



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Uso de nanobodies para la modificación del tropismo de vectores lentivirales pseudotipados

Tesis presentada para obtener el título de
Magíster en Biotecnología

Autor:

Lic. Diego Pérez Escanda

Director:

Dr. Gualberto González Sapienza

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Mayo de 2019

Resumen

En este trabajo de tesis se exploró el uso de vectores lentivirales (LVs) pseudotipados con proteínas del virus de Sarampión (MV-LVs) y Nipah (NiV-LVs) y re-direccionados a través de nanobodies específicos contra receptores de células dendríticas, con el propósito de cargar a estas células con un antígeno y activarlas. En una primera instancia se produjeron MV-LVs que resultaron poco eficientes en la transducción de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (mBMDCs). En vista de estos resultados, se realizó un seguimiento del proceso de generación de los LVs, desde la transfección hasta la transducción de células. A partir de este análisis, se clonaron los nanobodies a nuevos plásmidos para generar MV-LVs y NiV-LVs, logrando producirlos con títulos comparables a los ya publicados. Utilizando estos vectores, se transdujeron mBMDCs *in-vitro* con eficiencias similares a las obtenidas con el VSV-G-LV. Aunque en un principio no se pudo verificar la especificidad de estos vectores debido a que la exposición a LVs afectó la detección de los receptores blanco, posteriormente se probó el correcto re-direccionamiento de los vectores anti-CD11b y anti-MHCII. Si bien no se pudo comprobar el re-direccionamiento del vector anti-CD11c, varios experimentos apoyaron la hipótesis del correcto *targeting* de este LV. Una vez comprobada su capacidad de transducción *in-vitro*, se exploró de forma preliminar, el proceso de transducción en un modelo murino *in-vivo*. En este sentido, se lograron transducir *in-vivo* células de la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6, aunque los cambios en la expresión de los receptores blanco no permitieron concluir sobre la especificidad de la transducción. Por otro lado, se avanzó en la generación de un plásmido para la expresión dual de transgenes, de forma de incluir, además del antígeno de interés, un elemento activador en la célula blanco. Para esto último, se incluyeron formas truncadas del gen que codifica para la quinasa NIK, un activador de NF κ B, que una vez empacado en partículas lentivirales, se utilizó para transducir células THP-1. Como se esperaba, la versión truncada de la NIK que carece de los dominios de inhibición y regulación negativa, produjo una potente secreción de citoquinas pro-inflamatorias.

Lista de abreviaciones

Ψ	– Señal de encapsidación del genoma de HIV-1
6xHis	– Cola de 6 histidinas
ADN	– Acido desoxirribonucleico
ARN	– Acido ribonucleico
ARNm	– ARN mensajero
APC	– Del inglés, <i>antigen-presenting cell</i> – célula presentadora de antígeno
CA	– Proteína de la cápside
CAR-T	– Del inglés, <i>chimeric antigen receptor T cells</i>
CD	– Del inglés, <i>cluster of differentiation (CD3, CD4, CD8, CD11b/c, CD19, CD20, CD25, CD28, CD34, CD40, CD46, CD80, CD86, CD105, CD117, CD133, CD150)</i>
CHO	– Del inglés, <i>chinese hamster ovary cells</i>
CMV	– Citomegalovirus
DARPin	– Del inglés, <i>designed ankryn repeat protein</i>
DC	– Del inglés, <i>dendritic cell</i> – célula dendrítica
ELISA	– Del inglés, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
F	– Proteína de fusión de paramixovirus
FDA	– Del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>
G	– Glicoproteína G de paramixovirus
GP	– Glicoproteína
H	– Hemaglutinina de paramixovirus
HEK293T	– Del inglés, <i>human embryonic kidney 293T cells</i>
HIV-1	– Del inglés, <i>Human Immunodeficiency Virus type 1</i> – Virus de la Inmunodeficiencia
Humana tipo 1	
HSC	– Del inglés, <i>human stem-cell</i> – célula madre humana
Ig	– Inmunoglobulina
IL	– Interloquina (<i>IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18</i>)
IN	– Integrasa
i.p.	– Intraperitoneal
LPM	– Del inglés, <i>large peritoneal macrophages</i>
LTR	– Del inglés, <i>long terminal repeat</i> – repetidos terminales largos
LV	– Vectores lentivirales o lentivectores
MA	– Proteína de la matriz
mBMDC de ratón	– Del inglés, <i>murine bone marrow-derived dendritic cell</i> – célula dendrítica derivada de médula ósea de ratón
MFI	– Del inglés, <i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	– Del inglés, <i>major histocompatibility complex</i> – complejo mayor de histocompatibilidad
MLV	– Del inglés, <i>Murine Leukemia Virus</i> - Virus de Leucemia Murino

MV	– Del inglés, <i>Measles Virus</i> - Virus del Sarampión
MV _{Ed}	– Cepa Edmonston del MV
MV _{vac}	– Cepa de vacunación del MV
MV _{wt}	– Cepa wt del MV
NC	– Proteína de la nucleocápside
NF- κ B	– Del inglés, <i>nuclear factor</i> κ B - Factor nuclear κ B
NIK	– Del inglés, <i>NF-κB-inducing kinase</i> – Quinasa inductora de NF- κ B
NiV	– Del inglés, Nipah virus - Virus del Nipah
PBMC	– Del inglés, <i>peripheral blood mononuclear cells</i> – células mononucleares de sangre periférica
PCR	– Del inglés, <i>polymerase chain reaction</i>
PR	– Proteasa
qPCR	– Del inglés, <i>quantitative PCR</i> – PCR cuantitativa
RCL	– Del inglés, <i>replication-competent lentivirus</i> - lentivirus capaces de replicarse
RRE	– Del inglés, <i>Rev-response element</i> – elemento de respuesta a Rev
RT	– Retrotranscriptasa
RT-qPCR	– Retrotranscripción y PCR cuantitativa
scFv	– Del inglés, <i>single chain variable fragment</i>
SFFV	– Del inglés, <i>spleen focus-forming virus</i>
SIN	– Del inglés, <i>self-inactivating</i>
SINDV	– Del inglés, Sindbis Virus - Virus Sindbis
SNC	– Sistema nervioso central
SU	– Subunidad de superficie gp160 (gp120)
TCR	– Del inglés, <i>T-cell receptor</i> - Receptor de linfocitos T
TM	– Subunidad transmembrana de gp160 (gp41)
TNF- α	– Del inglés, <i>tumor necrosis factor</i> α - factor de necrosis tumoral α
TPMV	– Del inglés, <i>Tupaia Paramyxovirus</i> – Paramixovirus Tupaia
VHH o Nanobody	– Fragmento variable de la cadena pesada de anticuerpos de cadena pesada de llama
VSV	– Del inglés, <i>vesicular stomatitis virus</i> - virus de estomatitis vesicular
VSV-G	– Proteína G de la envoltura del VSV
WT	– Del inglés, <i>wild-type</i>

Anglicismos

Annealing

Backbone

Batch

Delivery

Dot plot

Downstream

Fill-in

Freezer

Linker

Off-target

Overnight

Pellet

Phage display

Scraper

Screening

Spinfection

Splicing

Split-genome

Stock

Tag

Target

Targeting

Upstream

Wild-type

Tabla de contenido

<i>Resumen</i>	1
<i>Lista de abreviaciones</i>	
<i>Anglicismos</i>	
1.0. Introducción	1
1.1. Lentivirus.....	1
1.2. Vectores lentivirales.....	3
1.2.1. Generalidades.....	3
1.2.2. Desarrollo de sistemas para la generación de LVs.....	4
1.3. Panorámica de aplicaciones de los LVs.....	8
1.3.1. Aplicaciones clínicas.....	8
1.4. Modificación del tropismo de LVs.....	11
1.4.1. Pseudotipado de LVs con VSV-G.....	12
1.4.2. Pseudotipado de LVs con paramixovirus.....	14
1.4.2.1. Pseudotipado con MV.....	15
1.4.2.2. Pseudotipado con NiV.....	15
1.5. Re-direccionamiento de LVs y sus vías de entrada a la célula.....	16
1.5.1. Targeting de LVs.....	16
1.5.2. Vías de entrada a la célula.....	18
1.6. VHHs como dominio de unión para el re-direccionamiento de LVs.....	19
1.7. Targeting a células dendríticas (DCs) como método de vacunación.....	20
1.7.1. Vacunas y células dendríticas.....	20
1.7.2. Vías de activación de NFκB.....	23
1.7.3. Targeting a células dendríticas.....	25
2.0. Antecedentes	27
2.1. Pseudotipado de LVs con paramixovirus.....	27
2.1.1. Pseudotipado con MV.....	27
2.1.2. Pseudotipado con NiV.....	28
2.2. Sistemas de targeting de LVs.....	28
2.2.1. Targeting mediante la modificación de GPs de MV.....	29
2.2.2. Targeting mediante la modificación de GPs de NiV.....	31
2.3. Targeting de células dendríticas con LVs.....	32
2.4. Potenciamiento de vacunas dirigidas a células dendríticas.....	35
2.5. Nanobodies contra receptores de células dendríticas.....	35
2.6. Objetivo.....	36
2.6.1. Objetivo general.....	36
2.6.2. Objetivos específicos inicialmente planteados.....	36
3.0. Materiales y Métodos	38

3.1.	Plásmidos para la generación de vectores lentivirales.....	39
3.2.	Generación, expansión y purificación de plásmidos.....	40
3.2.1.	Clonaje de VHHs monovalentes al plásmido MV-Hmut.....	41
3.2.2.	Clonaje de VHHs bivalentes (BiVHHs) al plásmido MV-Hmut.....	42
3.2.3.	Clonaje de VHHs monovalentes a los plásmidos MV-p44, NiV-p66 y NiV-p70.....	43
3.2.4.	Clonaje de VHHs bivalentes a los plásmidos MV-p44, NiV-p66 y NiV-p70.....	43
3.2.5.	Transformación, expansión y purificación de plásmidos.....	44
3.3.	Mantenimiento de líneas celulares y generación de células primarias.....	44
3.3.1.	Líneas celulares.....	45
3.3.2.	Generación y cultivo de mBMDCs.....	46
3.3.2.1.	Generación de mBMDCs (NIBSC).....	46
3.3.2.2.	Generación de mBMDCs (PEI).....	46
3.3.2.3.	Generación de mBMDCs (Cátedra de Inmunología).....	47
3.4.	Análisis de la expresión de Hmut ^{VHH} en HEK293T.....	47
3.5.	Generación de LVs.....	48
3.5.1.	Producción a gran escala.....	48
3.5.1.1.	Producción de VSV-G-LVs y MV-LVs (NIBSC).....	48
3.5.1.2.	Producción de VSV-G-LVs, MV-LVs y NiV-LVs (PEI).....	49
3.5.2.	Producción a pequeña escala.....	50
3.6.	Titulación de LVs.....	51
3.6.1.	Titulación por transducción.....	51
3.6.2.	Titulación por RT-qPCR.....	53
3.7.	Ensayo de unión por interferometría de biocapa (BLItz).....	54
3.8.	Caracterización de LVs por Nanosight.....	55
3.9.	Ensayo de unión de LVs a células blanco.....	55
3.10.	Transducción <i>in-vitro</i> y análisis por citometría de flujo.....	56
3.11.	Transducción <i>in-vivo</i> de ratones mediante inyección de LVs.....	57
3.12.	Construcción del plásmido de transferencia pSIN-DP-SFFV/CMV.....	58
3.13.	Clonaje de GFP, NIK y fragmentos de NIK al plásmido pSIN-DP-SFFV/CMV.....	59
3.14.	Transducción y cuantificación de ILs en sobrenadantes.....	61
4.0.	Resultados y discusión.....	62
4.1.	Las preparaciones iniciales de MV-Hmut ^{(Bi)VHH} -LVs alcanzaron valores TU/mL por RT-qPCR similares a los reportados por vectores análogos.....	62
4.2.	Los primeros intentos de transducción de células dendríticas murinas con los MV-Hmut ^{VHH} -LVs no fueron exitosos.....	64
4.3.	Las proteínas de envoltura se expresan en altos niveles y los LVs generados reconocen a su antígeno...66	
4.4.	El MV-Hmut ^{VHH-V36} -LV es capaz de transducir distintas células diana, pero se produce con bajo título.....	70
4.5.	La transducción del MV-Hmut ^{VHH-V36} -LV a través del 6xHis se equipara con la del vector control al igualar la MOI, pero eso no ocurre cuando la transducción se da a través del VHH.....	73
4.6.	Se clonaron los VHHs a nuevos plásmidos y se eligió la mejor construcción de forma empírica.....	76

4.7.	Se alcanzaron títulos de hasta 10^7 TU/mL, sin embargo, en el mejor de los casos solamente 1 de cada 12000 partículas lentivirales es capaz de transducir.....	79
4.8.	Un gran número de partículas lentivirales se unen a las mBMDCs independientemente de que induzcan transducción.....	81
4.9.	La eficiencia de transducción de mBMDCs fue comparable a la del VSV-G-LV y la expresión del transgen se mantiene hasta los ocho días post-transducción.....	84
4.10.	La aparición de eventos off-target probablemente se deba a la unión de LVs no funcionales en la superficie celular.....	87
4.11.	La unión de los LVs a la célula se da de forma específica y a través del receptor reconocido por el VHH	90
4.12.	A los tres días post-transducción se siguen detectando LVs unidos en la superficie celular, lo que produce el presunto efecto off-target.....	94
4.13.	Al utilizar células capaces de replicarse el efecto off-target se ve disminuido y en el caso de CD11b desaparece	96
4.14.	En un screening preliminar, los tres BiVHHs testeados se adaptan mejor al sistema de MV-p44.....	101
4.15.	El modelo de inyección intraperitoneal de LVs permite el seguimiento de células transducidas hasta el día ocho post-inyección.....	102
4.16.	El NiV-p66 ^{VHH-MR33} -LV es capaz de transducir células in-vivo, si bien no se confirma la especificidad	108
4.17.	Se generó un plásmido de expresión dual para la expresión de un antígeno junto a un activador de NF κ B	112
4.18.	Al utilizar células de origen humano, el VSV-G-LV(NIK) es capaz de inducir activación.....	115
4.19.	Tras la transducción con VSV-G-LV(NIK- γ) las células THP-1 se activan induciendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.....	118
5.0.	<i>Conclusión y perspectivas</i>	121
5.1.	Conclusión.....	121
5.2.	Perspectivas.....	121
6.0.	<i>Referencias bibliográficas</i>	123

1. Introducción

1.1. Lentivirus

Los lentivirus son virus pertenecientes a la familia *Retroviridae*, caracterizados por la integración estable de su material genético en la célula huésped. Dentro de esta familia, los lentivirus se distinguen especialmente por infectar tanto células en división como células que no se dividen^{1,2}. Este género viral obtiene su nombre debido al largo (o lento) período de tiempo entre la infección y el inicio de la enfermedad³. Se han encontrado lentivirus presentes en felinos, ungulados y de mayor importancia para la salud, en primates tanto no humanos como humanos, entre los que se destaca el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, o HIV-1 por sus siglas en inglés⁴.

El genoma lentiviral (ver **figura-1**) de HIV-1 consiste en dos copias de moléculas lineales de ARN simple cadena de sentido positivo. Posee un tamaño de aproximadamente 9.3 kb y cada hebra de ARN incluye tres grandes genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*. La proteína precursora *gag* es cortada proteolíticamente y genera las proteínas de la matriz (MA, p17), de la cápside (CA, p24), de la nucleocápside (NC, p7) y una pequeña proteína, p6. El gen *pol* codifica para la proteasa viral (PR, p12), la retrotranscriptasa (RT, p66) y la integrasa (IN, p32); mientras que *env*, tal como lo indica su nombre, codifica para la glicoproteína de la envoltura gp160, que es procesada durante la maduración del virión para generar la subunidad de superficie gp120 (SU) y la subunidad transmembrana gp41 (TM). Además de los genes estructurales, el genoma viral codifica para las proteínas regulatorias, *tat* y *rev*, así como las proteínas virulentas *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*, llamados también accesorias, debido a que no son esenciales para la replicación. El genoma viral está flanqueado por dos repetidos terminales largos (LTRs) que son requeridos para la retrotranscripción, la integración y la transcripción viral. Las señales de dimerización y empaquetamiento del genoma (Ψ) se encuentran entre el 5'-LTR y el gen *gag*. Cada virión, de aproximadamente 100 nanómetros (nm), contiene las proteínas derivadas de *gag*, *pol* y *env*, las proteínas accesorias, y dos copias de ARN genómico viral^{3,5}.



Figura-1. Esquema del genoma de lentiviral. El genoma, con un total de nueve genes, se encuentra flanqueado por dos LTRs en sus extremos. De 5' a 3' se encuentran los genes estructurales *gag* (codificante de MA, CA, NC y p6), *pol* (codificante de PR, RT e IN) y *env* (codificante de SU y TM). A su vez, el genoma codifica para las proteínas regulatorias *tat* y *rev* y las proteínas accesorias *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*. Adaptado de www.abmgood.com.

Brevemente, como se muestra en la **figura-2**, la infección por HIV-1 es iniciada mediante la interacción de gp120 con su receptor primario CD4 (expresado en células T) y con su co-receptor CXCR4 (expresado en células T) o CCR5 (de expresión en monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T activados). En cuanto se da la unión, se sostiene que gp41 sufre cambios conformacionales para facilitar la fusión con la membrana celular^{3,6}, desencadenando la entrada viral, aunque se también se ha reportado que HIV-1 podría entrar vía endocitosis^{7,8}. Una vez dentro de la célula, la partícula se desencapsida, liberando el genoma viral y las proteínas, al citoplasma. La RT convierte el ARN en ADN doble hebra, el cual luego es importado al núcleo e integrado en el genoma celular mediante la IN, formando lo que se conoce como el provirus. Una vez integrado el ADN proviral, los LTRs flanqueantes regulan la transcripción y poliadenilación de los ARN mensajeros (ARNm) virales. El 5'-LTR actúa como promotor y activador de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II celular. Por su otra parte, el 3'-LTR estabiliza los transcritos mediante su poliadenilación. Inicialmente se da una transcripción basal independiente del factor Tat, la cual es ineficiente, generando ARNm virales que son cortados múltiples veces mediante *splicing*, generando así transcritos cortos. Estos transcritos de pequeño tamaño codifican para las proteínas no estructurales Tat, Rev y Nef que facilitan las siguientes etapas. La proteína Tat, recién sintetizada, se une al extremo 5' de los ARNm y actúa como transactivador y amplificador de la transcripción de los ARNm codificantes para las proteínas estructurales. Mientras tanto, Rev, también recién sintetizada, se une a su sitio de reconocimiento (RRE) en los transcritos virales enteros o cortados una vez para facilitar su exportación del núcleo hacia el citoplasma. Los transcritos exportados con un corte generan las proteínas Env, Vif, Vpr y Vpu, mientras que aquellos que no sufrieron *splicing* son usados para la traducción de *gag* y *pol* y como ARN genómico para el ensamblado de nuevos viriones. Los genomas virales exportados junto a las proteínas se ensamblan y brotan de la membrana celular. Luego de liberadas las partículas, la multimerización de *gag* y *gag-pol* activa la PR que convierte a los viriones inmaduros en viriones maduros e infectivos^{3,6}.

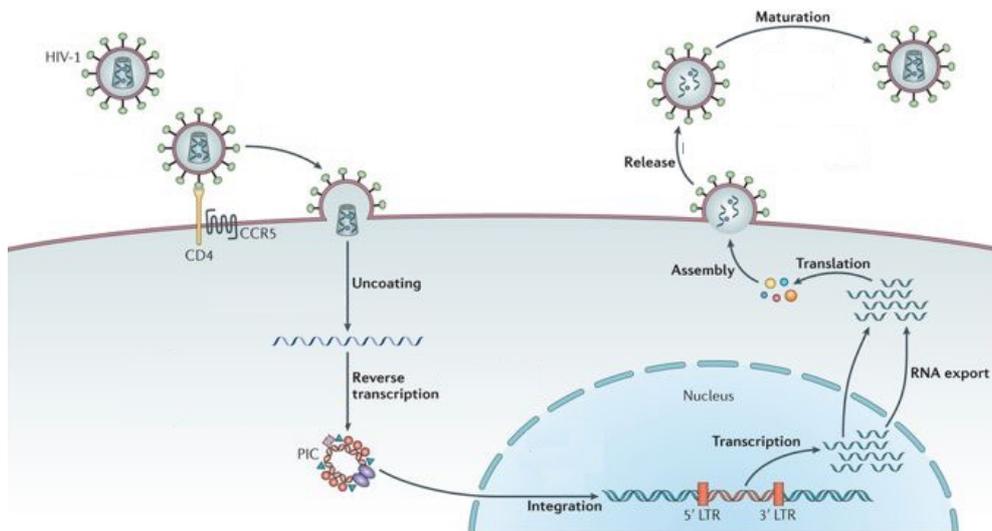


Figura-2. Ciclo de replicación de HIV-1 con fusión en la membrana plasmática. Tras la unión del virión al receptor y co-receptor, se induce la fusión y consecuente **desencapsidación** (*uncoating*) del virión, liberando el contenido viral hacia el citoplasma. La RT **retrotranscribe** (*reverse transcription*) el ARN viral a ADN doble hebra, formando el complejo de pre-integración (PIC), el cual es luego **integrado** (*integration*) al genoma celular. Este ADN proviral es **transcrito** (*transcription*) y **exportado** (*RNA export*) al citoplasma para ser **traducido** (*translation*), generando los componentes para que se pueda **ensamblar** (*assembly*) un nuevo virión, que finaliza el ciclo al **brotar** (*release*) de la célula y **madurar** (*maturation*). Adaptada de Barré-Sinoussi et al., 2013.

1.2. Vectores lentivirales (LVs)

1.2.1. Generalidades

Los virus son parásitos obligatorios, los cuales entregan eficientemente su material genético a la célula huésped. Se puede tomar ventaja de esta propiedad y mediante técnicas de clonaje molecular, remover los genes patogénicos presentes en el material genético viral y reemplazarlos con genes de interés⁹, de esta manera generando un vector que trasmite la información deseada. Se han generado vectores génicos basados en virus derivados de varias especies virales, incluyendo adenovirus¹⁰, virus adeno-asociados¹¹, baculovirus¹², herpes virus¹³, y retrovirus, incluyendo los lentivirus¹⁴, entre otros. Sin embargo, los vectores lentivirales, en su mayoría basados en HIV-1, son una de las herramientas génicas más utilizadas hoy en día¹⁵. Esto es, en parte debido a su habilidad para entregar su material genético tanto a células que se dividen como células que no, integrándose irreversiblemente en el genoma celular, por su baja inmunogenicidad¹⁶, debido a su incrementada bioseguridad¹⁷ y porque su tropismo puede ser modificado incorporando glicoproteínas heterólogas¹⁸.

En contraste a los virus de los cuales derivan, los vectores son deficientes en replicación, debido a que la información genética indispensable para el ensamblaje de nuevos viriones no está empaquetada en las partículas. De esta forma cada LV es capaz de transferir únicamente su información genética a una sola célula blanco en un proceso llamado transducción, que se diferencia del proceso de infección causado por los virus competentes en replicación¹⁹. La capacidad de transducción típicamente se cuantifica a través del denominado “título” que caracteriza a una dada preparación de LVs. Este título se obtiene, generalmente, estimando el número de células blanco transducidas en función de la expresión del gen de interés (transgen) que porta el LV y típicamente se expresa en unidades transductantes por mililitro (TU/mL). Es importante notar que dependiendo de la línea celular utilizada el título puede variar significativamente para una misma preparación de LVs, o si se usan distintas proteínas de membrana en su superficie. Alternativamente, es posible cuantificar el número de partículas virales utilizando instrumentos como el Nanosight. También se utilizan métodos de PCR cuantitativa que miden por ejemplo la “actividad” de la transcriptasa reversa, y esto se calibra contra alguna medida directa de cantidad partículas por volumen de muestra.

1.2.2. Desarrollo de sistemas para la generación de LVs

Generalmente, como se indica en la **figura-3**, la producción de LVs conlleva una primera etapa de transfección de las células productoras con diferentes plásmidos (que varían de acuerdo a la generación de los vectores). Posteriormente, los LVs se ensamblan y brotan de la célula productora acumulándose en el sobrenadante celular, de donde son purificados/concentrados. Estas partículas son capaces de transducir una célula blanco, en donde el gen codificado puede ser transcrito, y en caso de tratarse de una proteína, traducido²⁰.

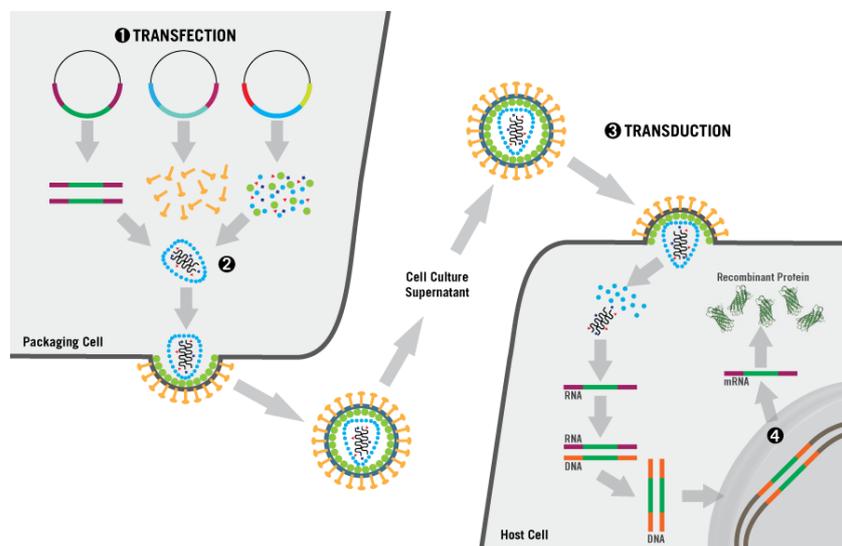


Figura-3. Esquema general de producción de vectores lentivirales y transducción de la célula blanco. Se divide en 4 etapas: 1-Transfección, 2-Ensamblaje, 3-Transducción y 4-Transcripción y síntesis. Para generar LVs, se transfectan células productoras con los plásmidos codificantes para todos sus componentes. Las partículas se ensamblan en la célula y brotan de la membrana celular, de donde se recuperan para transducir una célula blanco. Dentro de la célula, el material genético del vector se integra al genoma y es transcrito y traducido (en caso de ser una proteína) para generar un producto. Adaptada de www.mirusbio.com.

Los LVs se han ido desarrollando a lo largo del tiempo, desde los vectores de primera generación a los vectores de cuarta generación, clasificándose de acuerdo a su nivel de bioseguridad. Particularmente, se ha prestado atención a limitar la posibilidad de desarrollo de lentivirus capaces de replicarse (RCLs) mediante el sistema de *split-genome* o división del genoma¹⁷.

La primera generación (ver figura-4) de LVs, es referida a aquellos vectores que dividieron el sistema en tres plásmidos. La producción de estos primeros vectores deficientes en replicación fue lograda a través de la transfección transitoria de células productoras HEK293T con: i) plásmido de transferencia, ii) plásmido de empaquetamiento y iii) plásmido codificante de la envoltura. El primero contiene el transgen o gen deseado, con su expresión dirigida por un promotor heterólogo interno, además de elementos esenciales como los LTRs, la secuencia señal Ψ y RRE²¹. El plásmido de empaquetamiento expresa todos los genes virales de HIV-1 a excepción de *env*, es decir, *gag*, *pol* y las proteínas regulatorias/accesorias desde un promotor de fuerte expresión. El tercer plásmido, codificante de la envoltura, consiste en un promotor fuerte que dirige la expresión de la/las proteína/s insertas en la membrana viral¹.

Debido a que la envoltura de HIV-1 reconoce el CD4 humano como principal receptor, los primeros vectores derivados de HIV-1 fueron capaces de transducir solamente células humanas que expresaran el receptor CD4. Debido a la restricción de transducción con el uso de esta envoltura, se desarrolló por primera vez en 1993, un vector retroviral derivado del virus de leucemia murina (MLV) que acarrea en su membrana la glicoproteína G del virus de estomatitis vesicular (VSV-G). El uso en los vectores virales de proteínas de membrana diferentes a la del virus original se denomina pseudotipado, y en el ejemplo mencionado el LV equipado con VSV-G en su envoltura, fue capaz de transducir distintos tipos celulares, y además en distintas especies, debido al amplio tropismo y variedad de ligandos reconocidos por su envoltura²². De esta misma forma, posteriormente, se logró la producción de vectores derivados de HIV-1 pseudotipados con VSV-G²³.

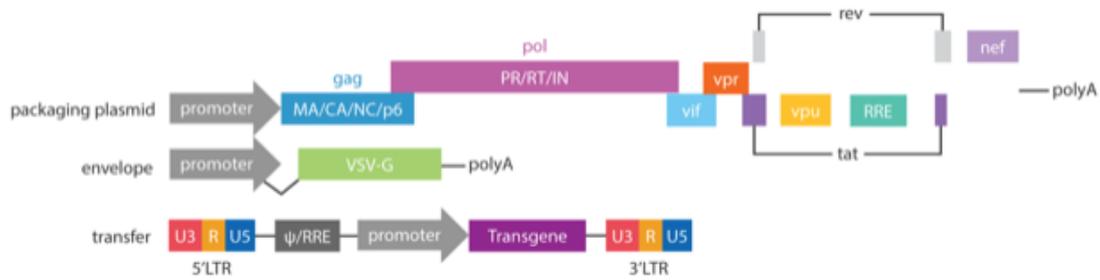


Figura-4. Esquema de vectores lentivirales de primera generación. Consta de tres plásmidos: 1) el de empaquetamiento (packaging plasmid) que codifica para las proteínas gag, pol, tat, rev y las accesorias, expresadas desde un promotor heterólogo; 2) el plásmido codificante de la envoltura (envelope) con expresión dirigida desde un promotor fuerte; 3) el plásmido de transferencia (transfer) que contiene el gen deseado con expresión desde un promotor heterólogo, además de contener los LTRs, y los elementos RRE y Ψ . Contiene ocho de los nueve genes originales de HIV-1. Adaptado de www.abmgood.com.

En los vectores de segunda generación, esquematizados en la figura-5, se emplea un sistema similar al de primera generación. Si bien también está basado en tres plásmidos, su bioseguridad se encuentra aumentada, dado que todas las proteínas accesorias (vif, vpr, vpu y nef), que son importantes para la virulencia del HIV-1 pero no para su replicación, son eliminadas del plásmido de empaquetamiento^{24,25}. De esta manera, al reemplazar también la envoltura de HIV-1 por la de VSV-G, los vectores de segunda generación contienen solo cuatro de los nueve genes originales de HIV-1: *gag*, *pol*, *tat* y *rev*.

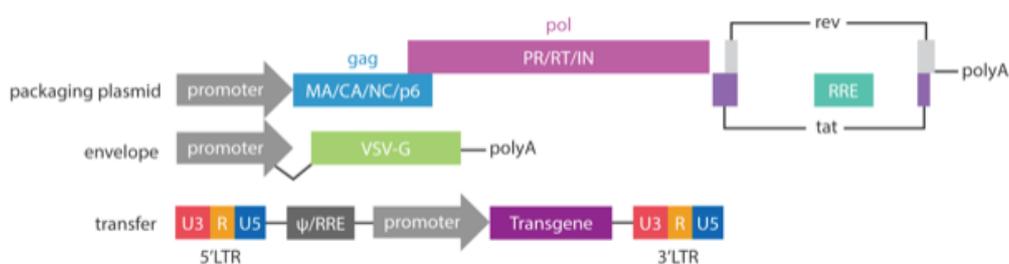


Figura-5. Esquema de vectores lentivirales de segunda generación. Consta los mismos tres plásmidos que los de primera generación, a excepción del plásmido de empaquetamiento, el cual no codifica para las proteínas accesorias. Contiene cuatro de los nueve genes originales de HIV-1. Adaptado de www.abmgood.com.

Los vectores lentivirales convencionales integran el transgen, flanqueado por dos LTRs, en el genoma celular. Estos LTRs transcripcionalmente activos pueden llegar a inducir recombinación homóloga entre el genoma del vector y el genoma *wild-type* (wt) de HIV-1. Esta situación se puede dar particularmente en individuos infectados con HIV²⁶. A su vez, el virus wt puede actuar como un virus *helper* y generar viriones que lleven el transgen, esparciendo la transducción más allá de la célula

blanco inicial²⁷. Alternativamente, otro efecto indeseado es la activación de genes celulares cercanos al sitio de integración, ya que debido a que los LTRs poseen tanto regiones promotoras como activadoras, la integración de los mismos puede activar genes celulares como proto-oncogenes²⁸. Es por estas razones, que los vectores SIN (por sus siglas en inglés, *self-inactivating*) han sido desarrollados. El genoma de un vector estándar está flanqueado por dos LTRs que contienen tres regiones: U3, R y U5 donde U3 actúa como promotor y activador. La duplicación de los LTRs ocurre durante la transcripción reversa en las células transducidas, en donde U3 del 3'-LTR es copiado y transferido al 5'-LTR. De esta forma, si parte de U3 en el 3'-LTR es eliminado, esta eliminación se transferirá luego al 5'-LTR, resultando en la inactivación transcripcional del LTR en el provirus. En efecto, mediante la eliminación de 299 pares de bases del 3'-LTR, Yu y colaboradores, fueron capaces de generar un vector retroviral SIN derivado de MLV²⁹. De la misma manera, este sistema fue aplicado a vectores basados en HIV-1 desarrollando un vector SIN de origen lentiviral³⁰.

Por su parte, a partir de los vectores de transferencia SIN, se desarrollaron LVs de tercera generación (ver **figura-6**). En estos, adicionalmente a la remoción de parte del U3 en el 3'-LTR, la región U3 del 5'-LTR en el vector de transferencia fue reemplazada por un promotor viral fuerte como el promotor de Citomegalovirus (CMV). Consecuentemente, la transcripción del genoma lentiviral se vuelve Tat-independiente, y este gen pudo también ser removido. Sumado a esto, el elemento Rev es proporcionado en un plásmido separado, además de *gag* y *pol*³¹. Por ende, los LVs de tercera generación poseen solamente tres de los nueve genes originales de HIV-1 y son generados a partir de cuatro plásmidos distintos.

Si bien los vectores SIN fueron desarrollados posteriormente a los LVs de segunda generación, estos se pueden usar con este sistema.

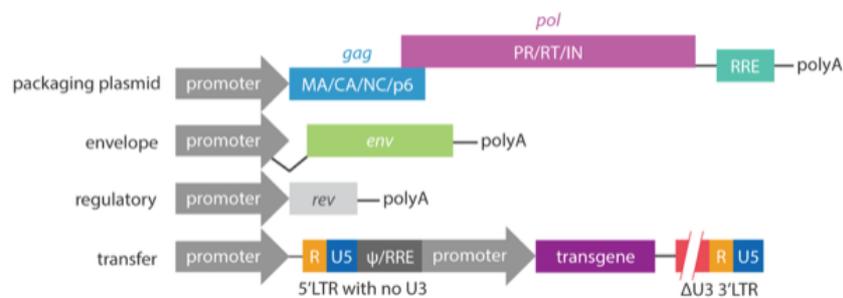


Figura-6. Esquema de vectores lentivirales de tercera generación. Tat es eliminada del sistema y se agrega un plásmido separado codificante de rev. A su vez, el vector de transferencia se transforma para ser *self-inactivating* SIN. Contiene tres de los nueve genes originales de HIV-1. Adaptado de www.abmgood.com.

Más recientemente, en 2017, se desarrolló lo que podría ser llamado un sistema de cuarta generación. Brevemente, estos LVs destacan debido a que varias señales esenciales como lo son Ψ y RRE se encuentran fuera del *backbone* viral, *downstream* del 3'-LTR. Estas señales, si bien están presentes en el ARN viral, son perdidas al ser retrotranscrito y por ende no son copiadas al provirus, aumentando aún más el nivel de bioseguridad. A su vez se demostró que este vector, llamado LTR1, es capaz de expresar el transgen significativamente más temprano en el tiempo que los vectores convencionales, además de sostener una expresión más prolongada³².

1.3. Panorámica de aplicaciones de los LVs

Los vectores lentivirales son capaces de transmitir la información desde su genoma hacia una célula blanco, en lo que podemos llamar *delivery* de genes. Dentro de lo que son sus aplicaciones en investigación, estos vectores han sido ampliamente usados para generar líneas celulares que expresen un transgen determinado de forma estable^{33,34}, o contrario a esto, para realizar silenciamiento de genes^{35,36}. Los LVs son capaces de transducir células presentes en distintos órganos y tejidos por lo que han sido vastamente utilizados en terapia génica. Entre estos se encuentran reportes de su uso en el sistema nervioso central (SNC)^{37,38}, hígado³⁹⁻⁴¹, músculo^{42,43}, células epiteliales^{44,45}, células del sistema inmune^{46,47} y médula ósea⁴⁸⁻⁵⁰, entre otras.

A continuación, se describirá brevemente sus aplicaciones y avances en la clínica.

1.3.1. Aplicaciones clínicas de los LVs

Además de su uso diario en el laboratorio, los LVs han sido ampliamente utilizados y aprobados tanto para enfermedades genéticas, como infecciosas, habiendo actualmente varios ensayos clínicos en desarrollo⁵¹.

En el año 2003, se empezó el primer ensayo clínico en humanos usando un LV codificante para un ARN anti-sentido contra el gen *env* de HIV-1. El estudio consistió de cinco pacientes catalogados como resistentes a la terapia anti-HIV. El vector fue utilizado para transducir células T-CD4⁺ *ex-vivo*, tras lo cual fueron re-infundidas en los pacientes⁵². Tras los buenos resultados de este estudio, otros dos ensayos clínicos se realizaron alcanzando un total de 65 pacientes en terapia. Cabe destacar que

no se detectaron efectos adversos en ninguno de estos pacientes, siendo algunos monitoreados hasta 8 años luego de la infusión de las células transducidas⁵³.

Recientemente, ha habido avances muy importantes en el campo de la inmunoterapia aplicada al cáncer. En especial, con el uso de células T modificadas genéticamente. Hay varios ensayos clínicos en progreso o recientemente finalizados utilizando células T autólogas transducidas con LVs para expresar un TCR específico de un antígeno tumoral. Por ejemplo, en noviembre de 2017, finalizó un estudio de fase II en dos pacientes con cáncer de esófago, los cuales fueron tratados con células T expresando un TCR específico contra el antígeno tumoral NY-ESO-1⁵⁴. De mayor interés para esta tesis, en la sección 2.3. se describirá el uso de un LV codificante para NY-ESO-1 para el tratamiento de sarcoma sinovial recurrente.

Otro estudio de fase I/II fue conducido con células T expresando un TCR anti-péptido derivado de los antígenos NY-ESO-1 y LAGE-1, en donde se observaron mejoras en algunos de los pacientes con mieloma múltiple⁵⁵. Además, se encuentra en progreso, un estudio con 22 pacientes con melanoma metastático los cuales son tratados con células T modificadas para expresar un TCR anti-MART-1^{56,57}.

Utilizando un método similar al reprogramado de TCRs en células T, últimamente se ha prestado atención al desarrollo de células CAR-T (del inglés: chimeric antigen receptor T cells). Estas células son modificadas genéticamente *ex-vivo* con un LV que codifica para un receptor quimérico CAR, que redirige a las mismas contra un cierto antígeno tumoral, al cual reconocen de manera TCR-independiente, y permite la activación de los mismos, aumentando su funcionalidad⁵⁸. El primer éxito en este campo fue cuando en 1989 se diseñó un receptor quimérico anti-2,4,6-trinitrofenil (TNP) que efectivamente dotó a las células T con una especificidad determinada, siendo a su vez, capaz de transmitir las señales de activación y mantener sus funciones efectoras⁵⁹. Desde la década de los 90 hasta hoy en día, este campo de investigación ha tenido un gran desarrollo, habiendo actualmente varios estudios clínicos en progreso^{58,60}.

Dentro de los estudios involucrando transducciones *ex-vivo*, se ha investigado el uso de células CAR-T contra el marcador CD20 en pacientes con tumores malignos en células B. Los ensayos clínicos utilizando estas células han demostrado tener una gran eficacia, con remisiones duraderas en un alto porcentaje de pacientes con leucemia linfóide aguda (ALL)⁶¹. En otro estudio, 90% de los pacientes con el mismo tipo de cáncer lograron remisión tras la administración de células CAR-T derivadas de células T-CD4 y células T-CD8⁶². Por otro lado, se han desarrollado estudios en pacientes con linfoma

no-Hodgkin usando células CD19-CAR-T rindiendo resultados promisorios⁶³. A su vez, intrínseco a la terapia anti-células-CD19⁺, se estudió el efecto de este tratamiento sobre el sistema inmune humoral de los pacientes. Se encontró que estos CAR-T pueden inducir remisiones completas, sostenidas en el tiempo durante el cual los niveles de inmunoglobulinas (Igs) aumentan y que la mayoría de los pacientes no necesitó reemplazo de Igs⁶⁴. Estos son solo algunos de los muchos ensayos clínicos que se están o fueron llevados a cabo, y que condujeron a la aprobación por la FDA de las terapias Kymriah™ and Yescarta™ basadas en células CAR-T contra el receptor CD19⁶⁵.

Sumando a sus aplicaciones en células T, varios LVs han sido aplicados para el tratamiento de enfermedades genéticas, particularmente en células CD34⁺. Por ejemplo, se han aplicado para la corrección de la deficiencia de la proteína ALD, causada por una enfermedad llamada adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X). Para esto, células CD34⁺ autólogas fueron transducidas *ex-vivo* y re-inyectadas en los pacientes, resultando en mejoras notables⁶⁶. Otro estudio, mostró que un paciente con β -talasemia, el cual era dependiente de transfusiones mensuales desde su niñez, logró la independencia de las mismas luego del tratamiento con un vector lentiviral codificante para la β -globina⁶⁷.

Por otra parte, otro exitoso ensayo clínico fue realizado en 3 pacientes con síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) caracterizado por mutaciones en el gen codificante de la proteína WASP que regula el citoesqueleto. En este estudio, se transdujeron células madre hematopoyéticas (HSCs) de forma *ex-vivo* con un vector codificante para WASP funcional antes de ser re-infundidas en los pacientes⁶⁸. Estos, tuvieron mejoras en el desempeño de sus funciones inmunes, aumento en el recuento de plaquetas y un mejor desempeño clínico. Además, no se observó integración del vector cerca de oncogenes ni expansión clonal aberrante⁶⁸.

A su vez, en 2010, nueve pacientes con leucodistrofia metacromática o MLD fueron tratados con un LVs codificante para la proteína arilsulfatasa A (ARSA), que logró la expresión estable de dicha proteína en HSCs, y en los primeros tres pacientes estudiados, impidió la manifestación o el progreso de la enfermedad entre los 7 y 21 meses de la predicción del inicio de los síntomas⁶⁹. Un estudio posterior, reveló que todos los pacientes mostraban una progresiva reconstitución de la actividad de ARSA en células hematopoyéticas circulantes y en el fluido cerebroespinal. A su vez, se constató una prevención de los síntomas o reducción en la progresión de la enfermedad en 8 de los 9 pacientes tratados⁷⁰.

Además de las modificaciones *ex-vivo*, los LVs también están siendo aplicados *in-vivo* para fines terapéuticos. Pacientes con degeneración macular fueron tratados con una inyección subretinal de LVs codificante para endostatina y angiostatina y aunque no se observaron cambios significativos en las lesiones oculares, se comprobó una expresión robusta y sostenida del transgen⁷¹.

La mayoría de las aplicaciones mencionadas anteriormente, tanto para la investigación como para ensayos clínicos ha usado LVs pseudotipados con VSV-G, punto que se discutirá en la siguiente sección.

1.4. Modificación del tropismo de LVs mediante pseudotipado

El tropismo de los virus envueltos está dictado por las glicoproteínas (GPs) presentes en su membrana. Basándose en esto, el blanco de los vectores retrovirales, incluyendo a los LVs, puede ser modificado o alterado mediante un proceso conocido como pseudotipado. Como se observa en la **figura-7**, los LVs pseudotipados consisten en partículas que llevan GPs foráneas insertas en su membrana, es decir, la envoltura de estos vectores proviene de otro virus envuelto⁷². Consecuentemente, estos vectores poseen una nueva especificidad dada por las GPs heterólogas. Actualmente, hay reportes de LVs pseudotipados con envolturas de virus pertenecientes a diversas familias¹⁸.

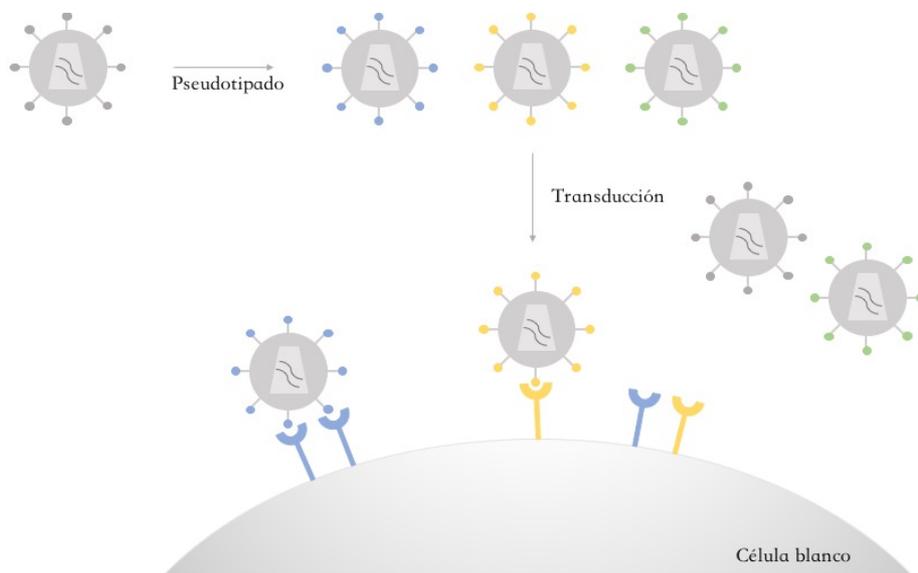


Figura-7. Vectores lentivirales pseudotipados. Los LVs se puede pseudotipar con envolturas de virus foráneos, es decir, el *core* lentiviral se rodea de envoltura de otro virus, formando una partícula recombinante. Como consecuencia, estos LVs pseudotipados son capaces de transducir células que expresen el receptor para el cual la nueva glicoproteína actúa como ligando.

