a los VHHs (**Figura 1.5**), y su posterior digestión con la enzima de restricción SfiI, enzima con la cual también se sometió a digestión el vector pINQ.

La reacción de PCR se realizó utilizando 0.2 μ M del cebador directo 5: 5'-GTTACTCGCGGCCAGGCGGCCATG-3', 0.2 μ M del cebador reverso 6: 5'-CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAG-3', 60 ng de ADN plasmídico, 2.5 U de la enzima Taq ADN polimerasa (ThermoFisher), 1X Buffer Taq (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH= 8.4), 1.5 mM de MgCl₂, y 0.2 mM de dNTPs, en un volumen final de 50 μ L; el ADN plasmídico se extrajo mediante la utilización del kit comercial QIAprep spin miniprep (Qiagen; procediendo según indican las instrucciones del fabricante) a partir de alícuotas de un cultivo ON de bacterias *E. coli* ER2738 infectadas con el último *output* en medio SB-ampicilina (tal como se describió anteriormente). La reacción de PCR se desarrolló en termociclador (BIORAD) bajo el siguiente programa: 94°C durante 1 minuto, 30 segundos a 94°C, 60°C y 72°C en un total de 30 ciclos y para finalizar 72°C durante 10 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, con el agente intercalante de ADN bromuro de etidio bajo luz UV. A continuación se digirieron 5 μ g del producto de PCR y del vector pINQ con 50 U de la enzima SfiI (ThermoFisher) en termociclador (BIORAD) a 50°C, ON. Los fragmentos digeridos se eluyeron del gel y se purificaron mediante la utilización del kit comercial QIAquick Gel Extraction Purification (Qiagen) según el protocolo establecido. La preparación del vector pINQ requiere su defosforilación para lo cual se incubaron 200 ng

del vector purificado con 1U de la enzima SAP (shrimp alkaline phosphatase; NEB) en termociclador (BIORAD) durante 30 min a 37°C, tras lo cual se inactivó la enzima de forma completa e irreversible al incubar la mezcla de reacción a 65°C durante 5 minutos. Los productos de digestión purificados se ligaron en presencia de la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas), en una relación molar 1:5 inserto: vector, de manera que se sometieron 25 ng de vector y 8 ng de inserto a 1 U de la enzima durante 2 horas a 22°C en termociclador (BIORAD), inactivando la enzima tras la incubación de la mezcla de reacción durante 10 minutos a 80°C. Los controles de re-ligación (misma preparación pero en ausencia de inserto) y de vector (misma preparación pero en ausencia de inserto y ligasa) se realizaron en paralelo. Posteriormente, 50 µL de bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5α se transformaron con 2 µL del producto de ligación mediante electroporación utilizando el equipo Micro Pulser™ (BIORAD) y cubetas de electroporación de 1 mm (SigmaAldrich). Las células se incubaron durante 1 hora en medio de recuperación SOC a 37°C con agitación, tras lo cual se sembraron diluciones seriadas en placas de LB agar-kanamicina, las cuales permanecieron a 37°C, ON. Al día siguiente, se contaron las colonias obteniéndose el valor de ufc/mL. La totalidad de las colonias crecidas para la ligación (a fin de no perder diversidad) se recolectó con 2 mL de LB, se centrifugó durante 10 minutos a 6000g y se extrajo el ADN plasmídico a partir de las células contenidas en el pellet, procediendo tal como se explicita anteriormente. 50 ng de este ADN (vector pINQ-H6HA conteniendo el panel de VHHs seleccionados) se utilizó para transformar 30 µL de bacterias electrocompetentes *E. coli* BL21 (procediendo tal como ya se explicitó), y se sembraron las células en las diluciones correspondientes en placas de LB agar-kanamicina-glucosa 4%, incubándolas a 37°C, ON.

3.6.3 Clonado individual de VHHs al vector de expresión

En algunos casos se requirió el clonado individual de ciertos clones a la versión del vector pINQ adecuada. El clonado se desarrolló de igual manera a la descrita para la totalidad del *output*, con la salvedad de que la amplificación de los VHHs individuales por reacción de PCR se realizó utilizando 2 U de la enzima Pfu (ThermoFisher) y su buffer correspondiente. Por otro lado, en el caso en el cual el clonado se realizó al vector de expresión pINQ-BtH6, el protocolo realizado fue idéntico a excepción de que las células transformadas con el ADN plasmídico fueron *E. coli* BL21-pCY216; se trata de la cepa celular *E. coli* BL21 previamente transformada con el vector pCY216, el cual, además de presentar como marcador de selección resistencia al antibiótico cloranfenicol, codifica para la biotina-ligasa BirA.

3.6.4 Screening desde pINQ-H6HA:

Se ensayó la reactividad de los clones por los el antígeno de interés de manera esencialmente similar a la descrita para el vector pComb3X, aunque se presentan ciertas diferencias que se destacan a continuación. Se seleccionó al azar 10 colonias *E. coli* BL21 aisladas en placas de LB agar-kanamicina-glucosa4%. Las mismas se crecieron en medio líquido LB-kanamicina 40 µg/mL hasta $DO_{600nm} = 0.5$ UA, tras lo cual se indujo la expresión de los VHHs mediante el agregado de 3 µM IPTG (Goldbiotechnonology), y se incubó 4 hs. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 6000g durante 10 minutos obteniendo en el pellet las células del cultivo. Éste fue resuspendido en 500 µL de PBS 1X y sometido a 3 ciclos de congelado/descongelado, seguido de sonicado (potencia 60%, pulso 50%, 15 minutos).

Tras una ronda de centrifugación a máxima velocidad (15 minutos, 4°C) se obtuvo en el sobrenadante la denominada fracción soluble, la cual representa el contenido intracelular soluble de la célula. El resto del procedimiento se realizó tal como se describió para el screening desde pCom3X (Materiales y métodos 2.5.4) con la salvedad de que en lugar de enfrentar el antígeno sensibilizado en el pocillo a 100 µL directos del medio de cultivo, se lo enfrentó a 100 µL de una dilución 1/5 de la fracción soluble en PBS 1X.

3.7 Análisis de la reactividad por distintas subunidades de AgB

Se ensayó la reactividad de aquellos clones que presentaron reconocimiento por el AgB nativo a diferentes subunidades recombinantes del mismo. El ensayo se realizó en pocillos de ELISA procediendo de idéntica forma a la explicitada para el screening desde pINQ-H6HA (Materiales y métodos 2.6.4), con la salvedad de que la sensibilización del pocillo se realizó en cada caso con 0.5 µg de las subunidades recombinantes B1, B2 y B3, cedidas amablemente por la Dra. Ana Ferreira.

3.8 Secuenciación

La secuenciación fue realizada a partir de ADN plasmídico por el servicio de secuenciación de ácidos nucleicos de la empresa MACROGEN, KOREA. El ADN se extrajo mediante el kit comercial QIAprepR spin miniprep (Qiagen), a partir de un cultivo líquido ON de los clones a identificar. La secuenciación puede realizarse tanto desde el vector pComb3X como del vector pINQ. En el primer caso se requiere del cebador directo OmpASeq: 5'-AAGACAGCTATCGCGATTGCA-3', mientras que para pINQ se requiere del cebador directo T7-promotor: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'.

3.9 Expresión de VHHs

Se llevó a cabo la expresión de ciertos clones contenidos en el vector pINQ tanto a pequeña como a gran escala. Un punto esencial a destacar para la producción de VHHs independientemente de la magnitud con la que se lleve a cabo, es que el pH del medio LB debe ser igual a 7, de lo contrario la producción resulta ineficiente.

3.9.1 Expresión de VHH a pequeña escala en diferentes condiciones

Para cada clon se transformaron 30 µL de células electrocompetentes *E. coli* BL21 con 100 ng de ADN plasmídico, procediendo tal como ya se ha explicado, en cubetas de electroporación de 0.2 mm (SigmaAldrich). Las células se plaquearon en placas de LB-kanamicina-glucosa 4% y se incubaron ON. Se recogió con 2 mL de LB la totalidad de las colonias de la placa en la que las mismas se presentaban más separadas y de mayor tamaño, agregando la cantidad necesaria de esta suspensión de células a 20 mL de LB-kanamicina-glucosa 4% hasta obtener una DO_{600nm} inicial= 0.05 UA. El cultivo se desarrolló en las condiciones habituales hasta alcanzar una DO_{600nm} inicial= 0.5 UA, momento en el que se realizó la inducción. A fin de determinar cómo afecta la presencia de glucosa a la expresión de VHHs, la mitad del cultivo se desarrolló en presencia de glucosa, mientras que la otra mitad en ausencia de ésta. Para esto, 10 mL del cultivo se centrifugaron a 5000g durante 10 minutos, resuspendiéndose el pellet obtenido en 10 mL de LB-kanamicina 40 µg/mL. Una vez que la glucosa fue eliminada se llevó a cabo la inducción

con 3 μM de IPTG durante 4 horas a 37°C, 250 rpm, al igual que en el cultivo con glucosa. Transcurrido el período de incubación, a partir de una alícuota del cultivo se obtuvo la fracción soluble e insoluble del mismo. Para esto se centrifugó 1 mL del cultivo a 5000g durante 10 minutos y se resuspendió el pellet (correspondiente a las células del cultivo) en 100 μL de B-PER (ThermoFisher), se vortexeó e incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 200 μL de PBS 1X y se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido comprende la fracción soluble. El pellet se resuspendió en 30 μL de urea 8M, se vortexeó e incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agregó 270 μL de PBS 1X y se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos. El sobrenadante recuperado comprende la fracción insoluble. La fracción soluble e insoluble de cada clon en presencia y ausencia de glucosa se evaluó mediante SDS-PAGE (ver Materiales y métodos 3.16); en todos los casos se cargó el volumen máximo (20 μL).

3.9.2 Expresión de VHH a gran escala

Se siguieron esencialmente los mismos pasos ya descritos para la pequeña producción, sólo que escalado a volúmenes mayores y en ausencia de glucosa. La totalidad del cultivo se centrifugó a 6000g durante 15 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 25 mL de LB, seguido de una nueva ronda de centrifugación en iguales condiciones y resuspensión del pellet en 10 mL finales de PBS 1X. La suspensión celular se sometió a sonicado (15 minutos, pulso al 50% y potencia 60%) con posterior centrifugación a máxima velocidad, 10 minutos, 4°C. La centrifugación se repitió el número de veces necesaria hasta la obtención de una solución translúcida. Se recolectó el sobrenadante y se filtró por 0.45 nm, obteniéndose así los VHHs expresados en forma soluble. Esta fracción se purificó por columnas de Ni-NTA, tal como se explica en detalle más adelante (ver Materiales y métodos 3.10).

3.9.3 Expresión de VHH biotinilado a gran escala

Se recogió la totalidad de las colonias que crecieron en placas de LB agar-kanamicina-cloranfenicol tras la transformación de 30 μL de células electrocompetentes *E. coli* BL21-pCY216 con aproximadamente 100 ng de ADN plasmídico conteniendo la secuencia de VHH deseada, procediendo tal como ya se ha explicado en cubetas de electroporación de 0.2 mm (SigmaAldrich). A partir de las colonias recogidas se realizó un cultivo en 0.5 L de LB-kanamicina-cloranfenicol en presencia de D-biotina 100 μM y arabinosa 0.04% comenzando en una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.05$ UA. Al alcanzar $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.5$ UA el cultivo se indujo con 3 μM de IPTG durante 4 horas. Finalizado el período de incubación se realizó la misma serie de centrifugaciones descrita en el ítem anterior. La suspensión celular obtenida se sonicó (5 minutos, pulso al 50%, potencia 60%), llevando a la ruptura celular y como consecuencia a la liberación del contenido intracelular al medio, momento en el cual se está en condiciones de agregar D-biotina 100 μM para asegurar que la biotinilación ocurra al 100%; este agregado extra de D-biotina es necesario ya que, como la enzima biotiniliga BirA y los VHHs se encuentran en compartimentos celulares diferentes, la probabilidad de que ocurra la biotinilación se reduce a la probabilidad de encuentro entre éstos durante el pasaje del VHH a través del citoplasma hacia el periplasma, lo que se corresponde a proceso de biotinilación con 30% de eficiencia. Esta suspensión se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación, y finalmente se centrifugó a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C, proceso que se repitió hasta la obtención de una solución

translúcida. Los VHHs-biotinilados se encuentran contenidos en el sobrenadante, el cual se recolectó y filtró por 0.45 nm, para su posterior purificación por columna de Ni-NTA, paso imprescindible para la eliminación de biotina libre y restos celulares.

3.10 Purificación de VHH por cromatografía de afinidad

Dada la presencia en los vectores pINQ de la cola de histidinas, la purificación de los VHHs se realizó mediante la utilización de una columna Ni-NTA (GE Healthacer) en el equipo AKTA *purificationsystem* (GE Healthcare). A la fracción a purificar, previo a su inyección en la columna, se le agregó imidazol a una concentración final 20 mM, concentración que presenta el buffer A en el cual se encuentra equilibrada la columna. Tras la inyección de la muestra en el equipo, se realizó un primer lavado con 5 mL de buffer A (20 mM imidazol), seguido de 5 mL de buffer con 40 mM de imidazol (4% de buffer B en buffer A) y 5 mL de buffer con 50 mM de imidazol (6% de buffer B en buffer A). Para la elución del VHH se aplicó a la columna 5 mL de buffer con 500 mM de imidazol (100% buffer B). Todo el proceso de purificación fue monitoreado mediante espectrofotometría a 280 nm. El pico de absorbancia se dializó en 2 L del buffer correspondiente. En el caso del VHH no biotinilado la diálisis se realizó en el buffer de conjugación (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH= 8.3- 8.5), mientras que para el VHH biotinilado la diálisis precedió en PBS 1X. Ambas se realizaron durante 48 horas con cambios de buffer luego de transcurridas las primeras 4 horas y a las 24 horas. Una vez dializada la fracción se cuantificó el contenido proteico por absorbancia a 280 nm utilizando el equipo *NanoDrop1000 spectrophotometer* (ThermoFisher) y el blanco correspondiente. Las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación se visualizaron por SDS-PAGE (ver Materiales y métodos 3.15); se cargó el volumen máximo (20 µL) de todas las fracciones, incluyendo a la fracción "Pico" lo que correspondió con 50 µg.

3.11 Conjugación de VHH no biotinilado a columna de agarosa activada

Se conjugó 1 mg del VHH no biotinilado a 500 µL de resina Cyanogen Bromide Activated Sefarosa (SigmaAldrich), tal como establece el protocolo del fabricante. Para verificar que la proteína fue conjugada exitosamente, se midió el valor de absorbancia a 280 nm, (utilizando el equipo *NanoDrop1000 spectrophotometer* (ThermoFisher)) de la solución a conjugar y de aquella fracción recuperada luego de la conjugación.

3.12 Purificación de AgB desde líquido hidático a través de "columna conjugada"

Se aplicaron 20 mL de líquido hidático bovino (40 volúmenes de columna) previamente centrifugado a 11000g durante 20 minutos a 4°C. Si bien se desconoce la cantidad de AgB contenido en el mismo, se entiende que el AgB se presenta por lo general en una concentración entre 10 y 100 µg/mL. Aquellos componentes presente en el líquido hidático que no presentaron interacción de ningún tipo con la columna se recuperaron en lo que se denominó "fracción no unida" (FNU). Se recolectaron muestras de 500 µL de FNU cada 1 mL de líquido aplicado. La etapa de lavados se realizó con 10 volúmenes de columna de PBS-Tween 0.05%; todas las muestras fueron recolectadas. Finalmente, se aplicaron secuencialmente 400 µL, 500 µL y otros 500 µL de una solución de glicina pH

2.2, recolectando la fracción eluida cada vez por separado, las cuales fueron rápidamente neutralizadas con Tris 2M. Tanto las fracciones recolectadas, así como una muestra de líquido hidático y de AgB purificado por el método establecido en el laboratorio (proporcionado por la Dra. Ana Ferreira), se visualizaron por SDS-PAGE (ver Materiales y métodos 3.15); se cargó el volumen máximo (20 μ L) de cada fracción, incluyendo el AgB purificado lo que correspondió a 14 μ g. La muestra de líquido hidático, así como las fracciones FNU y lavados fueron concentradas 5 veces en el equipo Integrated speedvak system ISS100 (Savant). Por otra parte, para obtener un acercamiento a la cantidad de AgB purificado, se midió por absorbancia a 280 nm el contenido proteico de las fracciones correspondientes a la elución con glicina pH 2.2, utilizando el *NanoDrop 1000 spectrophotometer* (ThermoFisher) y el blanco correspondiente.

3.13 Westernblot

Las mismas fracciones y en iguales cantidades que se describe se visualizaron por SDS-PAGE en el ítem anterior (a excepción de la alícuota de AgB purificado de la cual se cargó 5 μ g), se evaluaron también por Western blot. Previo a la transferencia de las muestras a la membrana de nitrocelulosa, ésta junto con el gel y papel de filtro se humedecieron durante 10-15 minutos en el buffer de transferencia, tras lo cual se inició al armado del dispositivo. La transferencia procedió durante 45-60 minutos a 14 V, y se detuvo al constatar presencia del marcador de peso molecular pre-teñido (ThermoFisher) en la membrana. Se bloqueó la membrana con una solución de PBS-leche 5% a 4°C, ON. Luego de lavar la membrana con PBS-Tween 0.05%, se la incubó en presencia de 5mL de medio del hibridoma de ratón conteniendo el mAb EB7 anti-AgB, durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. Tras someter la membrana a una serie de lavados de 1 minuto cada uno, se la incubó con una dilución 1/5000 en PBS-Tween 0.05% del anticuerpo anti-ratón conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (FA; Pierce), durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. Finalmente, luego de los lavados pertinentes, se llevó a cabo la etapa de revelado en presencia de sustrato-FA durante aproximadamente 15 minutos deteniendo la reacción al enjuagar la membrana con H₂O destilada.