El primer paso en la transferencia génica mediada por LVs es la entrada a la célula blanco. Las envolturas virales de los lentivirus contienen GPs, por ejemplo, la gp120/gp41 de HIV-1, que media la fusión entre la membrana viral y la membrana celular directamente en la superficie celular⁷³. El proceso de fusión es desencadenado inicialmente por el contacto entre gp120 y su receptor/co-receptor celular, lo que induce cambios conformacionales en esta proteína y, subsecuentemente, en gp41. Los cambios en gp41 exponen péptidos hidrofóbicos fusogénicos que se insertan en la membrana de la célula blanco y forma el poro de fusión al acercar las dos membranas⁷³. Los lentivectores generados con proteínas de la envoltura de otros lentivirus, entre ellas, gp160 (gp120/gp41), suelen rendir títulos bajos. Es por esta razón, que se comenzaron a utilizar GPs derivadas de otros virus, incluidos los retrovirus, para la generación de nuevos vectores pseudotipados^{22,23}. Específicamente, este proceso es posible, ya que la formación de la cápside lentiviral es independiente de la presencia de proteínas de la envoltura, de hecho, las cápsides ensambladas pueden formarse y brotar de la célula como cápsides “desnudas” (rodeadas de membrana celular pero sin proteínas virales insertas)⁷⁴. Por otro lado, el proceso permite, que cualquier proteína transmembrana que se encuentre presente en el sitio de brotamiento pueda ser incorporada en la partícula y desplegada en su superficie. Usualmente, para obtener vectores pseudotipados con alta capacidad de transducción (alto título), es de suma importancia que la o las proteína/s de la envoltura estén expresadas en altos niveles⁷⁴.

1.4.1. Pseudotipado de LVs con VSV-G

Como se mencionó anteriormente, en 1993, debido al requerimiento para transducir nuevos tipos celulares, se logró pseudotipar un vector retroviral con la proteína G del virus de estomatitis vesicular²². Desde ese momento hasta la actualidad, el pseudotipado de LVs con VSV-G ha sido ampliamente explotado para diversas aplicaciones tanto en investigación como en clínica, como se discutió anteriormente. El uso tan amplio del VSV-G para pseudotipar LVs y la alta tasa de transducción que permite, ha hecho a esta GP el estándar con el cual otras GPs usadas para pseudotipar son comparadas⁷².

El virus de estomatitis vesicular (VSV) es un miembro de la familia *Rhabdoviridae*, que se constituye de virus envueltos, con ARN simple cadena de sentido negativo⁷⁵. La proteína VSV-G presente en la membrana viral consiste en un trímero, que al unirse a su ligando desencadena un proceso de endocitosis mediada por receptor. De esta manera, la partícula viral es internalizada y transportada hacia compartimientos endosomales en donde se fusiona con la membrana endosomal y libera su

contenido hacia el citoplasma celular⁷⁶. Esto ocurre ya que la acidificación del endosoma produce cambios conformacionales (divididos en varias etapas) en la proteína de membrana, que finalmente permiten el despliegue de un dominio hidrofóbico que actúa como péptido fusogénico, encargándose de fusionar la membrana viral con la endosomal⁷⁷⁻⁷⁹. Si bien todavía no se conoce del todo los receptores reconocidos por la glicoproteína G, el receptor de LDL y otros miembros de la misma familia parecen ser los blancos principales^{80,81}, explicando en parte, el tropismo que tiene esta proteína por varios tipos celulares. Por otra parte, se ha propuesto a la fosfatidilserina (PS) como posible sitio de unión para VSV debido a que la presencia de la misma inhibió la unión e infectividad del virus⁸². Aunque esto fue cuestionado posteriormente⁸³, la interacción entre el VSV y la PS fue efectivamente comprobada⁸⁴.

Los LVs pseudotipados con VSV-G (VSV-G-LVs) son sumamente estables y permiten ser concentrados por ultracentrifugación rindiendo preparaciones de alto título^{22,85}. Estas propiedades, tanto su amplio tropismo como su alto título fueron explotados para lograr, entre otras cosas, la transducción de células muy resistentes a este proceso, como por ejemplo, las células neuronales⁸⁶, o células primarias del sistema nervioso central^{87,88}. A su vez, estos vectores se han utilizado para la transducción de células madres hematopoyéticas CD34⁺ tanto de origen murino como humano^{23,89-91}.

Sin embargo, el pseudotipado con VSV-G también posee varias desventajas. Por ejemplo, se ha demostrado que los VSV-G-LVs derivados tanto de HIV-1 como del virus de inmunodeficiencia felina (FIV) son inactivados por componentes del complemento presentes en el suero humano⁹². Además, la expresión estable de la proteína VSV-G es contraproducente para la célula productora debido a la alta citotoxicidad de la misma⁹³. Por otra parte, si bien el amplio tropismo de estos vectores puede ser considerado una ventaja, también puede ser contraproducente, por ejemplo, cuando se busca dirigir un vector hacia un determinado tipo celular. Efectivamente, cuando este fue administrado *in-vivo* por vía intravenosa (i.v.) en ratones BALB/c, se observó expresión del transgen en varios órganos, confirmando su amplia biodistribución⁹⁴. Estas desventajas han llevado a la exploración de alternativas como estrategia para superar las limitaciones del pseudotipado con VSV-G. Por ejemplo, en un estudio, se logró peguilar (agregado de polietilenglicol) a la proteína G logrando reducir la inactivación por suero en un factor de 1000 veces⁹⁵. Posteriormente, se logró generar mutantes de VSV-G mediante una biblioteca de mutagénesis que fueron resistentes a la inactivación por un panel de suero humano y animal⁹⁶.

Como otras alternativas, virus de distintas familias fueron utilizados para pseudotipar LVs, como por ejemplo los paramixovirus, de importancia en esta tesis.

1.4.2. Pseudotipado con paramixovirus

La familia *Paramyxoviridae* se compone de virus envueltos que portan un genoma de ARN simple cadena y sentido negativo. Todos los miembros de esta familia poseen dos proteínas de membrana: la glicoproteína de unión (hemaglutinina H, hemaglutinina-neuraminidasa HN, o glicoproteína G) y la glicoproteína de fusión (F), encargada de la fusión de las membranas viral y celular⁹⁷. Algunos miembros de esta familia poseen una proteína transmembrana pequeña (SH) adicional, y solo los paramixovirus J codifican para una cuarta proteína de membrana (TM)⁹⁷ (ver **figura-8**). En los paramixovirus, la interacción entre la glicoproteína de unión y su ligando celular es suficiente para desencadenar la fusión mediada a través de la proteína F, de esta manera permitiendo la entrada del virus a la célula. Se considera que los virus de esta familia fusionan su membrana directamente con la membrana celular a pH neutro, sin el requerimiento de endocitosis⁹⁸. Numerosos trabajos dedicados a dilucidar el mecanismo de entrada de estos virus apoyan la teoría de que luego de la unión del virus a su ligando celular, la glicoproteína de unión sufre cambios conformacionales que desencadenan cambios conformacionales en la proteína F, los cuales permiten el despliegue de un péptido de fusión hacia la membrana celular^{99,100}.

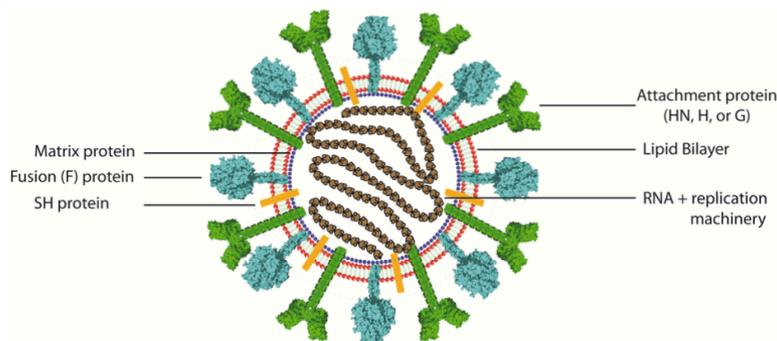


Figura-8. Estructura general de los paramixovirus. Estos son virus de ARN envueltos, que llevan insertos la proteína de unión (H, HN o G), la proteína de fusión F, y algunos miembros poseen otra pequeña proteína transmembrana SH. Adaptada de Chang et al., (2012).

Hay numerosos reportes de LVs pseudotipados con las GPs de paramixovirus. No obstante, a los efectos de esta tesis, nos vamos a centrar en el pseudotipado de lentivirus por dos paramixovirus muy conocidos: el virus del Sarampión (MV) y el virus del Nipah (NiV).

1.4.2.1. Pseudotipado con MV

El virus del sarampión es un virus altamente patogénico que pertenece al género *Morbillivirus*, de la familia *Paramyxoviridae*. En su membrana se encuentran insertas las proteínas de unión H (transmembrana tipo II) y la de fusión F (transmembrana tipo I), capaz de mediar fusión directamente con la membrana plasmática. De acuerdo al receptor de entrada a la célula, el MV puede ser dividido en las cepas *wild-type* (MV_{wt}) y las cepas de vacunación y manejadas en el laboratorio (MV_{vac})¹⁰¹. Ambas cepas comparten como ligandos celulares al receptor inmune SLAM, también llamado CD150¹⁰², y al receptor epitelial nectina-4^{103,104}. Adicionalmente, la MV_{vac} reconoce a la proteína reguladora de complemento CD46 como ligando¹⁰⁵, encontrada en todas las células nucleadas. Esto es debido a que el virus fue adaptado al crecimiento en líneas celulares para su uso en el laboratorio, lo que resultó en un proceso de adaptación, que permitió el uso de CD46 como receptor de entrada¹⁰¹. En los humanos, SLAM está expresado en linfocitos B y T activados, timocitos, células dendríticas maduras, monocitos y macrófagos, lo que explica el tropismo de este virus por células del sistema inmune y la inmunosupresión causada tras la infección¹⁰⁶. Por otra parte, la nectina-4 es un receptor de adhesión perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Este se puede encontrar, entre otros, en células epiteliales del sistema respiratorio, las cuales el virus utiliza para diseminarse^{103,104}. El uso de LVs pseudotipados con MV se discutirá más adelante en la sección 2.1.1.

1.4.2.2. Pseudotipado con NiV

El virus del Nipah constituye un virus zoonótico perteneciente al género *Henipavirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Este posee un tropismo extremadamente amplio siendo capaz de infectar murciélagos, caballos, cerdos, hámsters, perros y gatos además de humanos¹⁰⁷. Como en otros miembros de esta familia, la envoltura del NiV se caracteriza por poseer dos glicoproteínas, la de unión G (transmembrana tipo II) y la fusión F (transmembrana tipo I). La proteína G cumple la función principal de interactuar con los ligandos celulares, pero además de esto, es requerida para inducir la fusión de las membranas mediada por F directamente sobre la membrana plasmática¹⁰⁸. Actualmente se conocen dos receptores celulares que interactúan con la glicoproteína G, efrina-2^{109,110}, expresado ampliamente en varios tejidos, y efrina-3¹¹¹, expresado preferencialmente en determinadas regiones del CNS. El uso de LVs pseudotipados con NiV se discutirá más adelante en la sección 2.1.2.

1.5. Re-direccionamiento de LVs y sus vías de entrada a la célula

1.5.1. *Targeting* de LVs

Numerosas envolturas virales pueden y han sido usadas para pseudotipar LVs y mediar la transferencia génica preferencialmente hacia ciertos tipos celulares. Sin embargo, esta estrategia no permite elegir libremente el receptor de entrada del LV a la célula, y es por ello, que se han explorado estrategias para modificarlo. Mientras que estas envolturas confieren diversos tropismos, su especificidad depende del reconocimiento de ligandos dictado por la proteína de unión, que ha ido evolucionando y siendo seleccionada para infectar determinados tipos celulares, logrando diseminarse y propagarse entre poblaciones^{18,112}. Tomando las propiedades ofrecidas por la posibilidad de pseudotipado, durante los últimos años, varios grupos han desarrollado métodos para dirigir o re-dirigir LVs a células determinadas mediante la ingeniería de las proteínas de la envoltura, modificando físicamente las mismas para cambiar su receptor de entrada, proceso conocido como *targeting*¹¹³.

Dentro de las estrategias utilizadas, se incluye el pseudotipado de vectores con proteínas de envolturas modificadas, o la utilización de dominios de unión, esto es proteínas heterólogas que se unen específicamente a un ligando en la célula de interés, y que muchas veces corresponden a fragmentos de anticuerpos¹¹³. Como se muestra en la **figura-9**, la lógica detrás de este enfoque es simple; primero, el reconocimiento de receptores nativos por parte de la proteína de unión es destruido mediante mutaciones en los residuos de contacto, y segundo, se agrega un dominio de unión con capacidad de unirse con alta afinidad a la porción extracelular del receptor blanco¹¹². En la literatura, varios dominios de unión han sido explorados, desde anticuerpos anclados a la membrana a scFvs, DARPins y de especial interés para esta tesis, nanobodies.

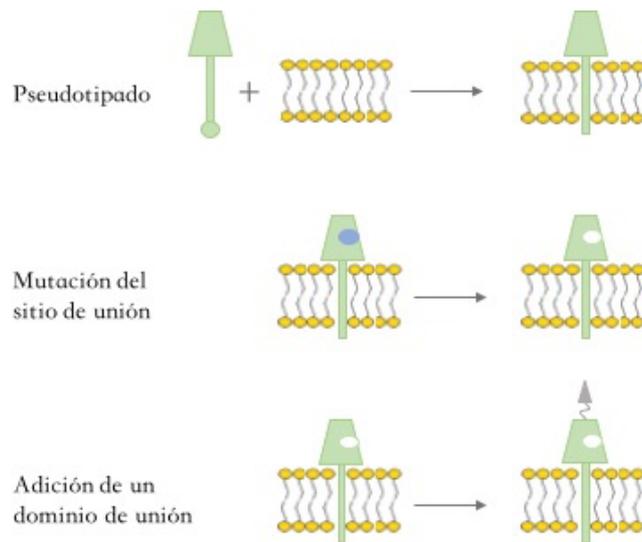


Figura-9. Estrategia de re-direccionamiento de vectores lentivirales. Primero se muestra el pseudotipado de LVs con una proteína de unión, en donde su cola citoplasmática (círculo verde pequeño) ha sido truncada. El reconocimiento de la proteína de unión por su ligando natural (motivo azul) es eliminado mediante una mutación puntual, resultando en un receptor “ciego”, o sin capacidad de reconocimiento. Posteriormente, se adiciona un dominio de unión (triángulo gris) que confiere una nueva especificidad de unión. Adaptada de Buchholz et al., (2009).

Los primeros intentos fueron realizados sobre vectores retrovirales. Efectivamente, mediante el agregado de scFvs al N-terminal de proteínas de envoltura retrovirales, fue posible alcanzar la unión específica del vector a su receptor blanco y por lo tanto su re-direccionamiento. Sin embargo, estos vectores fallaron en la capacidad de promover la fusión con la célula¹¹⁴. En los retrovirus, la proteína de la envoltura es responsable tanto de mediar la unión como de mediar la fusión y la manipulación de la misma para modificar su tropismo muchas veces afecta la funcionalidad del dominio de fusión y por tanto la capacidad de transducción. Además, el dominio de unión y el de fusión participan en la trimerización de la GP, lo cual agrega complejidad adicional¹¹⁵. Un claro ejemplo de fracaso fue la generación de un vector lentiviral que desplegara en su membrana la proteína G del VSV mutada y fusionada a un scFv. Si bien se observó la incorporación de la proteína G quimérica en LVs, los títulos del vector fueron considerablemente menores a aquellos pseudotipados con VSV-G, probablemente por una actividad fusogénica disminuida¹¹⁶.

Basados en esta experiencia, varios estudios lograron el eficiente re-direccionamiento de LVs en sistemas en donde la actividad fusogénica y la unión con el receptor celular se encuentran separadas, lo que se describirá más adelante en la sección 2.2.

1.5.2. Vías de entrada a la célula

Intrínseco a las GPs de la envoltura, los LVs podrán entrar a la célula por distintas vías, que dependen del mecanismo que desencadena la fusión. Generalmente, se distinguen dos vías principales: la vía endocítica mediante fusión con membranas endosomales y la vía no endocítica mediante fusión con la superficie celular.

Brevemente, como se muestra en la **figura-10**, una de las vías de entrada de los virus es mediante fusión directa con la membrana plasmática a pH neutro (**B**). Ejemplos de estos virus son los retrovirus o paramixovirus. En ambos casos, la fusión es mediada por el reconocimiento del receptor, es decir, cuando se da la interacción con el receptor celular, se producen cambios conformacionales que son transmitidos a los dominios o proteínas de fusión, que finalmente desencadenan los mecanismos de fusión (específicos de cada tipo de proteína) con la membrana plasmática. En cambio, otros virus, como los vesiculovirus, necesitan ser endocitados para mediar la fusión (**A**). Este proceso puede ser dependiente o independiente de la unión a un receptor celular y ocurre al pH de un compartimento endosomal dado. Se ha visto que existen numerosas vías de entrada (y mecanismos de fusión) dentro de la vía endocítica, por ejemplo, mediante la fusión con membranas de endosomas tempranos o tardíos, que puede ser, por ejemplo, dependiente del pH o de enzimas lisosomales^{117,118}.

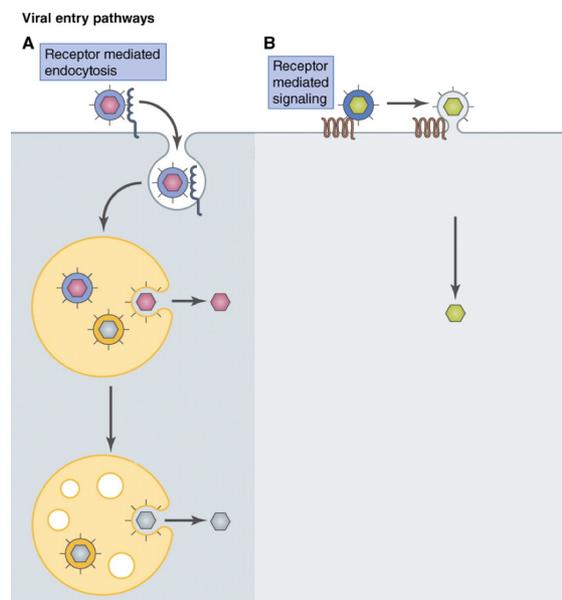


Figura-10. Diagrama esquemático de las vías de entrada de los virus a una célula tras la unión a su receptor. En el panel A, se describe la vía endocítica. En este caso, tras el contacto del virus con su receptor celular, se desencadena un proceso de endocitosis mediada por receptor que provoca la internalización de la partícula viral. Algunos virus se fusionan con endosomas tempranos (virus azul con cápside rosa) o tardíos (virus anaranjado con cápside gris). En el panel B se muestra

un virus que al reconocer su receptor, sufre cambios conformacionales que desencadenan la fusión directamente con la membrana plasmática, liberando su contenido al citoplasma celular. Adaptada de Grove et al., (2011).

Las vías de entrada de los distintos virus, y su necesidad de ser endocitados o no, es de particular interés a la hora de elegir el pseudotipado para el re-direccionamiento de LVs utilizando dominios de unión. Esto es porque la elección del receptor *target*, que dirige la vía de entrada a la célula (endocítica o no), dictará que pseudotipado mejor se adapta. Es decir, si dicho receptor es endocítico, se necesitará pseudotipar los LVs con las GPs de un virus que medie la fusión mediante la vía endocítica, en cambio, si el receptor no es endocítico, se deberá pseudotipar con una envoltura viral que medie la fusión en la membrana plasmática¹¹⁹.

1.6. VHHs como dominio de unión para el re-direccionamiento de LVs.

Además de los anticuerpos convencionales, los camélidos y algunas especies de peces cartilagosos presentan anticuerpos mono-dominio, caracterizados por la ausencia de la cadena liviana¹²⁰. Como se observa en la **figura-11**, el sitio de unión al antígeno está formado únicamente por el dominio variable de la cadena pesada, llamado VHH (o nanobody en su forma recombinante) en los camélidos. No obstante, la afinidad de unión a los antígenos, se mantiene similar a la de los anticuerpos convencionales¹²¹.

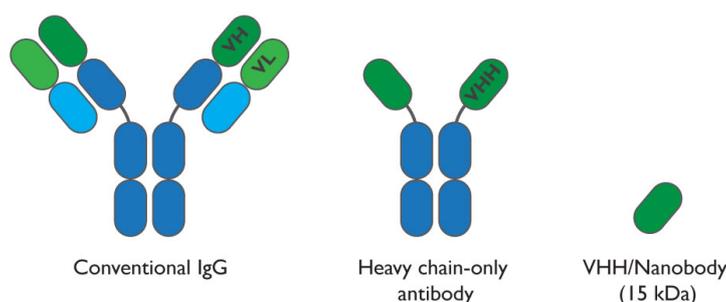


Figura-11. Diagrama esquemático de las estructuras de un anticuerpo convencional comparado con un anticuerpo de cadena pesada de llama. El anticuerpo convencional está formado por dos cadenas pesadas (azul oscuro) y dos cadenas livianas (azul claro), y el sitio de unión está formado por los dominios VH y VL. En cambio, los anticuerpos de cadena pesada de llama están compuestos solamente por dos cadenas pesadas (azul oscuro), las cuales poseen un dominio variable (VHH), encargado del reconocimiento del antígeno. Adaptada de cores.ukb.uni-bonn.de.

Una ventaja esencial desde el punto de vista de su obtención, es que la preparación de bibliotecas de expresión en fagos (*phage display*) de nanobodies se realiza con gran eficiencia¹²². En el caso de los anticuerpos convencionales, el apareamiento original de la cadena pesada y la liviana se pierde

fácilmente en las etapas de amplificación y clonado por lo que la probabilidad de encontrar el mismo apareamiento es muy baja, perdiendo así la especificidad original de los anticuerpos. En cambio, para los nanobodies, debido a su naturaleza de cadena simple, la especificidad del anticuerpo monodominio original se mantiene, por ende, se facilita su selección. Es por esta razón que la biblioteca de nanobodies puede ser varios órdenes menor a la de anticuerpos convencionales e igual mantener la representación del repertorio inmune original¹²². Por otro lado, el dominio VHH tiene alta similitud con el dominio variable de la familia VH3 de la cadena pesada de anticuerpos humanos, por lo que su inmunogenicidad sería muy baja. Sumado a esto, se han desarrollado estrategias para humanizar 12 de los 14 aminoácidos que difieren entre los VHHs de llama y el VH humano^{123,124}. Adicionalmente, otra propiedad interesante de los nanobodies es la existencia de un CDR3 largo y altamente flexible, lo que facilita la interacción con epítopes cóncavos como los que se encuentran generalmente en receptores celulares¹²⁵. Finalmente, las características de plegamiento independiente de los nanobodies hacen que puedan ser fusionados a otras proteínas sin alterar su funcionalidad^{122,126}. Otra posibilidad de los VHHs es la sencilla generación de construcciones biespecíficas o bivalentes en la que se fusionan dos VHHs con igual o distinta especificidad, siendo estos totalmente funcionales¹²⁷.

Debido a estas razones, los nanobodies son una interesante alternativa para ser utilizados como dominio de unión a células en sistemas de re-direccionamiento de LVs. Por ejemplo, estos fueron usados para el *targeting* de APCs¹²⁸, punto que se discutirá en la sección 2.3. Otra demostración del empleo de nanobodies en el re-direccionamiento de lentivectores lo constituye el uso de un VHH anti-VEGFR2 en un SINDV-LV¹²⁹. Particularmente, en este estudio, se insertó el nanobody en el sitio de unión de la proteína E2 del SINDV. Este vector fue capaz de transducir preferencialmente células HEK293T/KDR (VEGFR2⁺) con un porcentaje *off-target* de 1-2%¹²⁹.

1.7. *Targeting* a células dendríticas (DCs) como método de vacunación

1.7.1. Vacunas y células dendríticas

La vacunación es el método más efectivo de prevenir infecciones. En las vacunas convencionales, la formulación del antígeno se administra en el sitio de inoculación donde promueve la activación de las células de la inmunidad para dar inicio a la respuesta protectora. En esta situación, el antígeno debe ser captado por las DCs lo cual ocurre mediante procesos como la pinocitosis, o la fagocitosis mediada por receptores de reconocimiento de patrones asociados a patógenos (PRRs) o de fragmentos del complemento. En gran medida, la eficacia de la vacunación dependerá de cómo ocurre esta captación

y la activación de las DCs. Los LVs con tropismo por estas células han sido postulados como formas alternativas y potencialmente más directas de "cargar" antígenos y activar las DCs, y ha sido uno de los temas de estudio de esta tesis.

Las vacunas se pueden clasificar en dos tipos principales, preventivas o terapéuticas; mientras que las primeras son diseñadas para bloquear la infección, las segundas están desarrolladas para erradicar la causa de infección¹³⁰. De la misma manera, la respuesta del sistema inmune puede ser clasificada en dos grandes tipos, la inmunidad innata y la adaptativa, y a su vez, dentro de la última se pueden encontrar la inmunidad humoral y la celular¹³¹. La inmunidad humoral, se refiere a la protección mediada por anticuerpos, mientras que la celular se centra principalmente en la acción de los linfocitos T. La inmunidad generada por una vacuna eficiente, probablemente sería una combinación de una fuerte respuesta de anticuerpos con una fuerte respuesta celular. A lo largo de la historia, han habido numerosos éxitos en el campo de la vacunología, como contra la viruela, hepatitis B, tétanos y sarampión, entre otros^{132,133}. Sin embargo, muchos otros intentos han fracasado, como el caso de HIV y cáncer, aunque numerosos ensayos clínicos y desarrollos novedosos están siendo llevados a cabo^{134,135}. En algunos casos, estos fallos podrían estar asociados a que la mayoría de las vacunas suelen promover la generación de anticuerpos protectores y células B de memoria, pero fallan en la generación de una respuesta celular T-CD8⁺ robusta¹³⁶, y justamente el tipo de respuesta T-CD8⁺ es especialmente requerida en infecciones por patógenos intracelulares (por ejemplo, HIV) o en cáncer¹³⁷.

En la generación de una respuesta inmune adaptativa eficiente las células dendríticas tienen un rol esencial, debido a que son las encargadas de activar a los linfocitos T vírgenes. Las DCs inician y dirigen la respuesta del sistema inmune, siendo capaces de integrar las señales provenientes del sistema inmune innato y transmitir las a las células del sistema inmune adaptativo¹³⁸. El proceso de tomar un antígeno, degradarlo y cargarlo en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) se conoce como presentación de antígenos, y su rol es crítico para la generación de una respuesta inmune protectora, tanto humoral como celular. Mediante este proceso, las DCs inducen y regulan la inmunidad contra patógenos y promueven la tolerancia a antígenos propios y microorganismos comensales¹³⁹ (ver **figura-12**).

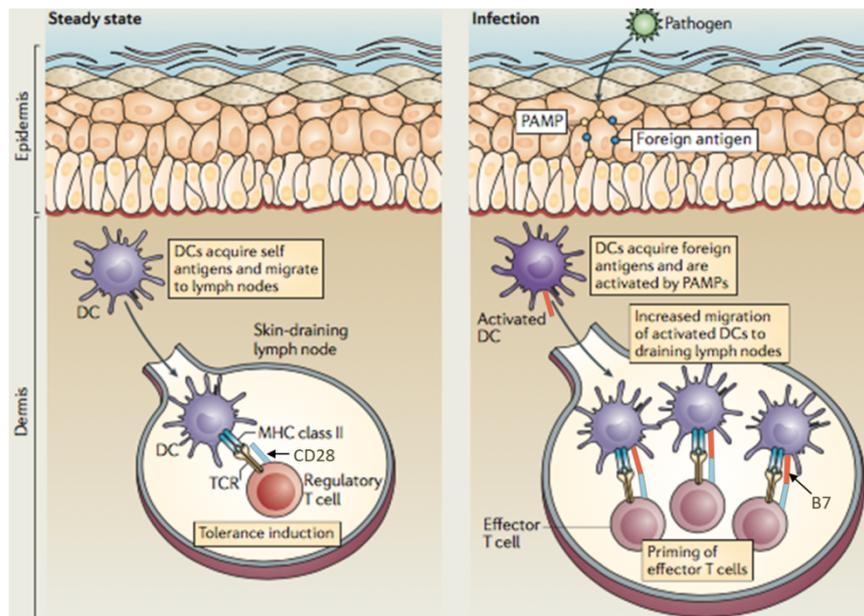


Figura-12. Inducción de respuestas T. En ausencia de infección (panel de la izquierda), las DCs participan en la tolerancia de células T mediante presentación de antígenos propios, sin co-estimulación (carencia del ligando B7), a células T, lo que induce muerte, anergia o funciones regulatorias de los mismos. En cambio, durante una infección (panel de la derecha), los estímulos inflamatorios inducen la expresión de las moléculas de co-estimulación B7(1 y 2) que activan a la DC a través de CD28, promoviendo la expresión de receptores para quimioquinas que provocan la migración de las DCs maduras a los órganos linfoides donde interactúan con los células T, activándolos. Adaptada de Summers deLuca et al., (2012).

Brevemente, ante la presencia de un estímulo inflamatorio, por ejemplo, derivado de un patógeno, las DCs sufren un proceso conocido como maduración, el cual está asociado con grandes cambios morfológicos y funcionales que inducen la capacidad de estas células de activar células T¹⁴⁰. Los estímulos inflamatorios son detectados por las DCs a través de PRRs, entre los que se encuentran los receptores transmembrana tipo-Toll (TLRs) y tipo lectina-C (CLRs), además de complejos citoplasmáticos como los receptores tipo RIG-1 (RLRs) y los receptores tipo NOD (NLRs)¹⁴¹. En cuanto se da el reconocimiento de un estímulo inflamatorio por parte de los PRRs, se activan cascadas de vías de señalización intracelulares que tienen como consecuencia la regulación de la transcripción de genes asociados a la inflamación, como las citoquinas pleiotrópicas interlequina (IL)-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)¹⁴¹. Estas DCs activadas y maduras se caracterizan por la alta expresión de las moléculas MHC I y MHC II en su membrana, además de moléculas accesorias y co-estimuladoras, como CD80 (B7₁), CD86 (B7₂), CD40, ICAM-1, ICOS-L, 4-1BB-L y OX40-L que son necesarias para la interacción con linfocitos T (ver figura-13). A su vez, se caracterizan por un incremento en la presentación de antígenos y secreción de citoquinas y quimioquinas específicas^{139,142}. Estas DCs maduras, migran a los órganos linfoides donde presentan péptidos derivados de antígenos a linfocitos T para iniciar una respuesta inmune. Más en detalle, existen dos vías principales por las

cuales las DCs pueden presentar antígenos peptídicos a células T-CD8⁺ a través del MHCI o T-CD4⁺ a través del MHCII. La carga de antígenos en el MHCI es generalmente de péptidos endógenos, es decir, presentes en el citosol de las DC. No obstante, estos péptidos pueden tanto provenir de proteínas propias degradadas o de proteínas de patógenos intracelulares como los virus y algunas bacterias. Por otra parte, los péptidos cargados en el complejo de MHCII son generalmente exógenos, derivados de antígenos presentes en las vías endocíticas^{140,143}. Sin embargo, mediante un proceso conocido como presentación cruzada, es posible que se carguen antígenos exógenos, internalizados por distintas vías, en moléculas de MHCI.

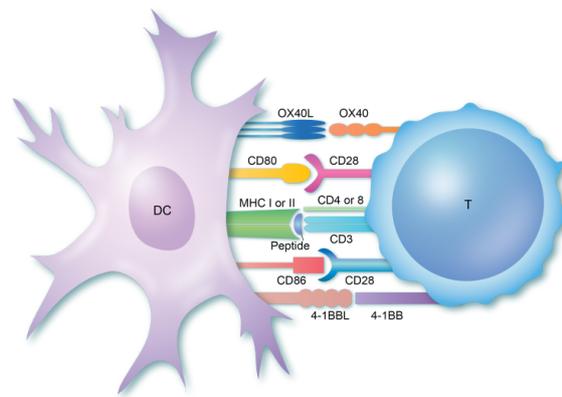


Figura-13. Esquema resumido de co-estimulación de células T. Además de la interacción entre MHCI/MHCII en la DC con TCR-CD8/CD4 en los linfocitos T, para la correcta activación de los linfocitos, se tiene que dar lo que se conoce como co-estimulación. Esta se da por interacción entre moléculas co-estimuladoras en DCs (por ejemplo: OX40-L, CD80, CD86 y 4-1BBL) y receptores co-estimulatorios en linfocitos T (por ejemplo: OX40, CD28 y 4-1BB, respectivamente). Adaptada de www.immunology.org.

1.7.2. Vías de activación de NF-κB

La compleja vía de señalización que acompaña la activación de las DCs ha sido foco de atención debido a la posibilidad de intervenir en la misma utilizando vectores que pudieran modular su activación ejerciendo una función como adyuvante, definidos como componentes que ayudan a la activación del sistema inmune y aumentan la capacidad de protección¹⁴⁴.

De entre los complejos de factores de transcripción que regulan la expresión de genes tras la activación de los PRRs, uno de los más estudiados es el factor nuclear κB (NF-κB). Se ha demostrado que la eficiente presentación de antígenos por las DCs en un contexto inflamatorio es dependiente de NF-κB, ya que el bloqueo de la activación por este factor induce una disminución en la expresión de

MHCII, así como de CD80, CD86 y CD40 y una baja en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12 y TNF- α ¹⁴⁵.

La familia de factores inducibles de NF- κ B incluye a los miembros NF- κ B1 p50, NF- κ B2 p52, RELA (también llamado p65), RELB y c-REL. NF- κ B1 p50 y NF- κ B2 p52 son producto de los precursores p105 y p100, los cuales contienen una región que funciona como inhibidores de NF- κ B. La degradación proteasómica de p105 y p100 resulta en las proteínas p50 y p52. Se conocen dos vías de activación de NF- κ B: la vía canónica y la no canónica. La primera media la activación a través de NF- κ B1 p50, RELA y c-REL, mientras que la segunda lo hace a través de NF- κ B2 p52 y RELB^{146,147}.

Brevemente, como se muestra en la **figura-14**, la vía canónica es desencadenada por una gran variedad de receptores inmunes que activan la quinasa TAK1. Esta quinasa activa el complejo trimérico IKK (formado por IKK α , IKK β e IKK γ) mediante fosforilación de la subunidad IKK β . Una vez activado el complejo IKK, este fosforila miembros de la familia de inhibidores de κ B (I κ B), como I κ B α o la molécula tipo-I κ B p105, que cumplen la función de secuestrar a los miembros de NF- κ B en el citoplasma. I κ B α se asocia con dímeros de p50 y miembros de la familia REL (RELA o c-REL), mientras que p105 se asocia con monómeros de p50 o REL (RELA o c-REL). Al ser fosforilados, I κ B α y p105 son ubiquitinizados y degradados en el proteasoma, resultando en la translocación nuclear de los miembros canónicos de NF- κ B, que se unen a elementos específicos en el ADN en forma de dímeros de p50-p50, p50-RELA o p50-c-REL, siendo capaces de activar la transcripción de genes específicos^{146,147}. Por otro lado, la vía no canónica está basada en el procesamiento de p100, una molécula tipo I κ B que, predominantemente, aunque no exclusivamente, regula RELB. Esta vía, responde a un conjunto de miembros de la superfamilia de receptores de TNF (TNFR) que activan la quinasa inductora de NF- κ B (NIK), de vital importancia. En células no estimuladas, la activación no canónica de NF- κ B está limitada debido a la degradación proteasomal de la NIK que es continuamente ubiquitinada por la ubiquitin:NIK E3 ligasa¹⁴⁸. Tras el estímulo celular, la NIK fosforila y activa IKK α , que consecuentemente fosforila a p100, desencadenando la degradación selectiva del mismo, generando la subunidad p52 y liberando al factor RELB, que son traslocados al núcleo para dirigir la transcripción de genes^{146,147}.

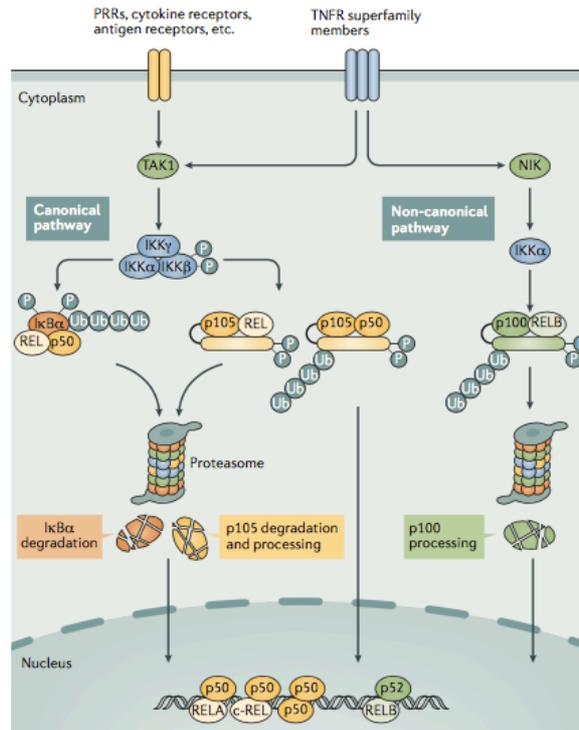


Figura-14. Vías de activación de NF-κB. La activación de NFκB puede darse principalmente por dos vías: la canónica y la no canónica. La primera es dependiente de la activación del complejo IKK mediante la quinasa TAK1, que consecuentemente induce la degradación de los inhibidores de κB, permitiendo la liberación y subsecuente asociación de sus componentes p50, RELA y c-REL que migran al núcleo y dirigen la transcripción de genes asociados a la activación. Por otra parte, la vía no canónica es dependiente de la quinasa NIK que fosforila principalmente IKKα que provoca la generación de p52 y liberación de RELB, que se traslocan al núcleo y actúan como factores de transcripción para genes específicos. Adaptada de Sun et al., (2017).

Sin embargo, a pesar de que existen dos vías de activación de NF-κB definidas, se ha demostrado entrecruzamiento entre ellas. Particularmente, se ha observado que si bien el sustrato principal de la enzima NIK es IKKα, ésta también es capaz de interactuar con IKKβ¹⁴⁹. Por lo tanto, la noción de que NIK no es requerida para la activación por la vía canónica es engañosa, ya que se ha demostrado que la NIK es necesaria para la señalización de receptores que activan ambas vías. En esta línea de pensamiento, se demostró el rol de la NIK en la amplificación de señales bajo la activación de la vía canónica. A su vez, se reportó que la sobre-expresión de NIK induce la vía canónica de activación de NF-κB^{150,151}.

1.7.3. Targeting a células dendríticas

Por las razones mencionadas anteriormente, y por el hecho de que las DCs son células presentadoras de antígeno muy eficientes, es que en los últimos años se ha recurrido al *targeting* de dichas APCs

como método de vacunación para aquellos casos en donde las vacunas convencionales no han rendido buenos resultados¹⁴³. Especialmente, el rol crítico de las DCs en la activación de linfocitos T-CD8⁺ las hace un blanco muy atractivo para la vacunación contra patógenos intracelulares o enfermedades en donde la inmunidad humoral generalmente generadas por las vacunas convencionales, aunque complementaria, no es suficiente¹⁴³. Lógicamente, la molécula de superficie elegida para el *target* debería ser lo más específica posible de células dendríticas. Aunque hay distintos marcadores utilizados para diferenciar DCs de otras poblaciones, como CD11c, pero también DC-SIGN, Clec9A y DEC205, ninguno de ellos es completamente exclusivo de DCs. Sin embargo, el alto nivel de expresión de estas moléculas de superficie sobre las DCs apoya su uso como forma de direccionamiento^{152,153}.

La lógica de direccionar los antígenos a células dendríticas se basa en la concomitante disminución en la dosis necesaria para inducir respuesta, lo cual contribuiría a disminuir los efectos *off-target* reduciendo el riesgo de reacciones adversas, como respuestas autoinmunes, inducción de tolerancia o el síndrome de secreción de citoquinas sistémico¹⁵⁴. En este sentido, el co-direccionamiento del antígeno con el adyuvante es de suma importancia ya que por ejemplo, la activación de APCs a través de estímulos de TLRs en ausencia de suficiente cantidad de antígeno puede inducir respuestas autoinmunes, o la sobre-estimulación de ciertos tejidos no fagocíticos puede inducir la secreción de citoquinas de forma sistémica y la consecuente destrucción de órganos¹⁵⁴. Por otro lado, se ha visto que el suministro de antígeno en ausencia de co-estimulación en un modelo de re-direccionamiento de antígenos a DCs puede inducir tolerancia en lugar de protección¹⁵⁵.

Si bien se han reportado varios enfoques para el re-direccionamiento de antígenos a DCs, como lo es el uso de anticuerpos anti-DCs conjugados a antígenos¹⁵⁶, una de las principales alternativas es el uso de vectores virales¹⁵⁷, y de mayor interés en esta tesis, de lentivectores que expresen en su membrana un dominio de unión a un receptor celular junto a una proteína de fusión, lo que se discutirá en la sección 2.3.

2. Antecedentes

2.1. Pseudotipado de LVs con paramixovirus

En esta sección se discuten antecedentes relacionados al pseudotipado con paramixovirus debido a que en esta tesis se trabajó con formas modificadas de las GPs de MV y NiV para pseudotipar LVs.

2.1.1. Pseudotipado con MV

Dentro de la familia *paramyxoviridae*, el pseudotipado con MV fue extensamente explorado. En 2008, se demostró que la cepa Edmonston (Ed) perteneciente al grupo de MV_{vac} podía ser utilizada para pseudotipar LVs. Este grupo realizó un *screening* de distintas mutantes de H y F con distinto largo de la cola citoplasmática, observando que los vectores con mayor título se generaron cuando se truncaban 18 aminoácidos de la cola citoplasmática de H ($Hc\Delta 18$) y 30 de la de F ($Fc\Delta 30$). Estos MV_{Ed} -LVs fueron exitosos en la transducción de varias líneas celulares como las HT1080, HEK293T, A-431 y A3.01¹⁵⁸.

En el mismo año, un grupo francés generó MV_{Ed} -LVs. Estos LVs mediaron una transferencia eficiente en células $CD46^+$ y/o $SLAM^+$, entre las que se encuentran las HEK293T, Jurkat, Raji y B95. A su vez, los MV_{Ed} -LVs superaron a los VSV-G-LVs en la transducción de linfocitos T primarios pre-estimulados con IL-7 y de linfocitos T quiescentes¹⁵⁹.

Posteriormente, el primer grupo que logró generar los MV_{Ed} -LVs, demostró que también era posible el pseudotipado de LVs con las envolturas de los MV_{wt} , confirmando a su vez, que estos vectores conferían mayor especificidad debido a la falta de reconocimiento del receptor ubicuo CD46. Estos vectores rindieron títulos de hasta un orden mayor que los MV_{vac} -LVs y permitieron la discriminación entre células $SLAM^-$ y $SLAM^+$. A su vez, los MV_{wt} -LVs permitieron la transducción de células epiteliales del tejido respiratorio, PBMCs y de un cultivo primario de linfocitos B primarios con mayor eficiencia que los VSV-G-LVs¹⁶⁰.

El grupo francés demostró luego, que los MV_{Ed} -LVs eran también capaces de mediar la transferencia génica a linfocitos B no estimulados, sin causar activación, entrada al ciclo celular ni cambios fenotípicos. A su vez, estos LVs también permitieron la transducción de células B-CLL, un tipo celular

que se mantenía resistente a la transducción por LVs hasta el momento¹⁶¹. Por otra parte, se comprobó que los MV_{Ed}-LVs transducen eficientemente las células dendríticas derivadas de monocitos (MDDCs) utilizando los receptores SLAM, CD46 y DC-SIGN, en contraparte a los estudios realizados con VSV-G-LVs, que rindieron bajas eficiencias. A su vez, estos vectores no indujeron la expresión de marcadores de activación o maduración en las MDDCs, demostrando su potencial aplicación¹⁶². Recientemente, los MV_{Ed}-LVs demostraron transducir el 100% de un cultivo de células humanas CD34⁺ estimuladas por citoquinas y hasta un 70% de células sin estimular. Más interesantemente, estos permitieron la corrección genética de anemia Fanconi en células derivadas de pacientes¹⁶³.

2.1.2. Pseudotipado con NiV

Debido al carácter altamente patogénico de este virus y el requerimiento de un laboratorio con alta bioseguridad para su manejo y estudio, en 2010, se generaron LVs pseudotipados con las proteínas G y F del NiV (NiV-LVs). Estos fueron capaces de reconocer y mediar transducción en células U87, HOS74X4 y HEK293T¹⁶⁴. En estudios posteriores, se tomó provecho de la afinidad del orden de picomolar de la proteína G de NiV por el receptor efrina-B2. Se logró optimizar el título de los NiV-LVs mediante el truncamiento de la cola citoplasmática de F y el uso de G sin modificar. Estos LVs lograron transducir células madres de origen neural, hematopoyético y embrionario. Además, se comprobó su eficiencia *in-vivo*, al inyectar ratones por vía intravenosa y detectar transducción en bazo y pulmones¹⁶⁵. En el mismo año, se demostró que para poder producir NiV-LVs con alto título es necesario tanto el truncamiento de la cola citoplasmática de F como de G. A su vez, se observó que estos LVs podían transducir células primarias endoteliales como las HUVEC¹⁶⁶.