3.14 Construcción de la “columna capturada”

Se colocaron 100 μ L de la resina en suspensión High Capacity streptavidin-agarose (ThermoFisher) en una columna (Starta™), eliminando el buffer en el cual se encuentra mediante su centrifugación durante 1 minuto a 700g, de manera que en la columna quedaron retenidos únicamente 50 μ L de resina. La columna se equilibró en 200 μ L de PBS 1X (buffer en el cual se encuentra contenido el VHH), mediante incubación durante 5 minutos con posterior centrifugación en las condiciones mencionadas. Procediendo a la captura del VHH, 50 μ g de la solución de VHH-biotinilado en PBS se colocaron en la columna, solución a la cual previamente se le midió el contenido proteico por absorbancia a 280 nm utilizando el equipo *NanoDrop 1000 spectrophotometer* (ThermoFisher). Luego de la incubación durante 15 minutos y tras la centrifugación a 700 g durante 1 minuto, se recogió la fracción no retenida y se midió nuevamente su contenido proteico, constatando así la retención del VHH-biotinilado. El proceso descrito se repitió de manera idéntica el número de veces necesaria hasta constatar saturación. La columna se lavó con 10 volúmenes de cada una de las siguientes soluciones: PBS-Tween 0.05%, NaCl 0.5 M en PBS

y PBS. Finalmente, a modo de explorar cuáles eran las condiciones más apropiadas para llevar a cabo la elución, se aplicó de manera consecutiva 200 μ L de una solución de glicina pH 3.0 y 200 μ L de una solución glicina pH 2.2, incubando durante 1 minuto, y centrifugado a 700 g por igual tiempo luego de la aplicación de cada solución. El eluido fue neutralizado rápidamente con una solución Tris 2 M. La columna se regeneró en PBS. Las diferentes fracciones recogidas fueron visualizadas por SDS-PAGE (ver Materiales y métodos 3.15); de cada fracción se cargó el máximo volumen (20 μ L).

3.15 Purificación AgB desde líquido hidático por columna “capturada”

Se aplicó a la columna “capturada” un total de 72 mL de líquido hidático previamente centrifugado a 11000 g durante 20 minutos a 4°C. Se recogieron muestras de 1 mL de FNU correspondiente a los 8, 16, 24 y 72 mL de líquido hidático aplicado, para posteriormente visualizar la presencia de AgB en las mismas mediante SDS-PAGE. La etapa de lavados se realizó con 10 volúmenes de columna consecutivos de las siguientes soluciones: PBS-Tween 0.05%, NaCl 0.5 M en PBS y PBS, y la elución se realizó en dos etapas, cada una de las cuales constó de la incubación con 200 μ L de una solución de glicina pH 3.0 durante 1 minuto y posterior centrifugación. El eluido se recogió y neutralizó inmediatamente con una solución de Tris 2 M. Tanto a las fracciones FNU recogidas, como a las correspondientes a la elución de AgB se les determinó su contenido proteico a 280 nm en el equipo *NanoDrop 1000 spectrophotometer* (ThermoFisher). Para su visualización por SDS-PAGE (ver Materiales y métodos 3.15), se cargó el volumen máximo (20 μ L) de cada fracción, incluyendo el AgB purificado lo que corresponde a 14 μ g. La muestra de líquido hidático, así como las fracciones FNU fueron concentradas 5 veces en el equipo *Integrated speedvak system ISS100* (Savant).

3.16 SDS-PAGE

En todos los casos la visualización de proteínas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE), posteriormente teñido con solución colorante para tinción con azul de Coomassie). Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular “unstained” (Pierce). Previo a ser cargadas en el gel, las muestras fueron calentadas a 100°C durante 5 minutos en presencia de buffer de carga 6X.

3.17 Evaluación de la construcción ROR1 recombinante por ensayo ELISA

La sensibilización de los pocillos de ELISA se realizó con 100 μ L de una solución de avidina a 2 μ g/mL incubando a 4°C ON, tras lo cual se bloquearon con una solución de PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37°C, y posteriormente se agregó 100 μ L del antígeno ROR1-bt a una concentración de 4 μ g/mL incubando durante 1 hora a 37°C. Se agregaron 100 μ L del anticuerpo anti-ROR1 comercial correspondiente en la misma concentración que sugiere el fabricante para los ensayos de citometría. Se utilizó el anticuerpo monoclonal en ratón anti-ROR1 humano clon 2A2 (MiltenyiBiotec), del cual se agregó una dilución 1:11 en PBS-Tween 0.05%, y el anticuerpo monoclonal en ratón anti-ROR1 humano clon 4A5 (BDPharmingen) se utilizó en una dilución 1:200 en PBS-Tween 0.05%. Posteriormente, se incubó en presencia de 100 μ L de una dilución 1/5000 en PBS-Tween 0.05% del anticuerpo conjugado anti-ratón-PO (ThermoFisher), y se reveló mediante el

agregado de 100 μL de sustrato PO, deteniendo la reacción con 50 μL de H_2SO_4 . Las incubaciones con los diferentes anticuerpos transcurrieron durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación, y entre cada una de ellas se realizó una serie exhaustiva de lavados con PBS-Tween 0.05%. En la **Figura 3.9** se esquematiza el ensayo realizado. Los blancos realizados consistieron en: i) *control de anticuerpo conjugado*: pocillos sensibilizados con avidina-ROR1-bt y bloqueados con PBS-BSA 1%, incubados únicamente en presencia del anticuerpo conjugado anti-ratón-PO, ii) *control inespecífico*: pocillos sensibilizados con avidina, bloqueados con PBS-BSA 1% e incubados en presencia del anticuerpo anti-ROR1 y del anticuerpo conjugado anti-ratón-PO.

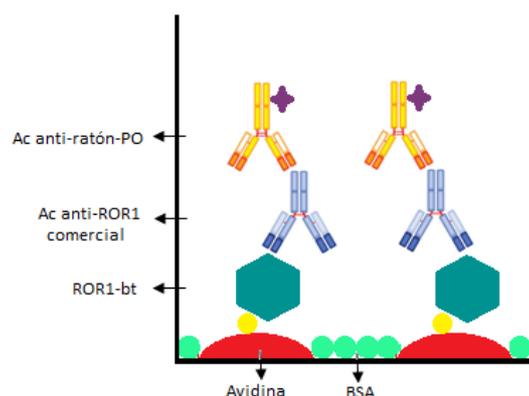


Figura 3.9. Esquema del ensayo de ELISA realizado para verificar la calidad del antígeno ROR1-bt. Se esquematiza el reconocimiento del antígeno ROR1-bt por parte de los anticuerpos anti-ROR1 comerciales, revelando esta interacción mediante la utilización de un anticuerpo secundario: anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa.

3.18 Análisis de la funcionalidad de los VHHs purificados por ensayo ELISA

Pocillos de ELISA fueron sensibilizados con 100 μL de avidina a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ incubados a 4°C ON, tras lo cual se bloquearon con una solución de PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37°C. Luego, se agregó 100 μL del antígeno ROR1-bt a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó durante 1 hora a 37°C, para así proceder al agregado de los VHHs purificados comenzando desde una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en diluciones seriadas al tercio en PBS-Tween 0.005%. El revelado se realizó mediante la incubación de los pocillos en presencia de 100 μL de una dilución 1/3000 en PBS-Tween 0.005% del anticuerpo anti-HA-PO (Roche) y posterior agregado del sustrato-PO durante aproximadamente 15 minutos, deteniendo la reacción tras el agregado de 50 μL de H_2SO_4 . Tanto la incubación con los VHHs como con el anticuerpo anti-HA-PO se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación, y finalizada cada una de éstas etapas se realizó una serie de lavados con PBS-Tween 0.05%. El blanco consistió en enfrentar las diluciones seriadas de cada VHH a pocillos sensibilizados con avidina y bloqueados con BSA, pero en ausencia de ROR1-bt, revelando tal explicitó.

3.19 Cultivo celular

La línea celular A549 de origen epitelial humano proveniente de carcinoma de pulmón (cedida amablemente por la Dra. Analía Rial perteneciente al Departamento de Desarrollo

Biocientífico de Facultad de Medicina), se cultivó en medio DMEM:HAM'S F-12 en una proporción 1:1 suplementado con 10% SFB y antibiótico-antimicótico (Sigma Aldrich) a 37°C en 5% CO₂ en incubador.

3.20 Citometría de flujo

3.20.1 Optimización del ensayo de citometría de flujo

Se determinó la expresión de ROR1 por parte de la línea celular A549 mediante la incubación de las células (2×10^5) con 0.75 μ g del anticuerpo comercial hecho en ratón anti-ROR1 4A5 (BD Pharmingen) durante 20 minutos a 4°C con agitación, y revelado con 300 μ L de una dilución 1/2000 del anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa-488 (ThermoFisher) tras la incubación en iguales condiciones y protegido de la luz. Como control isotópico se utilizó el anticuerpo IgG2b anti-CD38 hecho en ratón (anticuerpo producido por el equipo de Investigación del Dr. Pablo Opezso). Las reacciones tuvieron lugar en presencia de suero de conejo (1/30).

Igualmente se determinó la esencialidad de la utilización de suero de conejo durante el ensayo tras la incubación de las células A549 (2×10^5) con una dilución 1/300 del anticuerpo anti-HA conjugado al fluoróforo Ficoritrina (PE) (abcam), en presencia y ausencia de suero de conejo.

3.20.2 Análisis de la reactividad de clones VHH anti-ROR1 nativo por citometría de flujo

Se incubaron células A549 (2×10^5) junto con 5 μ g de los VHH candidatos para el reconocimiento del antígeno ROR1, durante 1 hora a 4°C con agitación, en un volumen final de 300 μ L en FCB. Posteriormente fueron incubadas en presencia de una dilución 1/300 en FCB del anticuerpo anti-HA-PE, durante 45 minutos a 4°C, con agitación y protegido de la luz. Tras cada incubación se realizó una etapa de lavados que consistió en una centrifugación a 500g durante 5 minutos a 4°C, descartar el sobrenadante, resuspender el pellet en 1 mL de FCB, y repetir el proceso 2 veces, resuspendiendo el pellet final en 300 μ L de FCB. Una vez más, para constatar la correcta expresión de ROR1 por parte de la línea celular se utilizó el anticuerpo comercial anti-ROR1 4A5 (BD Pharmingen) revelado con el anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa-488 (ThermoFisher). Se utilizó el anticuerpo IgG2b anti-CD38 hecho en ratón (anticuerpo producido por el equipo de Investigación del Dr. Pablo Opezso) como control isotópico. Como control de la interacción del VHH se utilizó el VHH T3, con especificidad por TetC (fragmento C recombinante de la toxina tetánica), revelado con el anticuerpo anti-HA-PE, el cual también se incubó solo en presencia de las células para descartar interacciones inespecíficas.

3.21 Identificación de clones por patrón de digestión

Se desarrolló una reacción de PCR a partir de colonias aislada de placas de LB agar resuspendidas en 100 μ L de H₂O. Se utilizó 5 μ L de esta suspensión en presencia de 0.2 μ M del cebador directo 5: 5'-GTTACTCGCGGCCAGGCGGCCATG-3', 0.2 μ M del cebador reverso 6: 5'-CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAG-3', 1 U de la enzima Taq ADN polimerasa

(ThermoFisher), 1X Buffer Taq (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH= 8.4), 1.5 mM de MgCl₂, y 0.2 mM de dNTPs en un volumen final de 50 µL. La reacción tuvo lugar en termociclador (BIORAD) bajo el siguiente programa: 94°C durante 1 minuto, 30 segundos a 94°C, 60°C y 72°C en un total de 25 ciclos y para finalizar 72°C durante 10 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, con agente el intercalante de ADN bromuro de etidio y bajo luz UV. Los productos de la reacción se purificaron por el kit GeneJET PCR Purification (ThermoFisher), tal como indica el fabricante. A continuación se sometieron a digestión de manera independiente con 5 U de las enzimas MvaI y HaeIII en presencia de 1X Buffer R en un volumen final de 20 µL. El perfil de digestión se observó mediante electroforesis en gel de agarosa 4% en buffer TAE 1X, con el agente intercalante de ADN bromuro de etidio y bajo luz UV.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de nanobodies específicos contra AgB que permita su purificación por cromatografía de inmunoafinidad.

4.1.1 El título de anticuerpos totales refleja una buena respuesta contra AgB por parte de la llama inmunizada

Previo al desarrollo de las técnicas que permitirán seleccionar los nanobodies específicos contra AgB, resultó relevante conocer el desarrollo de la respuesta de anticuerpos por parte de la llama, para lo cual, se enfrentaron diluciones del suero de la llama inmunizada al antígeno AgB nativo y se desarrolló un ensayo de ELISA. En la **Figura 4.1** se muestra la titulación de los anticuerpos totales reactivos contra AgB presentes en el suero de la llama inmunizada. En la misma se observa un aumento en la cantidad de anticuerpos generados a medida que aumenta el número de inmunizaciones. El título de anticuerpos (dilución que da lugar al 50% de la señal máxima) que previo a la inmunización mostró un valor de 9.8×10^2 UA/mL, tras la primera (priming) y segunda inmunización (booster) aumentó significativamente, pasando a ser 1.5×10^4 UA/mL y 1.5×10^5 UA/mL, respectivamente. Dada la buena respuesta observada se procedió a la generación de la biblioteca de VHHs en fagos filamentosos.

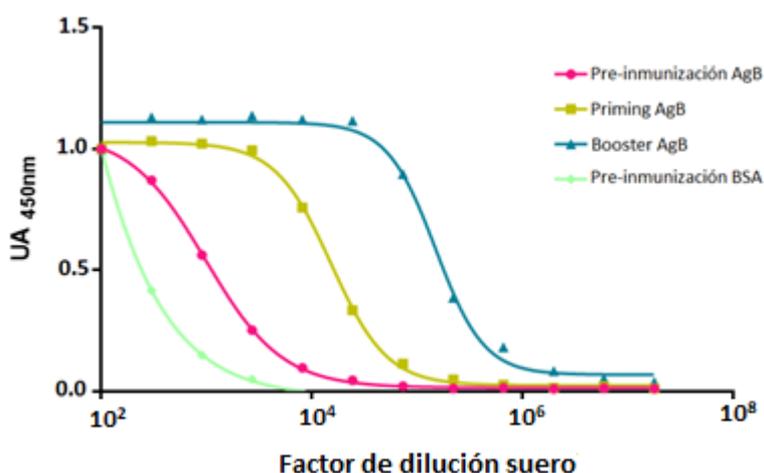


Figura 4.1. Titulación de anticuerpos totales reactivos contra AgB en suero de llama inmunizada. Se observa el efecto de dilución del suero de llama correspondiente a la pre-inmunización (rosado), priming (amarillo) y booster (celeste) para anticuerpos anti-AgB, y anticuerpos anti-BSA (proteína de bloqueo) correspondiente a la pre-inmunización (verde), cuando se lo enfrentó a una concentración fija del antígeno AgB nativo sensibilizado directamente en placa. Se reveló la presencia de anticuerpos totales mediante la utilización de anticuerpo anti-llama en ratón, y anticuerpo anti-ratón conjugado a PO hecho en conejo.

4.1.2 La selección de nanobodies específicos contra AgB resultó en un 100% de clones positivos

Con el fin de seleccionar aquellos clones presentes en la biblioteca de fagos filamentosos que presentan reconocimiento por el AgB, la misma se sometió a sucesivas rondas de selección o *panning* a modo de enriquecer en aquella fracción de VHHs que presentan reconocimiento por el mismo. La biblioteca 106 utilizada fue preparada por la

Q.F Cecilia Vallejo a partir de 10^8 linfocitos periféricos, y presentó una diversidad de 1.7×10^9 ufc/mL.

La primera ronda de selección o *panning* se realizó incubando 5×10^{11} fagémidos/pocillo en placas de ELISA sensibilizados con $1 \mu\text{g}$ de AgB nativo por pocillo. Tras sucesivos lavado, los fagos retenidos se eluyeron con tripsina, fracción denominada *primer output*. La misma presentó un título de 1.7×10^5 /mL. Luego de su amplificación, la población de fagos enriquecida se sometió a una segunda ronda de selección a partir de la cual se obtuvo el *segundo output*, el cual presentó un título de 3.1×10^5 /mL. Contrariamente a lo esperado, el título del *primer y segundo output* se mantuvo en el mismo orden. A pesar de que los valores parecen indicar que el enriquecimiento no fue muy eficiente y sería recomendable realizar una tercera ronda de selección, se procedió al análisis del mismo a fin de determinar qué porcentaje de los clones que componen el *segundo output* son específicos contra el AgB. Para esto, se enfrentó el sobrenadante del cultivo de 10 clones seleccionados al azar, procedentes de colonias aisladas en placa de LB agar-ampicilina correspondientes al *segundo output*, con $0.2 \mu\text{g}$ de AgB previamente adsorbido al pocillo de ELISA. Los clones positivos se detectaron con un anticuerpo anti-HA, dado que los VHHs procedentes de la biblioteca presentan este péptido en su extremo C-terminal. Como se muestra en la **Figura 4.2**, los 10 clones seleccionados al azar presentaron reactividad contra el AgB con señales de saturación, y ninguno de los clones reaccionó contra la BSA utilizada como control negativo.

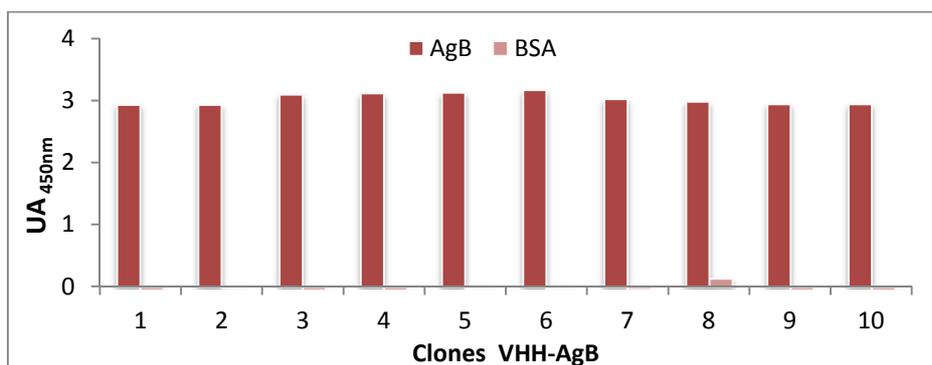


Figura 4.2. Reactividad contra el AgB de 10 clones seleccionados al azar a partir del *output* de la segunda ronda de *panning*. Se muestra la reactividad de los diferentes clones seleccionados frente al AgB y BSA simultáneamente.

A pesar de que se obtuvo señal de saturación para todos los clones, no es posible discernir si las mismas son producto de una alta afinidad por el antígeno o de su alta producción. Para caracterizar mejor los clones individuales, se procedió a la transferencia de la totalidad del *output* a un vector de expresión, para que, una vez identificados los clones más apropiados, se pueda pasar directamente a su producción a mayor escala.

4.1.3 No se evidenció pérdida de reactividad al clonar la totalidad del *output* a un vector de expresión

Teniendo en mente el objetivo general de lograr la purificación de AgB por cromatografía de inmutafinidad utilizando un VHH específico contra éste, se seleccionó el vector de expresión pINQ-H6HA para llevar a cabo el clonado. Este vector permite la

expresión del VHH asociado a una cola de 6 histidinas (6His) en su extremo C-terminal, seguido de un epítipo HA, etiquetas que permiten la detección y purificación del mismo.

Debido a dificultades constatadas al intentar realizar el clonado del *output* de la forma tradicional, la cual implica la digestión de ambos vectores con la enzima de restricción SfiI y posterior ligación, la misma se desarrolló mediante la amplificación por PCR y posterior digestión de los VHHs presente en el vector pComb3X, y la digestión del vector pINQ-H6HA, al cual se desea transferir el *output*. Ambas digestiones se realizaron con SfiI. Como se muestra en la **Figura 4.3**, la amplificación del *output* contenido en el vector pComb3X procedió correctamente, evidenciado como una banda a la altura de 400 pb, lo cual coincide con el tamaño teórico del VHH; debido a que no se observa diferencias de tamaño evidente entre el producto de PCR sin digerir y el producto de PCR digerido no se muestra el resultado. Por otro lado, tras la digestión del vector pINQ-H6HA se obtuvieron tres bandas: la banda que presenta mayor migración y se corresponde con un peso molecular de aproximadamente 1600 pb, corresponde al fragmento “stuffer” liberado del vector tras su digestión, mientras que las bandas que presentaron una menor migración corresponden a diferentes fracciones del vector. Aquella banda que se observa a una altura de aproximadamente 8000 pb corresponde a la fracción parcialmente digerida del vector, mientras que la fracción totalmente digerida del vector se presenta como banda de aproximadamente 6000 pb. En el carril S/D se muestra a modo de referencia el vector sin digerir, que por estar cerrado se presenta en su forma súper-enrollada y por tanto se observa una migración mayor (4500 pb) a la del vector abierto.

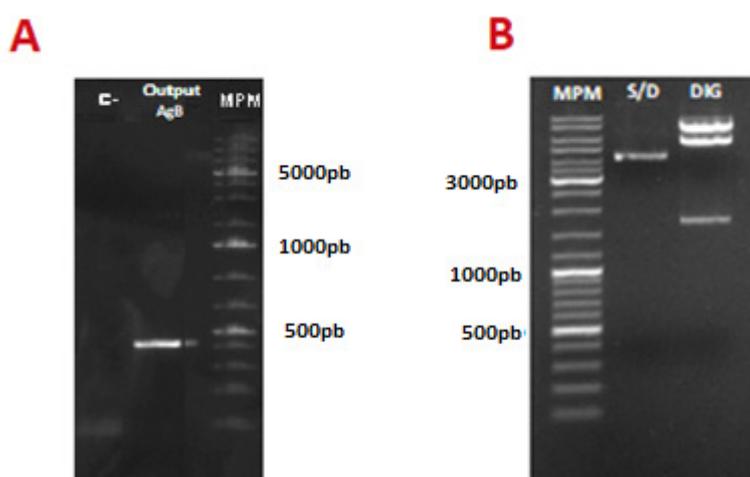


Figura 4.3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación y digestión de los diferentes vectores. Gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, con agente intercalante de ADN bromuro de etidio, visualizado bajo luz UV. **Figura 4.3A:** Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR correspondiente al *segundo output* contra AgB. Se denomina C-: control negativo; Output AgB: totalidad de VHHs seleccionados por su reconocimiento por el AgB, amplificados por PCR; MPM: marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus ADN Ladder (ThermoFisher). **Figura 4.3B:** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del vector pINQ-H6HA. Se denomina MPM: marcador de peso molecular Gene Ruler ADN Ladder Mix (ThermoFisher); S/D: vector pINQ-H6HA sin digerir; DIG: vector pINQ-H6HA digerido.

El ADN de la banda de 6000 pb y del inserto de 400 pb se purificó desde gel y se ligaron mediante la utilización de la ADN-ligasa T4. El producto de ligación se usó para transformar células *E. coli* BL21 que permiten la producción de los VHHs bajo el sistema de expresión pET. A partir de 10 colonias individuales obtenidas de esta transformación

seleccionadas al azar se analizó la reactividad contra el AgB, **Figura 4.4**. Nueve de los diez clones seleccionados resultaron positivos contra el AgB, mientras que ninguno presentó reactividad contra el control negativo, BSA. Por tanto, la eficiencia del clonado fue satisfactoria, conservándose la diversidad original.

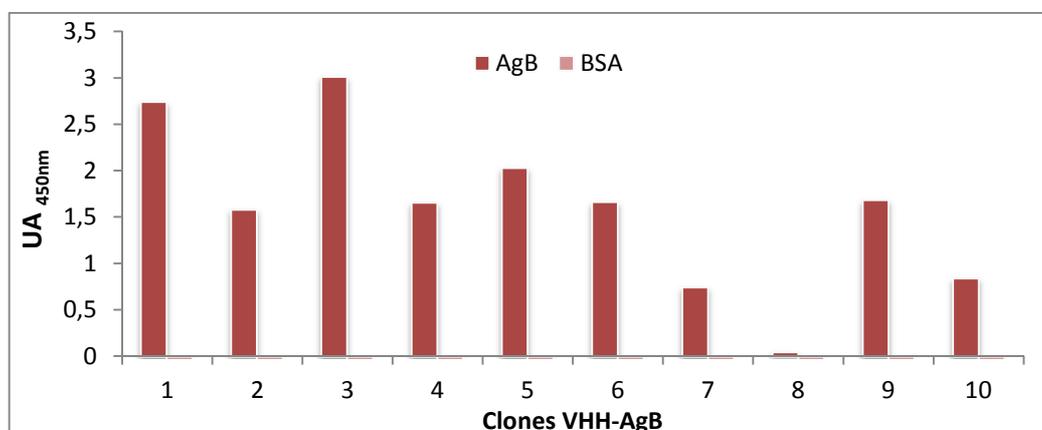


Figura 4.4. Reactividad contra el AgB de 10 clones seleccionados al azar. Se muestra la reactividad de los diferentes clones seleccionados frente al AgB y BSA simultáneamente.

Dado que se ha reportado que la composición en subunidades del AgB podría afectar su funcionalidad[36], se estudió la reactividad de los distintos clones contra tres de las subunidades del antígeno, subunidades B1, B2 y B3 recombinantes cedidas amablemente por la Dra. Ana Ferreira. Como se observa en la **Figura 4.5**, únicamente los clones VHH-AgB1, VHH-AgB3, VHH-AgB5, VHH-AgB7 y VHH-AgB10 resultaron reactivos contra la subunidad B1, mientras que ni la subunidad B2 ni la subunidad B3 fueron reconocidas por ninguno de los clones ensayados. El no reconocimiento de estas subunidades no es de extrañar dado que la subunidad B1 es la mayoritaria del AgB, y al haberse realizado tanto la inmunización de la llama como la selección de los clones con el antígeno nativo, en ambos procesos se sesgó al desarrollo y selección de clones reactivos contra la subunidad B1. Por otro lado, varios clones positivos originalmente contra el AgB nativo, no reaccionaron con ninguna de las subunidades ensayadas, lo que se entiende pudo ser consecuencia de que estos clones presentaran especificidad contra las subunidades B4 o B5 (no ensayadas), o definir epítopes que estuviesen conformados por dos o más subunidades diferentes. Por último, la falta de reconocimiento podría explicarse por el simple hecho de que, al tratarse de una proteína recombinante, los epítopes reconocidos por los clones en su conformación nativa no se correspondan completamente con los epítopes recombinantes.

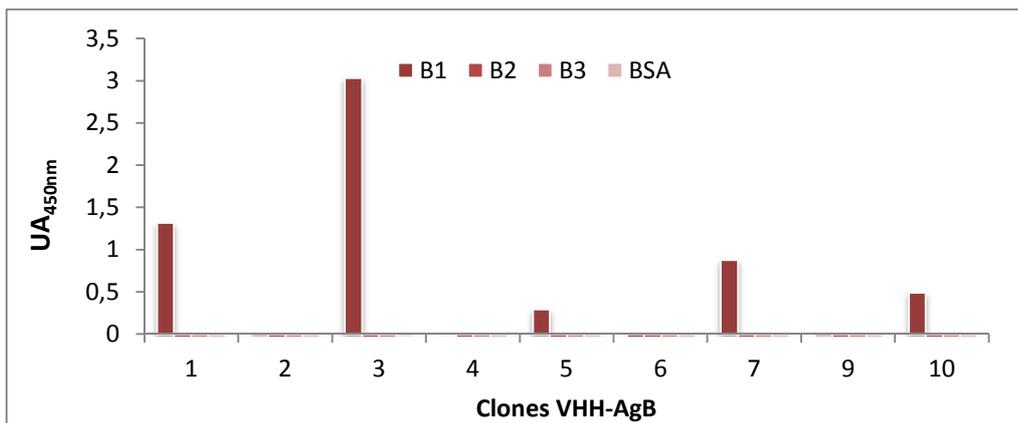


Figura 4.5. Reactividad contra las subunidades recombinantes B1, B2 y B3 de clones específicos contra AgB. Se muestra la reactividad de los diferentes clones previamente seleccionados por su reactividad contra el AgB por las subunidades recombinantes B1, B2 y B3, y BSA simultáneamente.

Contrariamente a lo esperado con el uso del vector de expresión fuerte pINQ-H6HA, la expresión de los VHH fue muy baja. Esto suele ocurrir cuando se parte de colonias BL21 mantenidas en placas por varios días después de la transformación. Para evitar esto en los experimentos posteriores, una vez ligados los VHHs en el vector pINQ-H6HA, se utilizó el producto de ligación para transformar células *E. coli* DH5 α electrocompetentes, de las cuales posteriormente se extrajo el ADN plasmídico. Este ADN se guardó a -20°C y se utilizó para transformar células *E. coli* BL21 electrocompetentes cada vez que se produjeron VHHs.

4.1.4 El panning contra AgB nativo permitió aislar cinco clones diferentes

Hasta ahora, todos los ensayos desarrollados han revelado la cantidad de VHHs que resultaron reactivos contra el AgB, sin embargo esos valores no son reflejo de la diversidad contenida. Para dejar en evidencia la misma, se debe secuenciar cada VHH de manera individual y comprar la secuencia de los CDRs. De los 9 clones contenidos en el vector pINQ-H6HA que presentaron reconocimiento por el AgB (independientemente de la subunidad que reconocieron) se obtuvieron 5 secuencias distintas, **Figura 4.6**. Los clones VHH-AgB2, VHH-AgB4, VHH-AgB6 y VHH-AgB9, que no reaccionaron con la subunidad B1, exhibieron la misma secuencia, mientras que del clon VHH-AgB5 no se obtuvo una secuencia definida.

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
01-	SLRLSCAAS	GVVFFSGAG	MGWFROPKGEREFVAA	ISGGGVST	AYRESVKGRFTISRDPGKNTVSLQMNSLKPEDTAVYYC	AARLRSRVVSRAFGDFDS	WGQGTQVTVSSGQA
02-S	.RLD.LYA	V.....A.S...P...	..PG.S.V	L.MS.....A...NA...Y.....F.....	..VG..SPY.SEYEE--(4)
03-L	.NI.....L	..Y..A...Q..L..L	VRSGDNT-	K.AD.....NA...D.....	NFGGTWYWG DY-----(1)
07-S	ERT..TYNA.....S..L	L.WN.G..	Y.SD.....AA...Y.....	..AY..WSYNDYAYDY-(1)
10-TII..RNW	..Y..A...Q..L..T	..I..NT-	D..D.....NA...Y.....	NVGRHISYTIITYYSPS.D(1)

Figura 4.6. Secuencia aminoacídica de clones reactivos contra el AgB contenidos en el vector pINQ-H6HA. Se muestra la secuencia de aminoácidos de los diferentes clones obtenidos: VHH-AgB1, VHH-AgB2, VHH-AgB3, VHH-AgB7 y VHH-AgB10. Se denomina como punto (.) a los mismos aminoácidos que se especifican para el primer clon, guion (-) la ausencia de aminoácidos. Al final de cada secuencia se especifica la frecuencia con la cual se observó. Las secuencias del FR1 y FR4 se muestran parcialmente, no teniendo mayor relevancia ya que se presentan constantes y los cambios en estas zonas no representan variaciones significativas a nivel de reconocimiento por parte del VHH.

4.1.5 Destaca el clon VHH-AgB1 en la expresión a pequeña escala frente al resto de clones candidatos

Tres de los cinco clones que se muestran en la **Figura 4.6** fueron seleccionados según reaccionaran con la subunidad B1, ya que al ser la más abundante podría facilitar la interacción durante la purificación, y no presentarían residuos de lisinas en sus CDRs para evitar la modificación de las mismas durante su inmovilización a la columna. Con estos clones se realizaron ensayos preliminares de expresión. Para cada clon el ensayo se llevó a cabo a partir de un cultivo de células electrocompetentes *E. coli* BL21 recientemente transformadas con el vector pINQ-H6HA. Típicamente, en la etapa inicial del cultivo se utiliza glucosa para reprimir la expresión del VHH, sin embargo, a fin de estudiar si la misma es consumida totalmente durante el período que transcurre previo a la inducción, se analizó la expresión de los VHHs en cultivos que se desarrollaron en presencia de glucosa (la glucosa que se adicionó inicialmente no es eliminada) y en ausencia de glucosa post-inducción (eliminada por centrifugación). Finalizado el período de incubación, se obtuvo de cada cultivo la fracción soluble e insoluble, las cuales se analizaron por SDS-PAGE, **Figura 4.7**. Los tres clones dejaron en evidencia que el consumo de la glucosa no es total, de modo que se encuentra presente durante el período post-inducción afectando notoriamente la expresión de los VHHs, los cuales se manifiestan como una banda de aproximadamente 20 kDa. En general, la presencia de VHHs en la fracción insoluble tiende a ser mayor, aunque para algunos clones no se observó esta diferencia. Finalmente el clon VHH-AgB1 fue el escogido dado que dio lugar a la mayor expresión de VHH soluble.

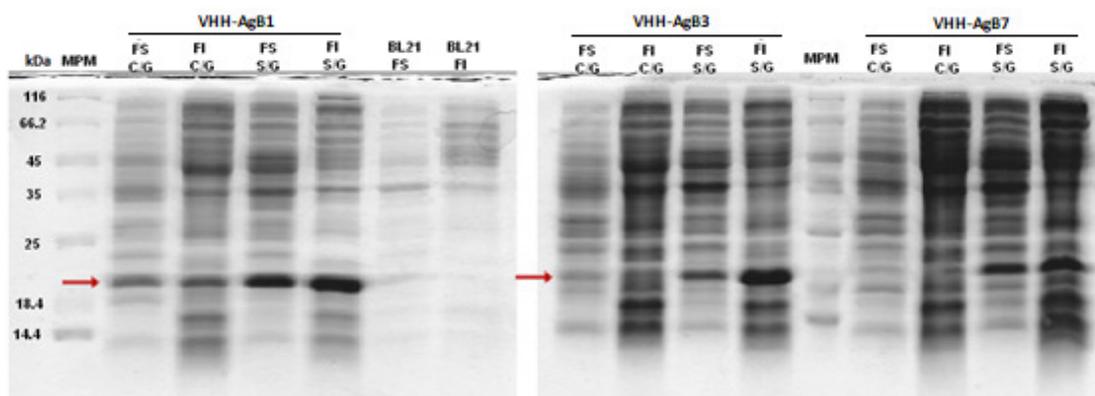


Figura 4.7. SDS-PAGE de la expresión de los clones VHH-AgB1, VHH-AgB3, y VHH-AgB7 en presencia y ausencia de glucosa post-inducción. Gel de poliacrilamida 15% en condiciones reductoras y desnaturizantes, teñido con azul de Coomassie. Se denomina FS: fracción soluble; FI: fracción insoluble; C/G: en presencia de glucosa; S/G: en ausencia de glucosa; MPM: Marcador de peso molecular (ThermoFisher). Se señala con flecha roja la banda correspondiente al VHH.

4.1.6 La expresión a gran escala y purificación del clon VHH-AgB1 rindió un VHH en cantidad y pureza satisfactoria

La expresión a gran escala del clon VHH-AgB1 se llevó a cabo en 500 mL de medio de manera similar a la ya detallada a pequeña escala, con la salvedad de que se realizó desde un principio en ausencia de glucosa. La purificación se llevó a cabo por columna de Ni-NTA en el equipo AKTA *purification system* (GE Healthcare) aplicando concentraciones creciente de imidazol y se monitoreó mediante medidas de absorbancia a 280nm (A280) arrojadas por el equipo en tiempo real, lo que se traduce en el cromatograma que se observa en la **Figura 4.8**. Se obtuvo un único pico que se recogió en una sola fracción.