2.2. Sistemas de *targeting* de LVs

La modificación de los LVs ha permitido la exploración de un sinfín de propiedades ofrecidas por estos vectores, entre las que destaca su uso en re-direccionamiento. Uno de los primeros éxitos de *targeting* de LVs hacia células específicas lo constituye el desarrollo de un vector derivado de HIV-1 pseudotipado con la envoltura del virus Sindbis modificada con la adición del dominio ZZ de unión a receptores Fc de la proteína A (SINDV-ZZ). De esta forma, se puede agregar un anticuerpo monoclonal (mAc) a elección y realizar *targeting* del ligando reconocido por el mAc. Este enfoque demuestra flexibilidad a la hora de elegir el target celular debido a que se puede realizar con cuantos mAc se disponga. El SINDV-ZZ-LV fue capaz de transducir en su mayoría a células CD4⁺ cuando se le agregó un mAc-anti-CD4¹⁶⁷. Posteriormente, el mismo grupo, continuó investigando variantes

mutadas del SINDV y logró indentificar la llamada m168 que presentó un tropismo endógeno mínimo (es decir mínimos efectos *off-target*). Al SINDV-m168-LV se le agregó un mAc-anti-glicoproteína-P y se utilizó el vector para demostrar *targeting in-vivo* a células de melanoma metastático¹⁶⁸ y posteriormente se usó el mismo sistema para realizar *targeting* a células CD133⁺, ABCG2⁺ y/o HLA-1⁺¹⁶⁹. Sin embargo, de acuerdo a los autores, una limitación de esta tecnología sería su uso en personas inmunocompetentes, las que tendrían concentraciones normales de anticuerpos circulantes que podrían competir con el mAc por la unión al dominio ZZ en el LV¹⁶⁸.

Como el virus del SINDV posee dominio de unión y fusión en la misma proteína, la manipulación del mismo puede afectar su capacidad de fusión. Es por esta razón que se comenzaron a explorar opciones en la que la generación de especificidad en la partícula viral no influya sobre su potencial fusogénico. Por ejemplo, en 2006 se describió un lentivector que llevaba inserto en su membrana, por una parte, una proteína de origen viral con actividad fusogénica pero deficiente en unión, y por otra parte, un mAc modificado mediante el agregado de una región transmembrana^{170,171}. Este grupo, utilizó la proteína del SINDV competente en fusión, pero deficiente en unión y en su lugar, un anticuerpo anti-CD20 como molécula generadora de especificidad. Este vector fue exitoso en la transducción de linfocitos B primarios *in-vitro* y fue capaz de transducir células CD20⁺ luego de la inyección intravenosa en ratones, con mínimos efectos *off-target*^{170,171}. En contraparte a los intentos anteriores, una ventaja importante de este modelo es que la proteína de fusión mantiene su actividad biológica completa por lo que los títulos de los vectores no se ven disminuidos¹¹⁵. Luego, este sistema se expandió tanto a otros ligandos celulares, como a otros dominios de unión, ya que se demostró el *targeting in-vivo* de linfocitos T-CD3⁺ y de células CD117⁺ al incorporar en los vectores, un mAb-anti-CD3 y el factor de células madres respectivamente^{172,173}.

2.2.1. *Targeting* mediante la modificación de GPs de MV

Si bien los SINDV-LVs descritos anteriormente demostraron ser eficientes para el direccionamiento “a medida” de LVs, una gran desventaja de este modelo es el requerimiento de la endocitosis de la partícula viral. Esto ocurre debido a que la fusión del SINDV se dispara a pH ácido luego de ser endocitado¹¹⁴ y por tanto solo los receptores endocíticos podrían utilizarse como blancos. Contrariamente, en los paramixovirus la fusión es pH-independiente y ocurre directamente sobre la membrana celular. Además poseen dos glicoproteínas separadas con funciones específicas de unión y de fusión¹¹⁴, esto último permite eliminar o modificar la especificidad de unión original, sin introducir modificaciones en la proteína que lleva adelante el proceso de fusión.

Por primera vez, en 2008, se demostró que LVs con las proteínas H y F del MV_{vac} podían ser utilizadas para conferir especificidad y *delivery* específico de genes a determinadas células blanco. El grupo alemán que trabajó en este tema, realizó un *screening* de 15 mutantes de H y 2 mutantes de F a las que se le removieron aminoácidos de la cola citoplasmática, logrando identificar aquellas que mejor se expresaron en la membrana, llamadas Hmut (HcΔ18) y F30 (FcΔ30) respectivamente¹⁵⁸. Para realizar *targeting*, se utilizó una variante de H previamente descrita que posee mutaciones en 4 aminoácidos (Y481A, R533A, S548L, F549S), las cuales eliminan el reconocimiento de los receptores SLAM y CD46¹⁷⁴. A esta proteína, de ahora en más, Hmut, se le fusionó en su extremo C-terminal el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o un scFv-anti-CD20, resultando en las construcciones MV-Hmut^{EGF}-LV o MV-Hmut^{scFV-CD20}-LV. Ambos fueron testeados contra células CHO-SLAM y CHO-CD46 para descartar la transducción mediante los receptores nativos y a su vez se constató la correcta transducción de células CHO-EGFR (con expresión del receptor de EGF) utilizando el MV-Hmut^{EGF}-LV y la transducción de CHO-CD20 y HT1080-CD20 utilizando el MV-Hmut^{scFV-CD20}-LV¹⁵⁸. Adicionalmente, el MV-Hmut^{scFV-CD20}-LV fue testado versus las líneas celulares K-562 (de origen mieloide, CD20⁻) y Daudi (linfocitos B, CD20⁺), constatando la insignificante transducción de la primera, de 0,3% vs 20,6% de transducción en células Daudi. A su vez, se comprobó que este vector fue capaz de mediar la transferencia génica de un gen suicida casi exclusivamente a células CD20⁺ cuando se mezclaban en una relación 1:1 de CD20⁺:CD20⁻. En otro experimento, se comprobó la eficiente transducción del MV-Hmut^{scFV-CD20}-LV en cultivo primario de linfocitos B humanos, demostrando ser más efectivo que los VSV-G-LVs¹⁵⁸. Dos años más tarde, el mismo sistema fue utilizado contra los targets CD105 de células endoteliales^{175,176}, CD133 en células hematopoyéticas^{175,177,178} y GluA presente en neuronas, alcanzando alta eficiencia y especificidad en los tres casos, y en el caso de células GluA⁺, superando al VSV-G-LV¹⁷⁵. A su vez, este sistema se utilizó para generar un MV-Hmut^{scFV-CD8}-LV que fue capaz de transducir específica y exclusivamente a células T-CD8⁺ utilizando como transgen TCR-anti-tirosinasa. Estos linfocitos T-CD8⁺ modificados con los LVs, interesantemente, no solo fueron capaces de matar células de melanoma expresando el antígeno tirosinasa, sino que lo hicieron en forma más eficiente y reproducible que las mismas células modificadas con otros LVs convencionales¹⁷⁹.

Si bien los scFvs probaron ser exitosos, como alternativa a estos, se exploró el uso de otros dominios de unión. Con el uso de DARPins específicas de Her2/neu fusionadas a Hmut, el grupo alemán fue capaz de transducir células Her2/neu⁺ casi exclusivamente, en contraposición a los vectores de VSV-G-LVs¹⁸⁰. Se demostró que el nivel de incorporación de las DARPins en los vectores fue mayor que el

alcanzado por los scFv anti-Her2/neu y anti-CD20. A su vez, al ser directamente comparado con un scFv-anti-Her2/neu (4D5), dos de las DARPins que reconocen el mismo dominio del receptor y con similar afinidad, mediaron la transferencia génica entre 10 y 30 veces mejor que el fragmento de anticuerpo¹⁸⁰. Más tarde, el mismo grupo generó MV-LVs con la incorporación de una DARPIn específica de CD4 humano¹⁸¹. Este MV-Hmut^{DARPIn-CD4}-LV demostró transducir *in-vitro* células Molt4.8 (CD4⁺) y un cultivo primario de PBMCs con transducción exclusiva de células CD4⁺. Se demostró, a su vez, que este fue capaz de transducir células CD4⁺ en modelos de ratones injertados con PBMCs humanas y en un modelo de ratón humanizado. Además, se constató su potencial en aplicaciones de terapia génica al demostrar la incorporación de distintos transgenes en contextos de infección por HIV-1, cáncer y de generación de linfocitos T regulatorios¹⁸¹.

2.2.2. *Targeting* mediante la modificación de GPs de NiV

Si bien los MV-LVs probaron ser exitosos en la transferencia génica específica de múltiples tipos celulares, estos vectores rinden títulos moderados y son parcialmente susceptibles frente a anticuerpos neutralizantes inducidos en la vacunación, por lo que dificultaría su aplicación repetida en terapia génica¹⁸². Aunque esto último no resultó ser un problema al usar LVs pseudotipados con la envoltura del virus de Tupaia (TPMV), los títulos fueron todavía menores¹⁸³.

Para poder superar los problemas de los sistemas de MV- y TPMV-LVs, el grupo alemán, desarrolló por primera vez en 2016, LVs pseudotipados con la envoltura del NiV para realizar *targeting* celular¹⁸⁴. En este trabajo, se generaron y caracterizaron distintas variantes de las proteínas G y F del NiV con la cola citoplasmática truncada, encontrándose, que las proteínas que mejor se lograron expresar en la membrana fueron F22 (FΔ22) y GΔ34. A su vez, se fusionó GΔ34 a una DARPIn específica contra EpCAM y se comprobó la eficiente incorporación tanto de GΔ34^{EpCAM} como de F22 en las partículas lentivirales y la transducción de células CHO-EpCAM. Como GΔ34^{EpCAM} todavía poseía la capacidad de reconocimiento de sus ligandos naturales, se analizaron distintas mutaciones en residuos de contacto que permitieron identificar una GΔ34 mutante para 4 aminoácidos (E501A, W504A, Q530A, E533A), denominada Gmut, en la que los niveles de reconocimiento de efrina-2 y efrina-3 (sus ligandos nativos) eran despreciables. Utilizando esta construcción se observó transducción específica de células CHO-EpCAM sin obtener transducción de células CHO-efrina-2 y CHO-efrina-3¹⁸⁴. A su vez, este sistema se expandió efectivamente hacia otros targets como CD8 humano utilizando un scFv, CD20 humano con otro scFv con y Her2/neu con una DARPIn (ya utilizados con MV-LVs). Interesantemente, los NiV-LVs rindieron entre 10 y 100 veces mayor título que sus contrapartes en MV-LVs, a excepción de NiV-Her2/neu, para el cual se comprobó que la causa de esto era la distancia

entre el sitio de unión de la DARPin en Her2/neu y la membrana. Para investigar esto, se generaron NiV-LVs contra dos receptores extracelulares largos como el CD117 y GluA4, pudiendo comprobar que la transferencia génica era más efectiva cuanto más cerca de la membrana se encontrara el sitio de unión del dominio al receptor¹⁸⁴. En particular, este sistema demostró ser superior al de los MV-LVs en varios aspectos. Se demostró que los NiV-LVs no son neutralizados por suero de distintos donantes y que son al menos 10000 veces menos susceptibles a las Ig humanas que los MV-LVs. Es de hacer notar que la población humana está vacunada contra MV. Además, los preparados de NiV-LVs demostraron de 3 a 5 veces más número de partículas totales que sus contrapartes de MV y que en 10⁸ partículas testeadas, todos los NiV-LVs rindieron mayor número de unidades transductantes (aquellas partículas capaces de transducir) que los MV-LVs¹⁸⁴.

Recientemente, en 2018, LVs armados con GPs modificadas de NiV se usaron para transducir linfocitos T-CD8⁺ y generar células CAR-T *in-vivo*. Este estudio utilizó un modelo de ratones trasplantados con células sanguíneas humanas, en los cuales se inyectaron NiV-LV por vía intraperitoneal y se comprobó la posibilidad de reprogramar células T *in-vivo* al poder generar CAR-T anti-CD19 dentro del ratón. A pesar de que se observaron efectos adversos, este reporte constituye el gran potencial que presentan los NiV-LVs para terapia génica¹⁸⁵.

2.3. Targeting de DCs con LVs

En 2008, se demostró el *targeting* de DCs utilizando un LV pseudotipado con la envoltura del SINDV modificada. En este trabajo, se mutó el sitio de unión del SINDV al heparán sulfato pero se mantuvo su especificidad natural por el receptor DC-SIGN¹⁸⁶. Este SINDV-LV fue capaz de transducir específicamente células HEK293T modificadas para expresar DC-SIGN humano o murino, pero incapaz mediar transducción sobre la línea parental. Luego se comprobó la transducción de células DC-SIGN⁺ en un cultivo mixto de médula ósea de ratón, demostrando tener poco efecto *off-target* y la preferencia de transducción por las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (mBMDCs). Adicionalmente, mBMDCs transducidas con el SINDV-LV para expresar el antígeno OVA fueron co-cultivadas con células T-CD4⁺ OT-I y T-CD8⁺ OT-II para evaluar su capacidad de presentación de antígeno. Luego del co-cultivo, los linfocitos T-OT-I demostraron tener un fenotipo efector, además de secretar interferón gamma (IFN- γ), mientras que en los OT-II, si bien se observó expresión de marcadores de activación y secreción de IFN- γ , ésta no fue tan pronunciada como la de los T-CD8⁺. En cambio, cuando el antígeno OVA se direccionó a la vía de presentación de MHCII se observó un aumento en la estimulación de los T-CD4⁺¹⁸⁶. En ensayos *in-vivo*, se demostró la inmunización de ratones el SINDV-LV y la subsecuente aparición de células T específicas del antígeno

con fenotipo efector, además de un título de anticuerpos específicos alto. Para testear esto más a fondo, ratones inyectados con el tumor E.G7 (caracterizado por la expresión de OVA) fueron inmunizados con el SINDV-LV posterior a la inyección del tumor y solamente en los ratones tratados se observó la desaparición del tumor. Mediante este trabajo, Yang y colaboradores, demostraron que los LVs pueden efectivamente realizar delivery de antígenos a DCs, siendo capaz de estimular tanto respuestas T-CD4⁺ como T-CD8⁺¹⁸⁶.

Recientemente se reportó el uso de un vector lentiviral llamado LV305 en un estudio clínico de pacientes con sarcoma sinovial recurrente¹⁸⁷. Este vector consiste en un LV de tercera generación, de integración deficiente, codificante para el antígeno tumoral NY-ESO-1, que es redirigido al receptor DC-SIGN mediante el uso de la envoltura del SINDV. La terapia con LV305 incrementó significativamente la respuesta T-CD8⁺ específica contra células NY-ESO-1⁺, así como también ejerció efectos sobre la avidéz de la respuesta. Estos cambios han durado dos años post-terapia lo que muestra que la estrategia también resultó eficiente para la generación de memoria. A los 24 meses de la terapia, la regresión del tumor fue del 84.8% por debajo de la línea de base, y hasta ahora se mantiene controlado. En este reporte se demostró por primera vez que la inmunoterapia basada en la inyección *in-vivo* de un LV re-direccionado a DCs es capaz de generar respuestas fuertes, duraderas y seguras, con alta correlación clínica¹⁸⁷.

Otro grupo desarrolló un sistema en donde se expresaba, por una parte, una versión de VSV-G competente en fusión pero deficiente en unión (VSV-GS), y por otra parte un nanobody con una región transmembrana¹²⁸. Estos LVs fueron capaces de mediar la transducción específicamente a mBMDCs y macrófagos murinos, pero no a fibroblastos, linfocitos B o linfocitos T del mismo origen. A su vez, en un modelo *in-vivo*, la especificidad se mantuvo y se observó que estos vectores fueron más eficientes en la transducción de DCs que los VSV-G-LVs. De la misma manera, estos vectores mediaron la transducción de DCs y macrófagos de origen humano *in-vitro* y en una suspensión de células de nódulos linfáticos humanos. En comparación, la transducción de células de origen humano fue mejor que la de origen murino¹²⁸, un efecto que muchas veces se observa debido a que los genes usados en el ensamblado de los LVs provienen de virus específicos de humanos como el HIV.

Tanto el sistema basado en el SINDV como el basado en VSV-GS requieren que el *target* celular sea un receptor con capacidad endocítica (ver **figura-15**), ya que ambos virus poseen mecanismos de fusión tras la endocitosis. Teniendo esto presente es interesante hacer notar que también se logró la transducción de DCs y otras APCs mediante el uso de scFv-anti-MHCII fusionados a la GP de

envoltura del MLV-A¹⁸⁸. Este vector (MLV-A^{scFv-MHCII}-LV) fue capaz de transducir mBMDCs *in-vitro*. Para analizar su potencial *in-vivo*, se inyectó el MLV-A^{scFv-MHCII}-LV subcutáneamente en ratones C57BL/6 pero no se observaron células transducidas en el ganglio drenante, posiblemente por el bajo título del vector y el limitado volumen de inyección. Como alternativa, células aisladas del nódulo linfático fueron transducidas con este vector demostrando la transducción de células MHCII⁺. Posteriormente, se inmunizaron ratones con el MLV-A^{scFv-MHCII}-LV codificante para OVA y 12 días después se midió la secreción de IFN- γ por parte de los esplenocitos, demostrando que la estimulación por este vector era mejor que el control con MLV-A sin modificar y comparable a la inducida por el VSV-G-LV¹⁸⁸.

Luego, este grupo fusionó el mismo scFv-anti-MHCII a la proteína Hmut del sistema de MV¹⁸⁹. Utilizando este nuevo vector, llamado MV-Hmut^{scFv-MHCII}-LV, se lograron transducir mBMDCs con eficiencia similar a los VSV-G-LVs. Posteriormente, se examinó la capacidad de este vector de transducir esplenocitos *ex-vivo*, logrando la transferencia génica en linfocitos B, DCs y macrófagos. Para examinar su uso *in-vivo*, se inmunizaron ratones con MV-Hmut^{scFv-MHCII}-LV codificantes para OVA y se demostró la generación de una respuesta T-CD8⁺ a relativamente bajas dosis del vector¹⁸⁹.

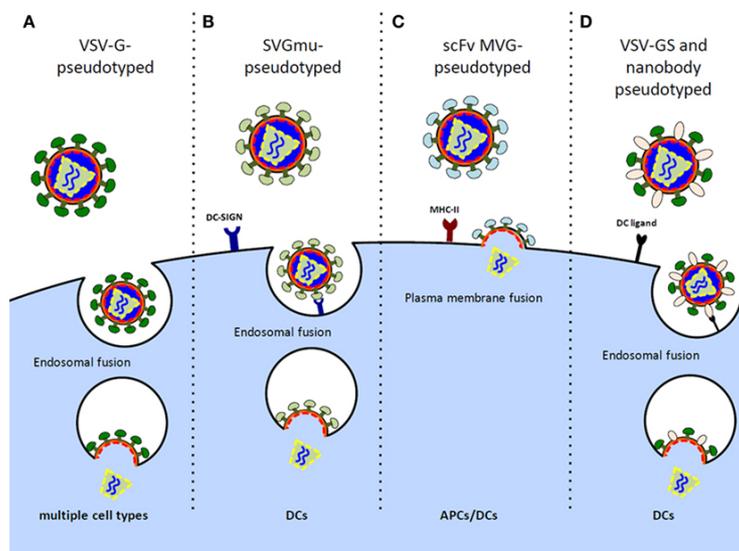


Figura-15. Representación del modo de entrada de distintos pseudotipados de LVs y su uso en APCs/DCs. A, B y D: Pseudotipado con VSV-G, SINDV y VSV-GS respectivamente, mecanismo de fusión tras ser endocitado. C: Pseudotipado con MV, mecanismo de fusión pH-independiente sobre la membrana plasmática. Adaptada de Norton et al., (2016).

2.4. Potenciamiento de vacunas dirigidas a DCs

Como se mencionó anteriormente, los adyuvantes son potentes inductores de la respuesta inmune, logrando mejorar los efectos protectores inducidos por las vacunas. Aunque se ha demostrado que las vacunas basadas en LVs son capaces de inducir respuestas T-CD4⁺ y T-CD8⁺, los LVs ofrecen la posibilidad de co-expresar el antígeno con un adyuvante lo que podría potenciar, mejorar y dirigir la respuesta.

Con este objetivo, se investigó el uso de distintos activadores del sistema inmune en el co-delivery con antígenos a células dendríticas. De importancia para esta tesis, en 2006, se investigó el potencial de la quinasa NIK en la activación de células dendríticas en contexto de la presentación de antígenos¹⁹⁰. Para esto, se utilizó un vector adenoviral codificante para NIK co-expresada con un antígeno (AdNIK). En este estudio, se demostró que la sobre-expresión de NIK fue capaz de activar la vía de activación de NFκB tanto canónica, como la no canónica en células dendríticas humanas. En concordancia con este resultado, el AdNIK (pero no los vectores control) indujo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, sugiriendo la posible inducción de respuestas tipo Th1. También se indujo la expresión de quimioquinas como IL-8, MIP-1α/β, MCP-1 y MCP-3. AdNIK fue a su vez, capaz de regular la expresión de los marcadores co-estimulatorios MHCI, MHCII, CD80 y CD86, además de inducir la expresión de CD25. Similarmente, estos efectos fueron vistos en células dendríticas murinas. Más interesantemente, en modelos murinos, el AdNIK fue capaz de inducir tanto una respuesta humoral como celular contra el antígeno, demostrando su capacidad para aumentar la función de presentación de antígenos *in-vivo*. A su vez, la sobre-expresión de NIK aumentó la respuesta de anticuerpos específicos (con cambio de clase a IgG2a) y fue capaz de inducir respuestas T-CD8⁺ específicas¹⁹⁰.

2.5. Nanobodies contra receptores de células dendríticas

Otro antecedente de relevancia para esta tesis, es que previamente en la Cátedra de Inmunología del Instituto de Higiene se desarrolló un método para la selección de nanobodies contra receptores celulares mediante *phage display*. De esta manera, se aislaron nanobodies específicos contra receptores presentes en células dendríticas como CD11c (MR31 y MR33), CD11b (V36) y MHCII (N11). Estos VHHs están altamente caracterizados, con afinidades descritas del orden nanomolar y se conoce parcialmente los sitios de unión a dichos receptores¹⁹¹. Si bien CD11b y MHC II son receptores celulares de más amplia expresión en distintos tipos celulares, CD11c es un marcador de células

dendríticas y es un blanco muy atractivo desde el punto de vista del *delivery* de antígenos a estas células. Por ende, estos nanobodies podrían ser excelentes candidatos para usarlos en el re-direccionamiento de LVs.

2.6. Objetivo

Este proyecto comenzó en el marco de una colaboración con la Prof. Mary Collins (investigadora principal de los artículos 188¹⁸⁸ y 189¹⁸⁹ citados en esta tesis) financiado por un proyecto ANII URU-UK (PR-UK-ID-2015-1-2), en la que se planteó el uso de nanobodies como dominio de unión para redirigir MV-LVs a células dendríticas. En el marco de este proyecto, se realizó una pasantía de investigación en el laboratorio de la Prof. Collins, en la cual se nos cedieron los plásmidos codificantes de HmutΔ18 y FΔ30 de MV, el p8.91 y el pSIN-SFFV-GFP. Posteriormente, se amplió esta colaboración con el Prof. Christian Buchholz (investigador principal de los artículos 112¹¹², 114¹¹⁴, 158¹⁵⁸, 160¹⁶⁰, 175¹⁷⁵, 176¹⁷⁶, 179¹⁷⁹, 180¹⁸⁰, 181¹⁸¹, 182¹⁸², 184¹⁸⁴, 185¹⁸⁵, 192¹⁹² y 193¹⁹³ citados en esta tesis) financiado por un proyecto de Movilidad e Intercambios Académicos de CSIC (CSIC-MIA417). En el marco de esta colaboración, se realizó una segunda pasantía en donde se exploró el pseudotipado y re-direccionamiento a través de NiV-LVs. Mediante un MTA, el Dr. Buchholz nos cedió los plásmidos codificantes de H de MV (p44) y G (p66 y p70) y F (F22) de NiV.

2.6.1. Objetivo general

Explorar el uso de nanobodies como potenciales elementos para modificar el tropismo celular de vectores lentivirales utilizando las células dendríticas como blanco.

2.6.2. Objetivos específicos

1. Producir MV-LVs y NiV-LVs con rendimientos similares a los obtenidos por otros grupos y verificar su capacidad de transducción en mBMDCs.
2. Comprobar la especificidad conferida por los distintos nanobodies empleados.
3. Explorar el uso de variantes de la fusión H/Gmut^{VHH}, utilizando distintos espaciadores que puedan conferir mayor flexibilidad para la unión del nanobody y por tanto aumentar el porcentaje de transducción.
4. Explorar el uso de fusiones de Hmut con dos nanobodies en tándem para aumentar la avidéz y mejorar la transducción.

5. Explorar el potencial de transducción *in-vivo* de los LVs re-direccionados en un modelo murino.
6. Desarrollar un plásmido de expresión dual que codifique para un elemento activador del sistema inmune.

3. Materiales y Métodos

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.
- Flow Cytometry Buffer Wash (FCB-Wash): 1 % seroalbúmina bovina (BSA), 0,03 % azida de sodio, 25 mM HEPES, en PBS c.s.p 250 mL, pH= 7,4.
- Flow Cytometry Buffer Fix (FCB-Fix): FCB-Wash + 10% paraformaldehido.
- PBS-EDTA-Tripsina: PBS 1x, 0,5 mM EDTA, 0,05% Tripsina. Filtrar por 0,22 µm en cabina de cultivo celular.
- PBS-Sacarosa 20%: PBS 1x, 20% sacarosa. Filtrar por 0,22 µm en cabina de cultivo celular.
- Polietilenimina (PEI): Para solución stock 1 mg/mL: Disolver polvo (#23966, Polysciences Inc) en agua MiliQ. Ajustar pH=7,0 con HCl y esterilizar mediante filtración (0,22 µm).
- Buffer de lisis (BL) 2x: 1 mL Tris-HCl 1M pH=7,4, 500 µL KCL 1M, 25 µL Tritón X-100, 4 mL glicerol en agua destilada c.s.p 10 mL.
- Kinetic Buffer (KB): 0,1%BSA, 0,02%Tween 20, 0,05% Azida de sodio en PBS 1%
- Sustrato para la enzima peroxidasa (PO) – revelado de ELISA: TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina): 200 µL solución 6 mg/mL de TMB (#T2885, Sigma Aldrich) en dimetilsulfóxido (DMSO), 50 µL de H₂O₂ 1% y 12,5 mL de buffer acetato 0,1 M pH=5,5.

Medios de cultivo

- Luria Bertani broth (LB): #L3152, Sigma Aldrich.
- Luria Bertani agar (LB agar): #L3027, Sigma Aldrich.
- Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC): 20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 0,5 g NaCl, en agua MiliQ c.s.p. 1 L, pH=7,0. Luego de autoclavar, agregar 10 mL MgCl₂ 1M y 20 mL de glucosa 1 M previamente filtrados.
- Dulbecco's Modified Eagle Medium HPSTA (DMEM-HPSTA): #DMEM-HPSTA, Capricorn. 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina estable y piruvato de sodio.
- Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640): #L0498, biowest. L-glutamina estable.
- Minimum Essential Medium Eagle alpha modification (MEM-Alpha): #36450, STEMCELL. Con nucleósidos.

3.1. Plásmidos para la generación de vectores lentivirales

Los LVs utilizados en esta tesis fueron producidos utilizando un sistema de segunda generación, con un vector de transferencia de tipo SIN.

Para la generación de VSV-G-LVs se utilizaron tres plásmidos: (i) plásmido codificante para la envoltura VSV-G, pMDG.2, (ii) plásmido de empaquetamiento p8.91, y (iii) plásmido de transferencia pSIN-SFFV-GFP o pSIN-DP-SFFV/CMV.

Para aquellos vectores pseudotipados con proteínas de MV o NiV se utilizaron cuatro plásmidos, (i) plásmido codificante para la hemaglutinina mutada (MV-Hmut o MV-p44) o glicoproteína G mutada (NiV-p66 o NiV-p70), (ii) plásmido codificante para la proteína de fusión MV-F30 o NiV-F22, además del (iii) p8.91 y (iv) pSIN-SFFV-GFP, mencionados anteriormente.

El plásmido de empaquetamiento p8.91 contiene los genes codificantes para la poliproteína gag-pol de HIV-1, además de codificar para los elementos reguladores tat y rev. Gag-pol dará lugar a la formación de la cápside y matriz del lentivirus, además de codificar para las enzimas necesarias para sus funciones como lo son la RT, IN y PR. Por otra parte, el plásmido de transferencia contiene la señal de encapsidación y el gen deseado, flanqueado por los dos LTRs. En el caso del pSIN-SFFV-GFP, la expresión de la Green Fluorescent Protein o GFP en la célula blanco está mediada por el promotor fuerte SFFV, mientras que el plásmido pSIN-DP-SFFV/CMV, al tratarse de un plásmido de promotor dual, expresa una primer proteína desde el promotor SFFV y otra segunda desde el promotor CMV. A su vez, como lo indica su nombre, estos son vectores SIN (*self-inactivating*), es decir, se inactivan luego de insertos en el genoma celular. Por último, como se muestra en la **figura-16**, la expresión de los plásmidos que codifican para las proteínas de la envoltura de los LVs están dirigidos por el promotor fuerte CMV. Si bien MV-Hmut y MV-p44 codifican para la hemaglutinina mutada, una de las diferencias entre ellos se basa en que el segundo es un plásmido optimizado, con algunas secuencias distintas con respecto al MV-Hmut; además, el segundo posee un linker flexible (G₄S)³ entre la proteína H y el dominio de unión. De la misma manera, el NiV-p66 y el NiV-p70 codifican para la proteína G mutada y se diferencian debido a que el primero posee el linker flexible (G₄S)⁴ entre la glicoproteína G y el dominio de unión.

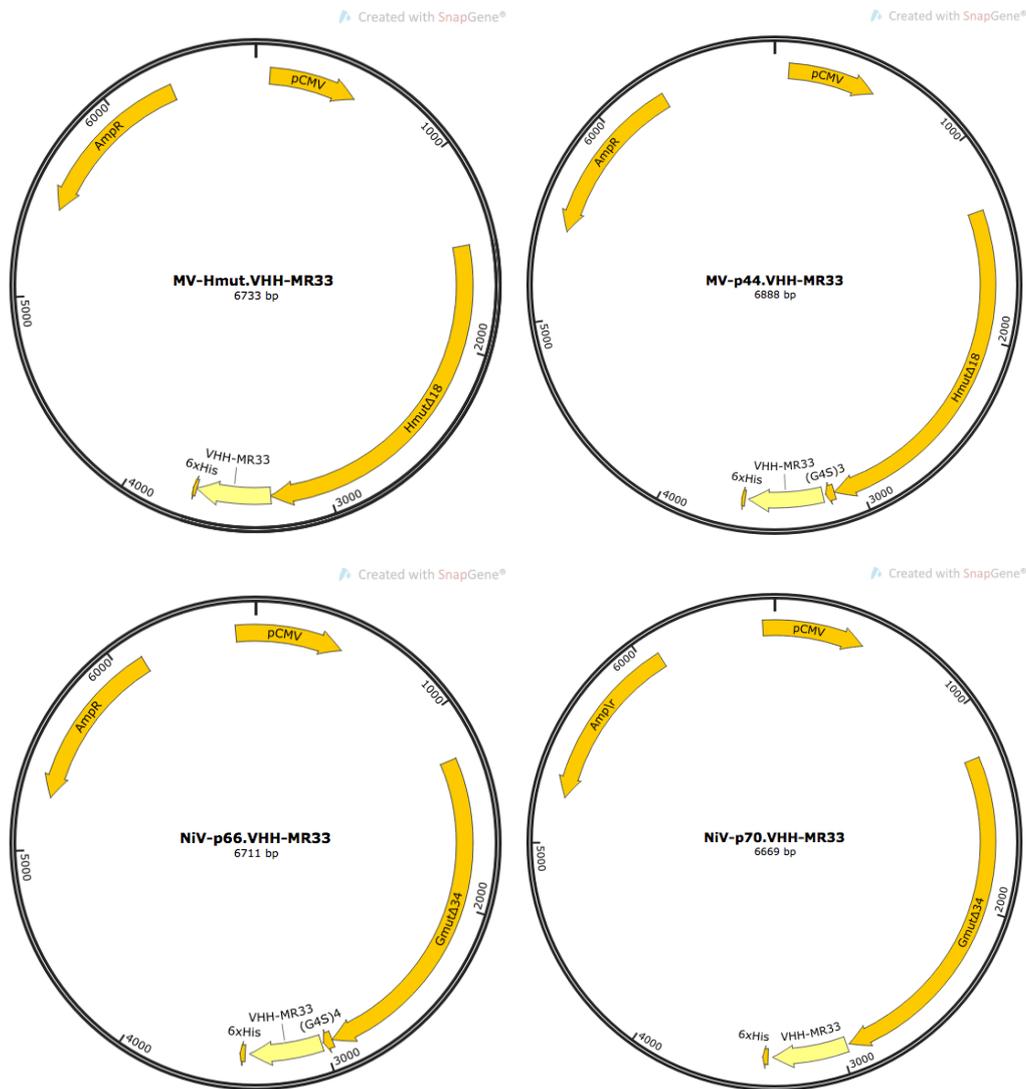


Figura-16. Esquema de plásmidos codificantes para H de MV y G de NiV fusionados al nanobody MR33. MV-Hmut y MV-p44 codifican para la proteína H de MV mutada de manera que no reconozca sus ligandos naturales. MV-p44 posee un linker flexible (G₄S)³ entre Hmut y el VHH-MR33 mientras que MV-Hmut carece del mismo. Por su parte, NiV-p66 y NiV-p70 codifican para la proteína G del NiV mutada y se diferencian en que el primero contiene el linker flexible (G₄S)⁴ entre Gmut y el VHH MR33 mientras que el segundo no. Las cuatro proteínas están bajo la expresión del promotor CMV y contienen un tag de 6xHis en sus extremos. Además, codifican para el gen de resistencia a ampicilina que les permite ser seleccionados cuando se preparan en cultivos de bacterias.

3.2. Generación, expansión y purificación de los plásmidos

Los plásmidos MV-Hmut, pSIN-SFFV-GFP, p8.91 y MV-F30 fueron generosamente cedidos por la Prof. Mary Collins. Por otra parte, los plásmidos MV-p44, NiV-p66, NiV-p70, y NiV-F22 fueron cedidos por el Prof. Christian Buchholz.

3.2.1. Clonaje de VHHs monovalentes al plásmido MV-Hmut

Como se mencionó anteriormente, los nanobodies utilizados para el re-direccionamiento de LVs fueron seleccionados por el Dr. Rossotti previamente al inicio de este trabajo. Entre ellos se encuentran los nanobodies anti-CD11c (MR31 y MR33), anti-MHCII (N11), anti-CD11b (V36) y como control negativo se utilizó el nanobody T3, anti-toxoide tetánico (especificidad irrelevante en el contexto de este trabajo).

Para clonar los nanobodies se amplificaron los genes codificantes mediante PCR utilizando la enzima Pfu (Thermo Scientific) y siguiendo el protocolo como lo indica el proveedor. Para ello, se utilizaron los cebadores FWD-SmaI y REV-SpeI (ver **tabla-1**), que se encuentran flanqueados por las enzimas SmaI (Thermo Scientific) y SpeI (Thermo Scientific) en sus extremos 5', respectivamente. El FWD-SmaI es capaz de hacer *annealing* en todos los genes de VHHs debido a que comparten la secuencia en su extremo 5'. Por su parte, el REV-SpeI se une a la secuencia conservada en el extremo 3' de los VHHs y además codifica para una secuencia de detección que consiste en seis aminoácidos histidina (6xHis). Se realizó una PCR utilizando como molde los vectores pINQBtH6-VHH codificantes para las secuencias de los nanobodies MR31, MR33, N11, V36 o T3. Los productos de PCR se limpiaron mediante un kit de purificación (Qiagen) y se digirieron con las enzimas de restricción SmaI y SpeI en dos etapas. Primero se digirió con SmaI durante 4 horas a 30°C, luego se limpió la digestión utilizando el mismo kit mencionado anteriormente y se procedió a digerir con SpeI durante 4hs a 37°C. Los productos de digestión se corrieron en un gel de agarosa 1% y se purificaron mediante un kit de extracción de gel (Thermo Scientific). Luego se ligaron al plásmido MV-Hmut previamente digerido con las mismas enzimas (originalmente MV-Hmut^{scFv-MHCII} - generado en el laboratorio de la Prof. Collins). Para realizar la ligación se utilizó una relación de 3:1 (inserto:vector) y se incubó a 22°C durante una hora con la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific). Para detener la reacción, se incubó a 65°C por 10 minutos.

Cebadores	Secuencia
FWD-SmaI	5'- AAAAAAA <u>CCCGGG</u> AAG ATG GAA CCA ATG CGG CCC AGC CGG CCA TGG CCC AGG TGC AGC TGG TG -3'
REV-SpeI	5'- AATAGAA <u>ACTAGT</u> <i>GTG GTG GTG GTG GTG GTG</i> TGA GGA GAC GGT GAC CTG GGT CC -3'

Tabla-1. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de los VHHs monovalentes. Subrayado se marcan los sitios de restricción de las enzimas utilizadas para la digestión y clonaje. El FWD-SmaI se une a nucleótidos conservados en el 5' de la secuencia de los VHHs. Por otra parte, el REV-SpeI se une a nucleótidos conservados en el extremo 3' de los VHHs, y además agrega una cola de 6xHis.

3.2.2. Clonaje de VHHs bivalentes (BiVHHs) al plásmido MV-Hmut

Se generaron los constructos bivalentes anti-CD11c (MR31-MR31) y anti-CD11b (V36-V36). Además, se generó una construcción biespecífica anti-CD11c/anti-CD11b (MR31-V36). Para generar las construcciones biespecíficas y bivalentes se realizaron PCRs por separado para cada VHH. Le llamamos VHH-1 al primer nanobody desde el extremo 5' de la secuencia, y VHH-2 al segundo. Se utilizó como molde el vector pINQ-BtH6-VHH y los cebadores Bi-VHH1-REV y Bi-VHH2-FWD descritos en la **tabla-2**. Ambos cebadores codifican para un *linker* flexible (G_3S)² el cual conecta los dos VHHs. Para amplificar el VHH-1 se utilizó el cebador FWD-SmaI (descrito previamente en la **tabla-1**) y el Bi-VHH1-REV. Para la amplificación del VHH-2 se utilizaron los cebadores Bi-VHH2-FWD, y el REV-SpeI (descrito previamente en la **tabla-1**). Una vez amplificados ambos VHHs, se purificaron y se realizó una reacción de *fill-in* sin cebadores, en la cual ambos productos de amplificación hacen *annealing* por la región (G_3S)² que comparten en común. Posteriormente, se tomó este molde y se realizó una segunda PCR con los cebadores FWD-5-Overlap y REV-6-Overlap (ver **tabla-2**) que hacen *annealing* en el extremo 5' del VHH-1 y 3' del VHH-2 respectivamente. Esta reacción de amplificación permite obtener los productos correspondientes a los VHHs biespecíficos/bivalentes. Estos fueron cargados en un gel de agarosa 1% y se purificaron los fragmentos de aprox. 800 pares de bases (pb) mediante el kit de extracción de gel (Thermo Scientific). Estos insertos ya purificados fueron utilizados para la ligación con el plásmido MV-Hmut siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente.

Cebadores	Secuencia
Bi-VHH1-REV	5'- <u>TGA GCC TCC ACC AGA GCC ACC TCC</u> T GAG GAG ACR GTG ACC TGG GTC C -3'
Bi-VHH2-FWD	5'- <u>GGA GGT GGC TCT GGT GGA GGC TCA ATG GCC SAG</u> GTG CAG CTG SWG SAG TCK GG -3'
FWD-5-Overlap	5'- AAA AAAA <u>CCCGGG</u> AAG ATG GAA CCA ATG CG -3'
REV-6-Overlap	5'- A ATA GAA <u>ACTAGT</u> <i>GTG GTG GTG GTG GTG GTG</i> -3'

Tabla-2. Secuencia de los cebadores utilizados para la construcción de los VHHs biespecíficos y bivalentes. Subrayado en los cebadores Bi-VHH-REV y Bi-VHH-FWD se encuentra la secuencia codificante para el linker flexible (G_3S)². Por otra parte, en los cebadores FWD-5-Overlap y REV-6-Overlap se subrayan los sitios de enzima para SmaI y SpeI respectivamente. Adicionalmente, en el REV-6-Overlap se destaca la secuencia de 6xHis en *itálica*.

3.2.3. Clonaje de VHHs monovalentes a los plásmidos MV-p44, NiV-p66 y NiV-p70.

Antes de poder clonar los nanobodies a los plásmidos MV-p44, NiV-p66 y NiV-p70, se insertó el sitio NotI en los plásmidos MV-Hmut^{VHH} generados previamente. Para ello, se digirieron los MV-Hmut^{VHH} con las enzimas de restricción BstEII (New England Labs, NEB) y SphI (NEB) durante 2h a 37°C. Simultáneamente se digirió en las mismas condiciones el vector MV-p44, el cual contiene un sitio NotI entre los sitios de corte de BstEII y SphI. Posteriormente, se cargaron los productos de digestión en un gel de agarosa 1% y se purificó el *backbone* de los plásmidos MV-Hmut^{VHH} y un fragmento de 232 pb correspondiente a la digestión del plásmido MV-p44. Luego, se ligó dicho inserto con los plásmidos MV-Hmut^{VHH} en una relación 3:1 (inserto:vector). Esto se realizó utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente. Posteriormente, se digirieron tanto los plásmidos MV-p44, NiV-66 y NiV-p70) como los vectores MV-Hmut^{VHH}(NotI) con las enzimas SfiI y NotI en buffer CutSmart (NEB). Se incubaron primero durante dos horas a 37°C y luego se aumentó la temperatura a 50°C y se incubó dos horas más. Luego, se cargaron los productos en un gel de agarosa 1% y se purificaron los *backbones* de los vectores MV-p44, NiV-p66 y NiV-p70 y los VHHs provenientes de los vectores MV-Hmut^{VHH}(NotI). Estos productos fueron ligados y posteriormente transformados siguiendo los procedimientos ya descritos.

3.2.4. Clonaje de VHHs bivalentes a los plásmidos MV-p44, NiV-p66 y NiV-p70.

Para el caso de los bivalentes (BiVHH), se realizó una PCR con la enzima Pfu (como lo indica el fabricante) con los cebadores detallados en la **tabla-3**, utilizando como molde los plásmidos MV-Hmut^{VHH}. El FWD-Bi-VHH hace *annealing* en el sitio SmaI presente en los MV-Hmut^{VHH} mientras que el REV-Bi-VHH se une a la región 3' de los VHHs y agrega el sitio NotI al usarse para amplificar. Los productos de PCR se purificaron y digirieron con las enzimas SfiI (*upstream* del sitio SmaI en los productos de PCR) y NotI y luego se clonaron a los plásmidos MV-p44, NiV-p66 y NiV-p70 siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Cebadores	Secuencia
FWD-Bi-VHH	5'- CAC AGT CA <u>CCCGGG</u> AAG ATG GA -3'
REV-Bi-VHH	5'- AAA AA <u>GCGGCCGC</u> TGA GGA GAC AGT GAC CTG GGT CC -3'

Tabla-3. Secuencia de los cebadores utilizados para el clonaje de los VHHs biespecíficos y bivalentes a los vectores p44, p66 y p70. En el FWD-Bi-VHH se encuentra subrayado el sitio de unión del cebador a los VHHs en el vector MV-Hmut. En el REV-Bi-VHH se encuentra subrayado el sitio de unión NotI que se agrega durante la amplificación de los VHHs.

3.2.5. Transformación, expansión y purificación de plásmidos

Los plásmidos generados fueron amplificados mediante su transformación en bacterias siguiendo dos protocolos (dependiendo del laboratorio donde se realizó):

(i) Para la transformación de bacterias por electroporación se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (Thermo Scientific) debido a que es una cepa EndA⁻, RecA⁻ por lo que no posee endonucleasas ni recombinasas. Para esto se tomó 1 μ L del producto de ligación o del plásmido correspondiente (independientemente de la concentración) y se electroporaron en 25 μ L de células electrocompetentes DH5 α . Posteriormente se agregó 1 mL de medio de recuperación SOC y se incubaron durante 45 minutos a 37°C en agitación. Luego se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon en placas de LB-agar-Ampicilina.

(ii) Para la transformación de bacterias por choque de calor, se utilizó la cepa bacteriana Top10 competentes (Thermo Scientific). Se tomaron 2-5 μ L del producto de ligación y se incubó 20 minutos en hielo-agua con 20-50 μ L de bacterias. Luego se realizó el shock por calor a 42°C durante 42 segundos e inmediatamente se colocaron por dos minutos en hielo-agua. Posteriormente se agregaron 200 μ L de SOC y se incubaron durante 30-45 minutos a 37° C en agitación. Finalmente se tomaron 100 μ L de la mezcla y se plaquearon en LB-agar-Ampicilina.

Para generar pequeñas cantidades de plásmido para digestiones y clonajes, se tomó una colonia transformada y se la incubó *overnight* (ON) a 37°C, con agitación en 3-4 mL de LB-Ampicilina. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo a 5000g por 5 minutos y se realizó la extracción de ADN plasmídico (ADNp) utilizando el kit de mini-prep (Qiagen). A modo de generar *stock* para las transfecciones, se tomó una colonia transformada y se la incubó 8 horas en 3-4 mL de LB-Ampicilina. Posteriormente, se tomó una alícuota de este cultivo y se lo incubó ON a 37°C y con agitación en 250-500 mL de LB-Ampicilina. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo durante 20 minutos a 5000g y se extrajo el ADNp mediante el kit maxi-prep endo-free (Qiagen o Thermo Scientific).