Como se observa en la **Figura 4.9** la alta expresión del VHH en forma soluble se reprodujo en el cultivo a gran escala. La retención del VHH en la columna fue cuantitativa, dado que no se evidencian cantidades visibles en la fracción no unida (FNU). En cuanto a la pureza, si bien se observa la presencia de ciertas proteínas contaminantes, las mismas se encuentran en una proporción significativamente menor frente al VHH. Luego de dializar la fracción del VHH contra el buffer de conjugación, se determinó el contenido proteico por A280 utilizando el equipo NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoFisher), siendo el saldo final de 4 mg de VHH-AgB1 obtenidos de 500 mL de cultivo.

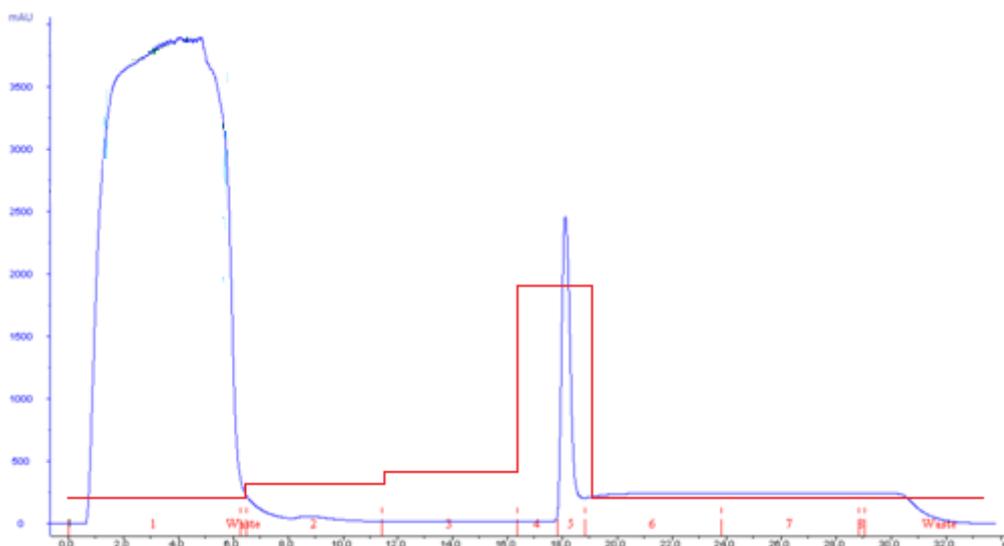


Figura 4.8. Cromatograma de la purificación por IMAC del clon VHH-AgB1. Se muestra la fluctuación de los valores de A280 (azul) y las diferentes concentraciones de imidazol aplicadas (rojo). El pico de elución se observa entre los 18 y 19 mL de volumen eluido correspondiente a la máxima concentración de imidazol (500 mM).

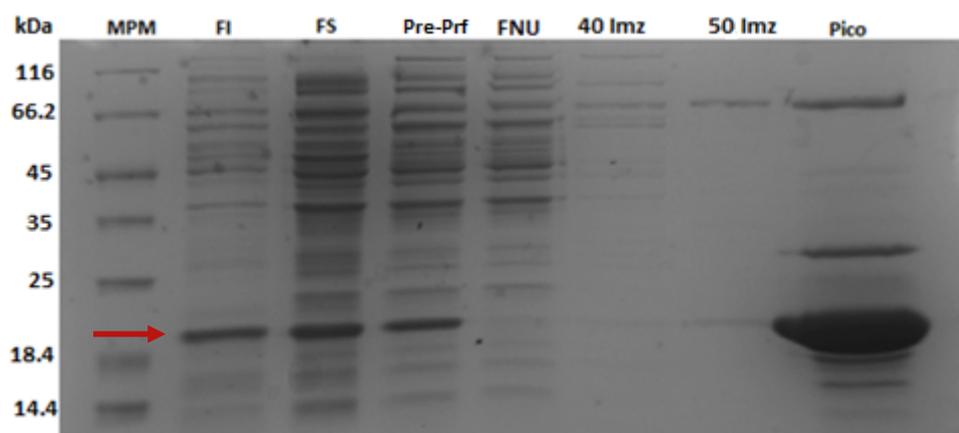


Figura 4.9. SDS-PAGE del proceso de purificación del clon VHH-AgB1 mediante IMAC. Gel de poliacrilamida 15% en condiciones reductoras y desnaturalizantes, teñido con azul de Comassie. Se denomina MPM: marcador de peso molecular (Thermofisher); FI: fracción insoluble del cultivo; FS: fracción soluble del cultivo; Pre-Prf: fracción soluble a purificar; FNU: fracción no retenida en la columna; 40 Imz: fracción eluida tras la aplicación de 40 mM de imidazol; 50 Imz: fracción eluida tras la aplicación de 50 mM de imidazol; Pico: fracción eluida durante la aplicación de 500 mM de imidazol. Se señala con flecha roja la banda correspondiente al VHH.

4.1.7 La conjugación del clon VHH-AgB1 se realizó con alta eficiencia

Procediendo a lo que es el armado de una columna que permita la purificación del AgB desde líquido hidático por cromatografía de inmutofinidad, 1 mg del VHH-AgB1 preparado como se comentó anteriormente, se conjugó químicamente a 500 μL de Cyanogen Bromide Activated Agarose, obteniéndose así lo que se denominó columna “conjugada”. Mediante medidas de A280 de la solución a conjugar (2.8 mg/mL) y de la fracción recogida post-conjugación (0.3 mg/mL), y teniendo en cuenta la relación de volúmenes y el coeficiente de extinción molecular del VHH-AgB1 ($1.3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), se comprobó que el 90% del VHH resultó conjugado a la columna. Si bien, según los cálculos realizados a partir de los datos ofrecidos por el fabricante en cuanto a la cantidad de proteína que se puede conjugar a la columna se determinó que es posible agregar 20 veces más de VHH para saturar 500 μL de gel, 0.9 mg de VHH conjugado permitiría, en teoría, la obtención de una cantidad de AgB considerable. A modo de determinar un valor de referencia para la evaluación de la capacidad de purificación de la columna, se trabajó bajo la hipótesis en la cual se considera que la unión entre VHH y AgB sucede 1:1, entonces, según la relación entre los pesos de ambas moléculas (PM_{AgB} : 200 kDa; PM_{VHH} : 16 kDa), se obtendría como máximo 12.6 mg de AgB purificado.

4.1.8 Columna “conjugada” y AgB: fácil obtención y buen nivel de pureza, aunque con bajo rendimiento.

A modo de comprobar la eficiencia de purificación de la columna “conjugada”, se aplicaron 20 mL de líquido hidático bovino a la columna y se recogieron las fracciones no retenidas a intervalos de 1 mL. Posteriormente se procedió al lavado de la columna y a la elución del AgB usando buffer glicina pH 2.2. Tal como se muestra en la **Figura 4.10**, la presencia del AgB en el líquido hidático se evidencia principalmente por una banda a 8 kDa. La retención del antígeno es evidente en las primeras fracciones, sin embargo la banda de 8 kDa comienza a ser visible a los 12 mL y va aumentando gradualmente hasta los 16 mL de volumen aplicado, por lo que se asume que la columna está alcanzando las condiciones de saturación, hecho que se confirma mediante su visualización por Western blot. En cuanto a las fracciones eluidas, se observa como, si bien se logró despojar al AgB del grueso de proteínas presentes en el líquido hidático, prevalece en un bajo porcentaje la presencia de proteínas que por su patrón de migración se presume se trata de la albúmina (65 kDa) y la cadena pesada y liviana de inmunoglobulinas (55 y 25 kDa, respectivamente), proteínas del hospedador que se encuentran en abundancia en el líquido hidático. A modo de intentar mejorar la purificación se repitió el proceso realizando modificaciones a nivel de la etapa de lavados (se adicionó una serie de lavados con NaCl 0.5 mM en PBS con el objetivo de eliminar interacciones inespecíficas de carácter iónico), sin embargo no resultó en cambios significativos (no se muestran resultados). Por otro lado, si se compara el nivel de pureza del AgB que se obtuvo mediante esta columna con la que exhibe el AgB purificado por el método actualmente utilizado (**Figura 1.9**) se observa cierta similitud, aunque existe una tendencia a una mayor pureza a través del método establecido, el cual cabe destacar requiere varios y distintos pasos de purificación, lo que implica un arduo trabajo.

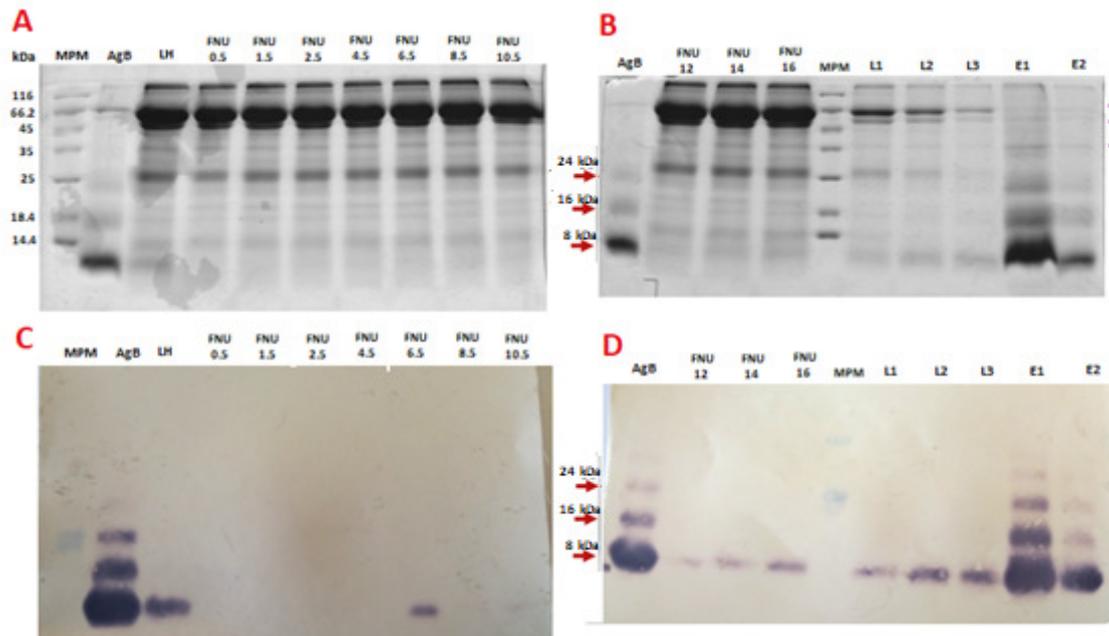


Figura 4.10. SDS-PAGE y Western blot de la purificación de AgB a partir de líquido hidático mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando el VHH-AgB1. En las Figuras 4.10A y 4.10B se muestra la purificación de AgB en gel de poliacrilamida 15% en condiciones reductoras y desnaturizantes teñido con azul de Coomassie. En las Figuras 4.10C y 4.10D se muestra el mismo proceso de purificación de AgB evaluado por Westernblot, revelado con medio de hibridoma de ratón conteniendo el anticuerpo monoclonal anti-AgB mAb-EB7 (anticuerpo primario) y anticuerpo anti-ratón-PO (anticuerpo secundario). Se denomina MPM: marcador de peso molecular (Figura A y B: Marcador de proteínas no teñido, ThermoFisher; Figura C y D: Marcador de proteínas pre-teñido, ThermoFisher), AgB: AgB purificado por método establecido en el laboratorio de Inmunología; LH: líquido hidático; FNU 0.5-16: fracción no retenida en la columna, el valor específica el total de mL de líquido hidático aplicados a la columna; L 1-3: número de lavados; E 1-2: número de eluidos. Se señala: con flecha roja las bandas correspondientes a los diferentes oligómeros que conforman el AgB; con cabezas de flecha las bandas correspondientes a albúmina (65 kDa), cadena pesada de IgG (55 kDa) y cadena liviana de IgG (25 kDa). En la fracción correspondiente a 6.5 mL del Western blot se observa una banda de 8 kDa que solamente puede ser explicada como una contaminación.

La eficiencia de la columna se determinó midiendo la A280 de las fracciones eluidas. Según este parámetro se obtuvieron 380 μg de AgB por mL de resina, y dado que sólo el 50% de la partícula de AgB es de naturaleza proteica (única parte del antígeno que absorbe a 280nm), este valor correspondería a 760 μg del antígeno. Considerando la cantidad de VHH inmovilizado, los pesos moleculares de las moléculas involucradas y asumiendo una relación de interacción VHH-AgB de 1:1, debería lograrse la purificación de 12.6 mg de AgB, sin embargo, el valor eluido de la columna (0.76 mg) es solamente un 6%. Sin embargo, aún a pesar de este bajo rendimiento, la columna en un único paso permitiría alcanzar rendimientos similares a los obtenidos a través del método en uso en laboratorio, y con pureza similar, características a destacar ya que esta herramienta permite la purificación de AgB de una manera muy práctica.

El bajo rendimiento de la columna puede deberse a varias causas: no todas las interacciones serán 1:1, puede ocurrir cierta desnaturización del VHH al inmovilizarlo, o más probablemente, a pesar de que no hay lisinas en los CDRs, dado el pequeño tamaño del VHH, la inmovilización a través de lisinas cercanas puede interferir en la interacción con el antígeno, **Figura 4.11**. Como alternativa, se propuso diseñar una columna en la cual

el VHH se encuentre bien orientado, lo que se presume permitirá maximizar la purificación de AgB.

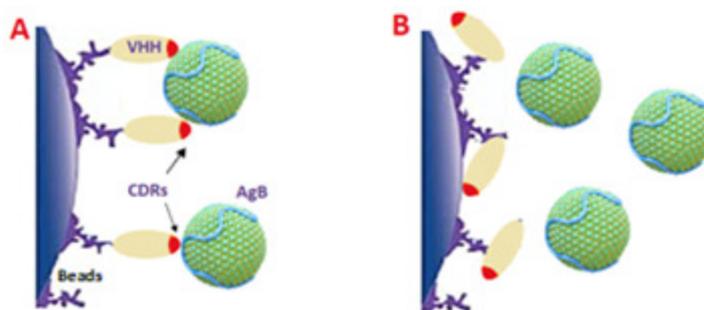


Figura 4.11. Esquema representativo sobre la posible disposición del VHH-AgB1 conjugado a la columna y su consecuente efecto en la interacción con el AgB. Figura 4.10A: se observa la interacción entre el VHH y el AgB en una relación diferente de 1:1. **Figura 4.10B:** el VHH se presenta en una orientación tal que imposibilita la interacción con el AgB, consecuencia de la conjugación.

4.1.9 Columna “capturada”, una alternativa para la purificación de AgB

Se construyó una columna de agarosa-estreptavidina en la cual se capturó el mismo clon VHH-AgB1 pero que se produjo con un péptido C-terminal, que resulta biotinilado en forma sitio específica in vivo. De esta forma el VHH resulta unido a la columna a través de su extremo C-terminal, y la región N-terminal de unión al antígeno queda orientada hacia el solvente. Se llamó a esta columna: “capturada”.

4.1.9.1: El clon VHH-AgB1 en su versión biotinilada repite buenos rendimientos y pureza tras su expresión a gran escala.

La producción del VHH-AgB1 biotinilado se realizó de manera similar a la ya descrita, pero partiendo de bacterias electrocompetentes *E. coli* BL21-pCY216 recientemente transformadas con el vector pINQ-BtH6 conteniendo la secuencia del clon VHH-AgB1 en 1 L de medio. Este vector contiene, además de la etiqueta 6His, una secuencia asociada al extremo C-terminal del VHH a la cual la enzima biotina-ligasa BirA (codificada por el plásmido pCY216) une covalentemente una molécula de biotina. En cuanto a la purificación, la misma se desarrolló de manera idéntica a la realizada para el clon en su versión no biotinilada, mediante la utilización del equipo AKTA *purification system* (GE Healthcare) en columna de Ni-NTA. Nuevamente se obtuvo un único pico recogido en una sola fracción, que tras dializarlo contra PBS rindió 11 mg del VHH-AgB1 presuntamente biotinilado purificado a partir de 1 L de cultivo.

4.1.9.2 Se logró la construcción de la columna “capturada” adecuadamente

La construcción de la columna “capturada” se realizó mediante sucesivas incubaciones de la solución de VHH-AgB1 biotinilado en PBS con 50 μ L de la resina High Capacity streptavidin-agarose hasta que se constató la saturación de la misma. Se estimó que la cantidad retenida de VHH fue 640 μ g de VHH/50 μ L. A los efectos de verificar la estabilidad de la unión del VHH biotinilado a la columna, se le aplicaron distintas soluciones tanto de lavado como de elución: PBS-Tween, PBS-0.5 M NaCl, PBS, y buffer glicina pH 2.2 y 3.0. El material eluido con cada uno de estas soluciones se muestra en la **Figura 4.12**. Únicamente se constató la elución de proteínas contaminantes tras la

aplicación de la solución de NaCl 0.5 M en PBS, (retenidas por interacción de carácter iónico) por lo cual este sería un adecuado buffer para incluir en el lavado de la columna. Por otro lado, de los dos pH utilizados para la elución, el más bajo no podría usarse dado que se produce una importante liberación del VHH que contaminaría el AgB. En ambos pH se observa cantidades relativamente significativas del monómero de estreptavidina, que también contaminarían el antígeno, a pesar de esto, el buffer de pH 3.0 se utilizó para la elución.

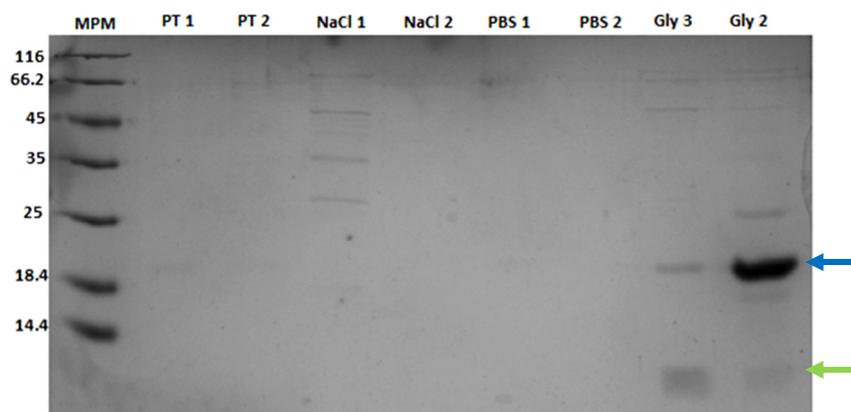


Figura 4.12. SDS-PAGE del proceso de lavado de la columna y prueba de nuevas condiciones de elución. Gel de poliacrilamida 15% en condiciones reductoras y desnaturalizantes teñido con azul de Comassie. Se denomina MPM: marcador de peso molecular (ThermoFisher); PT 1-2: lavado n° 1 y 2 con solución de PBS-Tween 0.05%; NaCl 1-2: lavado n° 1 y 2 con solución de NaCl 0.5 M en PBS; PBS 1-2: lavado n° 1 y 2 con solución de PBS; Gly 3: elución con solución de glicina 0.1 M, pH 3.0; Gly 2: elución con solución de glicina 0.1 M, pH 2.2. Se señala: con flecha azul la banda correspondiente al VHH-AgB1; con flecha verde la banda correspondiente a monómeros de estreptavidina.

4.1.10 La columna “capturada” no resulta una buena alternativa para la purificación de AgB

A modo de asegurar las condiciones de saturación de la columna respecto a AgB, se aplicó un total de 72 mL de líquido hidático (que por los datos del experimento descrito en la sección 3.1.8 se estimó tenía una concentración de AgB de 10 µg/mL) y se recogieron las fracciones no unidas correspondientes a los 8, 16, 24 y 72 mL aplicados. Luego del lavado de la columna con las diferentes soluciones, se llevó a cabo la elución en cuatro rondas consecutivas. En primer lugar se realizaron dos rondas con 200 µL de buffer glicina pH 3.0, sin embargo, como no se sabía si la acidez de esta solución podría afectar la unión entre el VHH y el AgB, se realizaron dos rondas adicionales de elución con 200 µL de buffer glicina pH 2.0, y se visualizaron las diferentes fracciones recogidas por SDS-PAGE, **Figura 4.13**. A pesar de que el resultado no es claro, parecería que en la fracción correspondiente a los 8 mL se observa una menor intensidad en la banda correspondiente al antígeno, y no así en las subsiguientes fracciones, sugiriendo entonces que se alcanzó la saturación. En cuanto a la purificación, a pesar de que el AgB parece libre de proteínas del líquido hidático, lamentablemente la contaminación con el VHH es muy importante y por tanto esto inhabilita a esta columna como método de purificación.

Llevando los resultados observados a valores numéricos, el contenido proteico de las dos primeras rondas de elución con glicina pH 3.0 (donde aparece la mayoría del AgB eluido) estimadas por A280 fueron: 68 µg y 22 µg. Asumiendo que solo la mitad del

contenido proteico corresponde al AgB (el resto sería VHH y monómero de estreptavidina), el rendimiento de la columna sería de 900 µg de AgB/mL de resina, y normalizando este valor según la cantidad de masa total del antígeno se obtiene un rendimiento de 1.8 mg AgB/mL de resina. Pese a que el rendimiento fue mucho más bajo del esperado, el mismo figura 2.4 veces mayor que el rendimiento de la columna “conjugada”. Sin embargo, pierde su valor por el hecho de que no se pueda evitar la co-elución del VHH junto con el AgB.

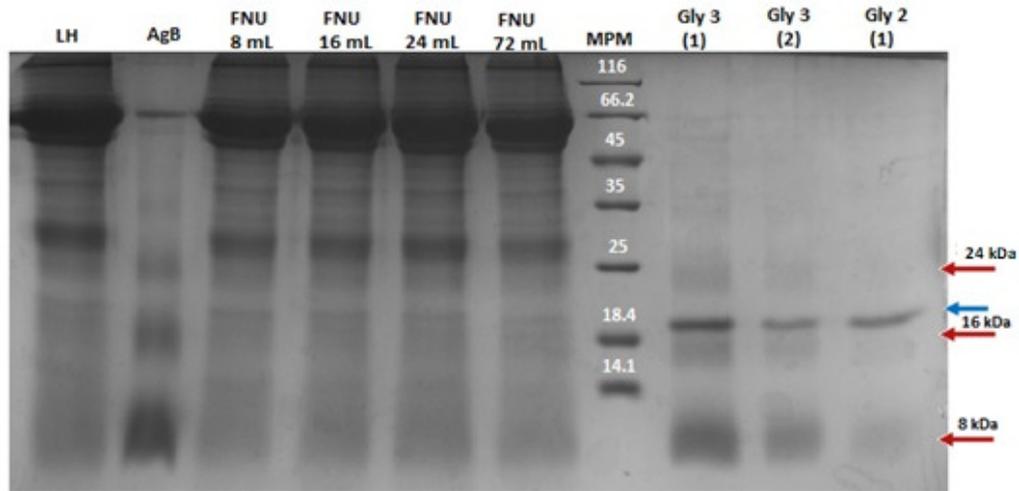


Figura 4.13. SDS-PAGE del proceso de purificación de AgB a partir de líquido hidático mediante cromatografía de afinidad utilizando el VHH-AgB1 biotinilado y resina de agarosa-estreptavidina. Gel de poliacrilamida 15% en condiciones reductoras y desnaturalizantes teñido con azul de Coomassie. Se denomina MPM: marcador de peso molecular (ThermoFisher); AgB: AgB purificado por método establecido en el laboratorio; LH: líquido hidático; FNU 8-72 mL: fracción no retenida en la columna, el valor especifica el total de mL de líquido hidático aplicados a la columna; Gly3(1): primera fracción eluida tras la aplicación de la solución de glicina 0.1 M pH 3.0; Gly3(2): segunda fracción eluida tras la aplicación de la solución de glicina 0.1 M pH 3.0; Gly2(1): primera fracción eluida tras la aplicación de la solución de glicina 0.1 M pH 2.2. Se señala: con flecha roja las bandas correspondientes a los diferentes oligómeros que conforman el AgB; con flecha azul la banda correspondiente al VHH-AgB1.

4.2. Obtención de nanobodies específicos contra ROR1 funcionales en citometría de flujo

4.2.1 El título de anticuerpos totales refleja una buena respuesta contra ROR1 por parte de la llama inmunizada

Al igual que para el antígeno AgB, se realizó la titulación de anticuerpos totales reactivos contra ROR1 presentes en el suero de la llama inmunizada mediante ensayo de ELISA. La **Figura 4.14**, permite ver como a medida que aumenta el número de inmunizaciones con el antígeno, la cantidad de anticuerpos reactivos contra éste es mayor. El título de anticuerpos presenta un valor de 2.7×10^1 UA/mL previo a la inmunización, mientras que luego de la primera (priming) y segunda inmunización (booster) el título aumentó, pasando a ser 8.3×10^2 UA/mL y 4.4×10^3 UA/mL, respectivamente. La buena respuesta constatada contra el antígeno dio lugar a la generación de la biblioteca de VHHs en fagos filamentosos.

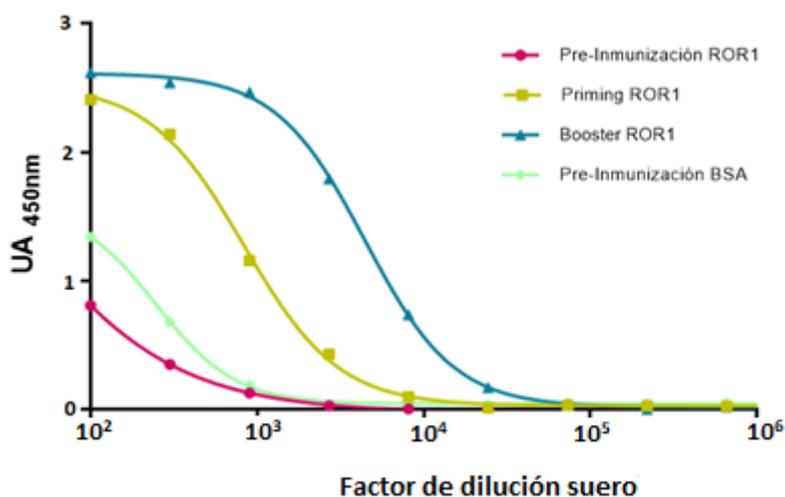


Figura 4.14. Titulación de anticuerpos totales reactivos contra ROR1 en suero de llama inmunizada. Se observa el efecto de dilución del suero de llama correspondiente a la pre-inmunización (rosado), priming (amarillo) y booster (celeste), para anticuerpos anti-ROR1, y anticuerpos anti-BSA (proteína de bloqueo) correspondiente a la pre-inmunización (verde), cuando se lo enfrentó a una concentración fija del antígeno ROR1 sensibilizado directamente en placa. Se reveló la presencia de anticuerpos totales mediante la utilización de anticuerpo anti-llama en ratón, y anticuerpo anti-ratón conjugado a PO hecho en conejo. Se define como título al inverso del \log_{10} del factor de dilución al cual la absorbancia máxima de saturación decae a la mitad de su valor.

4.2.2 El antígeno recombinante ROR1 es reconocido por dos anticuerpos comerciales utilizados como referencia

Como se comentó anteriormente, la construcción del antígeno ROR1 fue realizada en células HEK-293T y comprende únicamente al ectodominio, tal como se observa en la **Figura 3.1**, a diferencia del antígeno con el que se inmunizó que presenta fusionada la región Fc de IgG1 humana y el sitio de reconocimiento para la 3C proteasa. Antes de llevar a cabo la selección de los VHHs específicos contra ROR1, se verificó la reactividad del antígeno utilizado en el *panning* mediante un ensayo ELISA al enfrentarlo a distintos anticuerpos anti-ROR1 comerciales que son utilizados en citometría de flujo. El reconocimiento del antígeno recombinante por parte de estos anticuerpos permite

comprobar la presencia de epítopes nativos, indicio de que la construcción realizada reproduce a buen nivel la estructura nativa de ROR1. Los dos anticuerpos anti-ROR1 (2A2 y 4A5) se enfrentaron a pocillos sensibilizados con 0.2 μg de avidina y 0.4 μg de ROR1-bt, utilizando la misma dilución sugerida por los fabricantes para citometría, y se reveló la interacción entre los mismos mediante un anticuerpo anti-ratón-PO, **Figura 4.15**. Los mismos epítopes que son reconocidos por los anticuerpos anti-ROR1 comerciales en el antígeno nativo (ROR1 expresado en la célula), se presentan también en el antígeno recombinante (ROR1-bt), confirmando a ROR1-bt como una buena opción para la selección de VHH anti-ROR1.

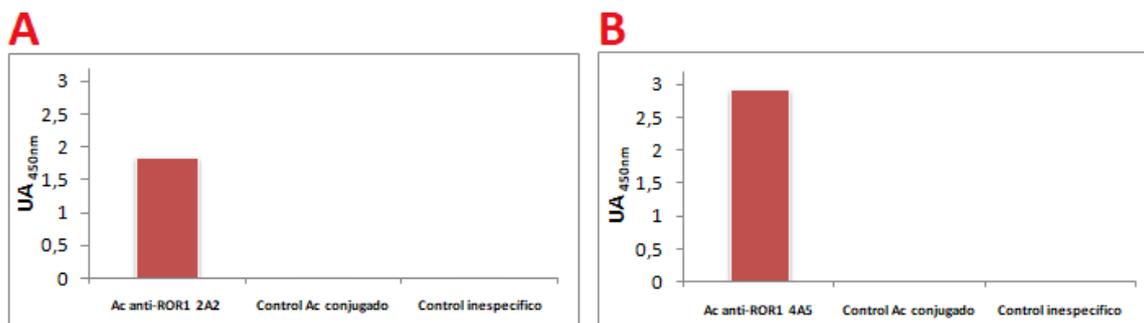


Figura 4.15. Evaluación de la construcción recombinante del antígeno ROR1 mediante ensayo ELISA. Figura 4.15A: se observa la reactividad del anticuerpo 2A2 anti-ROR1 a ROR1-bt en pocillos pre-adsorbidos con avidina. Se reveló con el anticuerpo anti-ratón-PO. **Figura 4.15B:** se observa la reactividad del anticuerpo 4A5 anti-ROR1 a ROR1-bt en pocillos pre-adsorbidos con avidina. Se reveló con el anticuerpo anti-ratón-PO. Los ensayos fueron realizados de manera independiente, y en ambos casos se realizaron los controles pertinentes.

4.2.3 Línea celular A549 expresa cantidades significativas de ROR1 y puede ser utilizada para la identificación de clones VHH específicos.

Se escogió la línea celular A549 (amablemente cedida por la Dra. Analía Rial perteneciente al Departamento de Desarrollo Biotecnológico de Facultad de Medicina) para el desarrollo de los ensayos de citometría. Se trata de una línea celular de origen epitelial humano proveniente de carcinoma de pulmón, para la cual, como se observa en la **Figura 4.16**, se ha reportado la expresión del receptor de superficie celular ROR1[81].

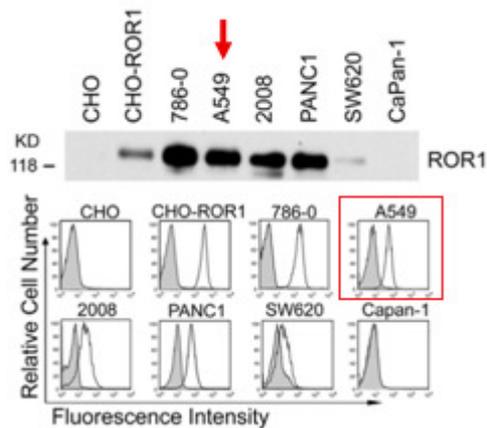


Figura 4.16. Varias líneas celulares cancerosas humanas expresan ROR1 en su superficie. En el panel superior se observan inmunoblots de inmunoprecipitados proveniente de lisados de varias líneas celulares (como se indica arriba de cada banda). La inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo monoclonal 4A5 (anticuerpo anti-ROR1) y se reveló con el anticuerpo anti-péptido de ROR1 conjugado. Se transfectaron células de ovario de hámster chino (CHO) para la expresión de ROR1 (CHO-ROR1) utilizado como control positivo. En el panel inferior se observan histogramas donde se representa la fluorescencia de las líneas celulares CHO, CHO-ROR1, y líneas celulares cancerosas humanas (786-0, A549, 2008, PANC1, SW620, CaPan-1) cuando se tiñen con el anticuerpo monoclonal anti-ROR1 4A5 conjugado a un fluorocromo (gráfico blanco) o al control isotópico, un anticuerpo monoclonal IgG2b conjugado al mismo fluorocromo (gráfico gris). Se resaltan los resultados referentes a la línea celular de interés A549. (Imagen adaptada de Zhang S. et.al.; 2012).

Luego de optimizar las condiciones para la citometría, se verificó la expresión de ROR1 en la superficie de la línea celular A549 usando el anticuerpo comercial anti-ROR1 4A5 y revelando con el anticuerpo anti-ratón-Alexa488, **Figura 4.17A**. El anticuerpo anti-ROR1 4A5 fue seleccionado para los ensayos de citometría dado que arrojó un mayor corrimiento de la señal en comparación a la que proporcionó el anticuerpo anti-ROR1 2A2 (no se muestra resultado). Por otra parte, se analizó la reactividad del anticuerpo anti-HA-PE (anticuerpo con el que se revelará el reconocimiento por parte de los VHHs) y como ésta se ve afectada en presencia y ausencia de suero de conejo, determinando así su esencialidad, **Figura 4.17B**. No se constató interacción por parte del anticuerpo anti-HA con las células en presencia o ausencia de suero, determinándose así las condiciones para ensayar los VHHs.

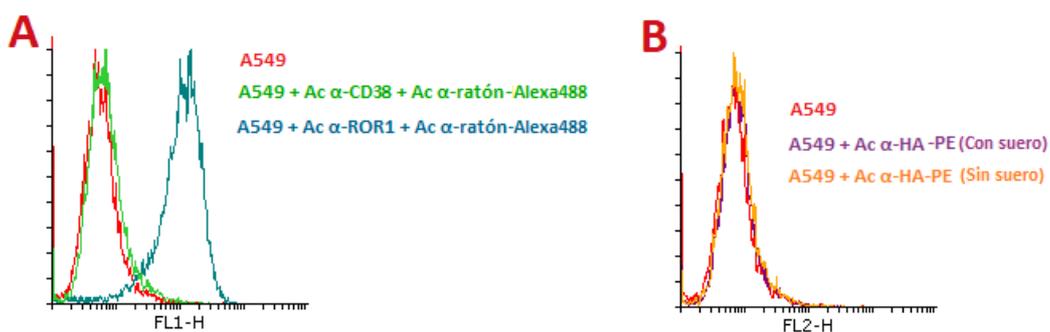


Figura 4.17. Histogramas resultantes de la incubación de las células A549 con los diferentes anticuerpos. **Figura 4.17A:** Se observa la autofluorescencia de las células A549 en el canal FL1-H (rojo), la interacción del anticuerpo anti-ROR1 (azul), y de su control isotópico IgG2b anti-CD38 (verde), ambos anticuerpos revelados con el anticuerpo anti-ratón-Alexa488. Todas las incubaciones se realizaron en presencia de suero de conejo. **Figura 4.17B:** Se observa la autofluorescencia de las células A549 en el canal FL2-H (rojo) y la interacción entre las células y el anticuerpo anti-HA-PE en presencia (violeta) y ausencia (naranja) de suero de conejo.