3.3. Mantenimiento de líneas celulares y generación de células primarias

Las células HEK293T (ATCC; CRL-3216) fueron cedidas generosamente por el Dr. Hugo Peluffo del Institut Pasteur de Montevideo. Las líneas celulares J774A.1 (ATCC, TIB-67) y RAW264.7 (ATCC, TIB-71) se mantenían ya en *stock* en la Cátedra de Inmunología. Las células THP-1 (ATCC, TIB-202) y

HT-29(GFP) (derivadas de la transfección de HT-29, ATCC HTB-38 con el plásmido pNF- α B-hrGFP) fueron cedidas por la Dra. Ana Ferreira y la Dra. Ana Hernández, respectivamente. Por otra parte, las líneas celulares CHO-anti-His (generada por transfección de la línea celular CHOK1 ATCC-CCL-61 con el plásmido pDisplay-3D5, codificante para un anticuerpo anti-His) y HT1080-anti-His (generada por transfección de la línea celular HT1080 ATCC-CCL-121 con el pDisplay-3D5) fueron obtenidas del laboratorio del Prof. Christian Buchholz. La línea celular JAWSII fue cedida amablemente por el Dr. Michael Muhlebach del Paul-Ehrlich-Institut.

Los medios utilizados para el cultivo de cada tipo celular se detallan en la **tabla-4**, a continuación:

Medio de cultivo	Suplementos	Nombre	Células/Línea Celular
DMEM-HPSTA	+ 1X Ab/Am + 10% SFB	DMEM-Completo	HEK293T
	+ 1X Ab/Am + 10% SFB Inactivado	DMEM-Inactivado	J774A.1 y RAW264.7
	+ 10% SFB + 50 μ g/mL Hygromicina	DMEM-G418	HT-29(GFP)
	+ 10% SFB + 1 μ g/mL Puromicina	DMEM-Puromicina	CHO-anti-His
	+ 10% SFB + 1 μ g/mL G418	DMEM-G418	HT1080-anti-His
RPMI 1640	+ 1X Ab/Am + 10 % SFB Inactivado	RPMI-BMDCs-I	mBMDCs (Inglaterra)
	+ 30 ng/mL GM-CSF + 50 μ M B-ME		
	+ 1X Ab/Am + 10 % SFB Inactivado	RPMI-BMDCs-A	mBMDCs (Alemania)
	+ 0,5 ng/mL GM-CSF		
	+ 1X Ab/Am + 10% SFB Inactivado	RPMI-BMDCs-U	mBMDCs (Uruguay)
	+ 10mM HEPES + 0,25 % sobrenadante J558		
MEM-Alpha	+ 1X Ab/Am + 20% SFB + 4mM L.-glut	MEM-JAWSII	JAWSII
	+ 5 ng/mL GM-CSF + 1 mM Piruvato de Sodio		

Tabla-4. Descripción de los medios utilizados para el cultivo de células eucariotas. Se detalla el medio base y los suplementos agregados para el cultivo de cada tipo celular.

3.3.1. Líneas celulares

Brevemente, las células HEK293T, J774A.1, HT-29(GFP), HT-1080-anti-His y CHO-anti-His, fueron cultivadas en sus respectivos medios (ver **tabla-4**) hasta alcanzar una confluencia de 70-90%, tras lo cual fueron incubadas con PBS-Tripsina-EDTA durante 3-5 minutos a 37°C en estufa de cultivo con 5% CO₂ para su disgregación. Luego la tripsina se neutralizó con el mismo volumen de medio conteniendo SFB al 10% y se realizaron pasajes a nuevas botellas para el sub-cultivo. Por su parte, las células RAW264.7 y JAWSII se mantuvieron hasta alcanzar una confluencia de 70-90% y luego se utilizó un *scraper* para despegar las células adherentes en el mismo medio. Se tomó un volumen determinado de medio con células y se realizaron pasajes a nuevas botellas. En el caso de las THP-1,

al tratarse de células en suspensión, se cultivaron hasta al alcanzar una concentración de 8×10^5 - 1×10^6 /mL de medio, tras lo cual se tomó una alícuota de cultivo y se la transfirió a nuevas botellas para ser sub-cultivadas.

3.3.2. Generación y cultivo de mBMDCs

Se utilizaron tres protocolos para la generación de mBMDCs, debido a que cada laboratorio tenía seteado su producción como de detalla a continuación:

3.3.2.1. Generación de mBMDCs (NIBSC)

Se aislaron fémures y tibias de ratones C57/BL6 y se lavaron con PBS-0,1% SFB. Se cortaron los extremos de los huesos y con una jeringa se perfundieron con 5mL de PBS para extraer la médula ósea. Esta se centrifugó durante 5 minutos a 350g y luego se resuspendió en 10 mL PBS-10% RBC, tras lo cual fue incubada por 10 minutos en hielo. Se realizaron dos lavados mediante centrifugación a 300g y posterior resuspensión en PBS y finalmente se resuspendió el *pellet* en 12 mL de RPMI-BMDCs-I (ver **tabla-4**). Se sembraron placas de 6-pocillos con 2 mL cada uno. Al tercer día se realizó un cambio de medio y al sexto día se colectaron las células no-adherentes y parcialmente adherentes. Se centrifugaron a 350g durante 5 minutos, se contaron y posteriormente se sembraron para su uso.

3.3.2.2. Generación de mBMDCs (PEI)

Las mBMDCs utilizadas durante la pasantía en Alemania fueron generadas con ayuda de la Dra. Martina Anzaghe del Paul-Ehrlich-Institut siguiendo el protocolo detallado a continuación. Brevemente, se aislaron ambos fémures y tibias de ratones C57BL/6 y se esterilizaron durante 30 segundos en 70% etanol (v/v). Luego se cortaron los extremos de los huesos y utilizando una jeringa y una aguja 25G cargada con 3-4 mL de PBS, se perfundieron los huesos y se expulsó la médula ósea. Esta fue resuspendida por pipeteo intenso y se centrifugó durante 6 minutos a 500g. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1.5 mL de RBC-lisis buffer (Sigma) y se incubó durante un minuto a temperatura ambiente. Luego se volvió a centrifugar en las condiciones descriptas anteriormente y se resuspendió el *pellet* en 10 mL de RPMI/ratón. Se contaron las células y se ajustó la concentración a 5×10^6 células en 5 ml de RPMI -BMDCS-A por botella de cultivo T-25 (Greiner). Las células se mantuvieron en estufa de cultivo por 8 días y se realizó cambio de medio

conteniendo el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) al día 3,4 y 7. Al octavo día se realizó un conteo de células totales y se sembraron para su uso.

3.3.2.3. Generación de mBMDCs (Cátedra de Inmunología)

Las mBMDCs utilizadas en Uruguay fueron generadas por la Lic. Yamila Martínez, utilizando el protocolo a continuación. En resumen, se aislaron fémures y tibias de ratones C57BL/6 y se limpiaron con etanol 70% durante 2-3 minutos. Luego se lavaron con PBS y se cortaron las epífisis para ser perfundidos utilizando una jeringa 24G con 5 mL de PBS de modo de obtener la médula. Se resuspendió la médula en RPMI y se contaron las células. Luego se sembraron en cantidad de 3×10^6 precursores en 10 mL de RPMI-BMDCs-U + 1% sobrenadante J558 en placas de Petri. Se realizaron cambios de medio al día 3, 6 y 8 utilizando el mismo medio. Al décimo día, las células fueron cosechadas y centrifugadas a 300g durante 5 minutos, tras lo cual el *pellet* se resuspendió en un volumen conocido de RPMI-BMDCs-U y se sembraron para su uso.

3.4. Análisis de la expresión de Hmut^{VHH} en HEK293T

Se sembraron 4×10^5 células en placas de 12-well. Al día siguiente se transfectaron con 0,8 μ g del plásmido codificante para la respectiva proteína de envoltura haciendo uso del reactivo polietilenimina (PEI). Esta agente transfectante es un polímero catiónico que actúa condensando el ADN en partículas cargadas positivamente, que interaccionan con distintos residuos aniónicos sobre la superficie celular, tras lo cual son introducidas a la célula mediante endocitosis.

Para transfectar, se diluyó el volumen correspondiente a 0,8 μ g de ADN en 53 μ L de DMEM sin aditivos. Por otra parte, se tomaron 3 μ L de PEI 10mM y se lo agregó a 50 μ L de DMEM sin aditivos. Se tomó el PEI-DMEM y se lo agregó sobre PEI-ADN e inmediatamente se vortexeó la mezcla y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, se cambió el medio de las células por 400 μ L de DMEM-15% SFB y luego se agregó la mezcla PEI-DNA (aprox. 110 μ L) al pocillo. Se homogeneizó mediante pipeteo o movimiento en cruz. Entre 4 y 6 h post-transfección se realizó un cambio de medio a 1 mL DMEM-Completo.

A las 48 h post-transfección se analizó la expresión por citometría de flujo. Para ello, se retiró el medio de las células y se lavó x2 con FCB-Wash mediante centrifugación a 400g y 4°C por 5 minutos. Luego se incubó con 100 μ L la una dilución 1/100 del anticuerpo anti-His-PE (Miltenyi Biotec) durante 30

minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se realizaron dos lavados con FCB-Wash, como ya se describió, y se resuspendió la muestra en 100 µL de FCB-Fix para cargar en el citómetro. Los datos fueron analizados utilizando el software FCS Express (DeNovoSoftware).

3.5. Generación de LVs

3.5.1. Producción a gran escala

3.5.1.1. Producción de VSV-G-LVs y MV-LVs (NIBSC)

Un día previo a la transfección, se sembraron 5×10^6 células HEK293T en placas de 15 cm (Greiner) en DMEM-Completo. Al día siguiente, se transfectaron utilizando el reactivo FuGENE-6 (Promega) siguiendo el protocolo descrito a continuación:

(i) Para LVs pseudotipados con VSV-G: 3,75 µg del plásmido de transferencia pSIN-SFFV-GFP, 2,50 µg del plásmido de empaquetamiento p8.91 y 2,50 µg del pMDG.2.

(ii) Para LVs pseudotipados con MV: 3,75 µg del transgen pSIN-SFFV-GFP, 2,5 µg del plásmido de empaquetamiento p8.91, 2,5 µg de MV-F30 y 2,5µg de MV-Hmut^{VHH}.

Se tomó un tubo y se agregaron 500 µL de medio Opti-MEM (Thermo Scientific). Sobre este medio se agregaron 45 µL del reactivo FuGENE-6 teniendo cuidado de no tocar las paredes del tubo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó la cantidad correspondiente de ADN sobre el Opti-MEM/FuGENE-6 y se incubó durante 15 minutos. Mientras tanto, se cambió el medio de las células por 18 mL de DMEM-Completo. Al terminar la incubación, se agregó la mezcla de ADN/reactivo transfectante mediante goteo sobre las placas. Al día siguiente, se cambió el medio por 18 mL de DMEM-Completo y se dejó hasta las 48 o 60 h post-transfección, donde el medio fue recogido y filtrado por 0,45 µM. Cabe destacar que se trató de transfectar a última hora de un día, y realizar el cambio de medio a primera hora del día siguiente. Para concentrar los LVs se utilizó el protocolo a continuación:

(i) Para LVs pseudotipados con VSV-G: Centrifugación a 22000g durante 2 h a 4°C.

(ii) Para LVs pseudotipados con MV: Centrifugación durante 24 h a 4500g y 4°C

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 μ L de PBS frío, que se alicuotó y se guardó a -80°C .

3.5.1.2. Producción de VSV-G-LVs, MV-LVs y NiV-LVs (PEI)

Se sembraron 2×10^7 células HEK293T en frascos de cultivo T-175 en 25 mL de DMEM-Completo. Al día siguiente se transfectaron (siempre y cuando las células sembradas se encuentren en un 70-80% de confluencia) utilizando el reactivo PEI con 35 μ g de ADN total, siguiendo el protocolo detallado a continuación:

(i) Para LVs pseudotipados con VSV-G: 17,5 μ g del plásmido de transferencia pSIN-SFFV-GFP o pSIN-DP-SFFV/CMV-(NIK), 12 μ g del plásmido de empaquetamiento p8.91 y 6,13 μ g del pMDG.2.

(ii) Para LVs pseudotipados con MV: 15,17 μ g del transgen pSIN-SFFV-GFP, 14,44 μ g del plásmido de empaquetamiento p8.91, 4,04 μ g de MV-F30 y 1,35 μ g de MV-p44^{VHH}.

(iii) Para LVs pseudotipados con NiV: 15,17 μ g del transgen pSIN-SFFV-GFP, 14,44 μ g del plásmido de empaquetamiento p8.91, 3,85 μ g de NiV-F22 y 1,54 μ g de NiV-p66^{VHH} o NiV-p70^{VHH}.

Se tomó un tubo estéril y se preparó el mix ADN-DMEM al agregar los μ L de ADN necesarios en un volumen final de 2300 μ L de DMEM sin aditivos. Se vortexó brevemente el mix. Luego se tomó un segundo tubo estéril y se preparó la mezcla PEI-DMEM. Para 35 μ g de ADN, se utilizaron 140 μ L de PEI 10mM. Se tomaron los 140 μ L de PEI y se agregaron a 2200 μ L de DMEM sin aditivos; luego se vortexó brevemente. Para preparar el mix de transfección, se agregó rápidamente PEI-DMEM sobre ADN-DMEM, se vortexó durante 15 segundos y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, se cambió el medio de las células por 10 mL de DMEM-15% SFB, y finalizados los 30 minutos, se agregó el mix de transfección (aprox. 4,7 mL) mezclando por agitación en cruz o por pipeteo. Entre 4 y 6 h post-transfección (o al día siguiente) se cambió el medio a 18-20 mL de DMEM-Completo. Se colocaron las células en estufa de cultivo a 37°C y 5% CO_2 . Entre 36 y 48 h post-transfección se recogió el sobrenadante (conteniendo partículas lentivirales) y se filtró por 0,45 μ m. Luego de filtrado se dividió el volumen en tubos para ser concentrados mediante centrifugación. Para concentrar los LVs se utilizó el protocolo a continuación:

(i) Para LVs pseudotipados con VSV-G: Centrifugación a 22000g durante 2 h a 4°C.

(ii) Para LVs pseudotipados con MV o NiV: Se agregó suavemente en el fondo del tubo 4,5-5,5 mL de PBS-Sacarosa 20% y se centrifugó durante 24 h a 4500g y 4°C.

Una vez finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante y se dejó el tubo boca abajo durante 5 minutos sobre una toallita de papel para permitir que se seque. Luego, se agregaron 100 -200 μ L de PBS pre-enfriado y se resuspendió el *pellet* por pipeteo. Luego se colocaron los tubos en agua-hielo y agitación lenta durante 1-2 hs. Posteriormente se terminó de resuspender el *pellet* por pipeteo y se alícuotó en pequeños volúmenes (10-30 μ L) que fueron conservados en freezer a -80°C.

3.5.2. Producción a pequeña escala

Se sembraron $1,6 \times 10^6$ células HEK293T/pocillo en placas de 6-pocillos (Greiner) en 2 mL de DMEM-Completo. Al día siguiente se transfectaron (siempre y cuando las células sembradas se encuentren en un 70-90% de confluencia) con 1,92 μ g de ADN total, siguiendo el protocolo detallado a continuación:

(i) Para LVs pseudotipados con VSV-G: 0,96 μ g del plásmido de transferencia pSIN-SFFV-GFP o pSIN-DP-SFFV/CMV-(NIK), 0,63 μ g del plásmido de empaquetamiento p8.91 y 0,34 μ g del pMDG.2.

(ii) Para LVs pseudotipados con MV: 0,83 μ g del transgen pSIN-SFFV-GFP, 0,79 μ g del plásmido de empaquetamiento p8.91, 0,22 μ g de MV-F30 y 0,07 μ g de MV-Hmut^{VHH} o MV-p44^{VHH}.

(iii) Para LVs pseudotipados con NiV: 0,83 μ g del transgen pSIN-SFFV-GFP, 0,79 μ g del plásmido de empaquetamiento p8.91, 0,21 μ g de NiV-F22 y 0,08 μ g de NiV-p66^{VHH} o NiV-p70^{VHH}.

Para transfectar, se diluyó el ADN en 130 μ L de DMEM sin aditivos y se agregaron 8 μ L de PEI 10mM a 120 μ L de DMEM sin aditivos. Se tomó el PEI-DMEM y se agregó sobre el ADN-DMEM, tras lo cual se vortexeó inmediatamente por 15 segundos. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, mientras se realizó un cambio de medio a las células por 800 μ L de DMEM-15% SFB. Una vez finalizada la incubación, se agregó la mezcla a las células y se homogeneizó. A las 36-48 h post-transfección se recogió el sobrenadante conteniendo partículas lentivirales y se utilizó para transducir las células blanco.

3.6. Titulación de LVs

Para titular, es decir, medir las unidades transducentes por mililitro (TU/mL), se utilizaron dos métodos. El primero, llamado titulación por transducción se realizó directamente mediante transducción de células susceptibles y posterior medición de la cantidad de células que expresan el transgen (en nuestro caso, expresión de GFP por citometría). El segundo método, llamado RT-qPCR, es una medida indirecta que cuantifica la actividad de la transcriptasa reversa presente en la preparación de LVs a través de una PCR cuantitativa. El valor obtenido permite estimar la cantidad de TU/mL si se dispone de una curva de correlación entre el Ct obtenido de la qPCR y las TU/mL. Este método se utilizó al principio de este trabajo, cuando no se poseía una línea celular susceptible a la transducción con los MV-LVs; para ello, se utilizó una correlación generada con el VSV-G-LV. Es de hacer notar que el título de una preparación hace referencia a las TU/mL respecto a la población de células diana de interés, y como veremos, muchas veces es muy inferior al número total de partículas de vectores lentivirales presentes en la preparación, debido a que no todas las partículas generadas tienen la capacidad de transducir las células blanco.

3.6.1. Titulación por transducción

Este método se basa en la capacidad de los LVs de transducir determinados tipos celulares y se cuantifica midiendo la expresión del transgen que acarrea el vector lentiviral. Consecuentemente, este método nos informa sobre la cantidad de partículas capaces de transducir por mililitro de muestra, es decir, cuantifica las unidades transducentes por mililitro (TU/mL). En nuestro caso, el transgen es GFP, y la expresión de esta proteína fue cuantificada por citometría de flujo. A su vez, se utilizaron dos protocolos de transducción: (i) transducción estática y (ii) transducción por spinfection.

(i) Transducción estática

La transducción estática se utilizó en células adherentes o semi-adherentes. Se incubaron las células con los LVs durante 2 horas en estufa de cultivo. Posteriormente, se diluyó el vector por agregado del medio correspondiente y se incubaron las células en estufa de cultivo durante 72 hs, después de las cuales se realizó la citometría.

(ii) Transducción por spinfection

La transducción por spinfection se utilizó tanto en células adherentes como en células crecidas en suspensión, si bien es un método usado principalmente para células en suspensión. Se agregaron los LVs a las células e inmediatamente fueron centrifugados durante 1h a 800g y 32°C. Una vez finalizada la centrifugación, se realizó un cambio de medio y se incubaron en la estufa de cultivo durante 72 hs, después de las cuales se realizó la citometría.

Para titular los VSV-G-LVs se utilizó la línea celular HEK293T. Para titular las construcciones de MV-LVs y NiV-LVs se utilizaron las líneas celulares CHO-anti-His y HT1080-anti-His. Estas células son susceptibles a todas las construcciones que portan VHHs, debido a que como se observa en la **figura-16**, en el extremo C-terminal de cada proteína se expresa un *tag* de 6xHis. En este caso, las partículas portadoras de Hmut/Gmut^{VHH-6xHis} pueden reconocer al scFv anti-His expresado en ambas líneas celulares como su receptor y mediar la transducción celular. Para titular, se tomó una placa de 96-pocillos de fondo chato (NUNC) y se sembraron 4x10⁴ células/pocillo en 100 µL del medio correspondiente. Al día siguiente se realizaron diluciones seriadas de los LVs en DMEM-Completo (siempre y cuando fuese necesario) y se agregaron 50-70 µL de las diluciones o de LVs sin concentrar a los pocillos con células. Se procedió con la transducción (estática o por spinfection) y luego se agregaron 150-200 µL del medio correspondiente. Se incubó el cultivo en estufa y a las 72 h post-transducción se realizó la citometría de flujo. Para ello, se incubaron las células de 3-5 minutos a 37°C con 20 µL de PBS-EDTA-Tripsina para su disgregación. Luego se agregaron 100 µL de FCB-Fix y se cargó la muestra en el citómetro.

El cálculo del título viral expresado en TU/mL es:

$$\text{Título (TU/mL)} = \frac{(\# \text{ de cél. GFP positivas}/100) \times (\# \text{ de cél. sembradas})}{\text{volumen de LVs agregado (mL)}} \times \text{factor dilución}$$

Siendo “# de cél.” una abreviación de número de células, y teniendo en cuenta que para el cálculo se utilizó la dilución más grande de aquellas que rindieron porcentajes de transducción entre 5% y 20%.

Con las TU/mL se calculó la multiplicidad de infección o MOI, con lo que se cuantifica la cantidad de partículas transducentes por número de células. La MOI se obtuvo de la siguiente forma:

$$\text{MOI} = \frac{\text{título (TU/mL)} \times \text{volumen de LVs (mL)}}{\# \text{ de cél sembradas}}$$

3.6.2. Titulación mediante RT-qPCR

Esta técnica, como se comentó anteriormente, nos permite calcular las TU/mL utilizando una correlación entre el valor de Ct obtenido de la qPCR y valores de TU/mL calculados para un vector de referencia. Para esto se utilizó un modelo descrito previamente por Vermeire et al¹⁹⁴. Este se basa en la presencia y actividad de la enzima RT encapsidada en los viriones. Para ello, se agrega un ARN foráneo, y en muestras donde hay presencia de RT, se retrotranscribirá el ARN a ADN copia (ADNc), el cual luego será amplificado por PCR pudiendo medir la “actividad” de RT en la muestra. Si bien este método no proporciona información directa sobre las TU/mL, se puede generar una curva de correlación con la titulación por transducción y de ésta estimar los valores de TU/mL.

Como se muestra en la **figura-17**, en este ensayo, se toma el sobrenadante celular o LVs concentrados y se someten a una etapa de lisis en la que se libera la RT al medio. Luego se agrega al pocillo un ARN foráneo proveniente del fago MS2 (se utiliza este ARN debido a que el mismo no tiene una etapa de ADN por lo que disminuye las posibles interferencias) y cebadores específicos para este ADN. Además, se agrega el mix de PCR conteniendo dNTPs, MgCl₂, buffer y SYBR green (Thermo Scientific).

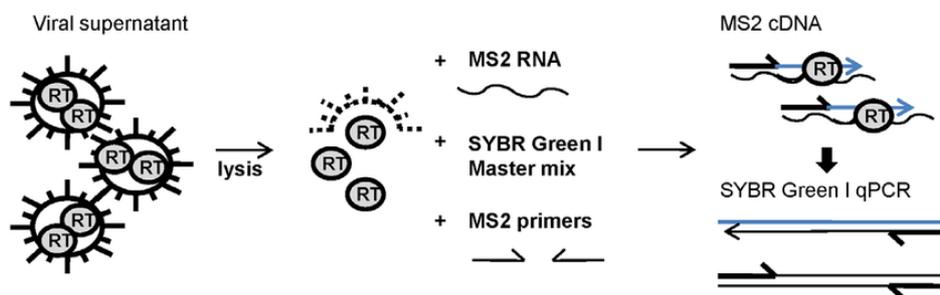


Figura-17. Descripción esquemática de los pasos para la titulación de LVs por RT-qPCR. En primera instancia, se toma una alícuota del sobrenadante viral y se realiza un paso de lisis (lysis) en el cual la RT viral se libera al medio. Luego se agrega un ARN (por ejemplo, de MS2), cebadores específicos y un master mix de qPCR y si de haber RT se retrotranscribirá el ARN a ADNc y se amplificará por sucesivos pasos de PCR. Adaptada de Vermeire et al., (2012).

Específicamente, se tomó una placa de 96-pocillos MicroAmp (Applied Biosystems) y se realizó la lisis del LVs con el BL (descrito en la sección Buffers y Soluciones). Se depositaron 5 µL directos o de una dilución de LVs en pocillos de la placa y se incubaron con 5 µl de BL durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción mediante adición de 190 µL de agua destilada de calidad biológica molecular. Posteriormente, se tomó otra placa de 96-pocillos MicroAmp y se realizó el mix para la PCR en un volumen final de 25 µL/reacción. Para este volumen se usaron 0,5 µM de cebadores

específicos para el ARN MS2 (ver tabla-5), 3,5 μmol de ARN MS2 (Sigma), 0,02 U/ μL de Ribolock RNase Inhibitor (Fermentas) y 12,5 μL de SYBR Green (Thermo Scientific).

Cebadores	Secuencia
FWD-RTqPCR	5'- TCC TGC TCA ACT TCC TGT CGA G -3'
REV-RTqPCR	5'- CAC AGG TCA AAC CTC CTA GGA ATG -3'

Tabla-5. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar el cADN de MS2 en la RT-qPCR. La secuencia se obtuvo de Vermeire et al., (2012).

Se utilizó un equipo de PCR Applied Biosystems 7500 HT y se siguió el protocolo detallado a continuación en la tabla-6:

Etapa	Tiempo	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Retrotranscripción	20 minutos	42
Activación inicial de Taq	15 minutos	95
Ciclado de 3 etapas:		
Desnaturalización	10 segundos	95
Unión de cebadores	30 segundos	60
Extensión	15 segundos	72
Número de ciclos	40 ciclos	

Tabla-6. Protocolo de la RT-qPCR para la detección de RT en muestras con LVs. La etapa de retrotranscripción ocurre a 42°C durante 20 minutos, y luego se activa la polimerasa Taq durante 15 minutos a 95°C . Posteriormente se realizan 40 ciclos de PCR en 3 etapas: desnaturalización (10s a 95°C), unión de los cebadores (30s a 60°C) y extensión (15s a 72°C).

Posteriormente, los datos fueron analizados utilizando el software SDS v.1.4.1 (Applied Biosystems).

3.7. Ensayo de unión por interferometría de biocapa (BLItz)

Para ello se utilizó el equipo BLItz (Fortebio) que mide en tiempo real interacciones moleculares. Se tomó un chip de estreptavidina (ForteBio) y se lo dejó hidratar por 10 minutos en kinetic buffer (KB). Posteriormente, debido a que todas las soluciones usadas son en KB, se realizó una línea de base inicial en kinetic buffer durante 30 segundos(s). Luego se sembraron 4 μL de una solución a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del VHH-76 anti-CD11b, realizando su cargado durante 120s, y se lavó durante 30 segundos en KB. La segunda etapa de cargado se realizó con 4 μL de una solución a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína

CD11b/CD18 (R&D) durante 120s. Luego se lavó durante 30 segundos en KB y se incubó con 4 μ L de los LVs re-direccionados con el VHH-36 (anti-CD11b) o con el VHH-T3 (anti-TT) durante 150s, tras lo cual se realizó una etapa de disociación en KB durante 120s con el fin de comprobar si la unión es estable. En la **figura-18**, a continuación, se detalla un esquema del ensayo.

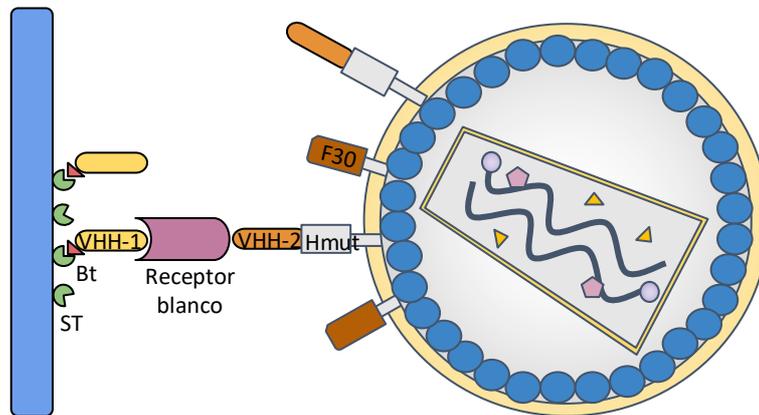


Figura-18. Esquema representativo de BLItz con LVs. Sobre un chip de estreptavidina (ST) se cargó un VHH-1 (VHH-76) biotilado (Bt). Luego se cargó el receptor blanco (CD11b/CD18) reconocido por el VHH-1 y posteriormente se incubó el LV acarreado la fusión Hmut^{VHH-2}. La unión de cada componente genera una señal que es captada por el equipo en tiempo real.

3.8. Caracterización de LVs por Nanosight

Se utilizó el equipo Nanosight NS500 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Este instrumento permite caracterizar nanopartículas proporcionando información detallada sobre su concentración y tamaño. Se tomó una alícuota del *batch* a utilizar y se realizaron diluciones de 1/3000 y 1/10000 en PBS, con el cual previamente se setó un blanco. Luego se inyectó la una dilución de cada muestra y para cada una se realizaron 4 medidas de 90 segundos a 25° C. Los datos se analizaron utilizando el software NTA2.3 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

3.9. Ensayo de unión de los LVs a sus células blanco

En la **tabla-7** a continuación, se detallan los anticuerpos utilizados en los ensayos de citometría de flujo y su dilución de uso para los experimentos *in-vitro*.

Clon	Antígeno	Fluoróforo	Dilución	Referencia
93	CD16/CD32	-	1/100	eBioscience, #14-0161-82
GG11-8F3.5.1	His6x	PE	1/100	Miltenyi Biotec, #130-098-810
M1/70	CD11b	PerCP-Cy5.5	1/100	eBioscience, #45-0112-82
M5/114.5.2	MHCII	PE	1/200	eBioscience, #12-5321-82
N418	CD11c	PE	1/300	eBioscience, #12-0114-82
HL3	CD11c	APC-Cy7	1/100	BDBiosciences, #561241

Tabla-7. Anticuerpos de citometría de flujo utilizados en experimentos *in-vitro*. Se describe para cada anticuerpo, el antígeno al cual reconocen, el clon, el fluoróforo al cual están conjugados, la dilución de uso y la compañía de donde se obtuvo.

Previamente a los ensayos de unión, se comprobó la expresión de los distintos receptores en las células blanco. Para esto, se despegaron/disgregaron las células de las botellas en donde se encontraban (siguiendo el método explicado anteriormente para cada tipo celular) y se tomaron 4×10^5 células por marcaje. Estas fueron centrifugadas a 300-400g por 5 minutos y 4°C y luego resuspendidas en 500 μL de FCB-Wash. Se lavaron mediante el mismo ciclo de centrifugado y resuspensión en FCB-Wash durante dos rondas. En el último lavado se resuspendieron las células en 100 μL de una dilución del anticuerpo anti-CD16/CD32 (en caso de ser necesitado) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C . Posteriormente se lavó 2 veces y finalmente se resuspendió el *pellet* en 100 μL de las diluciones correspondientes (detalladas en la **tabla-7**) de los anticuerpos anti-CD11b, -CD11c y -MHCII. Se incubaron 45 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugaron dos veces a 300-400g para ser lavadas en las condiciones mencionadas anteriormente. En el último lavado, se resuspendieron en 100 μL de FCB-Fix y fueron cargadas en el citómetro de flujo para su análisis (utilizando el software FlowJo o FCS Express). Una vez comprobada la expresión de los receptores, se procedió a realizar los ensayos de unión. Para ello, se tomaron 50 μL de una dilución de los distintos LVs y se agregó a 2×10^5 células blanco. La mezcla de células y LVs se centrifugó durante 1 h a 850g y a 4°C . Para lavar, se resuspendió el *pellet* en 500 μL de PBS y se centrifugó a 300g. El lavado se repitió x2. Posteriormente se agregaron 100 μL una dilución del anticuerpo anti-His-PE (ver **tabla-7**), se lavó y se resuspendió finalmente en 100 μL de FCB-Fix para ser cargado en el citómetro de flujo. Es de suma importancia destacar que durante todo el proceso la muestra se conservó a 4°C para evitar internalización de las partículas virales ya sea por endocitosis o por fusión de las membranas.

3.10. Transducción *in-vitro* y análisis por citometría de flujo.

Para transducir las células blanco mBMDCs, J774A.1, RAW264.7, JAWSII y THP-1 se tomó el volumen de LV necesario y se procedió con la transducción estática o por spinfection siguiendo el protocolo

detallado anteriormente. Luego de 72 horas, las células fueron lavadas x2 con 500 μ L FCB-Wash y centrifugadas a 300-400g durante 5 minutos. Luego, se incubaron durante 30 minutos a 4°C con la dilución de uso del anticuerpo anti-CD16/CD32 (detallado en la **tabla-7**) para bloquear los receptores Fc. Posteriormente se lavó x2 como fue indicado anteriormente y se procedió a teñir las células con los distintos anticuerpos de marcaje (**ver tabla-7**) mediante incubación a 4°C por 45 minutos y en oscuridad. Una vez finalizada la incubación, se lavó la muestra x2 y el *pellet* se resuspendió en 100 μ L de FCB-Fix para ser cargado en el citómetro. El análisis de citometría se realizó utilizando el software FlowJo o FCS Express.

3.11. Transducción *in-vivo* de ratones mediante inyección con LVs.

Los ratones de la cepa C57BL/6 o BALBc fueron obtenidos del bioterio de Facultad de Medicina con edad de 6-8 semanas y se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Higiene hasta su uso. Tanto para la inyección como para el procesamiento de los ratones, se recibió ayuda de la Dra. Cecilia Casaravilla. El protocolo utilizado se corresponde al numero 865 de los protocolos de la CEUA, Facultad de Química.

Brevemente, los ratones se inyectaron por i) vía i.p. con 200 μ L de LVs conteniendo 1×10^6 TU/mL o con 200 μ L de PBS como control o ii) vía intravenosa con 100 μ L de LVs conteniendo 1×10^6 TU/mL o con 100 μ L de PBS como control. Entre 5 y 8 días más tarde, los ratones se sacrificaron utilizando isofluorano y se obtuvieron i) las células de la cavidad peritoneal y/o de los ganglios mesentéricos o ii) el bazo. Para obtener las células de la cavidad peritoneal, se realizó un corte con un bisturí, teniendo cuidado de no perforar el peritoneo. Se tomó una jeringa con aguja 25G, se cargó con 5mL de DMEM-0,2% SFB y se inyectó en la cavidad peritoneal, homogeneizando mediante movimientos suaves. Posteriormente se succionó el líquido de la cavidad peritoneal y se realizó un segundo lavado de la misma forma; ambos se juntaron en un tubo falcon de 10 mL, que se mantuvo a 4°C. Luego se abrió la cavidad peritoneal del ratón utilizando un bisturí y se obtuvieron i) los ganglios mesentéricos o ii) el bazo, que se conservaron en 1 mL de DMEM-0,2%SFB a 4°C. Estos se machacaron y disgregaron sobre una malla de serigrafía que permite el pasaje de células y se resuspendieron en 2 mL de DMEM-0,2% SFB. Posteriormente, tanto las células de la cavidad peritoneal como las de ganglio/bazo y se centrifugaron a 350g durante 7 minutos a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 3 mL de FCB-Wash y se repitió el paso de lavado. En el caso del bazo se lisaron los glóbulos rojos con Buffer RCB (Sigma Aldrich) como lo indica en el manual y luego se repitieron los pasos de lavados detallados anteriormente. Luego, se tomó una alícuota de 10 μ L de células y se mezclaron con 10 μ L de la tinta

AOPI para ser contadas utilizando el instrumento Cellometer (Nexcelom). Posteriormente, las células se centrifugaron en las condiciones mencionadas anteriormente y se resuspendieron un volumen de FCB-Wash de tal manera que quedaran en una concentración de 1×10^6 células/100 μL . Posteriormente, se tomó una placa de 96-pocillos fondo en V (Greiner) y se depositaron 100 μL de cada muestra por pocillo. La placa se centrifugó como se describió anteriormente y las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C con 25 μL de suero normal de rata. Este paso es crucial debido a que se bloquean los receptores Fc. En paralelo, se procedió a realizar el mix de tinción necesario (utilizando los anticuerpos detallados en la **tabla-8**) y, finalizada la se agregó 25 μL del mix de anticuerpos a las células. En caso de los controles sin tinción, se agregaron 25 μL de FCB-Wash. Las células se incubaron durante 45 minutos a 4°C y en oscuridad y luego se centrifugaron dos veces para ser lavadas. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 100 μL de FCB-Fix y se cargaron en el citómetro. El análisis de citometría se realizó utilizando el software FlowJo.

Clon	Antígeno	Fluoróforo	Dilución	Referencia
N418	CD11c	BV421	1/200	BioLegend, #117343
17A2	CD3	APC	1/100	BioLegend, #100236
BM8	F4/80	PE-Cy7	1/100	BioLegend, #123114
6D5	CD19	APC-Cy7	1/100	BioLegend, #115530
M1/70	CD11b	PerCP-Cy5.5	1/100	eBioscience, #45-0112-82
M5/114.5.2	MHCII	PE	1/200	eBioscience, #12-5321-82
GL-1	CD86	BV421	1/200	BioLegend, #105031
16-10A1	CD80	PE	1/200	eBioscience, #12-0801-82

Tabla-8. Anticuerpos de citometría de flujo utilizados en ensayos realizados *in-vivo*. Se describe para cada anticuerpo, el antígeno al cual reconocen, el clon, el fluoróforo al cual están conjugados, la dilución de uso y la compañía de donde se obtuvo.

3.12. Construcción del plásmido de transferencia pSIN-DP-SFFV/CMV.

Se diseñó un gen sintético, llamado DP-SFFV/CMV, que contiene, como se muestra en la **figura-19**, una secuencia irrelevante flanqueada por los sitios de enzima BamHI y XhoI, bajo la acción del promotor SFFV y una segunda secuencia irrelevante flanqueada por los sitios SpeI y SalI, bajo la expresión del promotor CMV. A su vez, este gen posee un sitio para NheI en su extremo 5'. La secuencia del promotor SFFV, así como las secuencias *downstream* y *upstream* al mismo fueron obtenidas del plásmido pSIN-SFFV. De la misma manera, las del promotor CMV se obtuvieron de un plásmido genérico (addgene). Este gen se sintetizó utilizando el servicio de Gene Synthesis (opción

Custom Gene Synthesis) de General Biosystems. Como parte del servicio se clonó dicho gen por digestión con los sitios KpnI y StuI al vector pUC57 y se liofilizaron 5 µg en un tubo eppendorf.

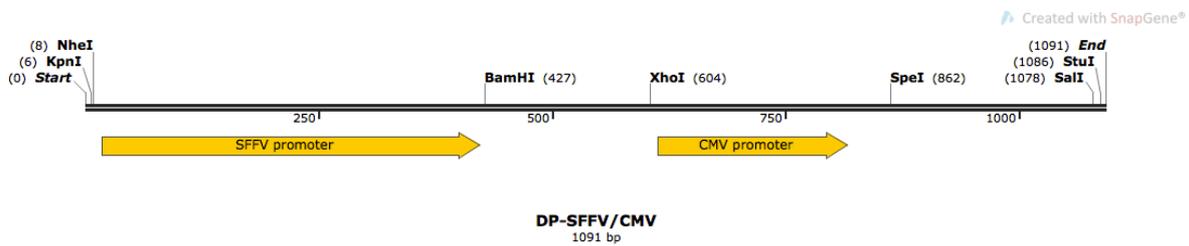


Figura-19. Esquema representativo de la secuencia del gen DP-SFFV/CMV. Este contiene dos sitios de clonaje para proteínas, uno entre los sitios BamHI y XhoI, bajo la expresión del promotor SFFV, y el segundo, flanqueado por los sitios SpeI y SalI que se encuentra bajo la expresión del promotor CMV. A su vez, en el extremo 5' contiene un sitio para NheI y se encuentra flanqueado por los sitios KpnI y StuI que fueron utilizados para su clonaje en el vector pUC57.

El plásmido pUC57 con el gen DP-SFFV/CMV clonado se resuspendió en 100 µL de agua calidad biología molecular. Se tomó una 1 µL del mismo y se utilizó para transformar bacterias DH5α (Thermo Scientific) como se describió anteriormente. Las bacterias se plaquearon en placas de agar-Ampicilina (resistencia proporcionada por el pUC57) y se crecieron ON a 37°C. Al día siguiente se realizó una mini-prep (Qiagen) y el ADNp resultante se digirió con las enzimas NheI y SalI en dos etapas. Primero se digirió con NheI durante 1 hora a 37° C en buffer Tango 1X. Luego de terminada la incubación, se llevó a una concentración 2X del buffer Tango y se agregó la enzima SalI. La mezcla se incubó por una hora más en las mismas condiciones. Simultáneamente, se realizó la misma digestión con el plásmido pSIN-SFFV-GFP. Tanto el inserto (gen sintético) del pUC57 como el *backbone* del pSIN-SFFV-GFP fueron cargados en un gel de agarosa 1X y purificados mediante un kit de extracción de gel (Thermo Scientific). Como resultado, se obtuvo por un lado el gen sintético y por el otro lado el plásmido pSIN (con la secuencia de SFFV-GFP eliminada). Posteriormente, se ligaron ambos productos utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente y se produjo una preparación de ADN plasmídico de este nuevo plásmido llamado pSIN-DP-SFFV/CMV.

3.13. Clonaje de GFP, NIK y fragmentos de NIK al plásmido pSIN-DP-SFFV/CMV.

El plásmido pcDNA3-NIK fue generosamente cedido por el Prof. Wallach (The Weizmann Institute of Science, Israel). Este codifica para la secuencia completa (947 aminoácidos) de la quinasa NIK. Se realizaron una serie de PCRs para clonar el gen y versiones truncadas del mismo en el plásmido pSIN-

DP-SFFV/CMV utilizando los cebadores descritos en la **tabla-9**. Los cebadores FWD (NIK1 y NIK329) contienen los sitios de corte para BamHI y SpeI y la secuencia consenso Kozak, de suma importancia para la traducción de las proteínas. Por otra parte, los cebadores REV (NIK747 y NIK947) contienen los sitios de digestión para XhoI y SalI. Para generar la versión completa, denominada NIK α , se utilizaron los cebadores FWD-NIK1 y REV-NIK947. Para generar las versiones truncadas NIK β , NIK ϵ y NIK γ se utilizaron los pares FWD-NIK1/REV-NIK747, FWD-NIK329/REV-NIK747 y FWD-NIK329/REV-NIK947 respectivamente. Por otra parte, se utilizaron los cebadores FWD-DUAL-GFP y REV-DUAL-GFP (ver **tabla-9**) para amplificar el gen de GFP desde el vector pSIN-SFFV-GFP. Los productos de PCR se limpiaron mediante un kit de purificación de PCR y se digirieron con las enzimas BamHI/XhoI (generando los productos llamados BX) o con las enzimas SpeI/SalI (generando los productos llamados SS). Para la digestión BX se utilizó el buffer G (Thermo Scientific) y el doble de la concentración requerida de XhoI. La mezcla fue incubada durante 4 horas a 37°C. Para la digestión SS, primero se digirió durante 2 horas con SpeI en buffer Tango 1X a 37°C y luego se adicionó buffer Tango hasta una concentración 2X y se agregó el doble requerido de la enzima SalI. La mezcla fue incubada por dos horas más a 37°C. De forma paralela se digirió el pSIN-DP-SFFV/CMV para generar ambas versiones, BX o SS. Los productos de digestión se cargaron en un gel de agarosa 1X y se purificaron por un kit de extracción de gel. Posteriormente, los productos BX o SS de la NIK y sus versiones truncadas se ligaron con el pSIN-DP-SFFV_{BX}/CMV o el pSIN-DP-SFFV/CMV_{SS} generando los vectores pSIN-DP-SFFV(NIK)/CMV o pSIN-DP-SFFV/CMV(NIK).

Cebadores	Secuencia
FWD-NIK1	5'- AA AAA <u>GGATCC ACTAGT</u> <i>GCCACCATGG</i> CAG TGA TGG AAA TGG CCTG-3'
FWD-NIK329	5'-AA AAA <u>GGATCC ACTAGT</u> <i>GCCACC ATGG</i> AGA AGT TTT CTG TGG AGG AAT ACC TAG-3'
REV-NIK747	5'-AA AAA <u>CTCGAG GTCGAC</u> TTA GGA GGA CAG AGG TAA GGG TTC C-3'
REV-NIK947	5'-AA AAA <u>CTCGAG GTCGAC</u> TTA GGG CCT GTT CTC CAG CTG-3'
FWD-DUAL-GFP	5'-AA AAA <u>GGATCC ACTAGT</u> <i>GCCACCATGG</i> TGA GCA AGG GCG AGG-3'
REV-DUAL-GFP	5'- AA AAA <u>CTCGAG GTCGAC</u> TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3'

Tabla-9. Cebadores utilizados para la amplificación de NIK y sus versiones truncadas. Los cebadores FWD (1,329, y DUAL-GFP) contienen los sitios de enzima para BamHI y SpeI subrayados en la secuencia. Además, en negrita-italica se encuentra la secuencia consenso de Kozak, que fue añadida junto con el ATG de inicio de la proteína. Los números 1 y 329 hacen referencia al número del primer aminoácido codificado en la NIK. Por otra parte, los cebadores REV (747, 947 y DUAL-GFP) contienen los sitios de restricción para las enzimas XhoI y SalI, subrayados en la secuencia. Además, codifican para un codón stop (secuencia TTA, leída TAA). Los números 747 y 947 de los cebadores para NIK hacen referencia hasta al numero del ultimo aminoácido codificado.