4.2.4 La selección de nanobodies específicos contra ROR1 resultó en un 80% de clones positivos en ELISA

La selección de los clones se efectuó a partir de la biblioteca 106. La primera ronda se realizó incubando 5×10^{11} fagémidos/pocillo que habían sido previamente pre-adsorbidos en pocillos cubiertos con avidina y BSA, en placas de ELISA sensibilizadas con 0.5 μg /pocillo de avidina y posteriormente incubados con 1 μg de ROR1-bt. Tras sucesivos lavado, los fagos retenidos se eluyeron con tripsina, obteniéndose el *primer output*. Esta fracción presentó un título de 4×10^5 ufc/mL. Luego de su amplificación, la población de fagos enriquecida se sometió a una segunda ronda de selección a partir de la cual se obtuvo el *segundo output*, el cual presentó un título de 1.4×10^5 ufc/mL. Al igual que como ocurrió en el *panning* contra AgB, el título del *primer y segundo output* se mantuvo en el mismo orden. Se analizó la reactividad de 10 clones seleccionados al azar a partir del *segundo output* contra ROR1 por ELISA. Como se muestra en la **Figura 4.18**, 8 de los clones seleccionados al azar presentaron muy buena reactividad contra ROR1-bt, mientras que ninguno de ellos reaccionó contra los controles realizados.

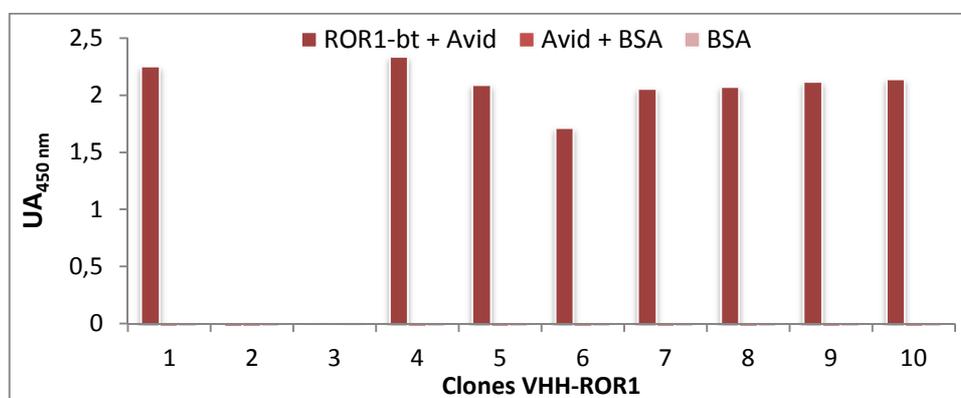


Figura 4.18. Reactividad contra ROR1 de 10 clones seleccionados al azar a partir del *output* de la segunda ronda de *panning*. Se muestra la reactividad de los diferentes clones seleccionados frente a ROR1-bt, avidina y BSA simultáneamente.

4.2.5 El *panning* contra ROR1 permitió aislar cuatro clones diferentes, uno de ellos dominante

Los sobrenadante de estos clones se analizaron también por citometría utilizando la línea células A549, arrojando resultados negativos. Dado que el número de clones ensayados fue restringido, podría ser que la frecuencia de los clones que tienen reactividad cruzada con el ROR1 expresado en la células fuese baja. Para explorar la diversidad de clones en el *segundo output* se seccionaron 14 clones contenidos en el vector pComb3X que resultaron positivos para reconocimiento de ROR1-bt en placa y se secuenciaron, **Figura 4.19**. De los 14 clones secuenciados se logró aislar únicamente 4 secuencias diferentes, siendo la correspondiente al clon VHH-ROR1.1 claramente dominante (79%). En cuanto a la identidad de las mismas, la secuencia dominante difiere ampliamente del resto, mientras que estas últimas presentan mayor similitud entre sí. En retrospectiva, solo había 2 clones diferentes en los 8 clones estudiados por citometría. Dada la baja diversidad del *output*, aun incrementando en forma considerable el número de clones, la situación no sería prometedora. Para aumentar además las chances de encontrar clones positivos, antes de analizar nuevos clones, se decidió pasar al sistema de

expresión pINQ-H6HA que permite obtener extractos con concentraciones mayores de los VHHs.

	FR1	CDR1	FR2	CDR	FR3	CDR3	FR4	
01-	SLRLSCAPS	ENIRSIAT	MGWYRQAPGIPRELVAT	ITDTSST	NYAESMKGRFTISRDKAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYC	NADKVLVLSGGYYDALYDV	WGQGTQVTVSSGQA	(14)
05-	SLRLSCAAS	RSTFSTDT	MGWYRQAPGK-RELVAT	ITAGNTR	NYADSVKGRFTISRDNKNTVHLQMNLSLKPEDTAVYYC	RLYYSGSGTIPPYDY	W-QGTQ.....	(1)
14-Q.....RSI.....L.....T.....G.....V.....
20-GR.....Q.D.....GST.H.....A.Y.....A.TNKN.....G.....

Figura 4.19. Secuencia aminoacídica de clones reactivos contra ROR1-bt contenidos en el vector pComb3X. Se muestra la secuencia de aminoácidos de los diferentes clones: VHH-ROR1.1, VHH-ROR1.5 VHH-ROR1.14 y VHH-ROR1.20. Se denomina como punto (.) a los mismos aminoácidos que se especifican para el primer clon, guion (-) la ausencia de aminoácidos. Al final de cada secuencia se especifica la frecuencia con la cual se observó. Las secuencias del FR1 y FR4 se muestran parcialmente, no teniendo mayor relevancia ya que se presentan constantes y los cambios en estas zonas no representan variaciones significativas a nivel de reconocimiento por parte del VHH.

4.2.6 La reactividad contra ROR1 se mantiene tras el clonado del output al vector pINQ-H6HA

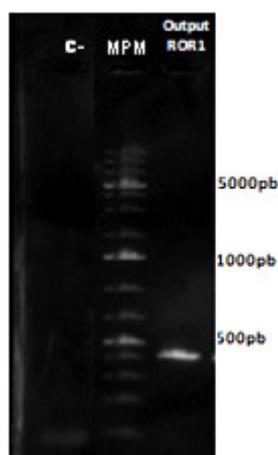


Figura 4.20. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del output seleccionado contra ROR1. Gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, con agente intercalante de ADN bromuro de etidio, visualizado bajo luz UV. Se denomina C-: control negativo; MPM: marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus ADN Ladder (ThermoFisher); Output ROR1: totalidad de VHHs seleccionados por su reconocimiento por ROR1 amplificados por PCR.

El clonado del *output* al vector de expresión pINQ-H6HA tuvo lugar de manera idéntica a la ya descrita para los clones VHH-AgB, procediendo mediante la amplificación por PCR del fragmento contenido entre los sitios SfiI en el vector pComb3X, **Figura 4.20**. El producto de PCR fue posteriormente purificado, digerido con SfiI y ligado en el vector pINQ-H6HA, con el cual se transformaron células *E. coli* DH5 α electrocompetentes. A partir de células *E. coli* BL21 recientemente transformadas con el ADN plasmídico extraído de las DH5 α , se seleccionaron colonias individuales y se analizó por ELISA la reactividad contra ROR1 de 9 clones seleccionados al azar, **Figura 4.21**. Siete de los nueve clones seleccionados resultaron positivos contra el ROR1-bt, mientras que ninguno presentó reactividad significativa contra los controles realizados.

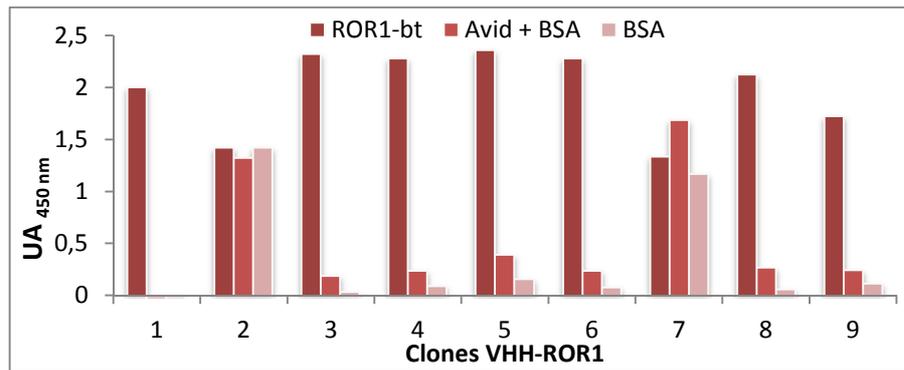


Figura 4.21. Reactividad contra ROR1-bt de 9 clones seleccionados al azar. Se muestra la reactividad de los diferentes clones seleccionados frente a ROR1, avidina y BSA simultáneamente.

4.2.7 A pesar de secuenciar 20 nuevos clones no se identificaron nuevas secuencias

Para aumentar la posibilidad de encontrar nuevas secuencias, 20 clones de VHHs seleccionados al azar y contenidos en el vector pINQ-H6HA fueron secuenciados. De estos, 19 correspondieron a la secuencia mayoritaria (nombrada como VHH-ROR1.1) encontrada anteriormente. La otra única secuencia que se obtuvo (nombrada como VHH-ROR1.16) fue la que se corresponde con el clon VHH-ROR1.20 contenido en pComb3X, **Figura 4.22**. Dado que no fue posible identificar nuevos clones, no resulta razonable seguir incrementando el número de clones a secuenciar para identificar nuevas secuencias. Por otro lado, únicamente dos de las cuatro secuencias aisladas previamente fueron identificadas, por lo que dado el interés en trabajar con extractos de clones expresados en pINQ-H6HA en citometría, se procedió al clonado individual de los clones VHH-ROR1.5 y VHH-ROR1.14 al vector pINQ-H6HA.

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
01-SLRRLSCAPS	ENIRSIAT	MGWYRQAPGIPRELVAT	ITDTSST	NYAESMKGRFTISRDKAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYC	NADKVLVYLSGGYYDALYDV	WGQGTQVTVSSGQA (19)
16-SLRRLSCAAS	RGRFSTDT	MGWYRQAPGKQRDVLVAT	ITAGGST	NHADSVKGRFTISRDNKNAVLYLQMNLSLKPEDTAVYYC	RLYYAGTNKNPPYDY	WGQGTQVTVSSGQA (1)

Figura 4.22. Secuencia aminoacídica de clones reactivos contra ROR1 seleccionados al azar, procedentes del segundo output clonado en el vector pINQ-H6HA. Se muestra la secuencia de aminoácidos de los únicos dos clones diferentes que se obtuvieron: VHH-ROR1.1 y VHH-ROR1.16 (corresponde al clon VHH-ROR1.20 contenido en pComb3X). Se denomina como punto (.) a los mismos aminoácidos que se especifican para el primer clon, guion (-) la ausencia de aminoácidos. Al final de cada secuencia se especifica la frecuencia con la cual se observó. Las secuencias del FR1 y FR4 se muestran parcialmente, no teniendo mayor relevancia ya que se presentan constantes y los cambios en estas zonas no representan variaciones significativas a nivel de reconocimiento por parte del VHH.

4.2.8 Los cuatro clones se produjeron y purificaron a gran escala.

La expresión a gran escala de los cuatro clones VHH-ROR1 se desarrolló de manera idéntica a la descrita para el clon VHH-AgB1, a partir de un cultivo en 250 mL de medio de células *E. coli* BL21 recientemente transformadas con el vector. Previo a la purificación de cada clon, la eficiencia de la producción de cada VHH en la fracción soluble se verificó mediante SDS-PAGE. La purificación se llevó a cabo por columna de Ni-NTA, en forma similar a lo realizado para el AgB. El proceso se desarrolló de forma idéntica para los cuatro clones obteniéndose un perfil de purificación similar, en el cual se observó un único pico recogido en una única fracción; se muestra únicamente el cromatograma de purificación del clon VHH-ROR1.5 a modo de ejemplo, **Figura 4.23**. En la **Figura 4.24** se

observa la presencia del VHH como una banda a la altura de 18 kDa presentándose en diferente intensidad dependiendo de la eficiencia de su producción de forma soluble. En cuanto a la pureza, se observan algunos contaminantes, que son minoritarios para los clones VHH-ROR1.5 y VHH-ROR1.14, y bastante más notorios para VHH-ROR1.1 y VHH-ROR1.16. Si bien podrían optimizarse las condiciones de elución, ya sea incluyendo etapas previas con mayor concentración de imidazol, o la utilización de gradientes, por razones prácticas continuamos trabajando con estos purificados. Las fracciones de los diferentes VHHs se dializaron en PBS, y se determinó su contenido proteico por A280 nm, **Tabla 4.1**.

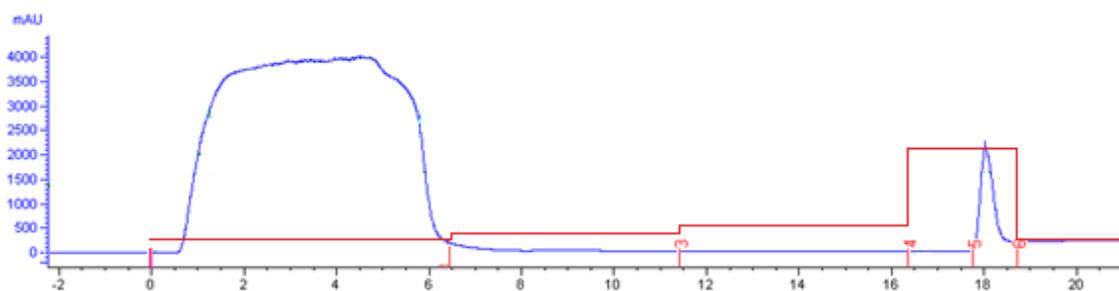


Figura 4.23. Cromatograma de la purificación por IMAC del clon VHH-ROR1.5. Se muestra la fluctuación de los valores de A280 (azul) y las concentraciones de imidazol aplicadas (rojo). El pico de elución se observa entre los 17.8 y 18.5 mL de volumen eluido correspondiente a la máxima concentración de imidazol (500 mM).

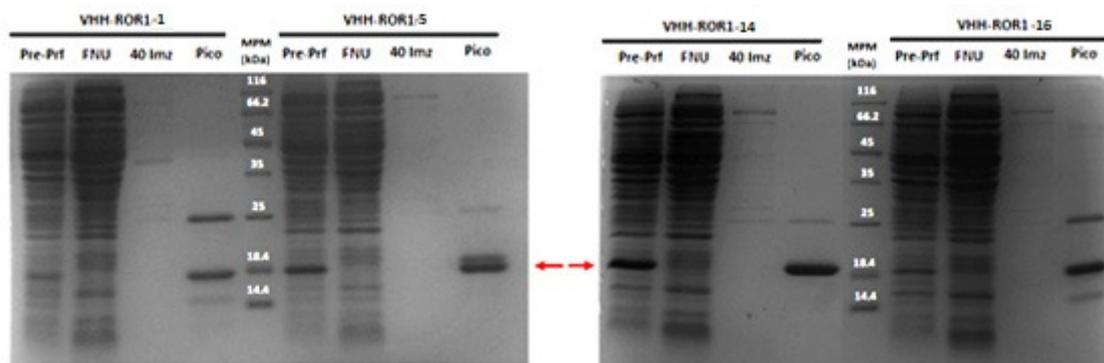


Figura 4.24. SDS-PAGE del proceso de purificación de los diferentes clones VHH-ROR1 mediante IMAC. Gel de poliacrilamida 15% en condiciones reductoras y desnaturalizantes, teñido con azul de Comassie. Se denomina MPM: marcador de peso molecular (ThermoFisher); Pre-Prf: fracción soluble a purificar; FNU: fracción no retenida en la columna; 40 Imz: fracción eluida tras la aplicación de 40 mM de imidazol; Pico: fracción eluida durante la aplicación de 500 mM de imidazol en la que se constata la presencia de un pico. Se señala con flecha roja la banda correspondiente al VHH.

Clon VHH-ROR1	Cantidad (mg)
1	0.075
5	1.8
14	1.7
16	0.18

Tabla 4.1. Valores proteicos de los diferentes eluidos. Se detallan las cantidades en mg obtenidas tras la expresión en 250 mL y purificación mediante IMAC en columna de Ni-NTA en el equipo AKTA purificationsystem (GE Healthcare). Los valores refieren al total de proteínas presentes en los eluidos.

4.2.9 Los cuatro clones anti ROR1 purificados mantienen su reactividad en ELISA pero no funcionan en citometría.

La reactividad de los cuatro VHHs purificados se verificó inicialmente por ELISA, **Figura 4.25**, resultando todos positivos.

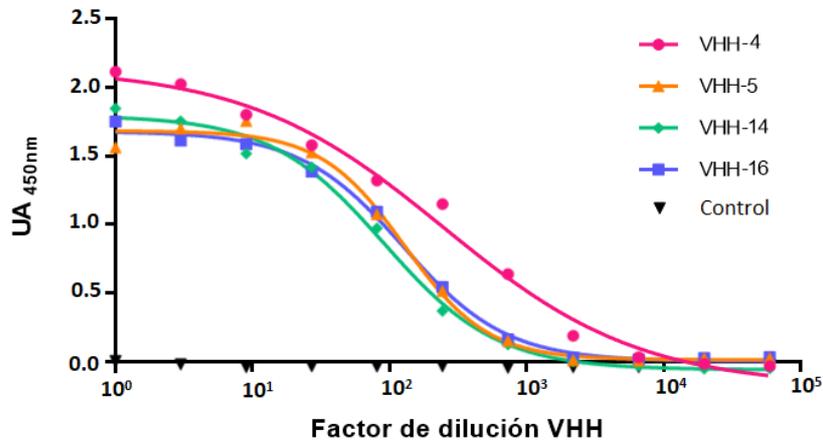


Figura 4.25. Titulación de VHHs-ROR1 purificados. Se observan los valores de absorbancia a 450 nm del VHH-ROR1.1 (rosado), VHH-ROR1.5 (naranja), VHH-ROR1.14 (verde) y VHH-ROR1.20 (azul) al enfrentar diluciones seriadas al tercio de éstos a una concentración fija de avidina-ROR1-bt en pocillo de ELISA. Se observa un promedio de la reactividad que presentaron los diferentes clones al enfrentarlos a pocillos sensibilizados con avidina y bloqueados con BSA (negro). Se comenzó con una concentración de 5 µg/mL y se reveló la presencia de los VHHs mediante el anticuerpo anti-HA-PO.