3.14. Transducción y cuantificación de ILs en sobrenadante.

Las mBMDCs y los THP-1 fueron transducidos de forma estática y por spinfection respectivamente y se cultivaron durante 6 días post-transducción. Los sobrenadantes fueron recolectados al día 6 y de no ser usados en mismo día, se mantuvieron en el freezer a -80°C . Se prepararon diluciones de los mismos y se siguió el protocolo determinado por cada kit comercial. Se cuantificó IL-12 para las mBMDCs e IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α para las células THP-1.

Generalizando, se sensibilizó una placa de fondo chato de 96-pocillos (Greiner) con la dilución correspondiente para cada anticuerpo de captura (indicada en el kit). Para ello, se depositaron 100 μL /pocillo de la dilución del anticuerpo y se incubó ON a 4°C . Luego se descartó el líquido y se lavó 2x con 300 μL de PBS-BSA 0,2%-Tween 0,05% (Buffer lavado). Luego se incubó la muestra, un control negativo o un estándar durante una hora en agitación y a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación se lavó 2x y se procedió a incubar con 100 μL /pocillo de la dilución del anticuerpo de detección en las mismas condiciones. Cabe destacar que algunos kits sugerían la incubación de la muestra y el anticuerpo de detección simultáneamente durante dos horas en agitación y a temperatura ambiente. Los anticuerpos de detección utilizados se encuentran conjugados a biotina por lo que luego de realizar dos lavados con el buffer de lavado se procedió a la incubación con estreptavidina-peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente, y en agitación y oscuridad. Posteriormente se realizaron dos lavados y se reveló la muestra utilizando el sustrato (descrito en la sección Buffers y Soluciones). La reacción se detuvo con 50 μL de ácido sulfúrico y luego se midió la absorbancia utilizando el equipo Fluostar.

4. Resultados y Discusión

4.1. Las preparaciones iniciales de MV-Hmut^{(Bi)VHH}-LVs alcanzaron valores de TU/mL por RT-qPCR similares a los reportados para vectores análogos.

Para generar los plásmidos codificantes para las fusiones Hmut^{VHH}, los genes de los VHHs fueron amplificados mediante PCR utilizando como molde los vectores pINQBtH6-VHHs, generados por el Dr. Rossotti, tal y como se indica anteriormente en la sección 3.2.1. A su vez, para la amplificación de los BiVHHs, se siguió el protocolo detallado en la sección 3.2.2. Los insertos codificantes para los VHHs (o su versión BiVHHs) fueron clonados en el vector MV-Hmut generando los vectores MV-Hmut^{(Bi)VHH}, que se secuenciaron utilizando el servicio de secuenciación de *Cambridge University*. Una vez comprobado el correcto clonaje de todos los nanobodies, se propuso producir los MV-Hmut^{(Bi)VHH}-LVs de acuerdo al protocolo utilizado en el laboratorio de la Prof. Collins, detallado en la sección 3.5.1.1. Brevemente, se transfectaron células HEK293T con los plásmidos p8.91, pSIN-SFFV-GFP, FΔ30 y MV-Hmut^{(Bi)VHH} (utilizando una relación 1:1 de MV-F30: MV-Hmut^{(Bi)VHH}). A las 48 h post-transfección, los LVs fueron concentrados por centrifugación. Simultáneamente, se generó un VSV-G-LV para ser utilizado como control positivo, tanto de transfección como de transducción. Para ello, se co-transfectaron células HEK293T con los plásmidos p8.91, pSIN-SFFV-GFP y pMDG.2 y se concentraron los LVs por ultracentrifugación como se indica en la sección 3.5.1.1. El siguiente paso luego de la producción de LVs es cuantificar el número de partículas obtenidas en cada preparación. Para ello, como se ha mencionado, existen principalmente dos métodos, aquellos que cuantifican las partículas totales, independientemente de su funcionalidad, y aquellos que cuantifican las partículas capaces de transducir. Sin embargo, para luego transducir células blanco con una MOI controlada, se debe conocer el título de aquellas partículas capaces de mediar la transducción. Para ello, se transducen células susceptibles con diluciones seriadas del LV y se cuantifica la expresión del transgen en las células transducidas, obteniendo un valor de las unidades transducentes por mililitro de muestra (TU/mL). Sin embargo, al momento no se poseían células que fueran susceptibles (y de fácil cultivo) a la transducción por los distintos MV-Hmut^{(Bi)VHH}-LVs, por lo que recurrimos a la generación de una curva de correlación entre el método de titulación por RT-qPCR (descrito en la sección 3.6.2) y la titulación por transducción de células utilizando el VSV-G-LV. Para ello, por una parte, se transdujeron células HEK293T con diluciones seriadas del vector concentrado, y a las 72 h se analizó la expresión del transgen GFP mediante citometría de flujo. Luego se calculó el título (en TU/mL) del vector y se realizaron diluciones conocidas que fueron tituladas mediante RT-qPCR, generando de

esta manera la curva de correlación entre ambos métodos. Como se observa en la figura-20, tras el ajuste, existe una muy buena correlación entre ambos métodos, presentando un $R^2=0,997$.

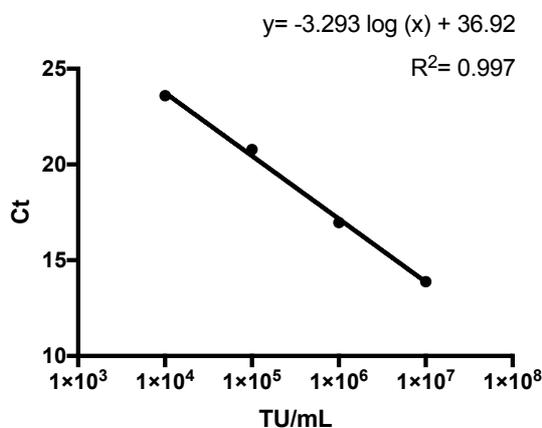


Figura-20. Curva de correlación entre el Ct y las TU/mL. Dicha curva se realizó utilizando un VSV-G-LV. Para ello, se realizaron diluciones conocidas de un vector previamente titulado por transducción de células HEK293T, las cuales fueron tituladas por RT-qPCR. De esta forma se generó una correlación entre el valor de Ct obtenido de la RT-qPCR y el valor en TU/mL obtenido de la cuantificación por transducción de células. Se realizó un ajuste de los datos con escala semilogarítmica.

Es de notar, que los LV pseudotipados con VSV-G poseen muy buena capacidad de transducción y por tanto el uso de esta curva para titular nuestras preparaciones, asume que nuestras preparaciones de LVs poseen una relación similar entre la actividad de RT y TU/mL, lo cual como veremos más adelante no es necesariamente así. Utilizando esta curva de correlación, se titularon los ocho MV-Hmut^{(Bj)VHH}-LVs mediante RT-qPCR y se interpolaron los valores correspondientes de TU/mL (ver figura-21). Sorprendentemente, no se observaron diferencias notorias entre los MV-Hmut^{(Bj)VHH}-LVs, donde el título más bajo es de $3,9 \times 10^6$ TU/mL (BiVHH-V36-V36) y el más alto es de $7,0 \times 10^6$ TU/mL (VHH-N11).

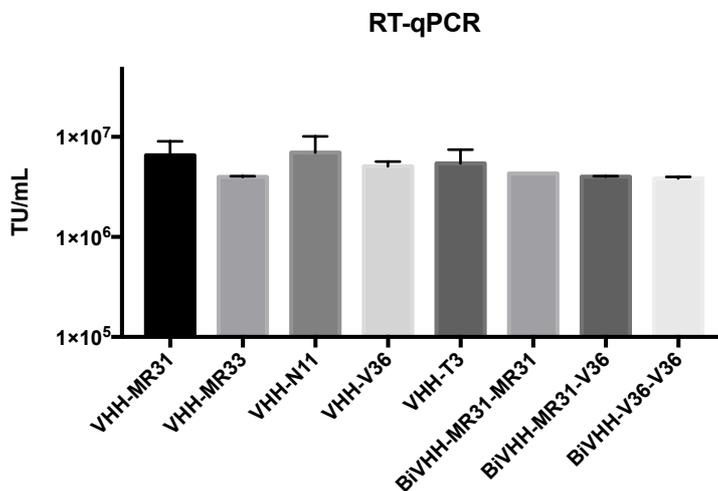


Figura-21. Titulación de los MV-LVs por RT-qPCR. Se observan los títulos de los MV-LVs expresados en TU/mL, calculados a partir de la extrapolación de los valores de Ct con la curva de correlación detallada en la figura-20. Se realizaron por lo menos 3 producciones independientes para cada LV.

Si bien el título del VSV-G-LV calculado por transducción de células HEK293T alcanza las 10^8 TU/mL (resultado no mostrado), es de esperar que los MV-Hmut^{(Bi)VHH}-LVs presenten títulos menores. Por una parte, el número menor de partículas totales (o más precisamente la menor actividad de RT) se puede deber a que la expresión de la proteína MV-F22 en las células productoras genera la formación de sincitios que afecta la capacidad de producción de LVs¹⁹⁵. Por otra parte, durante la generación de los mismos, se utiliza un plásmido adicional (ya que posee dos proteínas de membrana) en comparación con la producción de VSV-G-LVs. Por ende, para que se produzcan partículas funcionales en el primer caso, una misma célula productora debe transfectarse con cuatro plásmidos (menor probabilidad), mientras que en el segundo caso debe transfectarse con tres. Durante la producción de VSV-G-LVs se pueden producir partículas no transductantes, por ejemplo, por falta de incorporación del transgen (las cuales no serían detectadas) o por falta de incorporación de la proteína VSV-G en la partícula. Sumado a estas dos posibilidades, en el caso de los MV-LVs, se pueden producir partículas con falta de una de las dos proteínas de membrana, o con una relación de los plásmidos MV-F30: MV-Hmut^{(Bi)VHH} que afecte su capacidad de transducción, por lo que es de esperar que las unidades transductantes sean menores. No obstante, los títulos calculados fueron muy similares a los obtenidos con el MV-Hmut^{scFv-MHCII}-LV, publicado previamente por el grupo de la Prof. Collins, por lo que se concluyó que el proceso de transfección y generación de los MV-Hmut^{(Bi)VHH}-LVs había sido eficiente. Por esta razón, se propuso determinar la capacidad de transducción de los LVs en células blanco.

4.2. Los primeros intentos de transducción de células dendríticas murinas con los MV-Hmut^{VHH}-LVs no fueron exitosos.

Para comprobar la funcionalidad de los LVs producidos, se propuso transducir células blanco y cuantificar la expresión de GFP. Para ello, se generaron mBMDCs a partir de ratones C57BL/6 (protocolo detallado en la sección 3.3.2.1) y se fenotiparon por citometría de flujo, confirmando la expresión de los receptores *target* CD11c y CD11b (resultados no mostrados). Debido a que se poseían varias construcciones contra el mismo receptor, a modo de reducir la cantidad de LVs con los cuales trabajar, se eligió transducir las mBMDCs con los MV-Hmut^{VHH}-LVs anti-CD11c (MR31), anti-CD11b

(V36) y anti-toxoide tetánico (T3) como control negativo. Además del control de mBMDCs sin transducir, la construcción con el VHH-T3 se utilizó como control negativo de los LVs ya que posee una especificidad irrelevante en el contexto de este trabajo. El uso de este control era de suma importancia para comprobar que la fusión de los VHH-MR31 y -V36 a Hmut era capaz de medir la transducción, mientras que la fusión con un VHH con especificidad irrelevante (T3), no daba lugar a este proceso. Como control positivo se utilizó un VSV-G-LV, el cual ya se conocía que era capaz de transducir mBMDCs. Basados en la literatura¹⁹⁶, decidimos utilizar una MOI=10, teniendo en cuenta los títulos calculados anteriormente (ver **figura-21**). En la **figura-22**, a continuación, se muestra el porcentaje de células GFP⁺ (células transducidas) para cada LV.

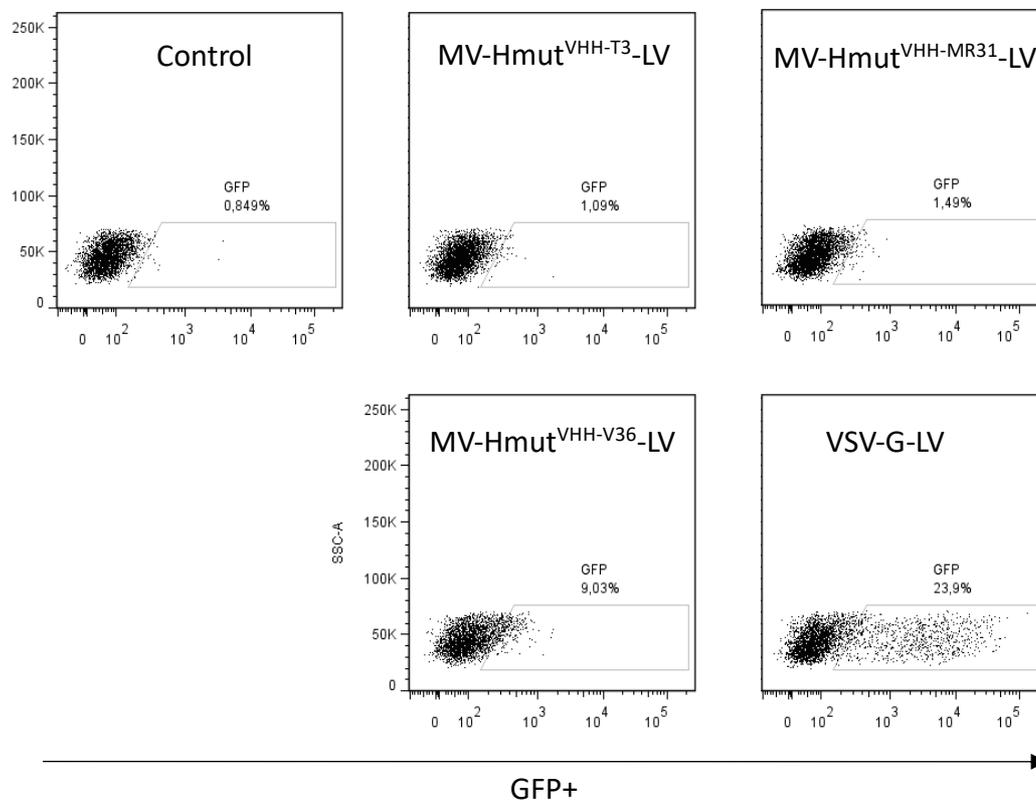


Figura 22. Transducción estática de mBMDCs a una MOI de 10. Se transdujeron mBMDCs y a las 72 horas se cuantificó la expresión de GFP mediante citometría de flujo. Como control negativo se utilizaron células sin transducir y como control positivo se utilizó el VSV-G-LV. Se usaron las construcciones anti toxoide tetánico (MV-Hmut^{VHH-T3}-LV), anti-CD11c (MV-Hmut^{VHH-MR31}-LV) y anti-CD11b (MV-Hmut^{VHH-V36}-LV).

Como se observa en la **figura-22**, y para nuestra sorpresa, ninguno de los MV-Hmut^{VHH}-LVs fue capaz de transducir las mBMDCs. Contrariamente, el VSV-G-LV transdujo las mBMDCs muy eficientemente, alcanzando un 23,9% de células GFP⁺. Si bien en el caso del MV-Hmut^{VHH-V36}-LV se

observa un 9,0% de células GFP⁺, la intensidad de expresión de GFP es notablemente menor en comparación a la generada por el VSV-G-LV. Este fenómeno, en el cual aparentemente hay células transducidas pero las mismas no expresan niveles altos del transgen, se denomina pseudotransducción^{197,198}. Esto sucede cuando el LV es capaz de entrar a la célula blanco, pero no de integrarse al genoma y por ello no hay expresión del transgen. Cuando el LV brota de la célula puede llevar en su interior proteínas que se encuentren sobre-expresadas en el citoplasma de la célula productora, por ejemplo, GFP. Si el LV entra a una célula (o es captado inespecíficamente) liberará su contenido al citoplasma celular, entre las cuales se puede encontrar GFP. Consecuentemente, se genera una señal positiva, y generalmente de baja intensidad, que a su vez esta caracterizada por ser de corta duración.

En función de estos resultados negativos se decidió revisar los distintos pasos que precedieron este experimento. Desde la generación de los LVs hasta la transducción de células, se pueden definir varias etapas, entre ellas, la transfección de las células productoras, generación de los LVs, concentración de los mismos, unión de estos a la célula blanco y transducción (integración al genoma). Por una parte, en vista de los resultados, se había asumido que el proceso de transfección era exitoso debido a que se realizó de forma paralela (y utilizando los mismos reactivos) que para las preparaciones de VSV-G-LV. A su vez, se concluyó que los MV-Hmut^{VHH}-LVs estaban siendo generados debido a que se cuantificaban por RT-qPCR, por lo que asumía que las etapas de transfección, generación y concentración de los LVs estaba siendo llevada a cabo de forma correcta. Finalmente, cabía la posibilidad de que la etapa de unión a las mBMDCs fuese la que estaba fallando. En este sentido, cabe recordar que la cuantificación por RT-qPCR no proporciona información sobre la viabilidad (o funcionalidad) de las partículas, y por tanto era posible que los LVs no estuviesen acarreamo cantidades suficientes (posiblemente debido a la baja expresión) de las proteínas de *targeting* Hmut^{VHH}. De ser así, las partículas se podrían generar, pero no ser capaces de unirse (ni transducir) a la célula y posiblemente la pseudotransducción observada con el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV se podría haber generado por captación inespecífica de las partículas.

4.3. Las proteínas de envoltura se expresan en altos niveles y los LVs generados reconocen a su antígeno.

De modo de revisar las distintas etapas, inicialmente se procedió a cuantificar la expresión de las fusiones Hmut^{VHHs} sobre la membrana de células HEK293T transfectadas, ya que la sobre-expresión estas proteínas y su incorporación a la partícula durante el brotamiento de las mismas, son pasos

limitantes para definir el potencial de transducción de los LVs. Para ello se transfectaron células HEK293T con cada una de las construcciones, y a las 48 hs, se midieron los niveles de expresión en la membrana a través del revelado con un anticuerpo anti-His-PE (ver figura-23). Cabe recordar que todos los VHHs llevan en su extremo C-terminal (extremo expuesto al exterior celular) un *tag* de 6xHis. Además de las construcciones con los VHHs, se incluyó un control de expresión del plásmido MV-p11^{DARPin-CD4} utilizada y generada en el laboratorio del Prof. Buchholz. Dicho plásmido (MV-p11) codifica para la proteína Hmut (en este caso fusionada a una DARPin anti-CD4) y también contiene un *tag* 6xHis en su extremo C-terminal.

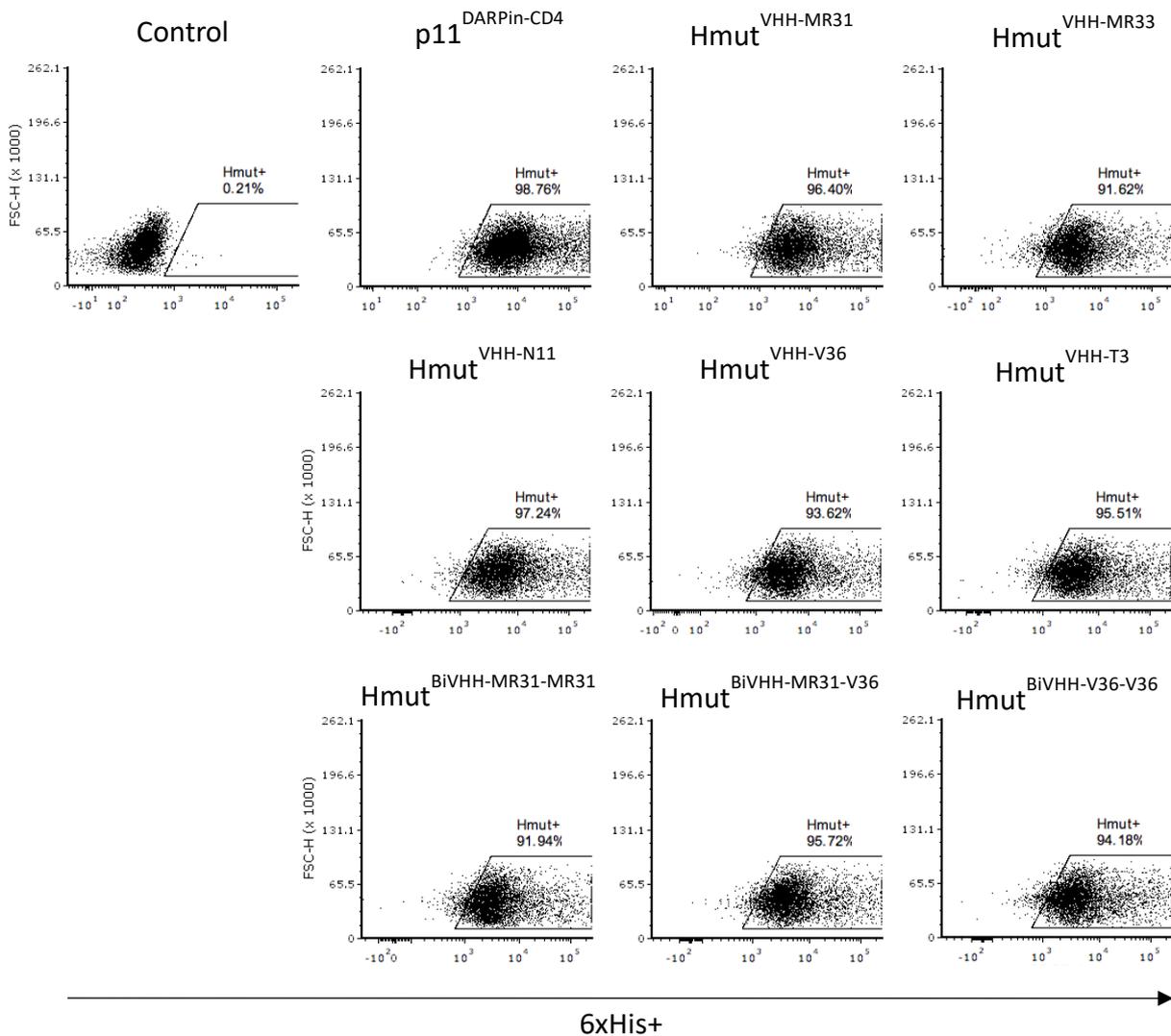


Figura-23. Expresión de Hmut^{VHH} sobre células HEK293T. Se transfectaron células HEK293T y 48 h más tarde se cuantificó la expresión de las proteínas de fusión Hmut^{VHH} mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-His (reconoce el *tag* 6xHis). Como control negativo se utilizaron células sin transfectar y como control positivo se transfectaron células para la expresión de p11^{DARPin-CD4}.

Como se observa en la **figura-23**, todas las construcciones alcanzaron niveles de expresión muy altos (mayores al 91,2%) y muy similares al control positivo con MV-p11^{DARPin-CD4} (98,8%). Esto indica que, contrario a lo que se ha reportado con algunos scFv¹⁸⁰, todos los nanobodies testeados permiten una alta expresión fusionados a Hmut, por lo que surgen como un dominio de unión muy eficiente a ser incorporado en fusiones con Hmut, probablemente debido a su pequeño tamaño y capacidad de plegamiento independiente. De todas formas, mientras que la MFI (Intensidad de fluorescencia promedio) de las células Hmut⁺ en el control positivo es de 7384, nuestros vectores presentan MFI menores que van desde 3114 a 5034. Esto podría deberse, por un lado, a que el plásmido p11 se encuentra optimizado y permite una mejor expresión de la proteína o que simplemente esta DARPin anti-CD4 en su fusión con Hmut es mejor expresada sobre la membrana celular. De todas formas, se consideró que la expresión de todas las Hmut^{(Bi)VHH} testeadas fue de muy buen rendimiento.

En resumen, hasta este momento, se conocía que nuestras partículas virales se estaban generando en niveles comparables a los ya publicados (de acuerdo a la titulación por RT-qPCR) y que las proteínas Hmut^{(Bi)VHH} estaban siendo sobre-expresadas en la membrana, por lo que es de pensar que éstas estaban siendo incorporadas en las partículas lentivirales. Para comprobar esto, se tomó como modelo el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV y se realizó un ensayo de interferometría de biocapa (BLItz) para evidenciar la presencia de la proteína de unión en el LV evaluando su capacidad de unión a su ligando. Para ello, como se indica en la sección 3.7, sobre un chip de estreptavidina se capturó a la proteína CD11b/CD18 mediante la unión del VHH-76^{Bt} (anti-CD11b) que reconoce un epítipo diferente y no solapado al VHH-V36, y luego se incubó con partículas de MV-Hmut^{VHH-V36}-LV (anti-CD11b) o de MV-Hmut^{VHH-T3}-LV (anti-TT) como control negativo.

Como se observa en la **figura-24**, tanto el cargado del VHH-76^{Bt} al chip de estreptavidina como el cargado de CD11b/CD18 se dio de forma eficiente, ya que se registró un aumento de señal. En la **figura-24a**, correspondiente al MV-Hmut^{VHH-V36}-LV, se observa que al incubar este LV se registró un aumento en la señal que indicó su unión a CD18/CD11b, mientras que cuando se incubó con el MV-Hmut^{VHH-T3}-LV (**figura-24b**) no se observó unión. Respecto a la disociación MV-Hmut^{VHH-V36}-LV la misma ocurre de forma lenta como cabe esperar teniendo en cuenta la alta afinidad del VHH-V36. Mediante este sencillo ensayo, se obtuvo información muy valiosa que confirmó, por lo menos para el caso del MV- Hmut^{VHH-V36}-LV, que la proteína Hmut^{VHH-V36} estaba siendo incorporada en la partícula y era capaz de unirse a su ligando, por lo que la incapacidad de transducción, al menos en cierta medida, debería ser por otra causa.

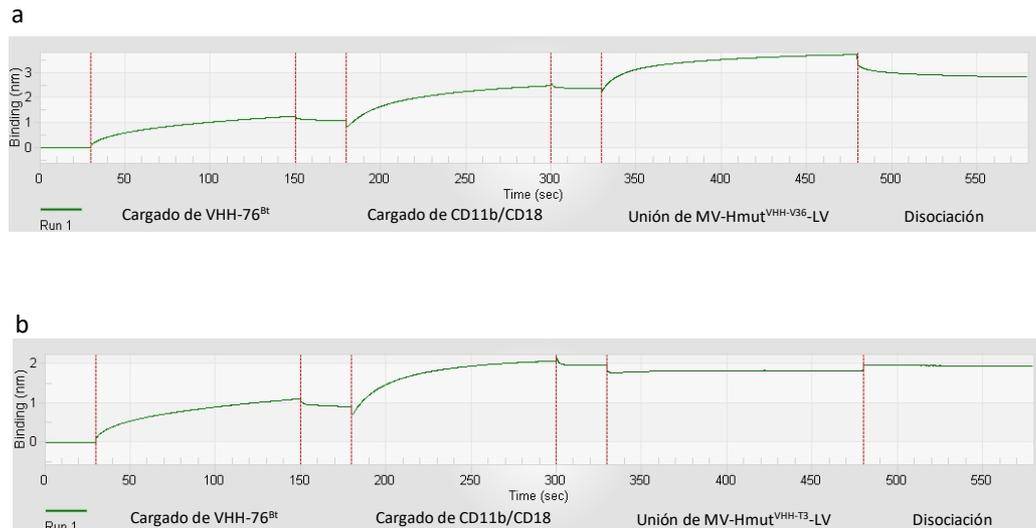


Figura 24. Ensayo de unión por BLITz. Para ello se utilizó un chip de estreptavidina (previamente hidratado en buffer KB) que fue cargado con 4 μ L de una solución a 20 μ g/mL del VHH-76 biotinilado (VHH-76^{Bt}) durante 120s, tras lo cual se realizó un lavado con buffer KB. Posteriormente, en las mismas condiciones, se cargó la proteína CD11b/CD18 y luego del lavado, se incubó durante 150 segundos con a) MV-Hmut^{VHH-V36}-LV o b) MV-Hmut^{VHH-T3}-LV. Por último, se realizó una etapa de disociación en buffer durante 120 s.

En conclusión, y extrapolando los resultados obtenidos para el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV a los otros LVs, podríamos confirmar que las proteínas de *targeting* no solo estaban siendo sobre-expresadas en las células productoras, sino que también estaban siendo incorporadas al LV y permitían la unión a su ligando, por lo que deberían de ser capaces de transducir las células blanco. En este sentido, y habiendo explorado ya las distintas etapas en la generación de LVs, surgió la idea de que quizás el título de los MV-Hmut^{(Bi)VHH}-LVs calculado por RT-qPCR estaba siendo sobre-estimado por lo que la transducción de mBMDCs pudo haber sido realizada a una MOI mucho más baja de lo estimado, resultando en la ineficiencia de transducción. Como se ha comentado, el valor obtenido por RT-qPCR se utilizó como una aproximación para estimar el título de los vectores, asumiendo que la actividad de RT en nuestras preparaciones indicaba una capacidad de transducción similar a la de los VSV-G-LVs en células HEK293T. Esto implica asumir una similar eficiencia de producción de partículas lentivirales y de capacidad de transducción que seguramente llevaron a sobreestimar su título. Por otra parte, para que los MV-LVs sean capaces de fusionar su membrana con la de la célula blanco, tiene que haber una relación óptima entre las dos proteínas de membrana, F30 y Hmut, la cual, hasta el momento, estaba siendo de 1 a 1, basados en el protocolo de producción utilizado en el laboratorio de la Prof. Collins.

Para corroborar las dos hipótesis anteriores, es decir, comprobar el bajo título de los LVs y explorar otra relación de F30:Hmut para la generación de MV-LVs, decidimos generar nuevas preparaciones de MV-Hmut^{VHH-V36}-LV siguiendo el protocolo de producción del grupo del Prof. Buchholz, y titularlo directamente mediante transducción de células.

4.4. El MV-Hmut^{VHH-V36}-LVs es capaz de transducir distintas células diana, pero se produce con bajos títulos.

Para producir el nuevo *batch* de MV-Hmut^{VHH-V36}-LV, se siguió un nuevo protocolo el cual se encuentra detallado en la sección 3.5.1.2. Brevemente, en diferencia al protocolo utilizado anteriormente, la relación de F30:Hmut utilizada en este experimento (y a partir de este momento) es de 3:1. A su vez, para concentrar los LVs se utilizó un colchón de sacarosa 20%, el cual permite amortiguar el choque de las partículas con el fondo del tubo durante su concentración por centrifugación, y por ende, permite mayor recuperación de partículas viables, es decir, obtención de títulos mayores.

Como modelo, se eligió generar el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV, debido a que se conocía que este LV fue capaz de unirse a su ligando (CD11b/CD18) en el ensayo de BLItz. Asimismo, para disminuir la variabilidad de las distintas preparaciones de mBMDC, se optó por utilizar como células blanco dos líneas celulares de macrófagos murinos (J774A.1 y RAW264.7) con alta expresión del receptor CD11b. A su vez, y no menos importante, se dispuso también de una línea celular denominada HT1080-anti-His. Estas células expresan en su membrana un scFv anti-His¹⁹² que puede actuar de receptor celular, el cual interacciona con el *tag*6xHis que acarrean las fusiones de Hmut^{VHH} en su extremo C-terminal. De esta forma, todas las construcciones que posean el *tag*6xHis podrían ser tituladas sobre esta línea celular independientemente de la especificidad del VHH. Con estas herramientas, se propuso analizar si el VHH-V36 era capaz de mediar la transducción en células CD11b⁺, y compararla con la transducción mediada a través del 6xHis. A su vez, las células HT1080 son de origen humano, lo que resultó interesante para comparar, ya que se ha visto que las líneas de origen murino son más resistentes a la transducción por vectores derivados del HIV-1⁹⁴, por lo que la eficiencia de transducción podría ser menor.

En resumen, utilizando el nuevo protocolo, se generó el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV y el MV-p11^{DARPin-CD4}-LV, utilizando este último como control positivo tanto de transfección como de transducción. Ambos fueron concentrados en colchón de sacarosa 20% y luego se realizó un ensayo de transducción estática en células HT1080-anti-His. Para cada transducción se utilizaron 50 μ L de distintas diluciones de los

LVs correspondientes y como control negativo se usaron células HT1080-anti-His sin transducir. Los resultados se detallan en la **figura-25**, en donde se puede observar que la transducción con el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV (**figura-25b**) fue aproximadamente 20 veces menos eficiente que la del control positivo (**figura-25a**). A la dilución más concentrada (1/50), el porcentaje de transducción con nuestro vector fue de 2,0%, frente a un 42,2% del vector control, y la MFI alcanzada también fue inferior (no mostrada). A pesar de ello, esta fue la primera vez desde el inicio de este trabajo en donde se constató transducción per se (y no pseudotransducción), en donde claramente se distingue una población GFP⁺ que se diferencia de las células no transducidas. A su vez, se confirma que la transducción a través del 6xHis es también viable en nuestras construcciones, por lo que, a partir de este momento, la titulación mediante transducción de células HT1080-anti-His fue utilizada como método para titular todos los LVs y poder comparar los títulos en condiciones similares.

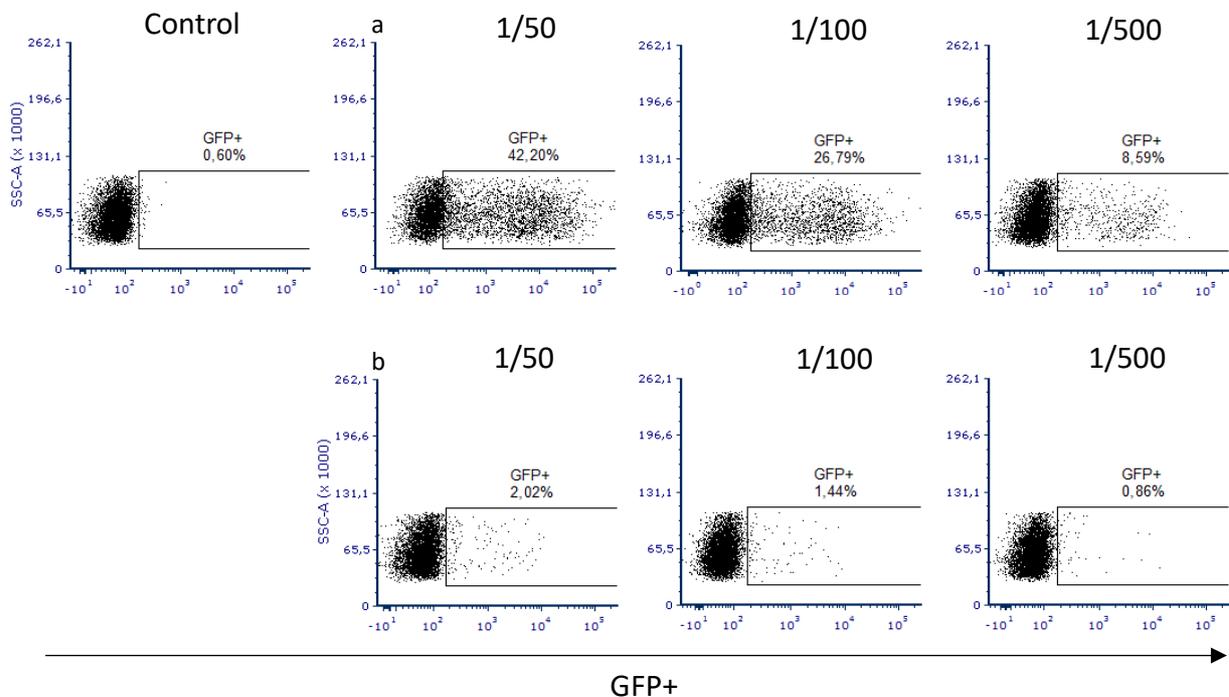


Figura 25. Transducción de células HT1080-anti-His. Para ello, previo a la transducción, se sembraron 4×10^4 células. Al día siguiente, para transducir se utilizaron 50 μ L de tres diluciones (1/50, 1/100 y 1/500) del MV-Hmut^{VHH-V36}-LV y del control positivo MV-Hmut^{DARPin-CD4}-LV, y 72 h después, se cuantificó la expresión del transgen por citometría de flujo. Como control negativo se utilizaron células sin transducir.

De forma simultánea, utilizando el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV, se transdujeron las dos líneas celulares de macrófagos murinos CD11b⁺, J774A.1 (**figura-26a**) y RAW264.7 (**figura-26b**). Como control negativo se utilizaron células sin transducir.

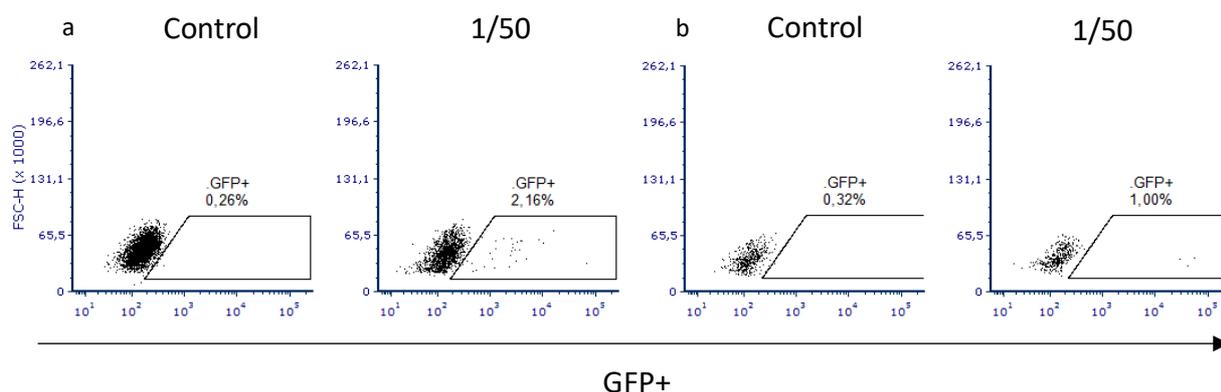


Figura 26. Transducción de líneas celulares de macrófagos murinos con el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV. Un día previo al ensayo, se sembraron a) 4×10^4 células J774A o b) 4×10^4 células RAW264.7, y al día siguiente, se transdujeron con 50 μ L de una dilución 1/50 del MV-Hmut^{VHH-V36}-LV. A las 72 hs, se cuantificó la expresión de GFP por citometría de flujo. Como control se utilizaron células sin transducir.

Como se observa en la **figura-26**, el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV demostró ser capaz de transducir ambas líneas celulares murinas con una eficiencia similar a la observada en las células HT1080-anti-His (humanas). Este resultado confirmó que dicho LV es capaz de mediar el proceso de transducción a través del reconocimiento de CD11b mediado por el VHH-V36. En las células J774A.1 se puede observar un 2,2% de transducción, mientras que este porcentaje es de 1,0% en las células RAW264.7.

Como se mencionó anteriormente, para calcular el título de los vectores, nos basamos en la transducción de las células HT1080-anti-His. Teniendo en cuenta que se usaron 50 μ L de la dilución 1/50 y se obtuvieron 2,0% de células transducidas en un total de 40000 células, podemos aplicar la fórmula descrita en la sección 3.6.1 y calcular el título del MV-Hmut^{VHH-V36}-LV, el cual nos da un valor de $8,0 \times 10^5$ TU/mL. Realizando cálculos similares, se desprende que el título del MV-p11^{DARPin-CD4}-LV es de $3,4 \times 10^7$ TU/mL (en base a dilución 1/500), aproximadamente un orden y medio mayor que nuestro vector. Este resultado fue inesperado, debido a que la producción de ambos vectores fue en simultáneo, utilizando el mismo protocolo, los mismos reactivos (a no ser por el plásmido codificante de Hmut) y calculados por transducción de las mismas células. A su vez, ya se había demostrado que la fusión Hmut^{VHH-V36} se expresaba con niveles similares a la de la construcción p11^{DARPin-CD4}. No obstante, este resultado constató que efectivamente el título de nuestro vector era bajo. Una de las diferencias entre ambos vectores es justamente es plásmido MV-p11, que codifica la DARPin-CD4, el cual se trata de una versión optimizada (generada en el laboratorio del Prof.

Buchholz) del plásmido MV-Hmut, que probablemente le permita al vector control alcanzar mayores títulos, como ya ha sido demostrado.

Por otra parte, con respecto a la hipótesis planteada anteriormente de la posible sobre-estimación del título de los MV-Hmut^{VHH}-LVs calculados por RT-qPCR, suponiendo que el nuevo protocolo de producción, y en particular que la centrifugación utilizando un colchón de sacarosa 20%, permite la obtención de títulos mayores, se podría pensar que previamente se estaban obteniendo títulos todavía menores al obtenido ($8,0 \times 10^5$ TU/mL). De ser este el caso, cuando se realizó la transducción de las mBMDCs con los distintos MV-Hmut^{VHH}-LVs, se podría haber transducido con una MOI de por lo menos un orden menor a la que se pensaba, lo que podría explicar el fracaso.

De todas formas, para definir si los bajos porcentajes de transducción eran simplemente por el hecho del bajo título del LV, decidimos repetir la transducción de estas líneas celulares utilizando una mayor cantidad de LVs.

4.5. La transducción del MV-Hmut^{VHH-V36}-LV a través del 6xHis se equipara con la del vector control al igualar la MOI, pero esto no ocurre cuando la transducción se da a través del VHH.

Al aumentar la cantidad de partículas lentivirales utilizadas para transducir, se debería de ver un aumento en el porcentaje de células transducidas, a menos que la transducción no dependa solo del título del vector. Haciendo uso del título recién calculado para nuestro vector (8×10^5 TU/mL), se transdujeron las tres líneas celulares con MOI conocidas y se compararon con los respectivos controles positivos. Específicamente, se transdujeron células con una MOI=1 (correspondiente a 50 μ L de vector concentrado) o de 0,5 (correspondiente a 50 μ L de una dilución 1/2).

En la **figura-27**, se observa el resultado de transducción de las HT1080-anti-His. Como control positivo se muestra la transducción previa correspondiente a la dilución 1/100 con el MV-p11^{DARPin-CD4}-LV, que se corresponde con una MOI de 0,4, y como control negativo se utilizaron células sin transducir. Como se puede notar, efectivamente al aumentar la cantidad del vector MV-Hmut^{VHH-V36}-LV (MOI=0,5), se registra un aumento notable en el porcentaje de transducción (23,8%), siendo igual de eficiente que el control positivo (25,0%) a MOI muy similares. En este sentido, se puede concluir que nuestro vector tiene la misma capacidad de transducción que el vector control sobre las células HT1080-anti-His.

Este resultado es el esperado teniendo en cuenta que el título se definió en base a la transducción de estas mismas células, pero indica que la producción de partículas activas es al menos 25 veces inferior a la alcanzada para MV-p11^{DARPin-CD4}-LV. Lamentablemente no se realizó en su momento, pero hubiera sido interesante cuantificar el número total de partículas generadas en ambas preparaciones para conocer si el problema radica en que se producen menos partículas lentivirales o que su concentración es similar pero hay problemas con su capacidad de transducción.

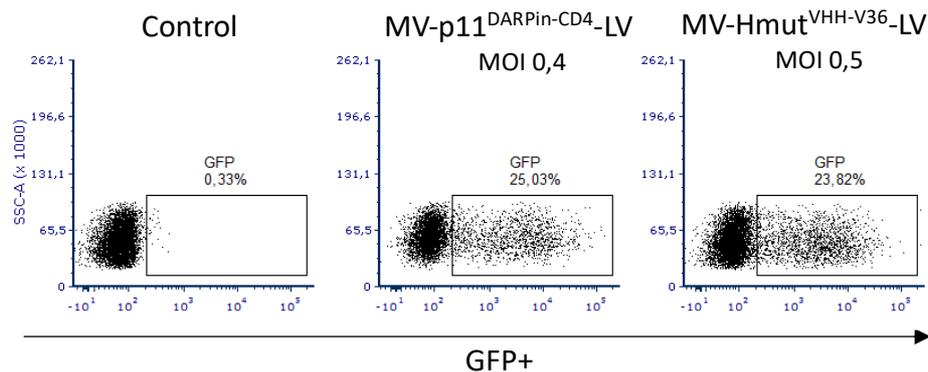


Figura 27. Transducción estática de células HT1080-anti-His con el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV a una MOI de 0,5. Previo a la transducción, se sembraron 4×10^4 células. Al día siguiente, estas células se transdujeron utilizando 50 μ L de una dilución 1/2 del MV-Hmut^{VHH-V36}-LV. 72 h después, se cuantificó la expresión del transgen por citometría de flujo. Como control negativo se utilizaron células sin transducir y como control positivo se muestra el *dot plot* correspondiente a la dilución 1/100 de la figura-25a (MV-p11^{DARPin-CD4}-LV).

De la misma forma, se realizó la transducción sobre ambas líneas celulares murinas a efectos de comprobar si la transducción mediada a través del VHH también se veía aumentada al aumentar la MOI. En este caso, se utilizó como control de transducción el VSV-G-LV, ya que se había mostrado que ambas líneas celulares eran susceptibles a la transducción con este vector^{199,200}. Como control negativo se utilizaron las células sin transducir. En la figura-28, se observa la transducción con el VSV-G-LV a una MOI de 0,025 y con el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV a una MOI de 1. En estas condiciones se detectó un 2,0% de transducción en las células J774A.1 (figura-28a) y un 1,2% de transducción en las células RAW264.7 (figura-28b). A la misma MOI, el VSV-G-LV alcanzó porcentajes de transducción entre 50 y 60% en ambas células (datos no mostrados). Solo cuando se transdujeron ambas líneas celulares con el VSV-G-LV a una MOI de 0,025 se observaron porcentajes de transducción comparables. Esto indica que el rendimiento del MV-Hmut^{VHH-V36}-LV en estas células fue, a grandes rasgos, 40 veces menor que el alcanzado con el VSV-G-LV.