Siguiendo la experiencia previa del laboratorio con otros VHHs, la reactividad de los clones en citometría se realizó utilizando 5µg/2x10⁵ células, **Figura 4.26**. El ensayo se validó dado el reconocimiento que exhibió el anticuerpo anti-ROR1 en comparación a su control isotópico. Sin embargo, ninguno de los VHHs ensayados resultó reactivo.

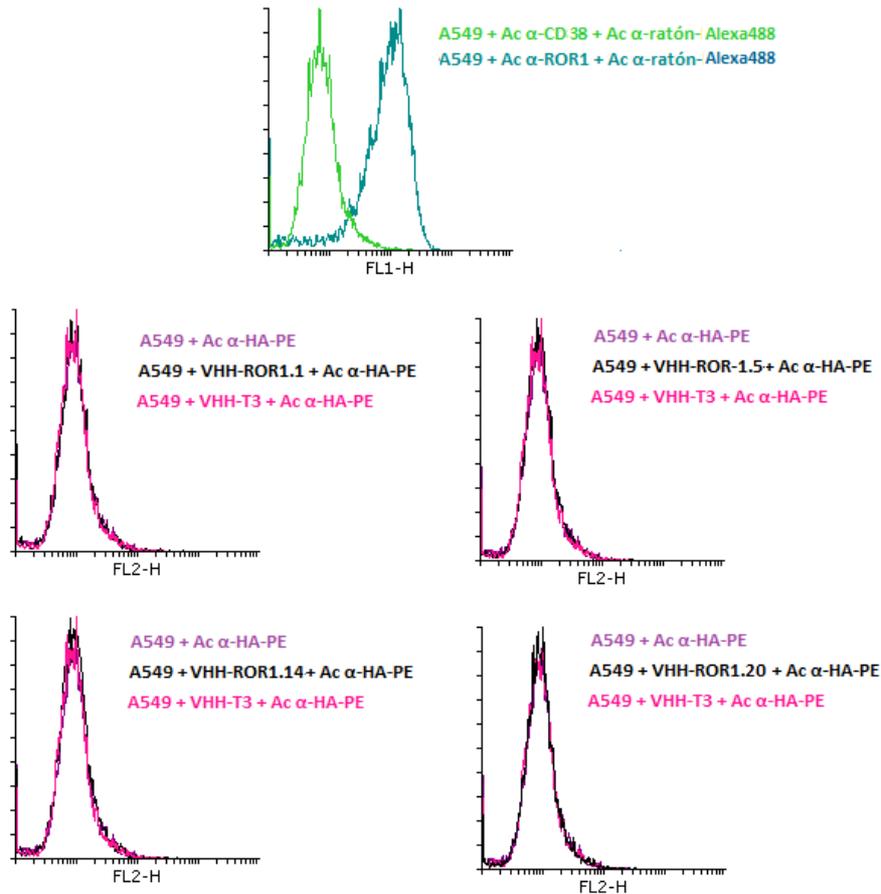


Figura 4.26. Histogramas resultantes de la incubación de las células A549 con los diferentes VHHs y sus respectivos controles. Se observa la interacción del anticuerpo anti-ROR1 (azul) y de su control isotópico IgG2b anti-CD38 (verde), ambos anticuerpos revelados mediante el reconocimiento por el anticuerpo anti-ratón-Alexa488 (**panel superior**). Se observa la interacción con las células A549 de VHH-ROR1.1 (**panel medio izquierdo**), VHH-ROR1.5 (**panel medio derecho**), VHH-ROR1.14 (**panel inferior izquierdo**) y VHH-ROR1.20 (**panel inferior derecho**). Todos los VHH-ROR1 fueron revelados con anticuerpo anti-HA-PE y su señal se muestra en negro. Se observa también la señal procedente de la interacción del VHH-T3 con las células (rosado) y la interacción inespecífica del anticuerpo anti-HA-PE (violeta).

En base a estos resultados se planeó cambiar la estrategia de *panning*, incubando la biblioteca con células y recuperando los fagos unidos a las mismas con tripsina como se describe en[80]. Cuando se realizó la primera ronda, se obtuvo un *output* muy alto, 2.3×10^7 ufc/mL. En base a esto y para evitar continuar enriqueciendo clones reactivos contra otros componentes de la célula, se realizó una segunda ronda en placa utilizando el antígeno ROR1-bt, pero la cantidad de fagos recuperada fue muy baja, 3×10^2 ufc/mL, por lo que no se continuó. Dado que se adjudican los resultados obtenidos a la alta amplificación de clones que reconocieron componentes expuestos en la superficie celular, una buena alternativa podría ser invertir las etapas de *panning*, realizando una primera en placa contra el antígeno inmovilizado seguido de una segunda etapa enfrentando los clones seleccionados a las células.

4.3 Optimización de una metodología que permita identificar diferentes clones

Dado que el gran sesgo que ocurrió durante el *panning* contra ROR1 impactó significativamente en los resultados obtenidos, resulta interesante el desarrollo de una metodología que permita constatar la diversidad contenida en los diferentes *output* de manera rápida y económica, lo cual no ocurre con la secuenciación. Dicho método permitiría elegir clones diferentes para caracterizarlos, así como también reformular la estrategia de *panning* si se constatará una pobre diversidad. Se optó por la identificación de clones a través de la digestión de su secuencia nucleotídica con diferentes enzimas de restricción. Para seleccionar las enzimas que permitieran obtener mayor información, se analizó in-sílico la digestión de diferentes clones de secuencia conocida con enzimas de restricción promiscuas, y se seleccionaron aquellas que en combinación permitían la obtención de patrones de digestión bien diferenciados. A partir de este análisis se eligieron las enzimas MvaI y HaeIII, que como se ve en el patrón de digestión teórico mostrado en la **Figura 4.27**, dan lugar a perfiles de digestión bien diferenciado para 4 VHHs seleccionados como modelo por tener secuencias distintas.

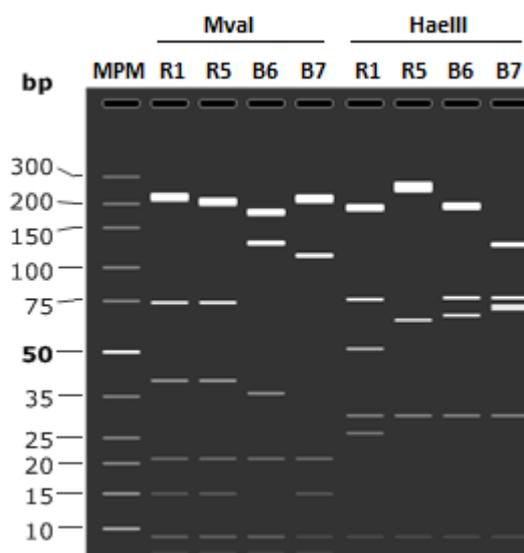


Figura 4.27. Digestión in-sílico de diferentes clones con las enzimas MvaI y HaeIII. Se observan los productos de digestión de diferentes clones con las enzimas MvaI y HaeIII en gel de agarosa 4%. Se denomina MPM: marcador de peso molecular; R: VHH-ROR1; B: VHH-AgB (en cada caso el número asociado refiere al clon específico).

Una vez determinadas las enzimas a utilizar, se llevó a cabo la digestión de los mismos clones que se analizaron in-sílico junto con algunos más. Para esto, se realizó la amplificación por PCR de las secuencias de VHHs contenidas en el vector (se realizó tanto desde vector pComb3X como desde vector pINQ-H6HA), y los productos de la reacción se sometieron a digestión con las enzimas MvaI y HaeIII de manera independiente. En la **Figura 4.28** se observa como los patrones de digestión obtenidos coinciden con aquellos predichos representados en la **Figura 4.27**. Si bien el método tiene un gran poder de discriminación, puede no ser suficiente para diferenciar VHH con pequeñas diferencias de secuencia como es el caso de los clones ROR1.5 y ROR1.16. Para estos dos clones la digestión in-sílico no muestra diferencia de tamaño entre los fragmentos de digestión, se

reporta una diferencia de sólo 3 pb en uno de ellos lo cual no puede ser resuelto en el gel de agarosa. Por tanto, patrones de digestión diferentes implican secuencias diferentes, pero el mismo patrón no necesariamente significa la misma secuencia.

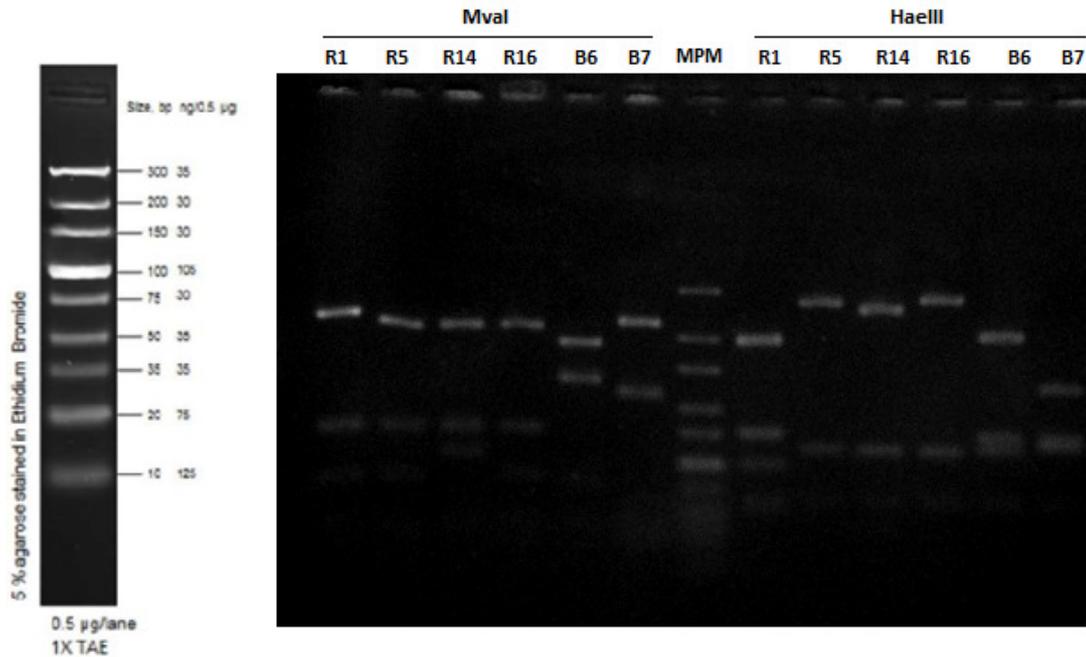


Figura 4.28. Digestión de diferentes clones de secuencia conocida con las enzimas MvaI y HaeIII. Electroforesis en gel de agarosa 4% en buffer TAE 1X, con agente intercalante de ADN bromuro de etidio, visualizado bajo luz UV. Se observan los productos de digestión de diferentes clones con las enzimas MvaI y HaeIII. Se denomina MPM: marcador de peso molecular Ultra Low Range (ThermoFisher); R: VHH-ROR1; B: VHH-AgB (en cada caso el número asociado refiere al clon específico).

Con el fin de aumentar la practicidad de la técnica, se realizó un nuevo análisis seleccionando aleatoriamente colonias aisladas de bacterias *E. coli* ER2738 infectadas con fagos procedentes de una biblioteca inmune de llama. Como se observa en la **Figura 4.29** las secuencias de VHH se amplificaron correctamente por Colony PCR, y la digestión de estos productos con las dos enzimas de restricción permitió la distinción de un gran número de clones distintos, reflejo de la gran diversidad contenida en la biblioteca, tal y como era de esperar. Cabe destacar que la utilización de ambas enzimas se presenta indispensable para la distinción de patrones. Como se observa en la **Figura 4.29B** el par de clones 2 y 4, así como el par 3 y 6 presentan un patrón de digestión con la enzima MvaI muy similar, sugiriendo que podría tratarse del mismo clon. Sin embargo, tras la digestión con la enzima HaeIII fue posible determinar que los clones 3 y 6 son distintos, mientras que los clones 2 y 4 volvieron a presentar un patrón idéntico, por lo que en este caso para su distinción es necesario recurrir a la secuenciación.

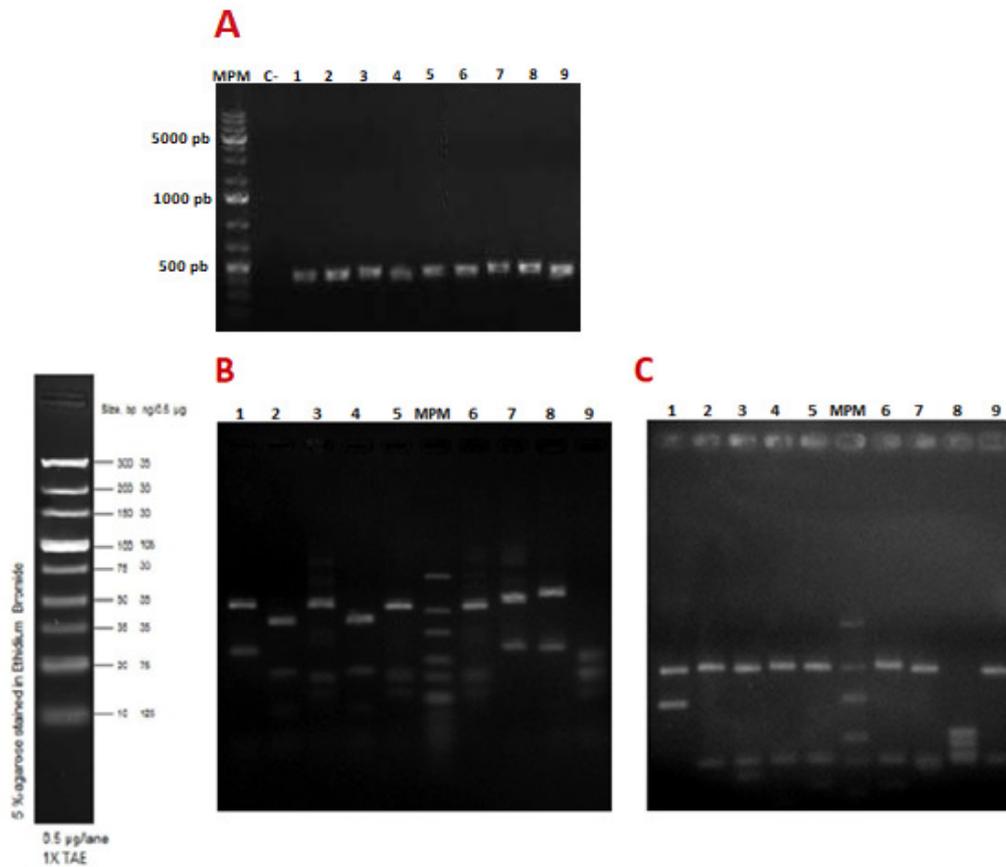


Figura 4.29. Identificación de clones diferentes desde biblioteca inmune en llama. Electroforesis en gel de agarosa en buffer TAE 1X, con agente intercalante de ADN bromuro de etidio, visualizado bajo luz UV. **Figura 4.29A:** Gel 1%. Se observan los productos de PCR amplificados desde colonias aisladas. **Figura 4.29B:** Gel 4%. Se observan los productos de digestión con la enzima MvaI. **Figura 4.29C:** Gel 4%. Se observan los productos de digestión con la enzima HaeIII. Se denomina MPM: marcador de peso molecular; C-: control negativo; 1-9: diferentes clones aislados.

En base a los resultados obtenidos, es posible concluir entonces que la metodología descrita permite la determinación de diversidad de clones contenida en una fracción (ya sea en la biblioteca o un *output*) de manera práctica, rápida y económica. Por ejemplo, en el caso del *panning* contra ROR1, el contar con este método hubiese permitido revisar y modificar la estrategia de *panning* sin necesidad de purificar DNA de cada clon y esperar los resultados de la secuenciación. Asimismo, la aplicación de este método permite la identificación de clones de secuencias diferentes para su selección, y proseguir así con los ensayos pertinentes sin necesidad de esperar los tiempos que requiere la secuenciación. Sin embargo, vale aclarar que la información que brinda este método no suplanta a la secuenciación, ya que solo permite aminorar los tiempos para seguir adelante con los ensayos.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se siguieron estrategias de *panning* para seleccionar anticuerpos monodominio contra dos antígenos de distinta naturaleza, uno soluble (AgB) y el otro un receptor de membrana (ROR1), a su vez en ambos casos, la aplicación final era también diferente, la purificación por afinidad en el caso del AgB y la detección por citometría de células ROR1 positivas en el otro caso.