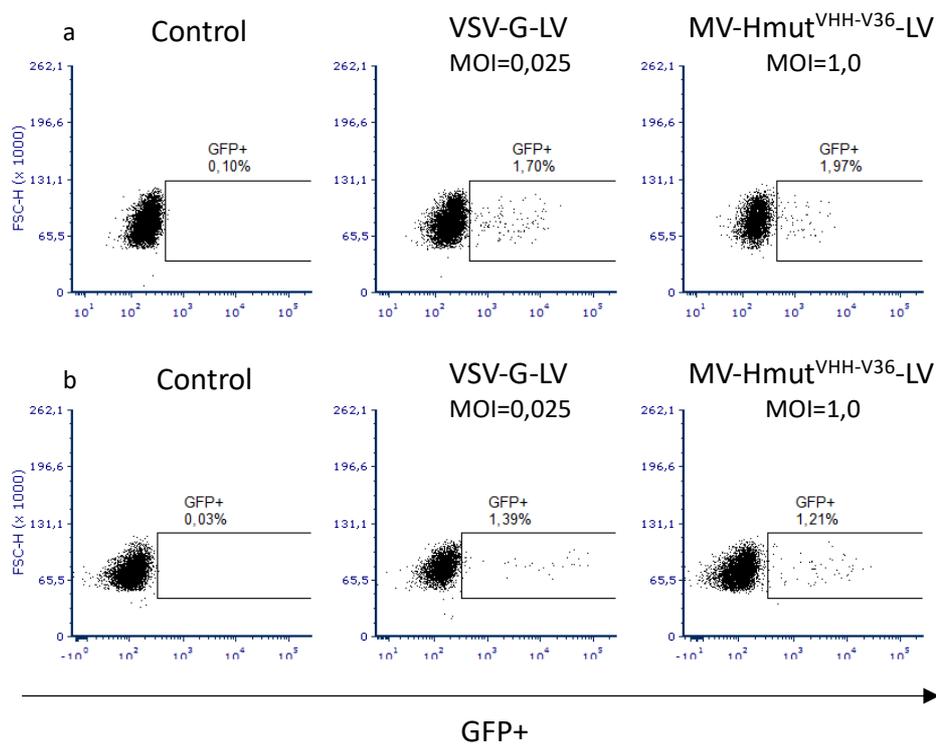


Figura-28. Transducción estática de las líneas de macrófagos murinos a una MOI de 1 utilizando el MV-Hmut^{VHH-V36}-LV. Un día previo al ensayo, se sembraron a) 4×10^4 células J774A o b) 4×10^4 células RAW264.7, y al día siguiente, se transdujeron con la MOI indicada utilizando 50 μ L de la dilución correspondiente. Al tercer día post-transducción, se cuantificó la expresión de GFP por citometría de flujo. Como control positivo se utilizó un VSV-G-LV y como control negativo se usaron células sin transducir.

Sorprendentemente, al aumentar el número de partículas utilizadas para transducir ambas líneas celulares, no se detectó un aumento en el porcentaje de células GFP⁺ en comparación con los resultados hallados anteriormente (ver figura-26). Dada su función, el receptor CD11b es altamente endocítico/fagocítico²⁰¹, por lo que si la partícula es endocitada (debido a su unión a este receptor), esto podría interferir en la fusión del vector a través de F, especialmente en los macrófagos. Esto es debido a que se ha visto que los macrófagos fagocitan rápidamente²⁰² y debido a la consecuente acidificación del pH, podría impedir que se fusione debido a que, como se describió en la sección 1.5.2., estos lentivectores utilizan un mecanismo de fusión a pH neutro. Para corroborar esta teoría, se debería haber bloqueado la endocitosis y observado si el porcentaje de transducción aumentaba. Sin embargo, parece improbable que al aumentar 50 veces la cantidad de LV a utilizar no se observe al menos un mínimo aumento en el porcentaje de células transducidas, por lo que probablemente la causa de este problema era otra.

En resumen, por una parte, se sabía que las fusiones de Hmut^{VHH} estaban siendo sobre-expresadas en la célula productora, y el proceso de transfección estaba siendo eficiente (ya que los controles se comportan como lo esperado). Por otra parte, se sabía que en el caso del MV-Hmut^{VHH-V36}-LV las partículas se estaban generando (aunque con un título un orden más bajo de lo calculado inicialmente), y que eran capaces de transducir células HT1080-anti-His con igual eficiencia al MV-p11^{DARPin-CD4}-LV cuando eran comparadas en las mismas condiciones. No obstante, la transducción mediada a través del VHH-V36 no mejoró al aumentar la cantidad de LVs. En este sentido, se podría pensar que quizás el contacto entre el nanobody V36 y el receptor CD11b es de cierta forma ineficiente (si bien se había constatado unión a través del BLItz), por ejemplo, debido a que el sitio de unión del VHH a su antígeno podría estar poco accesible. Cabe recordar que la proteína H es una proteína transmembrana de tipo II, es decir, su N-terminal se encuentra en el citoplasma y su C-terminal hacia el espacio extracelular. Por esta razón, la fusión con otra proteína, en este caso, un VHH, debe hacerse sobre su extremo C-terminal. Sin embargo, el sitio de reconocimiento del antígeno en los VHHs se encuentra hacia su extremo N-terminal, por lo que la fusión con una proteína transmembrana de tipo II podría generar un efecto de impedimento estérico que dificulte la unión del VHH a su antígeno, y, por ende, la transducción. En el caso contrario, el tag 6xHis se encuentra hacia el extremo C-terminal del nanobody, por lo que este se encuentra mucho más expuesto para ser reconocido.

Resumiendo, tenemos problemas vinculados al bajo título que rinden los vectores y a la probable unión ineficiente entre los VHHs y sus ligandos. Para tratar de mejorar estas condiciones, se decidió clonar los VHHs a nuevos plásmidos (generados por el grupo del Prof. Buchholz), que no solo podrían permitir alcanzar mayores títulos, sino que le podrían dar mayor movimiento al VHH, lo que podría mejorar su unión a los receptores celulares.

4.6. Se clonaron los VHHs a nuevos plásmidos y se eligió la mejor construcción en forma empírica.

Para resolver las dificultades mencionados anteriormente, se decidió clonar los nanobodies a un nuevo plásmido codificante para Hmut, denominado MV-p44. Este plásmido deriva del MV-p11 que es la base del MV-p11^{DARPin-CD4}-LV, y la única diferencia con el mismo es que posee un linker flexible (G₄S)³ entre la proteína Hmut y el elemento de unión, lo que en nuestro caso podría resultar en un mejor acceso al sitio de unión de los VHHs. A su vez, este plásmido ha sido optimizado para generar LVs con títulos muy superiores (hasta 10⁷ TU/mL) a los alcanzados con el plásmido Hmut-MV usado hasta el momento. A través de la colaboración con el Prof. Buchholz, también apareció la posibilidad de

incluir el uso de vectores pseudotipados con el NiV (que acarrean las proteínas Gmut y FΔ22 en su membrana). En algunos casos, estos NiV-LVs rindieron resultados significativamente mejores que los MV-LVs y permitieron alcanzar mayores títulos¹⁸⁴. A su vez, como se mencionó durante la introducción de este trabajo, los NiV-LVs son mucho más resistentes a la neutralización por suero humano que los MV-LVs, lo que es importante en el contexto de la terapia en humanos¹⁸⁴. En particular, se utilizaron dos plásmidos codificantes para la proteína Gmut, el NiV-p66 que posee un linker flexible (G₄S)⁴ entre la proteína y el elemento de unión y el plásmido NiV-p70 que no posee linker. Si bien la construcción sin linker flexible se incluyó para el pseudotipado con NiV-LV, esto se realizó porque estos son los vectores que alcanzan mayores títulos, y aunque fuese improbable, podría haber una diferencia en la transducción mediada por el 6xHis (la cual se usa para determinar el título de los vectores) entre los NiV-p66^{VHH}-LVs y los NiV-p70^{VHH}-LVs. De esta manera, se analizaron todas las construcciones en un mismo experimento y se eligió la mejor construcción de forma empírica para cada VHH, tomando como criterio, por una parte, el porcentaje de transducción en células HT1080-anti-His (que es un reflejo del título del vector) y, por otra parte, el efecto de la presencia o no de un linker flexible entre las proteínas Hmut/Gmut y los VHHs.

Para ello, los nanobodies monovalentes anti-CD11c (MR31 y MR33), anti-MHCII (N11) y anti-CD11b (V36) fueron digeridos de los vectores MV-Hmut y clonados a los vectores MV-p44, NiV-p66 y NiV-p70 como se indica en la sección 3.2.3. Una vez generados los plásmidos correspondientes, se utilizaron para producir los MV-p44^{VHH}-LVs y los NiV-p66/p70^{VHH}-LVs en pequeña escala, siguiendo el protocolo indicado en la sección 3.5.2. Los sobrenadantes sin purificar fueron utilizados para transducir de forma estática las células HT1080-anti-His y realizar un *screening* para determinar rápidamente a cuál de las tres envolturas, ya sea MV-p44, NiV-p66 o NiV-p70 funcionaba mejor cada uno de los nanobodies.

En la **figura-29**, se observan los porcentajes de transducción de los distintos vectores. A grandes rasgos, comparando los NiV-LVs, la presencia del linker flexible (comparación entre NiV-p66 y NiV-p70) no afecta significativamente la capacidad de transducción mediada por el 6xHis, como era de esperar dada su posición en el extremo C-terminal de la proteína. No obstante, el uso de un pseudotipado u otro sí modificó la capacidad de transducción del vector de forma dependiente del VHH. En particular, el nanobody MR31 rindió resultados notablemente mejores en su versión MV-p44), alcanzando un 37,4% de transducción (**figura-29a**) por lo que se eligió esta versión como su condición óptima. Contrariamente, tanto el VHH-MR33 como el -V36 rindieron mejores resultados en sus versiones de NiV-LVs. En el primer caso, se nota una mejoría al utilizar al plásmido NiV-p66,

alcanzando un 36,2% de transducción (figura-29b), por lo que se continuó trabajando con esta construcción. Cabe destacar que el nanobody N11 no pudo ser clonado en el momento del experimento en los plásmidos MV-p44 o NiV-p70 por lo que se trabajó únicamente con su versión en el plásmido NiV-p66 (figura-29c), que de todas maneras alcanzó un 18,6% de transducción, resultados similares a los observados con el NiV-p66^{VHH-V36}-LV (figura-29d). En este último caso, si bien la versión NiV-p70 alcanzó un porcentaje de transducción levemente mayor que la NiV-p66 (32,8% vs 27.7%), se continuó trabajando con el NiV-p66 debido a la hipótesis de que el linker flexible podría mejorar el reconocimiento mediado por el VHH.

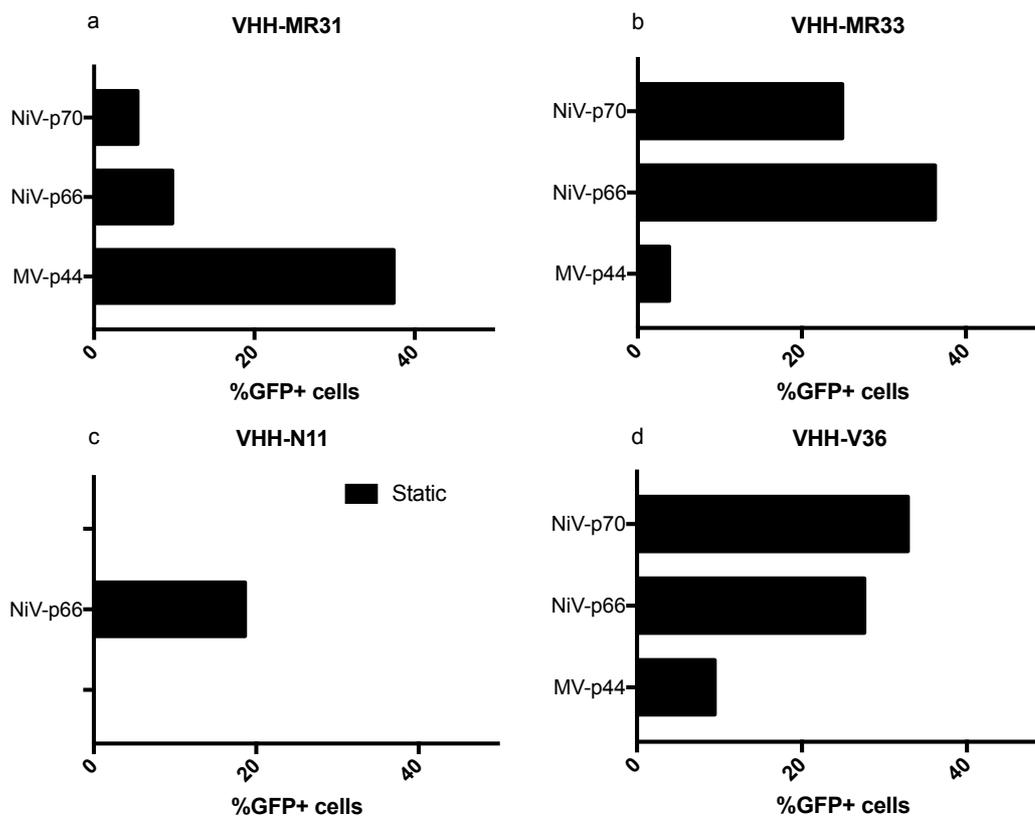


Figura-29. Screening de la proteína de envoltura óptima para cada VHH. Para ello se produjeron los MV-LVs y los NiV-LVs acarreando el a) VHH-MR31, b) VHH-MR33, c) VHH-N11 o d) VHH-V36 en formato de pequeña escala, y los sobrenadantes sin purificar se utilizaron para transducir células HT108-anti-His de forma estática. 72 horas después se cuantificó la expresión de GFP mediante citometría de flujo.

Realizando cálculos estimativos, el título de los vectores sin purificar es del orden de $1,0-1,5 \times 10^5$ TU/mL, a excepción de la construcción con el VHH-N11 que tiene un título levemente menor, de $7,0 \times 10^4$ TU/mL. Esto fue un buen indicativo de que, al concentrarlos, se podrían alcanzar títulos similares a los publicados por el grupo del Prof. Buchholz¹⁸⁴. Para poder corroborarlo, a continuación, se generaron *batches* independientes de los LVs elegidos y se caracterizaron.

4.7. Con los nuevos plásmidos de envoltura se alcanzaron títulos de hasta 10^7 TU/mL, sin embargo, en el mejor de los casos solamente 1 de cada 12000 partículas lentivirales es capaz de transducir.

Siguiendo el protocolo utilizado en el laboratorio alemán (ver sección 3.5.1.2), se generaron *batches* independientes de los cuatro vectores seleccionados en el *screening* anterior: el MV-p44^{VHH-MR31}-LV, el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV, el NiV-p66^{VHH-N11}-LV y el NiV-p66^{VHH-V36}-LV, los cuales fueron posteriormente titulados mediante transducción estática de células HT1080-anti-His.

En la **figura-30**, se observan los resultados de las titulaciones de al menos tres *batches* independientes de cada LV. Tres de los LVs testeados, aquellos acarreado los VHH-MR31, -MR33 y -V36, alcanzaron títulos promedio de $3,6 \times 10^7$ TU/mL, $2,7 \times 10^7$ TU/mL y $1,6 \times 10^7$ TU/mL, respectivamente, que, si bien son más bajos que los alcanzados con otros vectores publicados, se encuentran dentro de lo aceptable. Cabe destacar que, anteriormente, en el caso del VHH-V36, el título obtenido por transducción de células HT1080-anti-His fue en el orden de 10^5 TU/mL, por ende, en este caso hubo un aumento de aproximadamente dos órdenes. En conclusión, utilizando los nuevos plásmidos optimizados, pudimos alcanzar títulos similares a los obtenidos con el control positivo (MV-p11^{DARPin-CD4}-LV, sección 4.4), excepto para el LV modificado con el nanobody N11 que rindió un título promedio menor, de $5,0 \times 10^6$ TU/mL. Esto podía esperarse, debido a que ya en el *screening* previo se había visto que esta construcción era la que mediaba menor transducción y, por ende, menor título. En particular, y contrario a lo reportado, no se notaron diferencias entre los títulos obtenidos para los NiV-LVs y para el único MV-LV, es más, siendo hasta menor el título del NiV-p66^{VHH-N11}-LV. Sin embargo, se ha visto que esto es muy dependiente del dominio de unión utilizado^{184,192}.

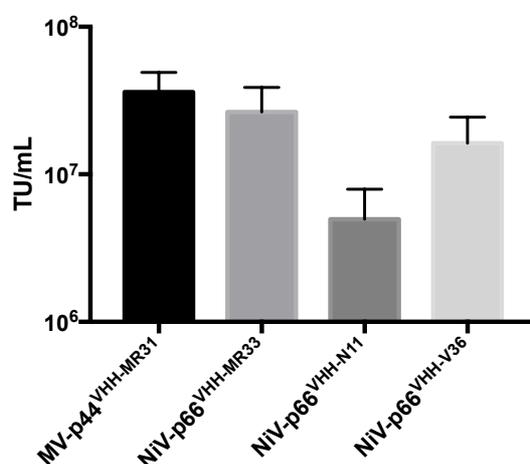


Figura-30. Título promedio de los LVs seleccionados. Se realizaron producciones independientes de cada vector y fueron tituladas por transducción de células HT1080-anti-His. Para ello, se sembraron 4×10^4 células y al día siguiente se transdujeron con distintas diluciones de los vectores concentrados. Tres días después se analizó la expresión del transgen GFP mediante citometría de flujo.

Habiendo caracterizado el título biológico de los LVs, nos propusimos caracterizar uno de los batches de cada LV utilizando el equipo Nanosight. Para ello, se siguió el protocolo indicado en la sección 3.7. En particular, esta herramienta nos proporciona información sobre la cantidad de partículas totales (unidades transductantes y no transductantes) en la muestra, así como el tamaño promedio de las mismas. Los resultados del análisis por Nanosight se detallan en la **tabla-10**, a continuación.

LV	Tamaño (nm)	Conc. (partículas/mL)	Conc. (TU/mL)	TU/ 10^5 partículas
MV-p44 ^{VHH-MR31}	149 +/- 4,3	4,5 +/- 0,7 E11	3,6 +/- 1,3 E07	8,00
NiV-p66 ^{VHH-MR33}	133 +/- 2,0	7,7 +/- 0,7 E11	2,7 +/- 1,2 E07	3,51
NiV-p66 ^{VHH-N11}	126 +/- 1,3	6,7 +/- 0,5 E11	5,0 +/- 3,0 E06	0,75
NiV-p66 ^{VHH-V36}	137 +/- 2,9	8,7 +/- 1.1 E11	1,6 +/- 0,8 E07	1,84

Tabla-10. Caracterización por Nanosight. Para ello, se realizaron diluciones de los LVs en PBS y se inyectaron en el equipo. Los datos de concentración y tamaño de las partículas se analizaron utilizando el software NTA2.3.

Como se observa en la **tabla-10**, el tamaño de las partículas derivadas del NiV ronda los 130 nm, muy similar a los datos publicados por el Prof. Buchholz¹⁸⁴, mientras que aquellas pseudotipada con MV son levemente mayores. Observando el tamaño promedio de las partículas, surge la pregunta de por qué cuando se filtran los LVs se usa un filtro de $0,42 \mu\text{m}$ y no uno de $0,22 \mu\text{m}$, sin embargo, se observó que existen agregaciones de partículas que alcanzan hasta los 500 nm, las cuales podrían ser funcionales, y se perderían al disminuir el tamaño del poro.

Por otro lado, analizando la concentración de partículas totales en las muestras, se observa que en todos los casos su valor se encuentra en el orden de 10^{11} partículas/mL con pocas variaciones, siendo en los tres NiV-p66^{VHH}-LVs ligeramente mayor que en el MV-p44^{VHH}-LV. No obstante, si se compara el título de partículas totales vs el título de TU/mL, se puede notar que, en el mejor de los casos, el del MV-p44^{VHH-MR31}-LV, a grandes rasgos, solamente 1 de cada 12000 partículas producidas es capaz de mediar transducción en células HT1080-anti-His. Así mismo, para el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV y el NiV-p66^{VHH-V36}-LV, esta relación es de 1 en 30000 y 1 en 50000 respectivamente. En el peor de los casos, con el NiV-p66^{VHH-N11}-LV, esta relación asciende un orden siendo de 1 en 130000. Para visualizarlo mejor, se muestra el valor de TU/ 10^5 partículas, que nos permite concluir que puede haber diferencias de hasta un orden con respecto a las unidades transductantes, como ya se había observado en los títulos

anteriormente. Específicamente, es interesante notar como dentro del mismo sistema (NiV) se notan diferencias dependiendo del VHH utilizado. Si bien, hay distintas causas que pueden incidir en la generación de partículas no viables, los resultados hallados fueron de gran sorpresa y contrarios a los publicados, en donde se reportaron que en igual cantidad de partículas, se hallaban más TU en los NiV-LVs que en los MV-LVs¹⁸⁴. Si bien es importante destacar que, en nuestro caso, solo se analizó un MV-LV, por lo que no se podría generalizar el resultado.

4.8. Un gran número de partículas lentivirales se unen a las mBMDCs independientemente de que induzcan transducción.

Previamente a la transducción de mBMDCs, se quiso demostrar que los LVs eran capaces de unirse a los receptores correspondientes en la membrana celular. Como se comentó anteriormente, la etapa de unión es una de las limitantes para que se pueda dar el proceso de transducción. Para demostrar la unión de los LVs a la célula, como células control se incluyeron las HT1080-anti-His, para las cuales ya se había comprobado que la transducción era eficiente utilizando los cuatro LVs. Para realizar el ensayo, se tomaron 4×10^5 células (ya sea mBMDCs o HT1080-anti-His) y se centrifugaron (como se indica en la sección 3.8) con aproximadamente 10^8 partículas totales de LVs. Esta centrifugación permite aumentar el contacto entre los LVs y las células. En la **figura-31**, se detallan los resultados correspondientes al ensayo de unión sobre las células HT1080-anti-His. Como control negativo se utilizaron células sin LVs y como control positivo se incluyeron dos LVs generados por el laboratorio alemán, el MV-p11^{DARPin-CD4}-LV y el NiV-p66^{scFv-CD8}-LV. Durante todo el ensayo se mantuvo una temperatura de 4°C para impedir la fusión de los LVs con las células o la posible endocitosis. Para revelar la presencia de los LVs se utilizó un anticuerpo anti-His-PE (ver **tabla-7**, sección 3.9), el cual reconoce el *tag* 6xHis presente en todas las construcciones utilizadas.

A grandes rasgos, todos los LVs demostraron unión a las HT1080-anti-His, sin embargo, es muy notorio que aquellos pseudotipados con NiV se unen en mayor medida (aproximadamente 52-86% de células positivas), mientras que los pseudotipados con MV alcanzan valores de aproximadamente 10-16%. Curiosamente, el MV-p44^{VHH-MR31}-LV, que posee los mayores títulos de transducción en estas células, fue el vector que presentó menor porcentaje de unión, detectándose un 9,8% de células His⁺, y además con baja intensidad de fluorescencia. En forma similar, el porcentaje de unión del control MV-p11^{DARPin-CD4}-LV, que transduce muy eficientemente estas células, fue también de los más bajos, de 15,9%, y con baja intensidad de fluorescencia. Por otra parte, dentro de los NiV-LVs, el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV y el NiV-p66^{VHH-V36}-LV demostraron no sólo el mayor porcentaje de unión, siendo de 86,3% y

80,8% respectivamente, sino que la intensidad de fluorescencia es mucho mayor a la observada con los MV-LVs. Similarmente, el control NiV-p66^{scFv-CD8}-LV demostró unión con intensidad similar a nuestros vectores, aunque con un menor porcentaje (61,3%). En tanto, si bien el porcentaje de unión del NiV-p66^{VHH-N11}-LV (51,9%), es similar al del control, se observa que la intensidad de unión es levemente menor.

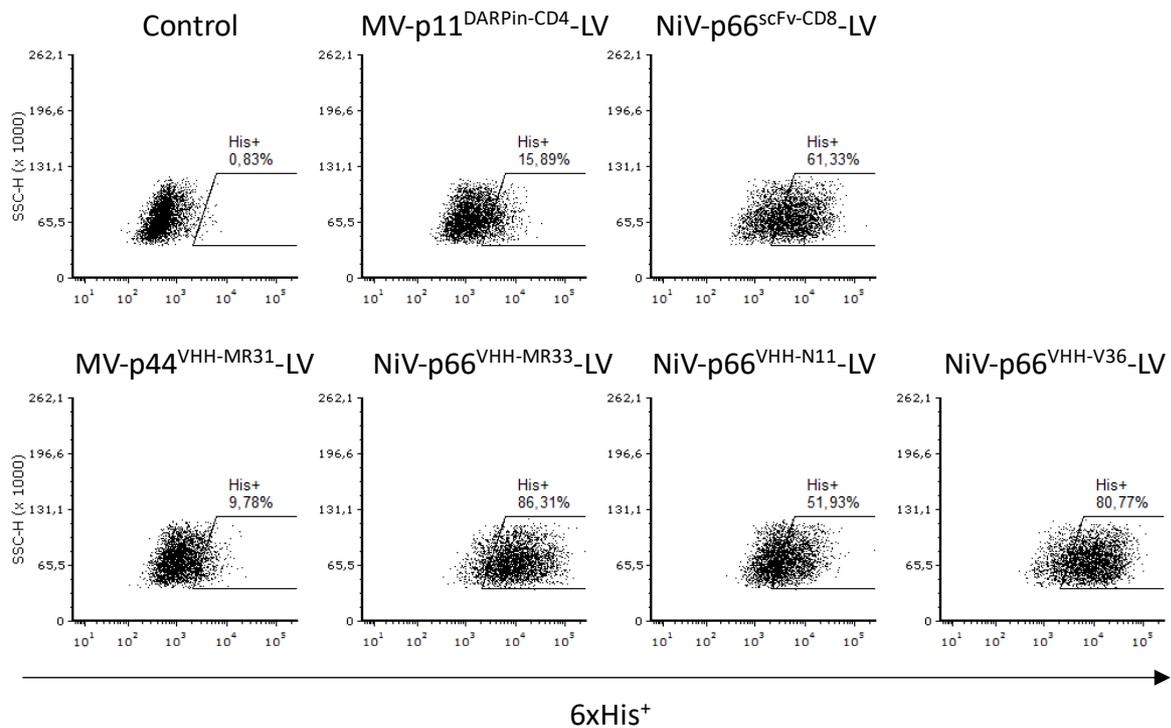


Figura-31. Ensayo de unión de LVs sobre las HT1080-anti-His. Se tomaron 5×10^5 células y se centrifugaron a 800g y 4°C durante una hora junto con 10^8 partículas totales. Luego, se realizaron dos lavados con el FCB-Wash y se tiñeron con un anticuerpo anti-His-PE. El porcentaje de unión se analizó mediante citometría de flujo.

Dado que las células HT1080-anti-His se crecieron con el antibiótico de selección es de suponer que el 100% de las células en cultivo expresan el anti-His en su membrana. De ser así, resulta extraño que no se alcance el 100% de unión para ninguna construcción teniendo en cuenta que se usó una relación de 200 partículas por célula. Aunque no se profundizó en este aspecto, esto podría indicar que en cada preparación muchas de las partículas carecen de la proteína de unión o de suficiente densidad de dicha proteína como para asegurar la unión y/o detección con el anti-His-PE. Aunque esto podría correlacionarse con la capacidad de transducción de cada preparación de LVs, la relación no parece ser directa. En efecto, al parecer, los NiV-LVs, que se sabe expresan una mayor densidad de proteínas de envoltura en su superficie¹⁸⁴, pueden detectarse sobre la superficie celular en forma más eficiente que los MV-LVs, pero estos últimos presentaron una mayor capacidad de transducción de las células HT1080-anti-His.

Teniendo en cuenta lo hallado en cuanto a la unión de los LVs a las células, se realizó el mismo ensayo sobre mBMDCs. Para ello, se generaron mBMDCs de acuerdo al protocolo detallado en la sección 3.3.2.2, y luego se analizó la expresión de los receptores CD11c y CD11b por citometría de flujo, los cuales, cabe recordar, son reconocidos por los nanobodies MR31/MR33 y V36, respectivamente. Las mBMDCs resultaron positivas para la expresión de los dos receptores, siendo 95,0% CD11c⁺ y 98,0% CD11b⁺ (resultados no mostrados). El porcentaje de MHCII no pudo ser analizado debido a que en el momento de realización de este experimento no se poseía un anticuerpo anti-MHCII.

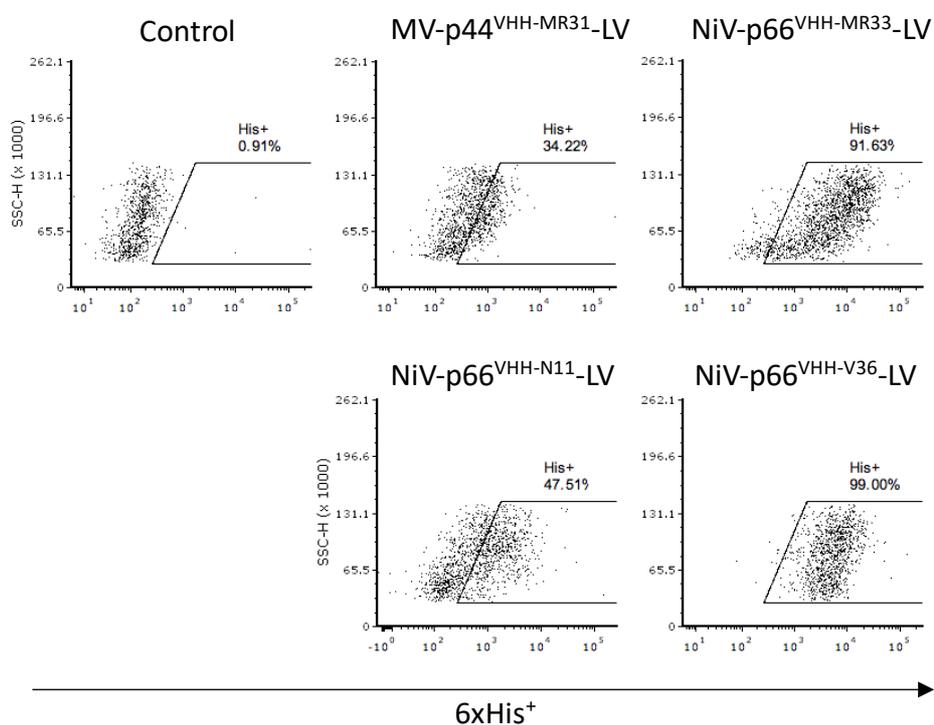


Figura-32. Ensayo de unión de LVs sobre las mBMDCs. Se tomaron 5×10^5 células y se centrifugaron a 800g y 4C durante una hora junto con 10^8 partículas totales. Luego se realizaron dos lavados con el FCB-Wash y se tiñeron con un anticuerpo anti-His-PE. El porcentaje de unión se analizó mediante citometría de flujo.

Como se observa en la figura-32, al usar mBMDC se destaca el alto porcentaje de unión del NiV-p66^{VHH-MR33}-LV y el NiV-p66^{VHH-V36}-LV, siendo de 91,6% y de 99,0% respectivamente. Teniendo en cuenta que las mBMDCs son 95,0% CD11c⁺ y 98,0% CD11b⁺, se concluye que se alcanzó la máxima capacidad de unión para estos vectores. En cuanto al NiV-p66^{VHH-N11}-LV, se detectó un 47,5% de unión a las mBMDCs, y similar a lo ocurrido en las HT1080-anti-His, la intensidad de unión es menor que en los otros NiV-LVs. En tanto, basados en los resultados anteriores, como era de esperar la detección del porcentaje de unión del MV-p44^{VHH-MR31}-LV fue menor (34,2%) que con los NiV-LVs. En términos

globales, es interesante notar que, con estas células, usando los NiV-LVs, sí se alcanzaron porcentajes de unión cercanos al 100%, lo cual indica que las HT1080-anti-His no son una población homogénea, y no todas expresan el scFv anti-His.

A grandes rasgos, la unión de los vectores a las mBMDCs fue claramente mejor que la unión a las HT1080-anti-His, pero en menor o mayor medida, todos los LVs fueron capaces de unirse. No obstante, si se tiene en cuenta la diferencia que existe entre la cantidad de partículas totales y las TU/mL (ver **tabla-10**), y sabiendo que se utilizó en el orden de 10^8 partículas totales en el ensayo, se puede deducir que las partículas capaces de transducir (HT1080-anti-His) fueron en realidad, en el mejor caso, alrededor de 10^4 . Realizando cálculos, surge que cada 1 célula se agregaron 0,025 unidades transductantes. Sin embargo, en el caso del NiV-p66^{VHH-MR33}-LV y el NiV-p66^{VHH-V36}-LV, se observa más del 90% de unión. Esto indica, que, dentro de las partículas no funcionales, se encuentran LVs que acarrean las proteínas de *targeting* en su membrana (tanto Hmut^{VHH} como Gmut^{VHH}), aunque por distintas razones, por ejemplo, falta de la proteína F no son capaces de fusionarse, o por falta del transgen no se detectan como unidades transductantes.

A pesar de los valores de unión relativamente menores para el caso del MV-p44^{VHH-MR31}-LV, esta es la primera vez desde que se comenzaron a usar estos vectores en donde probamos que el reconocimiento de los receptores celulares mediado por el VHHs se da de forma eficiente, quizás por la presencia del linker flexible entre las proteínas Hmut/Gmut y los nanobodies. En resumen, se generaron vectores que se producen con alto título y que se unen muy eficientemente a sus ligandos, por lo que a continuación se decidió transducir mBMDCs, con la esperanza de obtener mejores resultados que los que se obtuvieron al comienzo de este trabajo.

4.9. La eficiencia de transducción de mBMDCs fue comparable a la del VSV-G-LV y la expresión del transgen se mantiene hasta los ocho días post-transducción.

Sabiendo que los LVs testeados permiten que el VHH reconozca y se una a su ligando en mBMDCs, se decidió realizar un ensayo de transducción estática a una MOI de 10 (calculada en función su capacidad de transducir HT1080-anti-His). Como referencia, se incluyó como control el VSV-G-LV, el cual ya había demostrado ser eficiente en la transducción de mBMDCs. Los resultados de por lo menos 3 ensayos independientes para cada LV se muestran en la **figura-33**.

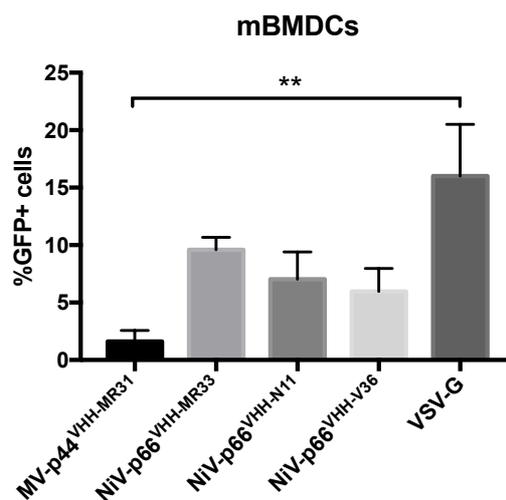


Figura-33. Transducción de mBMDCs. Un día previo a la transducción se sembraron 4×10^4 células. Al día siguiente, se transdujeron en forma estática con los LVs correspondientes a una MOI=10. 72 horas luego recolectaron las células y aquellas transducidas con el LV anti-CD11c y anti-CD11b se marcaron con los anticuerpos correspondientes (ver tabla-7, sección 3.9) siguiendo el protocolo indicado en la sección 3.9. Tras el marcaje, las células se analizaron por citometría de flujo. Este gráfico es resultado de al menos tres ensayos independientes para cada LV. Para determinar la significancia se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis con post-test de Dunn en donde $*=P<0,05$ y $**=P<0,01$.

Como se puede observar en la figura-33, independientemente del receptor reconocido por el VHH, los tres LVs pseudotipados con NiV son capaces de mediar la transducción en mBMDCs. Si bien no se observan diferencias estadísticamente significativas, si es notorio una tendencia de aumento clara frente al MV-p44^{VHH-MR31}-LV, con el cual, en promedio, se alcanzó solamente un 1,6% de transducción. Cabe destacar que, de todas maneras, cual pseudotipado funciona mejor depende en gran parte del elemento de unión y sus propiedades biofísicas^{184,192}, aunque en general, los MV-LVs rinden menores porcentajes de transducción que los NiV-LVs¹⁸⁴. Por otra parte, el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV, también anti-CD11c, alcanzó en promedio un 9,4% de transducción, aproximadamente 6 veces mejor que el LV acarreando el VHH-MR31. A su vez, entre todos los LVs testeados, este fue el que permitió una mayor transducción de mBMDCs (aunque no estadísticamente significativa), comparable a la observada con el VSV-G-LV (16,0%). En menor medida, aunque no estadísticamente significativo, el NiV-p66^{VHH-N11}-LV y el NiV-p66^{VHH-V36}-LV también fueron capaces de transducir las mBMDCs, rindiendo porcentajes promedio muy similares de 7,0% y 6,0% respectivamente.

Para poder verificar que efectivamente se estaba dando el proceso de integración del transgen al genoma de las mBMDCs, y por lo tanto descartar eventos de pseudotransducción, la expresión de GFP se siguió hasta los 8 días post-transducción, tras lo cual se analizaron las células por microscopía de fluorescencia. Para ello, se utilizaron las células transducidas que no pudieron ser despegadas de los

pocillos de la placa de cultivo al momento de realizar la citometría de flujo. Es por esta razón, y debido a que las mBMDCs no se dividen, que en las imágenes se observa una baja densidad de células. Cabe destacar que, en las condiciones de cultivo utilizadas, las mBMDCs se adherían fuertemente a la placa de cultivo y era muy dificultosa su recuperación para la citometría. En la **figura-34** se observa una serie de fotos correspondientes a una de las transducciones realizadas, en donde se muestran imágenes del campo claro, que nos permite observar todas las células, imágenes de fluorescencia, en donde se observan las células GFP⁺, y la combinación de ambas (Campo claro + GFP).

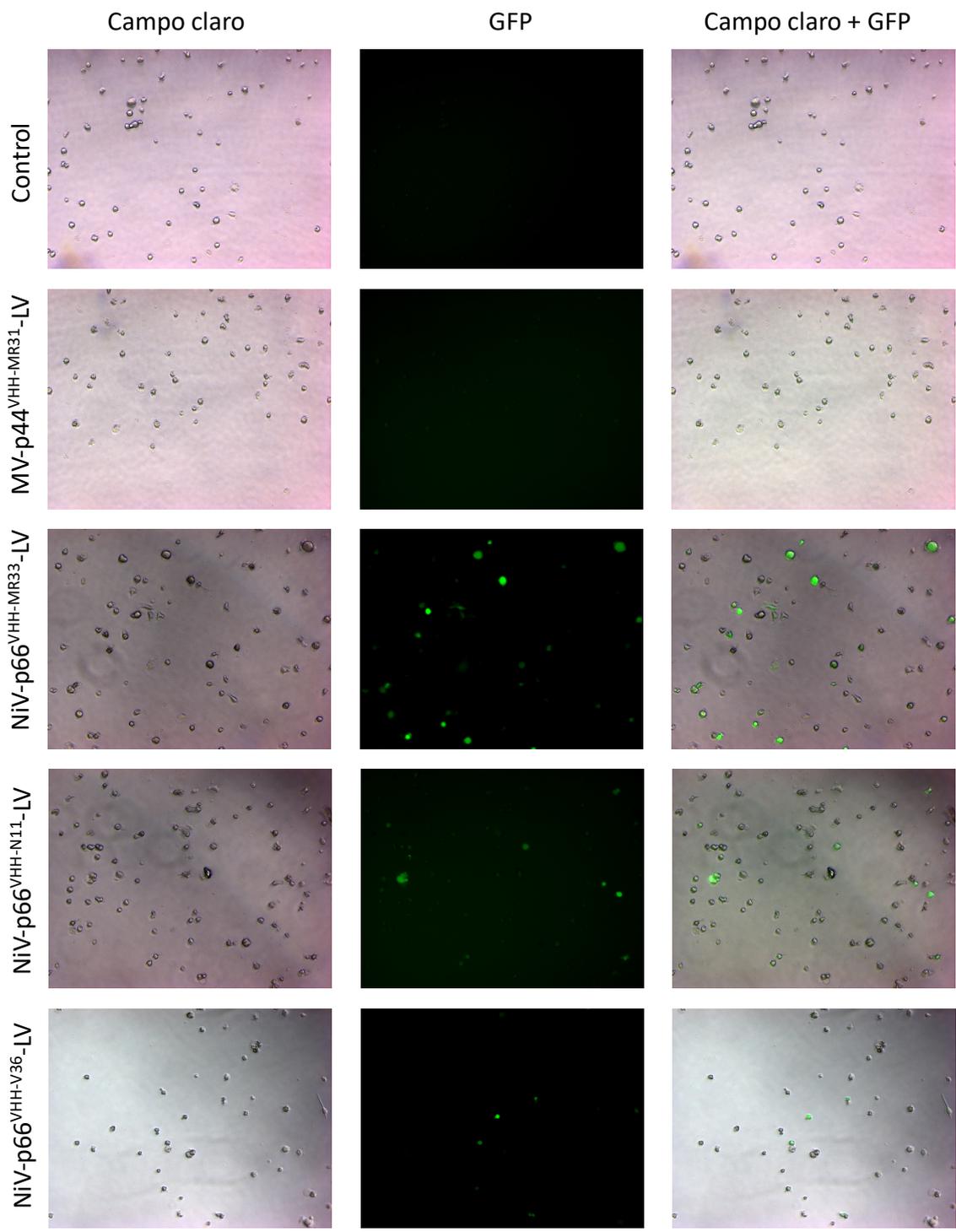


Figura-34. Evaluación de la expresión del GFP en mBMDCs al día 8 post-transducción mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, las mBMDCs transducidas con los distintos LV que no pudieron ser despegadas del pocillo debido a su fuerte adherencia, fueron cultivadas hasta el día 8 post-transducción, cuando se obtuvieron las imágenes. Se observan imágenes correspondientes al campo claro, en donde se distinguen todas las células, imágenes de fluorescencia en donde se observan las células GFP⁺ y la combinación de campo claro + GFP.

En las imágenes correspondientes al control sin transducir, como es de esperar, no se observan células GFP positivas. En cuanto a las fotos correspondientes a la transducción con el MV-p44^{VHH-MR31}-LV, posiblemente no se detecten células GFP⁺ (con alta intensidad) debido a que, en promedio, el porcentaje de transducción de este vector fue de tan solo 1,6%. Contrariamente, en aquellas mBMDCs transducidas con los tres NiV-LVs si fue posible evidenciar la expresión de GFP con alta intensidad aún a los 8 días posteriores a la transducción, descartando que la misma se deba a artefactos de pseudotransducción. En resumen, el uso de nuevos plásmidos para la generación de los vectores, y en especial la inclusión de los NiV-p66^{VHH}-LVs dio frutos y permitió la transducción (de forma estable) de mBMDCs.

4.10. La aparición de eventos *off-target* probablemente se deba a la unión de LVs no funcionales en la superficie celular.

Si bien se comprobó que las mBMDCs son transducidas por los distintos LVs, debido a que el objetivo de utilizar estos vectores es el re-direccionamiento, es de interés analizar si las células GFP⁺ corresponden a las células diana de interés: es decir, es importante verificar que la transducción es *on-target*. En este sentido, en la figura-35, se observan *dot plots* representativos, en donde se grafica CD11c/CD11b vs GFP. Para este momento, no se pudo contar con un anticuerpo anti-MHCII por lo que los gráficos correspondientes al NiV-p66^{VHH-N11}-LV no fueron incluidos.

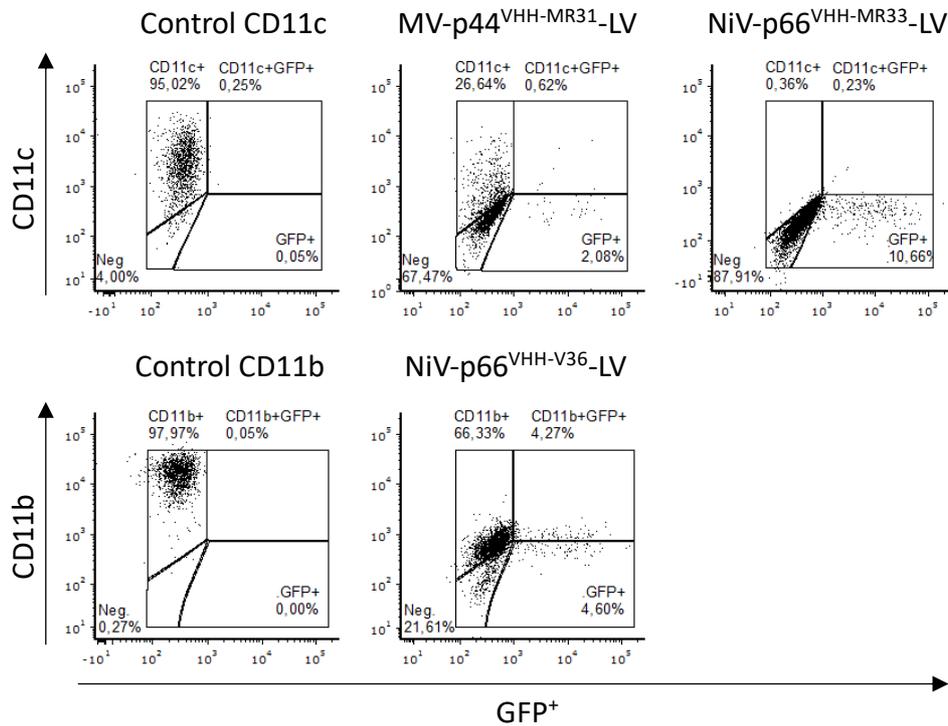


Figura-35. Representación de *dot plots* correspondiente a un experimento de transducción de mBMDCs. En la parte superior de la imagen se observan los gráficos correspondientes a las transducciones con los vectores re-direccionados a CD11c (MV-p44^{VHH-MR31}-LV y NiV-p66^{VHH-MR33}-LV) y el respectivo control de expresión de dicho receptor. En la parte inferior, se observan los gráficos de transducción con el NiV-p66^{VHH-V36}-LV (anti-CD11b) y el control de expresión de CD11b.