En lo que respecta al AgB, la selección de VHHs específicos resultó exitosa permitiendo obtener 5 VHHs contra el antígeno. De la comparación de las secuencias de sus CDRs resulta evidente que se trata de clones no relacionados entre sí, y que podrían por tanto definir epítopes independientes. El único intento de mapeo de epítopes realizado ensayando la reactividad contra las subunidades B1, B2 y B3 del antígeno mostró que 4 de los VHHs reaccionaban con la subunidad más abundante del antígeno (B1), mientras que el VHH-AgB2 no resultó reactivo contra ninguna de tres subunidades. Sobre la base de su mayor expresión relativa, el clon VHH-AgB1 se seleccionó como ligando para preparar la columna de afinidad para la purificación del antígeno. La producción en mayor escala de este VHH dio lugar a un rendimiento de 8 mg/L de cultivo. Si bien en base a la experiencia del grupo este rendimiento puede considerarse como modesto, debería ser suficiente para preparar columnas de afinidad que posibilitasen la obtención de miligramos de AgB. Sin embargo, el prototipo de columna preparado con este VHH y su aplicación a la purificación del AgB a partir de líquido hidático, mostró una capacidad de retención del antígeno en la columna de solamente un 6% en relación al valor tomado como referencia. No están claras las razones que dieron lugar a este bajo rendimiento. En una primera interpretación, se especuló con la posibilidad de que parte del VHH inmovilizado resultara inactivo no pudiendo interactuar con el antígeno. Los esfuerzos por intentar mejorar el rendimiento de purificación, promoviendo la inmovilización orientada del VHH mediante su biotilación *in vivo*, resultaron poco auspiciosos. Si bien se logró mejorar el rendimiento de AgB purificado, no se alcanzó una elución limpia, observándose en las diferentes condiciones ensayadas la co-elución del VHH. Dado que el VHH co-eluido permanecerá unido al AgB purificado, su remoción es difícil, por lo que este método de purificación resulta inválido.

De todas formas, es de destacar que a pesar de operar con bajo rendimiento, el prototipo de columna preparado por inmovilización directa del VHH aparece como una herramienta útil para la purificación del antígeno en una sola etapa. Particularmente si, en función de la experiencia generada, se realizan modificaciones que podrían mejorar su desempeño. Entre las modificaciones a realizar para preparar una nueva columna, por un lado debería mejorarse la purificación del VHH a inmovilizar, incorporando lavados a mayor concentración de imidazol, o utilizando un gradiente del mismo. Esto permitiría eliminar contaminantes minoritarios, que se evidenciaron al sobrecargar el VHH purificado en SDS-PAGE, y que de no removerse resultan co-inmovilizados y pueden ser los responsables, a su vez, de retener componentes del líquido hidático que terminan contaminando el AgB. Una vez logrado esto, debería aumentarse la relación de VHH respecto a la fase sólida, llegando a concentraciones cercanas al valor máximo sugerido por el fabricante. Esto permitiría, además de aumentar la cantidad de ligando de la columna, hacer que los VHHs se conjuguen a través de un menor número de residuos de lisina lo que eventualmente afectaría en menor medida su capacidad de unir el AgB. Otra

alternativa es la expresión del VHH fusionado a una proteína de un tamaño considerable y con alto contenido de lisina a modo de favorecer la conjugación mediante éstas y mejorar entonces la orientación del VHH aumentando la interacción con AgB. En resumen, la herramienta generada representa una importante base a partir de la cual explorar alternativas que permitan mejorar su rendimiento, lo cual de ser logrado permitiría la purificación de AgB de manera práctica y rápida.

Por otra parte, en lo que refiere al antígeno ROR1, a través de la utilización de la técnica de *panning* se logró la selección de cuatro clones diferentes reactivos contra el antígeno recombinante, presentándose uno de ellos con una frecuencia muy alta. Tras su expresión y purificación, los diferentes clones se enfrentaron al receptor de superficie celular ROR1 en su estado nativo en un ensayo de citometría de flujo, sin embargo ninguno de ellos resultó reactivo contra el mismo. Dado que se trabajó con VHHs purificados usados a concentraciones altas, y partiendo de la base de que la calidad del antígeno recombinante resultó satisfactoria al ensayarlos con los anticuerpos comerciales, la ausencia de reconocimiento del antígeno nativo por parte de todos los clones ensayados resultó desconcertante. Una posible explicación sería, que si bien se constató mediante la utilización de distintos anticuerpos anti-ROR1 comerciales funcionales en citometría que el antígeno ROR1 recombinante comparte estos epítopes (denominados epítopes nativos), la falta de reconocimiento podría deberse a que el antígeno recombinante presenta además “epítopes desnaturalizados” (ausentes en el antígeno nativo). Como consecuencia, durante la inmunización es probable que se generaran VHHs tanto contra epítopes “nativos” como “desnaturalizados”, pudiendo ser los mismos seleccionados e identificados durante el screening. Por alguna razón, como ocurre algunas veces durante el *panning*, se generó un sesgo muy importante durante esta etapa que derivó en la sobre-representación del VHH-ROR1.1 en el *segundo output*, el cual desafortunadamente no es reactivo contra el ROR1 nativo. Esta dominancia hizo muy difícil además identificar clones adicionales. Sólo se obtuvieron otros tres clones que difieren del anterior, pero que son muy similares entre sí, por lo cual probablemente reaccionen con el mismo epítope que lamentablemente no está presente en el ROR1 nativo.

Si bien es posible que, ampliando el screening a un alto número de clones aparezcan clones con reactividad contra el antígeno nativo, como se ha comentado, esto no resulta práctico debido a la sobre-abundancia del clon VHH-ROR1.1, y por tanto sería necesario usar otras estrategias de *panning*. Lamentablemente, el intento de *panning* sobre células en primera ronda, seguido de *panning* en placa no funcionó, probablemente por la alta retención inespecífica de fagos al usar células en la selección inicial. Sin embargo, pensamos que podrían realizarse nuevos intentos invirtiendo el orden, es decir realizando una primera ronda de *panning* en placa seguida de una segunda ronda en células, y procediendo en una instancia final al ensayo de los clones candidatos por citometría de flujo utilizando, de ser posible, una línea celular diferente a la utilizada para el *panning*. Otra posibilidad, sería realizar el *panning* en placas cubiertas con el VHH-ROR1.1 inmovilizado, el cual se usaría para capturar el ROR1 recombinante, de esta forma, el epítope de VHH-ROR1.1 no estaría disponible y fomentaríamos la selección de clones alternativos que pudieran, en algunos casos, reaccionar con el antígeno nativo.

Finalmente, si bien no se llegó a aplicar a ninguno de los casos estudiados, una importante contribución de este trabajo fue la puesta a punto de un método para la rápida

identificación de VHHs diferentes durante el screening. Como se evidenció en el caso de ROR1, en el screening muchas veces se invierten recursos y mucho tiempo para secuenciar un alto número de clones que luego resultan ser el mismo. El hecho de contar con un método que rápidamente permita distinguir entre clones diferentes, directamente a partir de las colonias individuales de los mismos, permitiría evitar este problema, pero además puede servir para introducir correcciones o cambios en la estrategia de *panning* sin necesidad de esperar los resultados y costos de la secuenciación.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Gonzalez-Sapienza, G., M.A. Rossotti, and S. Tabares-da Rosa, *Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 977.
2. Blanc, M.R., et al., *A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type gamma-globulins from camelid sera*. Biotechnol Appl Biochem, 2009. **54**(4): p. 207-12.
3. Hamers-Casterman, C., et al., *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. Nature, 1993. **363**(6428): p. 446-8.
4. van der Linden, R.H., et al., *Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1431**(1): p. 37-46.
5. Muyldermans, S., et al., *Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains*. Protein Eng, 1994. **7**(9): p. 1129-35.
6. Desmyter, A., et al., *Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(9): p. 803-11.
7. Nguyen, V.K., et al., *Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire*. The EMBO journal, 2000. **19**(5): p. 921-930.
8. Lauwereys, M., et al., *Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies*. The EMBO journal, 1998. **17**(13): p. 3512-3520.
9. De Genst, E., et al., *Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(12): p. 4586-4591.
10. Harmsen, M. and H. De Haard, *Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments*. Applied microbiology and biotechnology, 2007. **77**(1): p. 13-22.
11. Fanning, S.W. and J.R. Horn, *An anti-hapten camelid antibody reveals a cryptic binding site with significant energetic contributions from a nonhypervariable loop*. Protein Science, 2011. **20**(7): p. 1196-1207.
12. Dumoulin, M., et al., *Single-domain antibody fragments with high conformational stability*. Protein Science, 2002. **11**(3): p. 500-515.
13. Hagihara, Y., S. Mine, and K. Uegaki, *Stabilization of an immunoglobulin fold domain by an engineered disulfide bond at the buried hydrophobic region*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(50): p. 36489-36495.
14. Saerens, D., et al., *Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains*. Journal of molecular biology, 2008. **377**(2): p. 478-488.
15. Hussack, G., et al., *Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability*. PloS one, 2011. **6**(11): p. e28218.
16. Vu, K.B., et al., *Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies*. Molecular immunology, 1997. **34**(16-17): p. 1121-1131.
17. Ries, J., et al., *A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies*. Nature methods, 2012. **9**(6): p. 582.
18. Pérez-Martínez, D., T. Tanaka, and T.H. Rabbitts, *Intracellular antibodies and cancer: new technologies offer therapeutic opportunities*. Bioessays, 2010. **32**(7): p. 589-598.
19. Caussin, E., O. Kanca, and M. Affolter, *Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody*. Nature Structural and Molecular Biology, 2012. **19**(1): p. 117.
20. Muyldermans, S., *Nanobodies: natural single-domain antibodies*. Annual review of biochemistry, 2013. **82**: p. 775-797.

21. Frenken, L.G., et al., *Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae*. Journal of biotechnology, 2000. **78**(1): p. 11-21.
22. Arbabi-Ghahroudi, M., J. Tanha, and R. MacKenzie, *Prokaryotic expression of antibodies*. Cancer and Metastasis Reviews, 2005. **24**(4): p. 501-519.
23. Ismaili, A., et al., *Production and characterization of anti-(mucin MUC1) single-domain antibody in tobacco (Nicotiana tabacum cultivar Xanthi)*. Biotechnology and applied biochemistry, 2007. **47**(1): p. 11-19.
24. Nemudraya, A., V. Richter, and E. Kuligina, *Phage peptide libraries as a source of targeted ligands*. Acta Naturae (англоязычная версия), 2016. **8**(1 (28)).
25. Ebrahimzadeh, W. and M. Rajabibazl, *Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application*. Current microbiology, 2014. **69**(2): p. 109-120.
26. Rakonjac, J., et al., *Filamentous Phage: Structure and Biology*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1053**: p. 1-20.
27. Marvin, D.A., M.F. Symmons, and S.K. Straus, *Structure and assembly of filamentous bacteriophages*. Prog Biophys Mol Biol, 2014. **114**(2): p. 80-122.
28. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
29. Zhao, A., et al., *Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy*. Critical reviews in biotechnology, 2016. **36**(2): p. 276-289.
30. Hoogenboom, H.R., *Selecting and screening recombinant antibody libraries*. Nature biotechnology, 2005. **23**(9): p. 1105.
31. Thompson, R.A. and A.J. Lymbery, *Echinococcus and hydatid disease*. 1995: Cab International.
32. McManus, D.P., et al., *Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis*. Bmj, 2012. **344**(7861): p. 39-44.
33. Thompson, R. and D. Jenkins, *Echinococcus as a model system: biology and epidemiology*. International journal for parasitology, 2014. **44**(12): p. 865-877.
34. Silva-Álvarez, V., et al., *Echinococcus granulosus antigen B: A Hydrophobic Ligand Binding Protein at the host–parasite interface*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 2015. **93**: p. 17-23.
35. Eckert, J., F. Conraths, and K. Tackmann, *Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis?* International journal for parasitology, 2000. **30**(12-13): p. 1283-1294.
36. Díaz, A., et al., *Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis*. Parasite immunology, 2016. **38**(3): p. 193-205.
37. Brehm, K. and U. Koziol, *Echinococcus–host interactions at cellular and molecular levels*, in *Advances in parasitology*. 2017, Elsevier. p. 147-212.
38. Frayha, G.J. and R. Haddad, *Comparative chemical composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of Echinococcus granulosus (Cestoda)*. International Journal for Parasitology, 1980. **10**(5-6): p. 359-364.
39. Aziz, A., et al., *Proteomic characterisation of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans*. Journal of proteomics, 2011. **74**(9): p. 1560-1572.
40. Virginio, V., et al., *A set of recombinant antigens from Echinococcus granulosus with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease*. Clinical & Experimental Immunology, 2003. **132**(2): p. 309-315.
41. Carmena, D., A. Benito, and E. Eraso, *Antigens for the immunodiagnosis of Echinococcus granulosus infection: An update*. Acta tropica, 2006. **98**(1): p. 74-86.
42. Siracusano, A., et al., *Molecular cross-talk in host–parasite relationships: the intriguing immunomodulatory role of Echinococcus antigen B in cystic echinococcosis*. International journal for parasitology, 2008. **38**(12): p. 1371-1376.

43. Siracusano, A., et al., *Immunomodulatory mechanisms during Echinococcus granulosus infection*. Experimental parasitology, 2008. **119**(4): p. 483-489.
44. Lee, E.G., et al., *A hydrophobic ligand-binding protein of the Taenia solium metacestode mediates uptake of the host lipid: Implication for the maintenance of parasitic cellular homeostasis*. Proteomics, 2007. **7**(21): p. 4016-4030.
45. Obal, G., et al., *Characterisation of the native lipid moiety of Echinococcus granulosus antigen B*. PLoS neglected tropical diseases, 2012. **6**(5): p. e1642.
46. Maule, A.G. and N.J. Marks, *Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*. 2006: CABI.
47. Shepherd, J.C., A. Aitken, and D.P. McManus, *A protein secreted in vivo by Echinococcus granulosus inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis*. Molecular and biochemical parasitology, 1991. **44**(1): p. 81-90.
48. Rigano, R., et al., *Modulation of human immune response by Echinococcus granulosus antigen B and its possible role in evading host defenses*. Infection and immunity, 2001. **69**(1): p. 288-296.
49. Rigano, R., et al., *Echinococcus granulosus antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response*. Infection and Immunity, 2007. **75**(4): p. 1667-1678.
50. Ioppolo, S., et al., *Immunological responses to antigen B from Echinococcus granulosus cyst fluid in hydatid patients*. Parasite immunology, 1996. **18**(11): p. 571-578.
51. GONZÁLEZ, G., et al., *Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native Echinococcus granulosus antigen B*. Parasite Immunology, 1996. **18**(12): p. 587-596.
52. Folle, A.M., et al., *Characterisation of Antigen B Protein Species Present in the Hydatid Cyst Fluid of Echinococcus canadensis G7 Genotype*. PLoS neglected tropical diseases, 2017. **11**(1): p. e0005250.
53. Binet, J.L., et al., *Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2006. **107**(3): p. 859-61.
54. Goldin, L.R. and S.L. Slager, *Familial CLL: genes and environment*. ASH Education Program Book, 2007. **2007**(1): p. 339-345.
55. Baskar, S., et al., *Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(2): p. 396-404.
56. Fukuda, T., et al., *Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(8): p. 3047-3052.
57. Kipps, T.J., *Chronic lymphocytic leukemia*. Current opinion in hematology, 2000. **7**(4): p. 223-234.
58. Borchering, N., et al., *ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology*. Protein & cell, 2014. **5**(7): p. 496-502.
59. Masiakowski, P. and R.D. Carroll, *A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(36): p. 26181-26190.
60. Green, J.L., S.G. Kuntz, and P.W. Sternberg, *Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more*. Trends in cell biology, 2008. **18**(11): p. 536-544.
61. Choudhury, A., et al., *Silencing of ROR1 and FMOD with siRNA results in apoptosis of CLL cells*. British journal of haematology, 2010. **151**(4): p. 327-335.
62. DaneshManesh, A.H., et al., *Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy*. International journal of cancer, 2008. **123**(5): p. 1190-1195.
63. Al-Shawi, R., et al., *Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development*. Development Genes & Evolution, 2001. **211**(4):

64. Matsuda, T., et al., *Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development*. Mechanisms of development, 2001. **105**(1): p. 153-156.
65. Hudecek, M., et al., *The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4532-4541.
66. Uhrmacher, S., et al., *Use of the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) as a diagnostic tool in chronic lymphocytic leukemia (CLL)*. Leukemia research, 2011. **35**(10): p. 1360-1366.
67. Damle, R.N., et al., *Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia: Presented in part at the 40th Annual Meeting of The American Society of Hematology, held in Miami Beach, FL, December 4-8, 1998*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1840-1847.
68. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1848-1854.
69. Orchard, J.A., et al., *ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia*. The Lancet, 2004. **363**(9403): p. 105-111.
70. Barna, G., et al., *ROR1 expression is not a unique marker of CLL*. Hematological oncology, 2011. **29**(1): p. 17-21.
71. Danilov, A.V., *Targeted therapy in chronic lymphocytic leukemia: past, present, and future*. Clin Ther, 2013. **35**(9): p. 1258-70.
72. Society, A.C. *Typical Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia*. 2018 [2018].
73. Lamanna, N., *Advances in the treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Current oncology reports, 2005. **7**(5): p. 333-338.
74. Nordqvist, C. *Medical News Today*. 2017 [cited 2018].
75. Yu, J., et al., *Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation*. The Journal of clinical investigation, 2016. **126**(2): p. 585-598.
76. MacKeigan, J.P., L.O. Murphy, and J. Blenis, *Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance*. Nature cell biology, 2005. **7**(6): p. 591.
77. Hojjat-Farsangi, M., et al., *Inhibition of the receptor tyrosine kinase ROR1 by anti-ROR1 monoclonal antibodies and siRNA induced apoptosis of melanoma cells*. PloS one, 2013. **8**(4): p. e61167.
78. Rebagay, G., et al., *ROR1 and ROR2 in human malignancies: potentials for targeted therapy*. Frontiers in oncology, 2012. **2**: p. 34.
79. Baskar, S., et al. *Targeting malignant B cells with an immunotoxin against ROR1*. in *MAbs*. 2012. Taylor & Francis.
80. Rossotti, M., et al., *Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(7): p. 1397-404.
81. Zhang, S., et al., *The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers*. The American journal of pathology, 2012. **181**(6): p. 1903-1910.