Como se observa en la **figura-35**, es importante destacar que la expresión de GFP es de alta intensidad en los tres casos mostrados, lo que muestra la principal diferencia con el primer ensayo de transducción de mBMDCs (**figura-22**), en donde solamente se observó pseudotransducción. No obstante, llama la atención que mayoritariamente las células GFP+ son negativas para el receptor que supuestamente medió la transducción, lo que sugeriría una transducción *off-target*. Sin embargo, esta interpretación no es tan directa porque el porcentaje de células que expresan dicho receptor baja significativamente luego de la transducción. En efecto, como se muestra en la parte superior de la imagen, el control de células sin transducir marcadas con un anticuerpo anti-CD11c da lugar a un 95,0% de marcaje, pero en el gráfico a su derecha, correspondiente al MV-p44^{VHH-MR31}-LV, podemos observar que el número total de células son CD11c⁺ se redujo a 27,3%, y en el caso de NiV-p66^{VHH-MR33}-LV a solamente un 0,6%. Un fenómeno similar también se observó en relación al receptor CD11b, donde el 98,0% de las células son CD11b⁺ al comienzo, pero luego de la transducción con NiV-p66^{VHH-}

^{V36}-LV se reducen a un 70,6 % con una importante reducción en la intensidad de la marca (parte inferior de la **figura-35**).

Analizando más en detalle, parecería que cuanto mayor es el porcentaje de transducción, mayor es la reducción del receptor diana. Una de las posibles razones para explicar estos resultados totalmente sorprendidos podría ser que la interacción de los LVs con los receptores CD11c y CD11b provoca la endocitosis de los mismos y por ende una disminución en su expresión. Alternativamente, teniendo en cuenta los resultados hallados anteriormente, específicamente que, en el mejor de los casos (el del MV-p44^{VHH-MR31}-LV), hay 1 partícula transductante cada 12000 partículas no transductantes y que dentro de aquellas no funcionales igualmente se encuentran partículas capaces de unirse a los receptores *target*, se podría pensar que la disminución del marcado de los receptores es generada por la competición de miles de partículas que, si bien no se fusionan, se unen y bloquean la unión del anticuerpo comercial utilizado durante la citometría. En este sentido, es importante destacar que se conoce que el anticuerpo comercial anti-CD11c (clon N418) y el anti-CD11b (clon M1/70) compiten por la unión a dichos receptores con los nanobodies MR31 y V36 respectivamente. Si bien no se tienen datos del epítipo reconocido por el VHH-MR33 (anti-CD11c), a partir de este resultado, se piensa que el mismo también reconocería un epítipo solapado (o el mismo) al del N418. Esta teoría cobra aún más fuerza cuando consideramos que para la transducción de las mBMDCs se utilizó una MOI de 10. Esto indica que, por ejemplo, para el caso del MV-p44^{VHH-MR31}-LV, se transdujeron 4×10^4 células con $4,8 \times 10^9$ partículas totales. Este número asciende aún más en el caso de los NiV-LVs, en donde la relación entre unidades transductantes y no transductantes es mayor (ver tabla-10, sección 4.7). Particularmente, en el caso del NiV-p66^{VHH-MR33}-LV y el NiV-p66^{VHH-V36}-LV se transdujeron 4×10^4 células dendríticas con $1,2 \times 10^{10}$ y con $2,0 \times 10^{10}$ partículas totales, respectivamente. En el caso de los NiV-LVs, esta cantidad de partículas es dos veces mayor a la que se había usado previamente en el experimento de unión, en donde ya se había detectado unión de las partículas a más del 90% de las células.

A su vez, como se comentó anteriormente, es muy probable que la menor densidad de proteínas en la envoltura de los MV-LVs disminuya este efecto, ya que quedarían receptores libres para ser reconocidos por el anticuerpo comercial, como se observa en el caso del MV-p44^{VHH-MR31}-LV. Contrariamente, la alta densidad de proteínas en la envoltura de los NiV-LVs, provoca que haya menos receptores disponibles para la unión de los anticuerpos comerciales, hasta hacer desaparecer la señal completamente, como en el caso del NiV-p66^{VHH-MR33}-LV. Sin embargo, probablemente, en el caso del NiV-p66^{VHH-V36}-LV, como la expresión de CD11b en las mBMDCs era de gran intensidad (ver

figura-35, Control CD11b), la disminución de la señal, si bien fue drástica, no fue completa. De ser correcta esta teoría, los eventos categorizados como *off-target* en realidad serían *on-target*, y se estarían detectando así debido al fenómeno de unión de las partículas. No obstante, para comprobar que los LVs testeados son únicamente capaces de unirse a sus receptores blanco y, por ende, de transducir solamente células que lo expresen, se realizó un ensayo de transducción incluyendo un LV que acarrearía el VHH-T3, el cual reconoce al toxoide tetánico, es decir posee una especificidad irrelevante para este trabajo.

4.11. La transducción de las mBMDC se da de forma específica a través del receptor reconocido por el VHH.

Como se observó anteriormente, tras la transducción con LVs, la detección de los receptores diana no fue posible en todos los casos, lo cual arroja dudas sobre la especificidad de la transducción. Para disiparlas, se planteó realizar un ensayo de transducción incluyendo un control negativo y a su vez medir distintos receptores expresados en la membrana de las mBMDCs para verificar cuales variaban según el vector utilizado. Para realizar esto, se incluyó un LV control el cual acarrea el VHH-T3, que reconoce el fragmento TetC del toxoide tetánico. Previamente, se clonó el VHH-T3 a los vectores MV-p44, NiV-p66 y NiV-p70 como se indica en la sección 3.2.3. Utilizando estos vectores, se transfectaron células HEK293T y con el sobrenadante se realizó un *screening* en células CHO-anti-His (ver figura-36) similar al realizado anteriormente para determinar con cuál vector continuar. Estas células también expresan un scFv anti-His en su membrana de la misma forma que las HT1080-anti-His, y se utilizaron porque no se disponía de las células HT1080-anti-His para este experimento. Como se puede observar en la figura-35, solo se detectaron células GFP⁺ (7,3%) para el pseudotipado con MV. Lamentablemente, no se observó transducción con los NiV-VHH-T3, pero sin ahondar en este fallo, se continuó trabajando con el MV-VHH-T3 como control negativo.

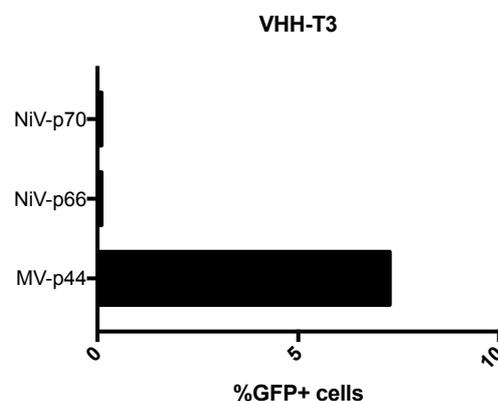


Figura-36. Screening de la condición óptima el VHH-T3. Para ello se produjo el MV-LV y los NiV-LVs acarreando el VHH-T3 en formato de pequeña escala, y los sobrenadantes sin purificar se utilizaron para transducir células CHO-anti-His de forma estática. 72 horas después se cuantificó la expresión de GFP mediante citometría de flujo.

Una vez confirmada la funcionalidad del MV-p44^{VHH-T3}-LV, el mismo se utilizó junto con el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV y el NiV-p66^{VHH-V36}-LV para transducir mBMDCs (generadas siguiendo el protocolo indicado en la sección 3.3.2.3.) a una MOI=10. En la figura-37, como era de esperar, se observa que el MV-p44^{VHH-T3}-LV no es capaz de transducir las mBMDCs a una MOI=10. En tanto que, en concordancia con lo observado anteriormente, tanto el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV como el NiV-p66^{VHH-V36}-LV fueron capaces de transducir las mBMDCs rindiendo porcentajes de transducción de 10,5% y 7,0% respectivamente. La inclusión de este control negativo, y el hecho de que no haya sido capaz de transducir las mBMDCs, nos permite concluir que efectivamente el proceso de transducción es VHH dependiente y nos permite validar los resultados hallados hasta el momento.

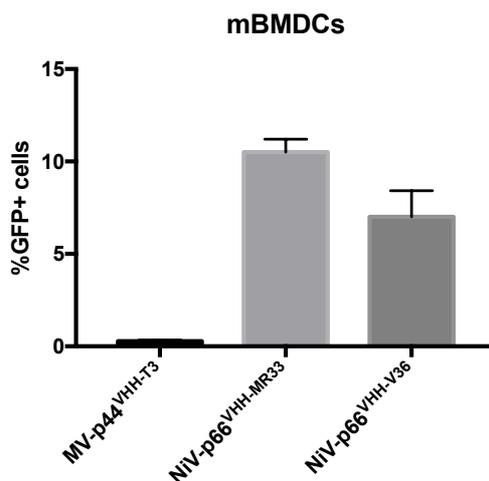


Figura-37. Transducción de mBMDCs. Un día previo a la transducción se sembraron 4×10^4 células. Al día siguiente, se transdujeron en forma estática con los LVs correspondientes a una MOI=10. 72 horas luego se realizó la citometría de flujo para detectar no solo la presencia del transgen GFP, sino también los receptores *target*.

Habiendo confirmado que la fusión con el VHH-T3 no media transducción en las mBMDCs, se analizó la expresión de los receptores CD11c, CD11b y MHCII en las células transducidas mediante citometría. De esta forma, buscábamos determinar si la desaparición de señal para un receptor era específica al VHH que se utilizara, lo que nos permitiría concluir que la unión a la célula (y por ende también la transducción) se da específicamente por el receptor en cuestión.

En la **figura-38**, se detallan los histogramas de la expresión de CD11c, CD11b y MHCII para las mBMDCs control o transducidas con los distintos LVs. Como control de tinción se utilizaron mBMDCs sin marcar (línea gris oscura sólida). A su vez, como control de expresión, se compara con el histograma correspondiente a las células marcadas sin transducir (línea gris clara punteada). Como se observa, cuando se transduce con el MV-p44^{VHH-T3}-LV, la expresión de los tres receptores se mantiene muy similar a la del control sin transducir, como era de esperar, ya que este vector reconoce un ligando no presente en las mBMDCs. En cambio, como ya se había observado, la transducción con el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV provoca una disminución en la detección de CD11c, que hace que las células se detecten como CD11c⁻, similares a las del control de tinción. Sin embargo, la expresión de CD11b y de MHCII se mantienen comparables a la del control sin transducir. De la misma forma, el único receptor afectado por la transducción con el NiV-p66^{VHH-V36}-LV es CD11b, ya que tanto CD11c como MHCII se mantienen similares al control sin transducir.

En vista de estos resultados, por una parte, se confirma que la transducción es VHH-dependiente, es decir, solamente se da este proceso cuando la proteína Hmut/Gmut se fusiona a un VHH que reconoce y se une a un receptor celular. No obstante, hubiese sido interesante producir los NiV^{VHH-T3}-LVs y analizar también su capacidad de transducción de mBMDCs. Sin embargo, por cuestiones de tiempo esto no se pudo realizar. Por otra parte, podemos confirmar que efectivamente tanto el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV como el NiV-p66^{VHH-V36}-LV son capaces de ser re-direccionados a un *target* específico y que este proceso depende únicamente de la especificidad conferida por los VHHs. Esto se deduce del hecho que solamente aquel receptor reconocido por el VHH es el que se ve disminuido en la citometría.

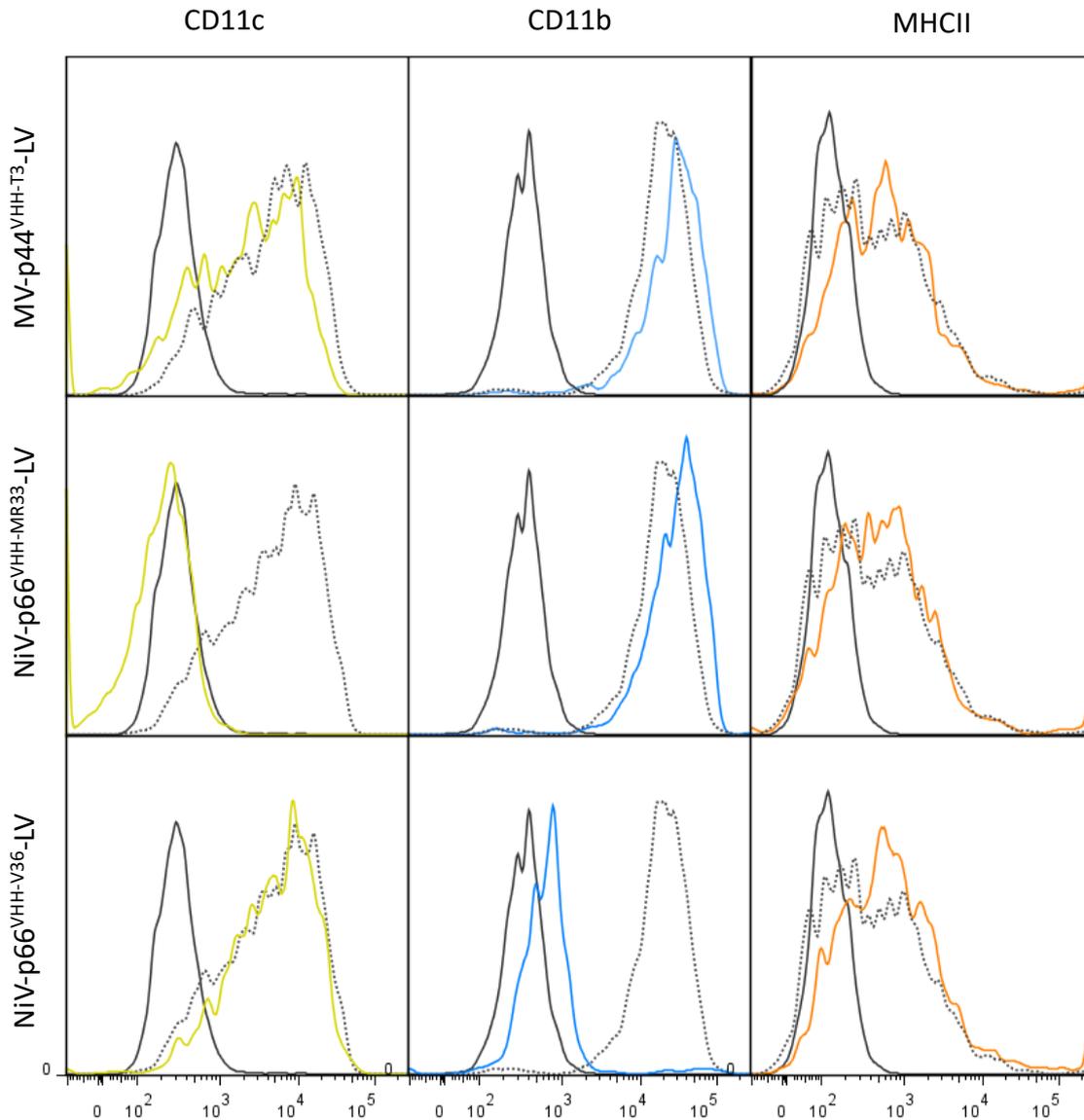


Figura-38. Expresión de receptores *target* tras la transducción de mBMDCs con LVs. Para ello, se marcaron células con los anticuerpos detallados en la tabla-7 y se realizó una citometría como se indica en la sección 3.10. En la imagen se detallan los niveles de expresión de los receptores CD11c (verde), CD11b (azul) y MHCII (anaranjado) en mBMDCs transducidas con distintos LVs. Como control de tinción se muestran mBMDCs sin marcar (línea gris oscura sólida) y como control de expresión se muestran mBMDCs sin transducir marcadas con los distintos anticuerpos (línea gris clara punteada).

En resumen, hasta el momento se sabe que los LVs son capaces de transducir células dendríticas uniéndose a ellas a través de los VHHs específicos. Sin embargo, cuando se analizan los gráficos de expresión de receptores vs GFP en células transducidas, aparecen eventos *off-target*. A continuación, se decidió comprobar la hipótesis que dichos eventos *off-target* se deben a que las moléculas de los receptores blanco son reconocidas por la enorme cantidad de partículas no transductantes que, al ser

incapaces de fusionarse, se mantienen unidas hasta las 72 h post-transducción, impidiendo así la unión de los anticuerpos comerciales durante el proceso de tinción en la citometría de flujo.

4.12. A los tres días post-transducción se siguen detectando LVs unidos en la superficie celular, lo que explica el presunto efecto *off-target*.

Asumiendo que la disminución en la detección de los receptores blanco se debía al bloqueo de los mismos por la unión de los LVs a la célula, cabía demostrar que los mismos persistían en la superficie celular al momento de realizar la citometría. Para esto se transdujeron mBMDCs nuevamente y se analizó la presencia de LVs en la membrana a las 72 h post-transducción (**figura-39**). Cabe destacar que cuando los LVs se fusionan con una célula, la membrana viral pasa a formar parte de la membrana celular, por ende, también lo hacen sus proteínas de membrana, por lo que eventualmente al incubarse con un anti-His-PE se podrían detectar las proteínas correspondientes a LVs fusionados. No obstante, para este experimento se considera que la contribución de este efecto es despreciable debido a que, como se discutió anteriormente, en el mejor de los casos hay 10^4 más partículas no transducentes que aquellas que sí transducen. A su vez, probablemente al tercer día de transducción, muchas de esas proteínas ya hayan sido ya degradadas.

En este experimento, como se observa en la **figura-39a**, en el control de mBMDCs sin transducir se detecta un 61,1% de células CD11c⁺. En el gráfico contiguo se detallan las células transducidas con el MV-p44^{VHH-MR31}-LV, en donde si bien se observa una reducción en el porcentaje de células CD11c⁺ (48,6%), esta no es tan drástica como se había observado anteriormente (ver **figura-34**). En cuanto al marcado con anti-His, apenas se detecta un 2,2% de células His⁺, lo que nos indicaría que casi no hay LVs unidos. Sin embargo, cabe recordar que la detección de MV-LVs con anti-His puede ser engañosa (ver **figura-31** y **figura-32**), por lo que la interpretación de estos resultados es dificultosa. De forma similar, en las células transducidas con NiV-p66^{VHH-MR33}-LV, si bien hay notoriamente menos células CD11c⁺ (15,2%) que en el control sin transducir (61,1%), esta reducción no es completa como había sido observado en casos anteriores (ver **figura-35** y **figura-38**). De todas formas, si es notable la reducción en la intensidad de expresión de CD11c. A pesar de que aparentemente la unión de los LVs a CD11c fue menos eficiente en este ensayo, para el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV se detectó un 15,8% de células His⁺. En la **figura-39b**, se detallan los gráficos correspondientes al control sin transducir marcado con CD11b y a las mBMDCs transducidas con el NiV-p66^{VHH-V36}-LV. Como se muestra, en el control hay un 98,2% de células CD11b⁺. En concordancia con lo que ya se había observado, al transducir con el NiV-p66^{VHH-V36}-LV se detecta una reducción en el porcentaje de células CD11b⁺, que en este caso paso

a ser 77,2% (similar a lo observado en la figura-35), en las cuales es notoria la reducción en la intensidad de fluorescencia. Sorprendentemente, en estas células se observa un 63,8% de células His⁺.

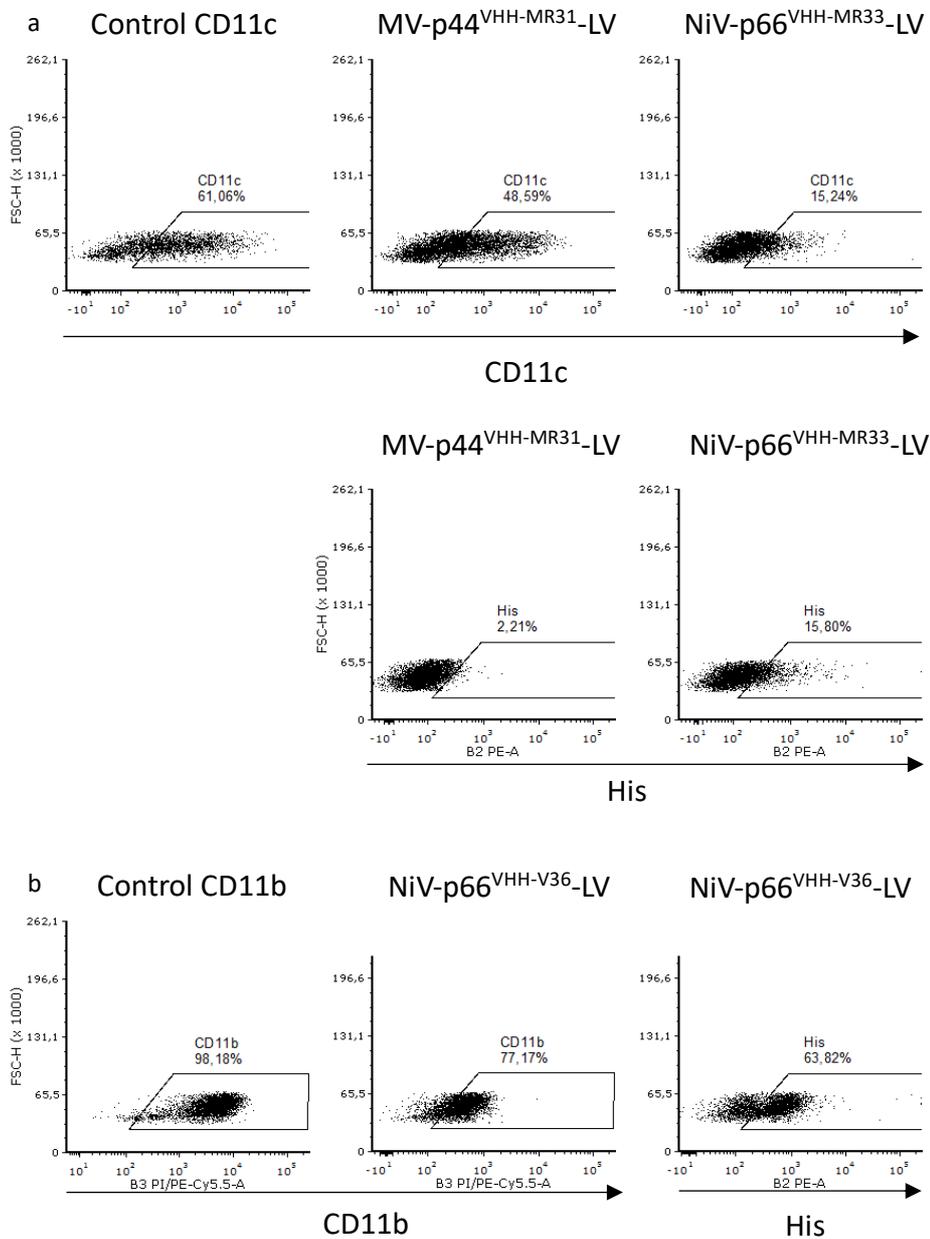


Figura-39. Detección de LVs unidos a mBMDCs a las 72 h post-transducción. Para ello, se transdujeron mBMDCs con los LVs detallados a una MOI=10. 72 horas luego, se marcaron las células con a) anti-His y anti-CD11c o b) anti-His y anti-CD11b y se analizaron por citometría de flujo como se indica en la sección 3.10.

Para el caso de los vectores anti-CD11c, parecería ser que la unión de los LVs a la célula fue más ineficiente que en los casos anteriores, lo que podría explicar el hecho de que la reducción en CD11c no fue tan marcada como se había observado previamente. Si bien no se esperaba detectar un gran

porcentaje de unión de LVs en las mBMDCs transducidas con el MV-p44^{VHH-MR31}-LV, este no era el caso para el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV, el cual había demostrado una fuerte capacidad de unión. Es de extrañar que habiéndose detectado un 15,2% de células CD11c⁺ se detectó solamente un 15,8% de células His⁺, lo que quiere decir que hay un gran porcentaje de células que es negativo para ambos, por lo que quizás el marcaje con anti-CD11c o con anti-His no fue eficiente. Para confirmar y calcular este porcentaje habría que haber realizado un doble marcado entre CD11c y His, pero esto no se pudo realizar debido que ambos anticuerpos están marcados con el fluoróforo PE. Los resultados parecen ser más concordantes para lo que ocurre con el receptor CD11b, dado que para el NiV-p66^{VHH-V36}-LV se detecta un gran porcentaje de células con partículas unidas en su superficie, lo que apoyaría nuestra hipótesis anterior. Otra conclusión que se desprende de estos resultados es que más allá de que los VHHs y el anticuerpo comercial compitan por la unión al epítipo, la detección del receptor blanco (probablemente debido a la densidad de proteínas en los LVs) es altamente dependiente del pseudotipado utilizado, por ejemplo, en el caso del MV-p44^{VHH-MR31}-LV en donde el porcentaje de células CD11c⁺ es siempre mayor al del NiV-p66^{VHH-MR33}-LV.

En resumen, especialmente para el NiV-p66^{VHH-V36}-LV, se concluye que una notable cantidad de partículas continúan unidas a las células luego de 72 horas de cultivo, por lo que efectivamente podrían estar bloqueando la detección de los receptores blanco por parte de los anticuerpos comerciales. En parte, la unión de los LVs a un alto porcentaje de células se mantiene en el tiempo de cultivo debido a que las mBMDCs no se dividen. En cambio, si se usase una línea celular capaz de dividirse, probablemente el efecto de unión se “diluiría” a medida que las células se irían replicando, por lo que los eventos *off-target* podrían desaparecer. Es por esta razón que se propuso transducir una línea celular y comprobar si este era el caso.

4.13. Al utilizar células capaces de replicarse, el efecto *off-target* se ve disminuido y en el caso de CD11b, desaparece.

Para comprobar la hipótesis mencionada anteriormente, se utilizó la línea celular murina JAWSII, compuesta de células dendríticas inmaduras y monocitos. Contrariamente a las mBMDCs, estas células sí son capaces de dividirse. No obstante, es importante destacar que su cultivo es dificultoso y la tasa de división es mucho menor que en otras líneas celulares. Justamente por esta razón, el ensayo se realizó en dos tiempos; una tanda de células se evaluó al día 3 post-transducción, como se había evaluado para las mBMDCs y otra al día 7 post-transducción. De esta forma esperábamos observar que a medida que las células se fuesen replicando, el efecto *off-target* desapareciera. Si bien hubiese

sido mejor evaluar el mismo cultivo de células al día 3 y luego al día 7, esto no se realizó para evitar perturbar las células, por ejemplo, al despegarlas para realizar la citometría. Al tratarse de células inmunes, al ser de cierta forma perturbadas, podrían modificar la expresión de ciertos receptores y afectar la comparación de los resultados. Antes de realizar el ensayo planteado, se comprobó que las células fuesen susceptibles a la transducción con los distintos vectores. Para ello, se realizó un fenotipado de las JAWSII mediante citometría, en el que se observó que las mismas se marcaban con los anticuerpos anti-CD11c, -CD11b y -MHCII (resultados no mostrados), por lo que se comprobó su potencial de ser transducidas por los vectores desarrollados.

En la **figura-40**, se detallan los *dot plot* (GFP vs receptor blanco) correspondientes a la transducción de JAWSII analizados al día 3 y 7 post-transducción. Este experimento se realizó utilizando los cuatro vectores con los que se venía trabajando, y en todos los casos se incluyó un control de JAWSII sin transducir marcadas con el anticuerpo comercial correspondiente, tanto al día 3 como al día 7. Sin embargo, debido a que entre de las células sin transducir al día 3 y al día 7 no se observaron cambios en la expresión de ninguno de los tres receptores, a modo de facilitar la visualización de los datos, solamente se detalla el control correspondiente al séptimo día.

En la **figura-40a**, se observan los gráficos correspondientes al control de células marcado con un anti-CD11c y las células transducidas con los vectores MV-p44^{VHH-MR31}-LV y NiV-p66^{VHH-MR33}-LV. En el control CD11c se detecta un 39,0% de células CD11c⁺ con una intensidad de expresión relativamente baja; esto no es de extrañar debido a que anteriormente se han reportado resultados similares en cuanto la expresión de distintos marcadores en estas células²⁰³. En el gráfico correspondiente a las células transducidas con el MV-p44^{VHH-MR31}-LV y analizadas al día 3, se observa un porcentaje de transducción del 2,0%, que debido a la baja en la detección de CD11c (17,7%) respecto al control (39,0%) aparecen como eventos *off-target*. Al analizar el gráfico correspondiente al día 7, se observa que, en concordancia con lo que se esperaba, el porcentaje de células CD11c⁺ aumentó a un 27,3%, probablemente debido a la replicación celular y la reducción en el porcentaje receptores bloqueados por LVs. Sin embargo, para nuestra sorpresa, a este tiempo ya no se detectan células GFP⁺, por lo que se podría pensar que quizás los pocos eventos GFP⁺ observados anteriormente se debían a pseudotransducción, es decir, simplemente transferencia de proteína. Por otra parte, en las JAWSII transducidas con el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV y analizadas al día 3 post-transducción, se observa un 24,0% de células CD11c⁺, para nuestra sorpresa, y contrario a lo que se había observado previamente, este es un porcentaje mayor al observado con el MV-p44^{VHH-MR31}-LV. No obstante, se destaca que se detecta un 10,1% de células transducidas, de las cuales hay un 5,8% *off-target* y un 4,3% *on-target*. Esto nos

indica, que ya a las 72 h hubo replicación celular, y debido a eso comienzan a aparecer los eventos *on-target*. Al día 7, se muestra un aumento en la detección de CD11c, que pasa a ser del 31,6%. En cambio, como ya se observó para el MV-p44^{VHH-MR31}-LV, se detecta una reducción en el porcentaje de las células GFP⁺ totales, que pasa a ser del 5,1%, de las cuales la mitad es *off-target* y la otra mitad *on-target*. Este resultado fue desalentador, ya que indicaría que los eventos realmente son *off-target*, sin embargo, si calculamos la relación *off-target:on-target*, al día tres, esta es de 1,3:1, mientras que al día siete es de 1:1. Si bien esta es una ligera disminución, quizás, si se cultivaran más días, sería posible notar una diferencia mayor; se recuerda que la tasa de división de estas células es lenta. A su vez, debido a que la intensidad de expresión de CD11c es baja, la definición entre células CD11c⁺ y CD11c⁻ es engañosa, por lo que se podría estar subestimando el porcentaje de eventos *on-target*. Otro efecto que se observa en las células transducidas, es que si bien el porcentaje disminuye (probablemente por desaparición de eventos de pseudotransducción), la intensidad de expresión al día 7 es mayor, lo que podría deberse a la acumulación de GFP en el tiempo. A su vez, se destaca que en el caso del vector NiV-p66^{VHH-MR33}, si bien el porcentaje de transducción fue del 10,1%, muy similar al obtenido en mBMDCs (ver figura-33), considerando que el porcentaje de células CD11c⁺ en las JAWSII es muy inferior al de las mBMDCs y que el vector es capaz de realizar *targeting* específico a células CD11c⁺, se podría decir que la eficiencia de transducción fue mayor en la línea celular. Esto no es de extrañar, debido a que se encuentra reportado que las células inmortalizadas son mucho más permisivas a la transducción por LVs que las células de origen primario, como por ejemplo células B primarias²⁰⁴.

Por otra parte, en la figura 40-b, se detallan los gráficos correspondientes al control sin transducir marcado para MHCII y la transducción con el vector anti-MHCII, NiV-p66^{VHH-N11}-LV. En el control se observa un 23,0% de células MHCII⁺ las cuales lo expresan con alta intensidad. Sorprendentemente, al transducir estas células con el NiV-p66^{VHH-N11}-LV no se detectó una disminución en la expresión (ni en la intensidad) de MHCII, las cuales son 23,4%⁺. Consecuentemente, se observa un 4,1% de células GFP⁺ en donde la mayoría (2,4%) es *on-target*. Al día 7, se observa que el total de células GFP⁺ es también MHCII⁺. Similar a lo observado anteriormente, el porcentaje total de células transducidas disminuye, pero la intensidad de expresión de GFP aumenta. Esta es la primera vez que se analizó la expresión de MHCII en células transducidas con este vector, y también es la primera vez en donde se observa que no hay una reducción en la detección del receptor. Esto podría deberse a que quizás, el VHH-N11 y el anticuerpo comercial anti-MHCII (Clon M5/114.5.2) reconocen epítopes distintos no solapantes, por lo que la unión del LV a la célula no entorpece la detección del receptor, contrariamente a lo que pasa con los nanobodies anti-CD11c y anti-CD11b.

Por otro lado, en la **figura-40c**, se muestra el control sin transducir para CD11b y la transducción de JAWSII con el NiV-p66^{VHH-V36}-LV. A diferencia de lo observado para CD11c, en el control se detecta un 91,2% de células CD11b⁺ con una alta intensidad de expresión. Sin embargo, en concordancia a lo observado anteriormente, en las células transducidas con el NiV-p66^{VHH-V36}-LV se detectó una disminución en el marcaje con el anti-CD11b, que en este caso pasó a ser del 27,0% al día 3. Consecuentemente, el 5,2% de células transducidas es CD11b⁻. No obstante, al día 7, la expresión de CD11b se ve recuperada y llega a ser similar (88,4%) a la del control sin transducir; esto a su vez hace que las células transducidas antes detectadas como CD11b⁻, ahora se detecten como células CD11b⁺, por lo que se confirmaría que efectivamente este vector es capaz de realizar *targeting* a CD11b.

En resumen, este experimento nos permitió comprobar, tanto en el caso de CD11b como de MHCII, que los vectores efectivamente son capaces de realizar *targeting*, y que el efecto *off-target* es en realidad un artefacto. Por otra parte, en el caso de los LVs anti-CD11c, si bien no se pudo comprobar definitivamente que los eventos *off-target* desaparecen, si se confirmó una aparición de eventos *on-target*. Probablemente, como se comentó anteriormente, esto se vio dificultado por el hecho de la baja intensidad de expresión de CD11c en las JAWSII, lo que dificulta la definición de células marcadas de las no marcadas. A su vez, contrario a CD11b, a los 7 días no se detectó una recuperación total en el porcentaje de células CD11c⁺, por lo que esto también podría estar incidiendo en el resultado. Cabe recordar que el cultivo de JAWSII está compuesto de células dendríticas inmaduras y monocitos, los que probablemente tengan tasas de replicación distintas, lo que podría explicar la aparición de ciertos receptores antes que otros. No obstante, sabiendo que el sistema del NiV permitió el *targeting* tanto en el caso del VHH-N11 como en el del -V36, y conociendo que el VHH-MR33 es específico de CD11c (y que solamente este vector se ve reducido en el marcaje por citometría, ver **figura-38**), se podría suponer que este vector si es re-direccionado, pero en el modelo usado no se puede diferenciar.

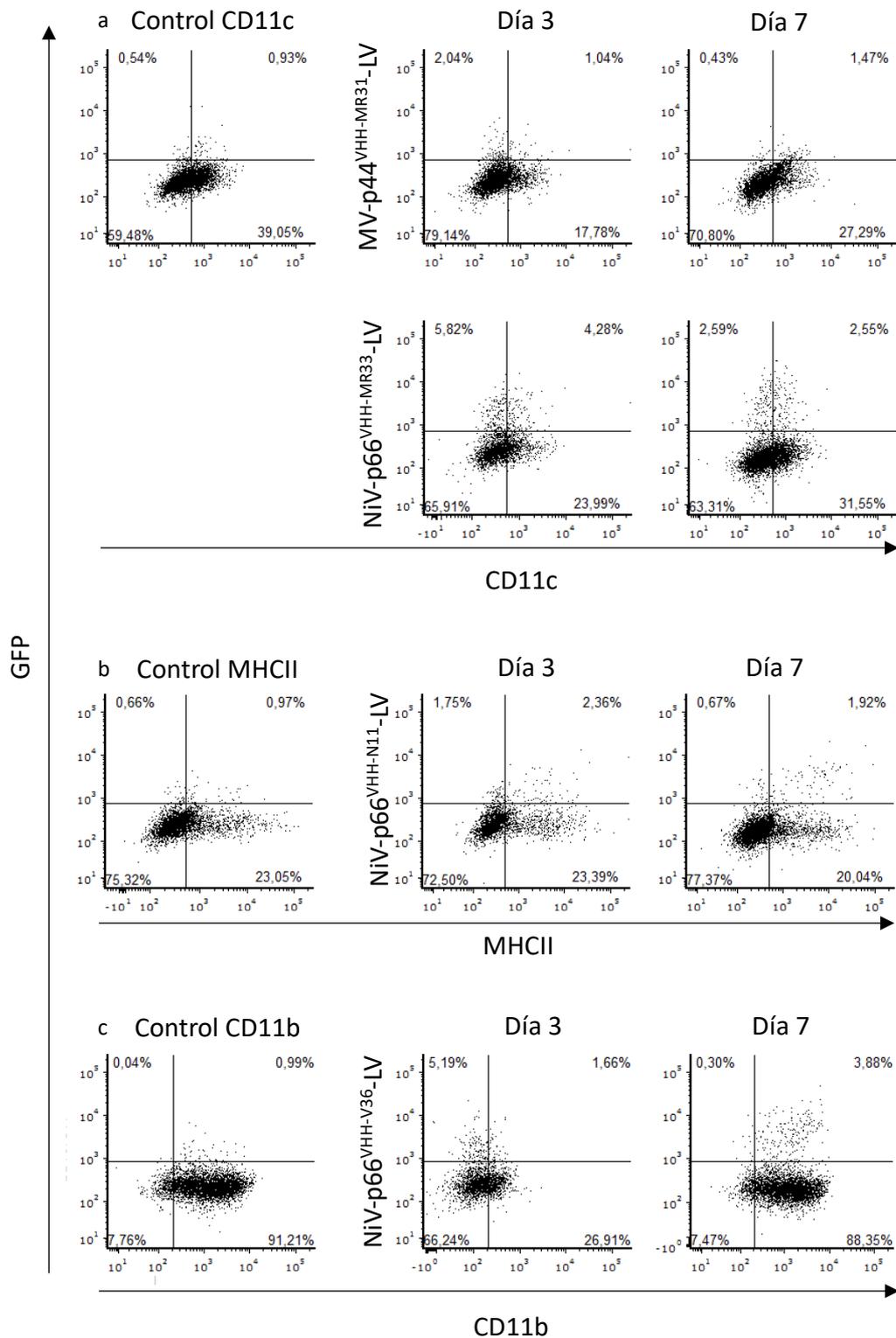


Figura-40. Transducción de JAWSII con LVs y análisis por citometría al día 3 y al día 7 post-transducción. Para ello, se sembraron 4×10^4 células JAWSII y al día siguiente se realizó una transducción estática a $MOI=10$ con los LVs

correspondientes. Al tercer o al séptimo día se recolectaron las células y se tiñeron para su análisis en citometría como se indica en la sección 3.10.

4.14. En un *screening* preliminar, los tres BiVHHs testeados se adaptan mejor al sistema de MV-p44.

Hasta este momento se trabajó con los nanobodies monovalentes. No obstante, fue de interés comprobar si la fusión de dos nanobodies en una construcción bivalente (BiVHH) aumenta la capacidad de transducción de los LVs. En este sentido, se generaron las construcciones bivalentes anti-CD11c (MR31-MR31), anti-CD11b (V36-V36) y la construcción biespecífica anti-CD11c/anti-CD11b (MR31-V36). Si bien, teniendo en cuenta los resultados anteriores podemos considerar que el VHH-MR33 sería un mejor candidato para los BiVHH (por lo menos en su versión NiV-LV), al momento del clonaje de estas construcciones no se conocían estos resultados. Para ello, se clonaron los nanobodies siguiendo el protocolo indicado en la sección 3.2.4. y utilizando estos plásmidos, se generaron los LVs correspondientes en pequeña escala como se detalla en la sección 3.5.2. De forma similar al *screening* realizado previamente para las construcciones monovalentes, se tomó el sobrenadante sin purificar de los cultivos y se realizó una transducción estática en células CHO-anti-His (que eran las disponibles en oportunidad de este experimento).

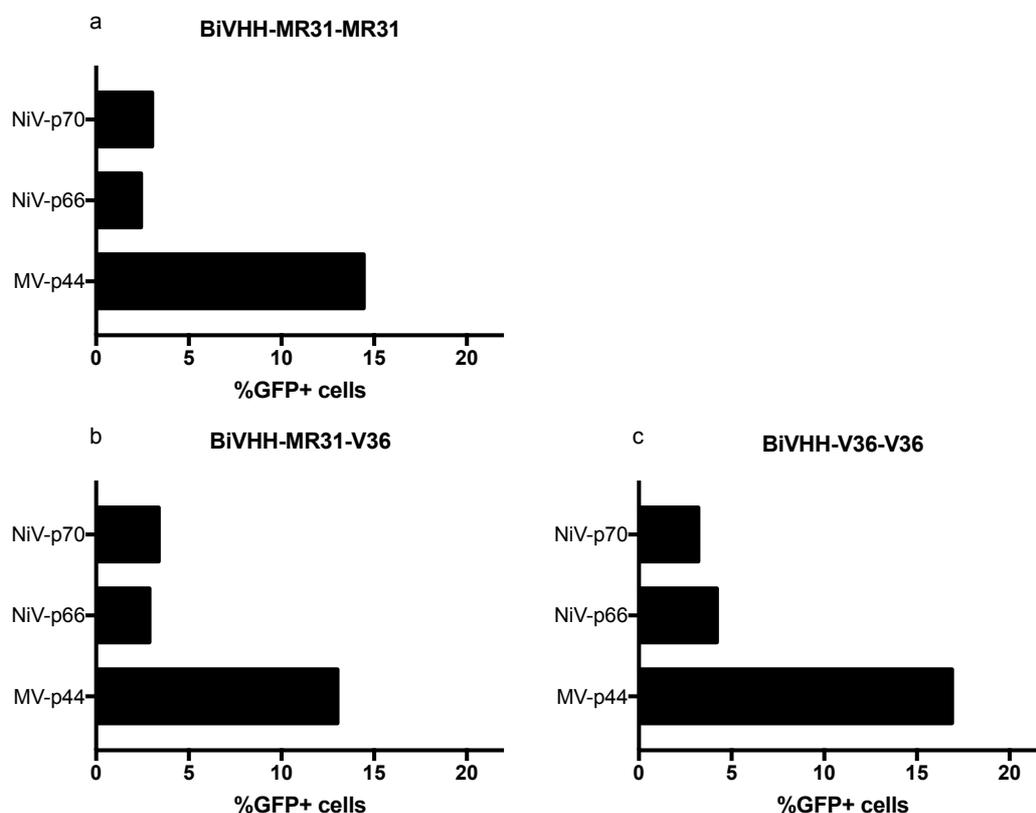


Figura-41. Screening de la condición óptima para los Bi-VHH. Para ello se produjeron los MV-LVs y los NiV-LVs acarreando el a) BiVHH-MR31-MR31, b) BiVHH-MR31-V36 o c) BiVHH-V36-V36 en formato de pequeña escala, y los sobrenadantes sin purificar se utilizaron para transducir células CHO-anti-His de forma estática. 72 horas después se cuantificó la expresión de GFP mediante citometría de flujo.

Como se observa en el gráfico correspondiente a la **figura-41**, los tres BiVHHs testeados tienen una mayor capacidad de transducción en su versión MV-p44. A su vez, como era de esperar los porcentajes de transducción son muy similares entre ellos, siendo de 14,5%, 13,0% y 17,0% para **a**, **b** y **c**, respectivamente. En cuanto a los NiV-LVs, todos presentan una transducción menor al 5%; como se había observado previamente para el VHH-T3 (ver **figura-36**), la eficiencia de transducción de estas células con NiV-LVs parece ser mucho menor que cuando se usan las células de origen humano HT1080-anti-His, lo que podría explicarse debido a la menor susceptibilidad de las células de roedor¹⁹³. La etapa siguiente que hubiese sido de gran interés sería la de comparar su potencial de transducción frente a los nanobodies monovalentes en mBMDC o líneas celulares de macrófagos, para verificar si el aumento de avidéz mejora la capacidad de transducción. Lamentablemente, por la dinámica de los experimentos, y debido a cuestiones de tiempo y prioridad, la caracterización posterior de los BiVHHs no se pudo realizar. En su lugar, se consideró pertinente avanzar sobre el análisis del potencial de transducción *in-vivo* de los LVs ya caracterizados previamente.

4.15. El modelo de inyección intraperitoneal de LVs permite el seguimiento de células transducidas en ratones C57BL/6 hasta el día ocho post-inyección.

Habiendo comprobado que los LVs son capaces de transducir mBMDCs y células JAWSII *in-vitro*, y que, en cierta medida, son capaces de ser re-direccionados, fue de interés analizar su potencial en un ensayo de transducción *in-vivo* en ratones. Para esto inicialmente se exploraron modelos para estudiar la transducción. Para ello, se planteó utilizar las cepas de ratones C57BL/6 y BALB/c. El uso de ambas cepas se justifica debido a que existen reportes que indican una diferencia en la duración y el nivel de expresión del transgen²⁰⁵. Para setear el modelo inicialmente se utilizó el vector de referencia VSV-G-LV, por su tropismo amplio y alta eficiencia de transducción. Cabe destacar que para todos los ensayos *in-vivo* se utilizó el transgen GFP.

En una primera instancia, se prepararon VSV-G-LVs siguiendo el protocolo indicado en la sección 3.5.1.2. Posteriormente, se tomaron 3 ratones de cada cepa, los cuales fueron inyectados por vía intravenosa con 1×10^6 TU en 100 μ L de PBS o 100 μ L de PBS como control. Al día 5 post-inyección,

los ratones fueron sacrificados. Como se indica en la sección 3.11, se obtuvo el bazo, el cual fue procesado, y los esplenocitos resultantes se analizaron por citometría de flujo.

En la **figura-42** se muestra a modo representativo el análisis para un ratón de cada cepa. Como se observa, y comparando con los respectivos controles negativos, se concluye que no hay células transducidas en ninguna de las cepas. Si bien esto resultó sorprendente al principio, es probable que la baja cantidad de partículas usadas no sean suficientes para observar transducción, ya que es muy posible que el VSV-G-LV, debido a su amplio tropismo, haya transducido otros tipos celulares antes de llegar al bazo. Si bien se encuentra reportado la inyección de al menos 10^7 TU totales^{94,205}, la elección de inyectar 1×10^6 TU totales se basó pensando en la futura inyección con los NiV-LVs. Cada dos frascos T-175 de producción de NiV-LVs se obtienen 100 μ L con un título de 10^7 TU/mL, que sería suficiente para la inyección de un ratón con 10^6 TU. Suponiendo que se inyectan 4-5 ratones, se prepararían 8-10 frascos de producción por LV, por lo que resultaría muy difícil aumentar un orden las TU totales manteniendo un volumen inyectable, ya que una vez que los LVs se resuspenden en PBS no se pueden re-concentrar.

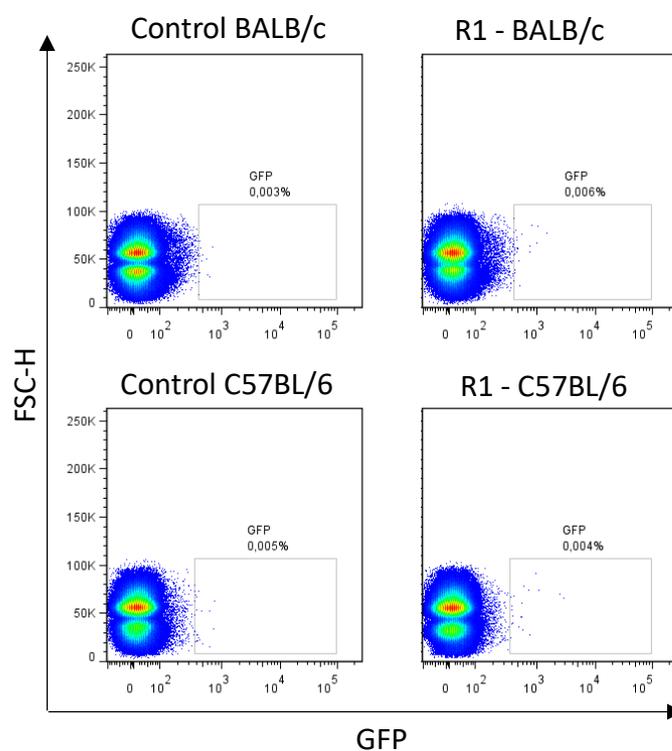


Figura-42. Análisis de esplenocitos de BALB/c y C57BL/6 inyectados con 1×10^6 TU de VSV-G-LV. Al día 0, tres ratones de cada cepa fueron inyectados con 1×10^6 TU en 100 μ L de PBS o 100 μ L de PBS por la vena de la cola. Al día 5, los ratones

fueron sacrificados y se extrajeron los esplenocitos (ver sección 3.11), los cuales fueron analizados para verificar la expresión de GFP. A modo representativo se muestra el ratón 1 (R1) para cada cepa.

Tras el fracaso de la inyección intravenosa, se testeó la inyección de VSV-G-LV de forma intraperitoneal. Debido a que luego se utilizaría el VSV-G-LV como control positivo para un eventual ensayo de transducción *in-vivo* con los NiV-LVs, y teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, se volvió a utilizar 1×10^6 TU totales a modo de poder definir si en la concentración de inyección de los NiV-LVs era posible visualizar eventos de transducción con el VSV-G-LV.

Para ello, se inyectaron 4 ratones de cada cepa con 1×10^6 TU de VSV-G-LV en 200 μ L de PBS y 2 ratones control de cada cepa con 200 μ L de PBS. A modo de determinar el tiempo óptimo post-inyección para el análisis por citometría, se utilizó un diseño experimental en donde se evaluó la transducción al día 5 y al día 8 post-inyección. Por ende, se evaluaron 2 ratones inyectados (y un control) al día 5 y lo mismo al día 8, para ambas cepas. A su vez, para determinar de forma preliminar que poblaciones celulares eran transducidas, las células se marcaron para CD11c, CD11b, MHCII y F4/80 utilizando los anticuerpos detallados en la **tabla-8** (sección 3.11). El procedimiento detallado del procesamiento de los ratones se encuentra descrito en la sección 3.11.

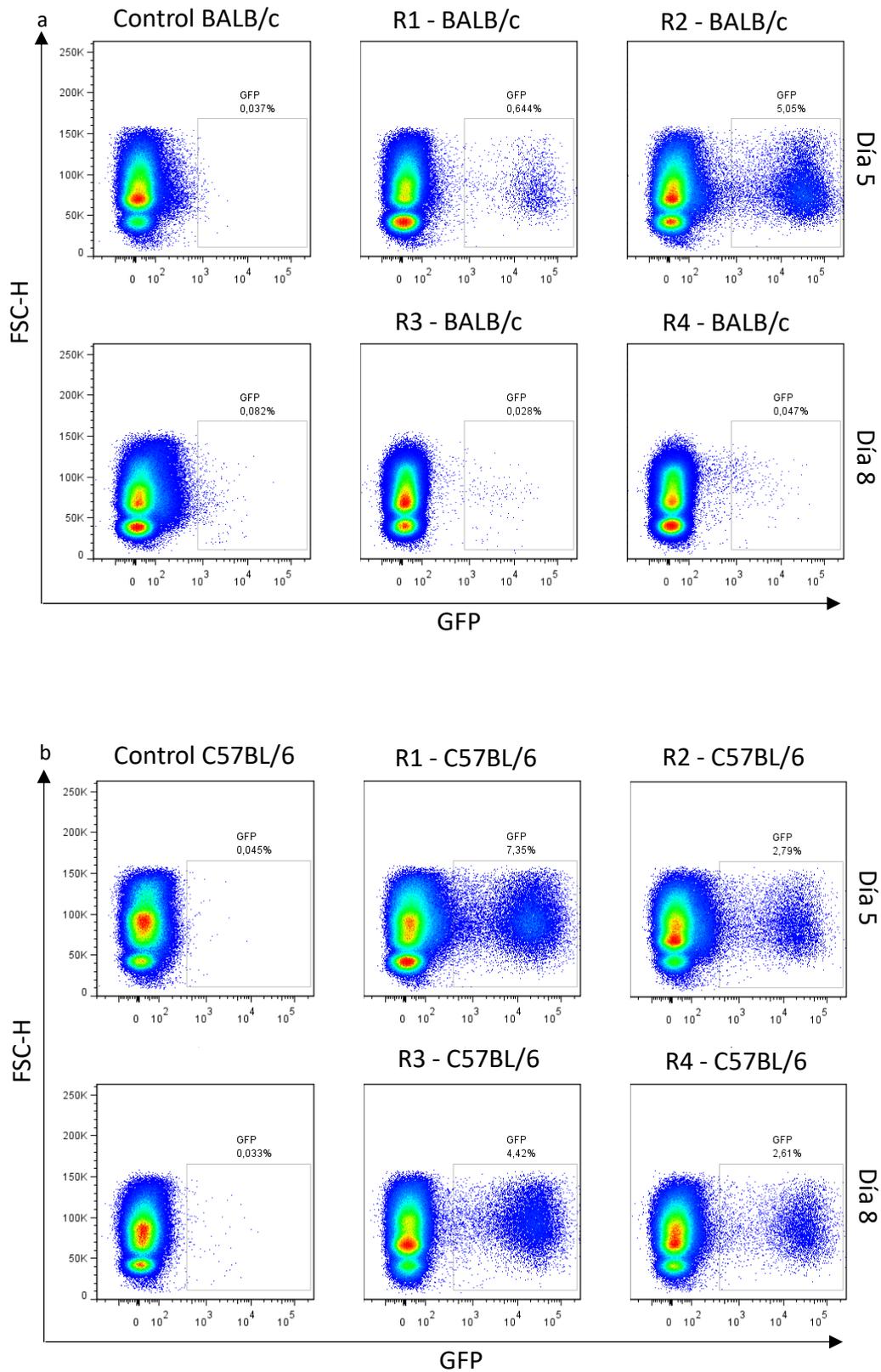


Figura-43. Análisis de células de la cavidad peritoneal de a) BALB/c y b) C57BL/6 inyectados con 1×10^6 TU de VSV-G-LV o PBS. Al día 0, cuatro ratones de cada cepa fueron inyectados con 1×10^6 TU en $200 \mu\text{L}$ de PBS por vía intraperitoneal y dos de ellos (control) fueron inyectados con $200 \mu\text{L}$ de PBS. Al día 5, dos de los ratones inyectados con LV y un control fueron sacrificados y se obtuvieron las células de la cavidad intraperitoneal, los cuales fueron marcadas con los anticuerpos anti-

CD11c, -CD11b, -MHCII y -F4/80 detallados en la **tabla-8** y analizadas por citometría de flujo (ver sección 3.11). Los tres ratones restantes fueron analizados de la misma forma al día 8 post-inyección.

En la **figura-43a**, se muestran los resultados correspondientes a los ratones BALB/c. Como se observa, tanto en el R1 como el R2 (5 días post-inyección) se detectan células transducidas, que se corresponden a un 0,6% y 5,1% de las células totales, respectivamente. Si bien la diferencia en la eficiencia de transducción entre ambos ratones es notoria, se podría decir que la población transducida parece ser la misma. No obstante, en los ratones R3 y R4 analizados al día 8 post-inyección (R3 y R4), no se detectaron células transducidas, lo que se podría deber a la eliminación de las células transducidas o a una migración de las mismas. Por otra parte, en la **figura-43b** se muestran los gráficos correspondientes a los ratones C57BL/6. Como se observa en los gráficos superiores correspondientes al día 5, ambos ratones R1 y R2 presentan células transducidas siendo del 7,4% y 2,8% del total de células, valores similares al R2-BALB/c. Contrario a lo observado para los ratones BALB/c, en los C57BL/6 se sigue detectando la misma población de células transducidas al día 8 post-inyección, con porcentajes similares a los del día 5, siendo de 4,4% y 2,6% para los ratones R3 y R4.

Analizando más en detalle las poblaciones de células transducidas, como se muestra en la **figura-44**, tanto en los ratones BALB/c (**a**) como en los C57BL/6 (**b**) se transduce casi exclusivamente la población F4/80^{hi}, correspondiente a los macrófagos grandes de la cavidad peritoneal (LPM, del inglés, *large peritoneal macrophages*)²⁰⁶, que no es de extrañar debido a su alta expresión del receptor de LDL, el cual es uno de los ligandos de la proteína G del VSV²⁰⁷. Como se comentó anteriormente, en el caso de los ratones BALB/c, dicha población ya no se detecta al día 8. Se ha reportado, que tras la estimulación con tioglicolato, la población de macrófagos desaparece de la cavidad peritoneal, ya sea por migración, adherencia al peritoneo o debido a que mueren por sobre-activación²⁰⁶. A su vez, se ha reportado que el mismo fenómeno ocurre en las primeras horas en un modelo de infección intraperitoneal²⁰⁸. Por ende, la activación de los macrófagos podría explicar su desaparición en el caso de los ratones BALB/c. De todas formas, en nuestro caso, a diferencia de lo reportado^{206,208}, la migración aparece en forma más tardía. Probablemente, el menor porcentaje de transducción observado en el R1-BALB/c pueda deberse a que este proceso de migración ya comenzó al día 5.

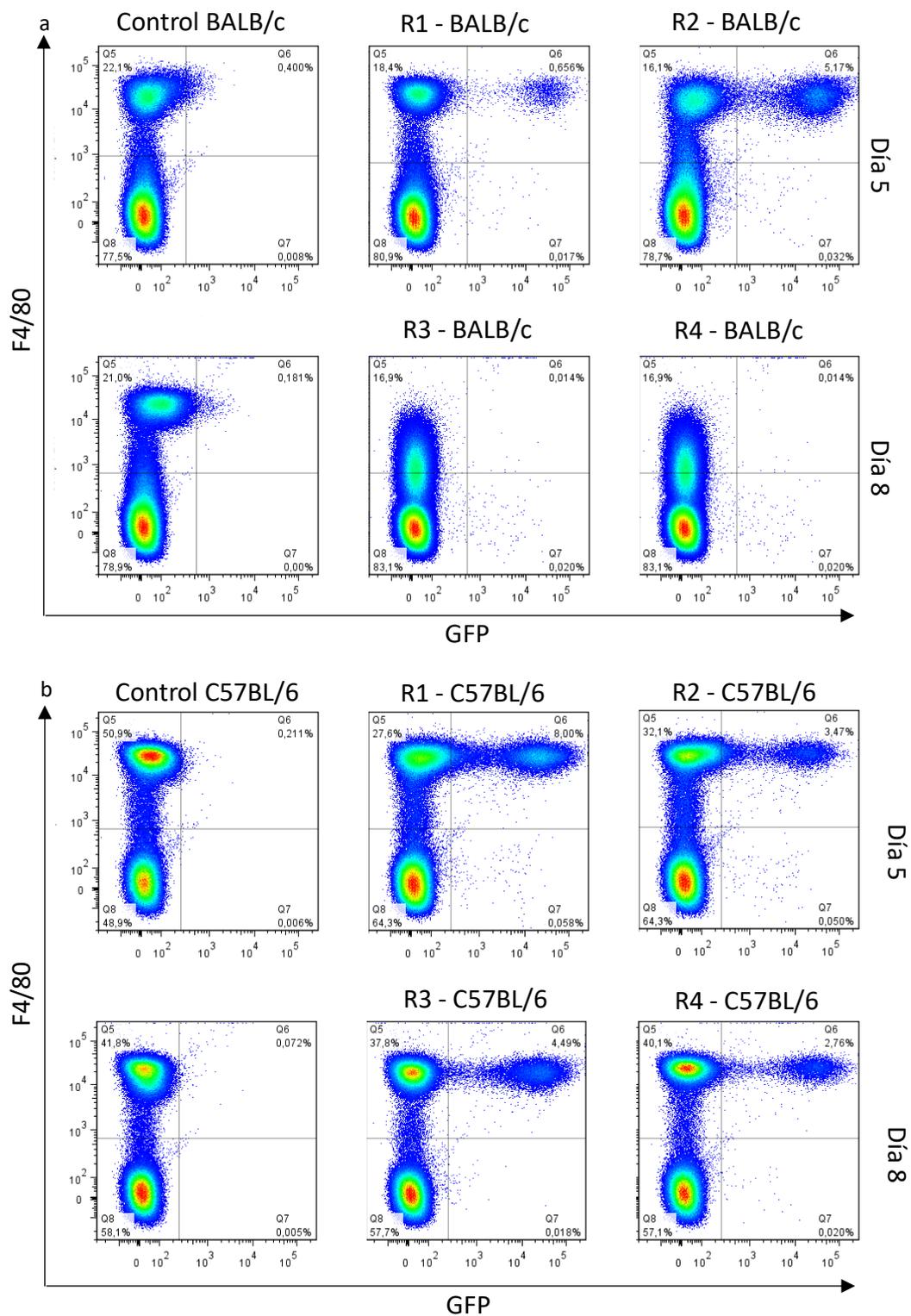


Figura-44. Análisis de células de la cavidad peritoneal de a) BALB/c y b) C57BL/6 inyectados con 1×10^6 TU de VSV-G-LV o PBS. Al día 0, cuatro ratones de cada cepa fueron inyectados con 1×10^6 TU en 200 μ L de PBS por vía intraperitoneal y dos de ellos (control) fueron inyectados con 200 μ L de PBS. Al día 5, dos de los ratones inyectados con LV y un control fueron

sacrificados y se obtuvieron las células de la cavidad intraperitoneal, los cuales fueron marcadas con los anticuerpos anti-CD11c, -CD11b, -MHCII y -F4/80 detallados en la **tabla-8** y analizadas por citometría de flujo (ver sección 3.11). Los tres ratones restantes fueron analizados de la misma forma al día 8 post-inyección.

En resumen, para evitar perder células transducidas debido al fenómeno observado anteriormente, para el futuro ensayo se eligió utilizar el modelo de inyección intraperitoneal en ratones C57BL/6. Además, el uso de este modelo permite monitorear la transducción hasta el día 8, lo que proporciona información de la duración de expresión del transgen *in-vivo*.

4.16. El NiV-p66^{VHH-MR33}-LV es capaz de transducir células *in-vivo*, si bien no se confirma la especificidad.

Una vez que se definió que modelo utilizar, se decidió realizar un experimento preliminar para evaluar el potencial *in-vivo* del vector NiV-p66^{VHH-MR33}-LV. Si bien este el único vector del cual no se confirmó completamente su re-direccionamiento a células CD11c⁺, resultó el más interesante por el simple hecho de que CD11c, aunque se encuentra expresado en otras células, se considera un marcador de células dendríticas. A su vez, hasta nuestro conocimiento, no hay reportes de re-direccionamiento de LVs a células CD11c⁺ en el contexto de un modelo de vacunas.

En este ensayo, se utilizaron 4 ratones por grupo, los cuales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 200 µL de PBS (control), o con 1x10⁶ TU de VSV-G-LV o de NiV-p66^{VHH-MR33}-LV en 200 µL de PBS. Al día 8 post-inyección, los ratones fueron sacrificados y, según se indica en la sección 3.11, se obtuvieron las células de la cavidad peritoneal. A modo de definir las posibles poblaciones transducidas, las células se marcaron con los anticuerpos anti-CD3, -CD19, -F4/80, -CD11c, -CD11b, -MHCII (ver **tabla-8**) para su posterior análisis por citometría de flujo. A su vez, las células fueron marcadas con los anticuerpos anti-CD80 y -CD86 para analizar si la transducción con LVs genera un aumento en dichos marcadores de activación. De forma paralela, se obtuvieron los ganglios mesentéricos para investigar la posible migración de células transducidas desde la cavidad peritoneal hacia los ganglios mesentéricos drenantes. Estos fueron procesados (ver sección 3.11) y marcados de la misma forma que las células peritoneales.

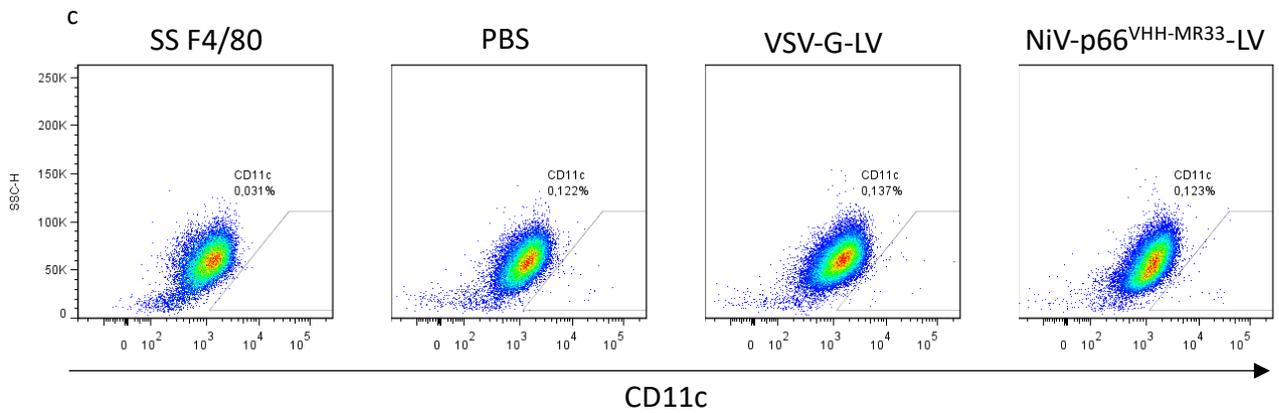
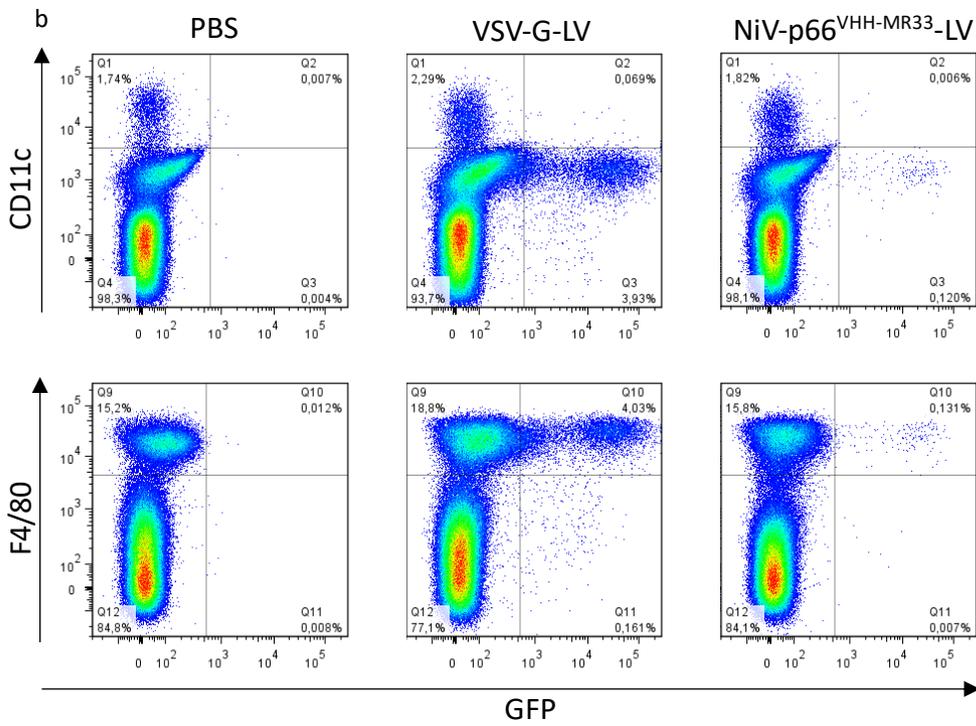
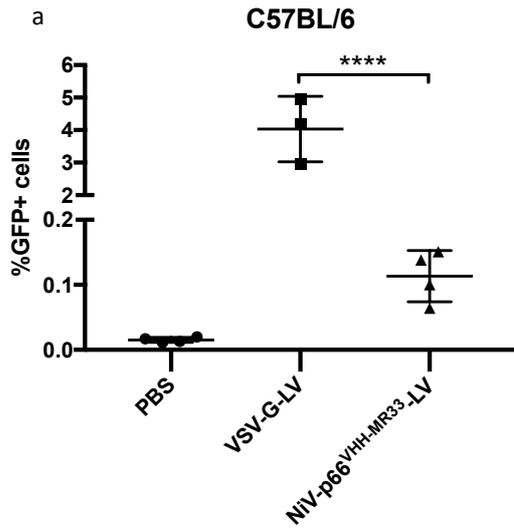


Figura-45. Análisis de las células de la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6 inyectados con LVs o PBS. Cada ratón se inyectó con 200 μ L de PBS (control), 200 μ L de 1×10^6 TU de VSV-G-LV, o 200 μ L de 1×10^6 TU de NiV-p66^{VHH-MR33}-LV. a) Gráfico que detalla el porcentaje de células transducidas para los tres grupos. Para determinar la significancia se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis con post-test de Dunn en donde $*$ = $P < 0,05$ y $****$ = $P < 0,0001$. b) Dot plot CD11c vs GFP y F4/80 vs GFP de las células de la cavidad peritoneal para un ratón representativo de cada grupo. c) Expresión de CD11c en población F4/80^{hi} para un ratón representativo de cada grupo; como control se muestra el control marcado solamente con F4/80.

En la **figura 45a**, se detalla el porcentaje de células transducidas para los ratones de los tres grupos. Como se observa, y en concordancia con lo hallado anteriormente, el VSV-G-LV es capaz de transducir en promedio, un 4,0% de las células de la cavidad peritoneal. Cabe destacar que para este grupo se muestran solo tres ratones debido a que en un ratón no se observó transducción, probablemente debido a una falla en la inyección. Por otro lado, se destaca que el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV también es capaz de transducir células peritoneales, si bien, aunque esperable, el porcentaje de transducción es significativamente menor, siendo en promedio del 0,1% de las células totales.

Para definir qué población celular se encuentra transducida en cada caso, en la **figura-45b**, se muestran los *dot plot* CD11c vs GFP, para definir si células transducidas con el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV son CD11c⁺, y F4/80 vs GFP debido a que previamente se había observado que la población de la cavidad peritoneal preferencialmente transducida por el VSV-G-LV son las células F4/80^{hi}. Como se muestra, en el control PBS se observa un 1,7% de células CD11c⁺ del total de células. En cuanto al ratón inyectado con VSV-G-LV, se observa un 2,3% de células CD11c⁺, las cuales no son transducidas por este vector. De forma similar, y para nuestra sorpresa, las células CD11c⁺ (1,8%) en el ratón inyectado con el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV tampoco se encuentran transducidas. Analizando más en detalle, parece ser que la población transducida por el VSV-G-LV y el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV es la misma, lo que se confirma al observar los gráficos de F4/80 vs GFP. Para ambos casos, se ve que casi la totalidad de células transducidas corresponde a la fracción F4/80^{hi}, lo que resultó desalentador. Sin embargo, cabe destacar que para el VSV-G-LV, también se encontraron células transducidas dentro de la fracción CD3⁺, correspondiente a células T, y CD19⁺ correspondiente a células B (resultado no mostrado).

Teniendo en cuenta el posible efecto de disminución de la expresión de CD11c que se observó *in vitro*, investigamos si dentro de las células definidas como F4/80^{hi} es posible encontrar células CD11c⁺ que pierdan la expresión de este receptor luego de la transducción. En la **figura-45c**, se detalla como control (SS F4/80) células marcadas únicamente para F4/80. Si bien en los tres grupos se detectan células CD11c⁺, aproximadamente esta población doble positiva es apenas el 0,02% del total de

células, por lo que no podría explicar el 0,1% de transducción observado con el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV. Teniendo en cuenta el fenómeno de desaparición de CD11c observado para este vector, cuantificamos en promedio el total de células CD11c⁺ en los tres grupos, aunque no se detectaron cambios notorios. Sin embargo, al calcular la MFI para la población CD11c⁺, se observa una ligera disminución en los ratones tratados con el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV en relación al control (resultado no mostrado). En resumen, si bien se observó transducción con el NiV-LV, no se pudo confirmar la especificidad por CD11c, y se podría concluir que la población celular transducida es la de macrófagos LPM. No obstante, en este sentido, se ha reportado que los LPM (F4/80^{hi}) también expresan CD11c^{206,209}, lo que hace presumir que es esta población la que resultó transducida y por tanto que vector sí es capaz de realizar *targeting*. Suponiendo que la transducción haya sido *on-target*, es probable que la transducción de macrófagos, pero no de células dendríticas (CD11c^{hi}) haya sido favorecida por la gran representación de los primeros dentro de las células de la cavidad peritoneal (15-20%). Si bien este experimento preliminar no nos permitió confirmar el re-direccionamiento del NiV-p66^{VHH-MR33}-LV, si se comprobó que este vector es capaz de transducir células *in-vivo*. Quizás el modelo elegido no fue el más indicado para visualizar transducción de células CD11c⁺, y en un futuro sería interesante optimizar el modelo de inyección intravenosa y análisis de esplenocitos.

Por otro lado, como se había comentado anteriormente, las células de la cavidad peritoneal también fueron analizadas para los marcadores de activación CD80 y CD86. Habiendo definido que en ambos casos la población transducida es la de LPM, se seleccionaron estas células para comprobar si las mismas expresaban marcadores de activación. Se decidió hacer un análisis de la población completa (y no solo las células transducidas) debido a que es probable que aquellas células que no estén transducidas igual hayan detectado la presencia de partículas, por ejemplo, por captación mediante pinocitosis. En la **figura-46**, se muestra la expresión de CD80 en los LPMs de los distintos grupos. Como control se utilizaron células sin marcar (SM). En el ratón inyectado con PBS se observa un 0,6% de células CD80⁺, muy similar al porcentaje observado en el ratón inyectado con el VSV-G-LV (0,5%). Por otra parte, en el ratón tratado con el NiV-p66^{VHH-MR33}-LV se distingue un 0,1% de células CD80⁺. Debido a que el porcentaje de células marcadas con CD80 en los ratones inyectados con LVs es igual (o menor) al ratón tratado con PBS, se concluye que los LVs no son capaces de activar las células, al menos en las condiciones testeadas. A su vez, dentro de los dos grupos tratados con LVs, al analizar específicamente aquellas células transducidas, no se encontró que las mismas expresaran CD80 (resultados no mostrados), por lo que confirma que el bajo nivel de inmunogenicidad de estos vectores.

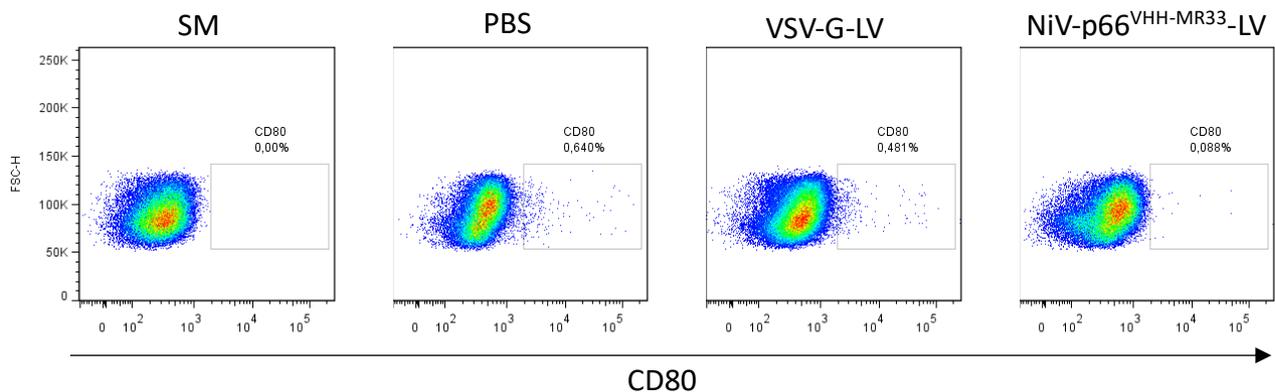


Figura-46. Expresión de CD80 en la población F4/80^{hi}. Se seleccionó la población F4/80^{hi} de la cavidad peritoneal, correspondiente a los LPMs y se analizó la expresión del marcador de activación CD80. Como control de tinción se agregaron células sin marcar (SM). Se muestra de forma representativa un ratón de cada grupo.

Por otro lado, como se comentó anteriormente, también se analizaron las poblaciones celulares obtenidas de ganglios mesentéricos para evaluar una posible migración de las células transducidas desde la cavidad peritoneal hacia los ganglios drenantes. Sin embargo, en ninguno de los casos se pudieron detectar células GFP⁺ en los ganglios, lo que afirma la teoría de que los LVs no son capaces de activar las células transducidas. Contrariamente, en un modelo de vacunas utilizando LVs redireccionados, la activación de la célula transducida es de suma importancia para generar una respuesta inmune contra el transgen, ya se ha visto que la ausencia de una señal de activación puede llevar a una respuesta tolerogénica en lugar de una protectora¹⁵⁵. En base a estas observaciones, nos propusimos explorar el diseño de un vector que pudiese acarrear a la célula blanco, tanto el transgen codificante para el antígeno como otro transgen que pudiese tener un efecto de activación de la célula presentadora.

4.17. Se generó un plásmido de expresión dual para la expresión de un antígeno junto a un activador de NFκB.

Debido a la carencia de muchos LVs de activar el sistema inmune para generar una respuesta potente y duradera, se propuso diseñar un plásmido de expresión dual, en el cual un promotor dirigiese la expresión del antígeno y simultáneamente otro promotor dirigiese la expresión de una proteína activadora de NFκB. Para ello, se diseñó y se mandó a sintetizar un gen, en el cual la expresión de ambos transgenes estuviesen bajo el control de los promotores SFFV y CMV. A modo representativo,

en la **figura-47** se muestra el gen denominado DP-SFFV(Ag)/CMV(Act) en donde el antígeno (Ag) está bajo control del promotor SFFV y el activador (Act) bajo control del promotor CMV. Una vez obtenido el gen sintético, se clonó dentro del vector pSIN siguiendo el protocolo indicado en la sección 3.12 y se generó el plásmido dual pSIN-DP-SFFV/CMV.

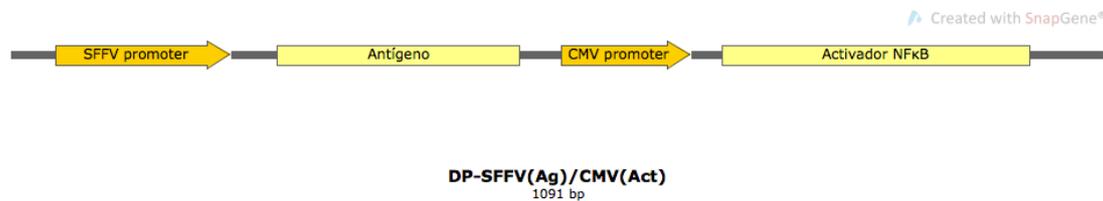


Figura-47. Esquema representativo del gen sintético DP-SFFV/CMV. El promotor SFFV dirige la expresión del antígeno (Ag), mientras que el promotor CMV dirige la expresión del activador de NFκB (Act).

Para comprobar la funcionalidad de ambos promotores, se clonó la secuencia codificante para GFP en ambas posiciones siguiendo el protocolo indicado en la sección 3.13, de esta forma generando los plásmidos pSIN-DP-SFFV(GFP)/CMV o pSIN-DP-SFFV/CMV(GFP), los cuales fueron transfectados en células HEK239T. A las 48 horas post-transfección se observó la expresión de GFP a través de microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la **figura-48**, se concluye que ambos promotores son funcionales debido a que permiten, en cierta medida, la expresión de GFP, aunque es notorio que el promotor CMV promueve una expresión mucho mayor. El resultado no fue el esperado, dado que el plásmido de transferencia (pSIN-SFFV-GFP) utilizado en los experimentos previos dirige la expresión de GFP través del promotor SFFV en forma muy eficiente. Si bien no tenemos evidencias al respecto, una posibilidad es que durante la construcción de nuestro plásmido se hayan modificado secuencias cercanas al promotor que pudieron afectar su función.

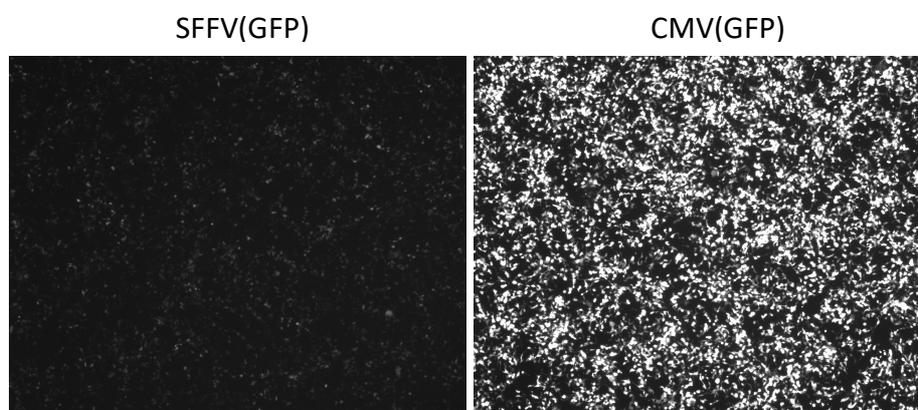


Figura-48. Expresión de GFP en el plásmido pSIN-DP-SFFV/CMV dirigida por el promotor SFFV o CMV. Para ello, se transfectaron células HEK293T con el plásmido correspondiente, y 48 h luego se observó al microscopio de fluorescencia. La exposición fue de 1.5 segundos.

A pesar de la diferencia de expresión entre ambos promotores, se decidió continuar utilizando este plásmido, debido a que es probable que el activador de NF κ B igual ejerza sus funciones de activación en menores concentraciones, por lo que podría clonarse bajo el control el promotor SFFV. Contrariamente, es de suma importancia que el antígeno se sobre-exprese.

Basados en reportes anteriores^{190,210}, elegimos la quinasa NIK como proteína activadora de NF κ B. Esta es una proteína que principalmente actúa en la vía no canónica de NF κ B, sin embargo, al ser sobre-expresada es capaz de activar la vía canónica^{190,211}. Para clonar la NIK, se partió de la secuencia completa obtenida del plásmido adenoviral AdNIK, y se amplificaron cuatro productos que fueron clonados en ambas posiciones del plásmido pSIN-DP-SFFV/CMV, como se indica en la sección 3.13. Basados en un trabajo en donde se describió el mínimo fragmento soluble activo de la NIK en ensayos *in-vitro*²¹⁰, nos propusimos generar distintas versiones de esta proteína y evaluar su capacidad de activar células. En la **figura-49a**, se observa la estructura completa de la NIK, en donde se distinguen principalmente cuatro dominios de importancia, i) el de unión al factor celular TRAF3, que ubiquitina a la proteína para su degradación, ii) el dominio de regulación negativa o NRD, iii) el dominio quinasa y iv) el dominio no catalítico de unión a factores celulares, que es necesario para la unión de los sustratos. Teniendo en cuenta la estructura de la proteína y los antecedentes mencionados, se amplificaron cuatro productos denominados NIK- α (a), NIK- β (b), NIK- ϵ (c) y NIK- γ (d), los cuales teóricamente deberían exhibir capacidades de actividad distintas debido a la presencia o ausencia de los dominios indicados.

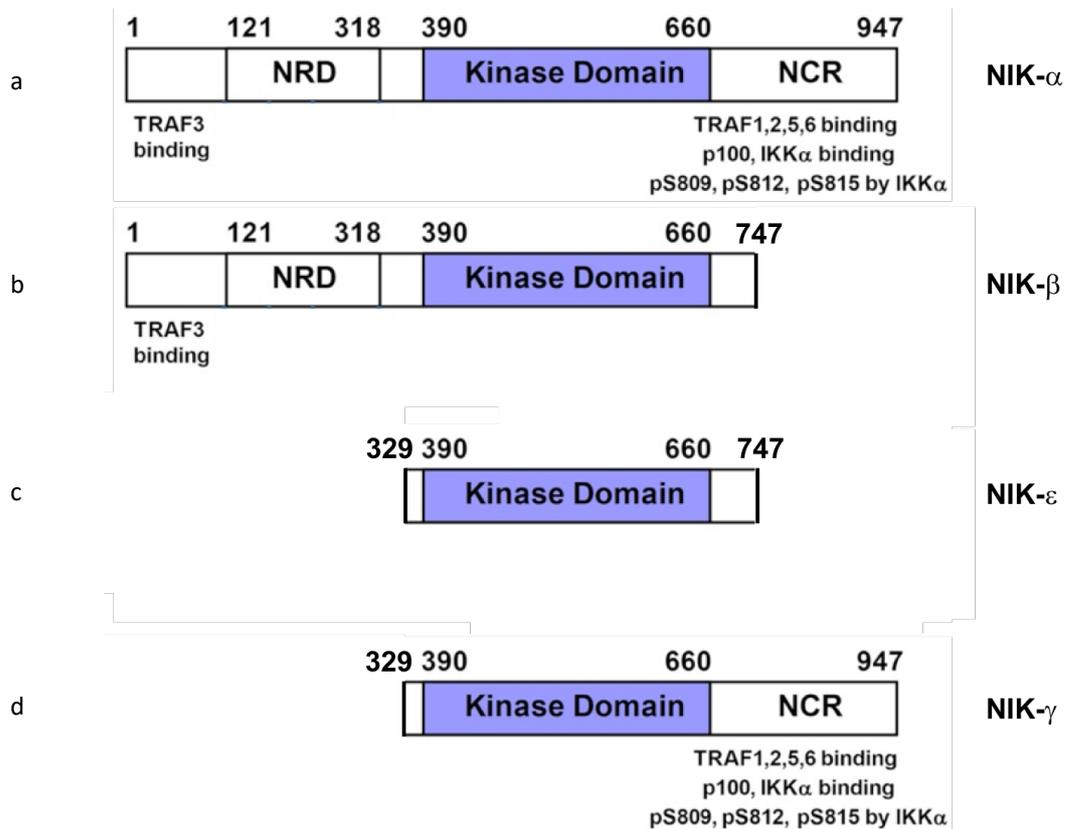


Figura-49. Imagen representativa de la estructura de los fragmentos de la NIK. En la parte a) se muestra un esquema de la estructura completa de la quinasa NIK (imagen obtenida de Liu et al., (2012)), a la cual denominamos NIK- α . b) Estructura del fragmento denominado NIK- β , que carece del dominio no catalítico de unión a factores celulares. c) Estructura del fragmento denominado NIK- ϵ , el cual solo posee el dominio quinasa y un fragmento del dominio NCR. d) Estructura del fragmento denominado NIK- γ , el cual carece del dominio de regulación negativa y de unión a TRAF-3.

4.18. Al utilizar células de origen humano, el VSV-G-LV(NIK) es capaz de inducir activación.

A continuación, se decidió evaluar el poder de activación de los fragmentos de la NIK en mBMDCs. Para ello se utilizó un LV que acarrearía las versiones de pSIN-DP-SFFV(NIK)/CMV o pSIN-DP-SFFV/CMV(NIK). A modo de poder obtener títulos altos del vector para permitir realizar varios ensayos, se decidió utilizar un VSV-G-LV.

Para ello, se utilizaron mBMDCs generadas a partir del protocolo indicado en la sección 3.3.2.3, las cuales fueron transducidas con sobrenadantes sin purificar de la producción de los VSV-G-LVs (ver sección 3.5.2). A las 72hs, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron por ELISA para IL-12 como se indica en la sección 3.14. Como resultado se obtuvo que ninguna de las construcciones realizadas

fue capaz de inducir la secreción de IL-12 (resultados no mostrados). En concordancia con este resultado, las mBMDCs transducidas se analizaron por citometría para la expresión de los marcadores CD40, CD80 y CD86, los cuales no resultaron estar aumentados frente al control (resultados no mostrados).

Una razón de este fracaso podría ser que, al tratarse de una proteína de origen humano, no estuviese actuando tan eficientemente en células murinas. Por esta razón, se propuso volver a producir los distintos VSV-G-LV(NIK) en pequeña escala y transducir células HT-29(GFP) utilizando el sobrenadante sin purificar. Estas son células reporteras que contienen una construcción por la cual frente a la activación de NF κ B se induce la expresión de GFP²¹². En este caso, se generaron los ocho LVs correspondientes a las cuatro versiones de la NIK bajo el control del promotor SFFV o del CMV.

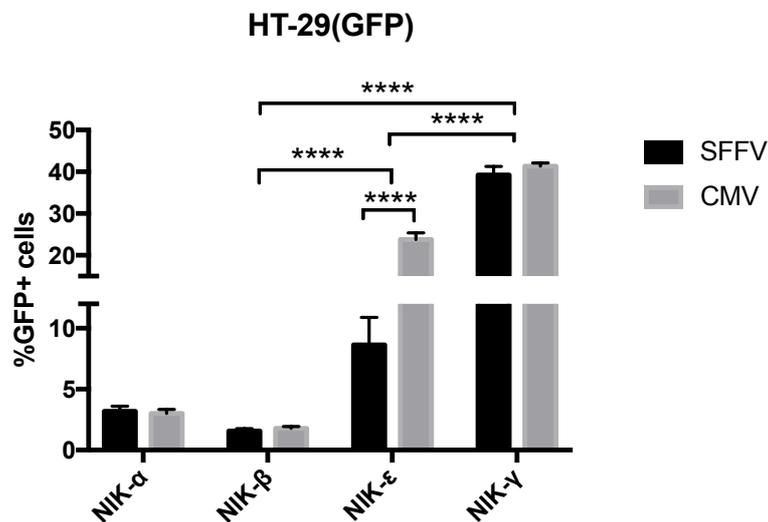


Figura-50. Evaluación de la activación en HT-29(GFP) transducidas con los diferentes VSV-G-LV(NIK). Para esto, se generaron los LVs correspondientes acarreando las versiones de la NIK ya sea bajo la expresión de SFFV o de CMV. Utilizando el sobrenadante sin purificar se transdujeron células HT-29(GFP) y se evaluó la activación a las 72hs mediante citometría de flujo. Para determinar la significancia se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis con post-test de Dunn en donde *=P<0,05 y ****=P<0,0001.

En la figura-50, se detallan los resultados de la transducción de las HT-29(GFP) con los VSV-G-LV(NIK). Debido a que ambos vectores codificantes para NIK- β presentaron un porcentaje de células GFP⁺ (1,7%) igual (y sin significancia estadística) al porcentaje basal de las células sin transducir (no mostrado), esta construcción se consideró como el control negativo. Recordando la estructura de la NIK- β (ver figura-49), observamos que esta construcción (β) tiene truncado el dominio de unión a ligandos celulares a la vez que tiene intactos los elementos de regulación negativa (sitio de unión a TRAF-3 y dominio NRD), por lo que es esperable que no genere activación. Cabe destacar que la NIK

en estado basal se sintetiza en un estado activado, pero está siendo ubiquitinizada y degradada constantemente²¹¹. En cuanto a la NIK- α , se observa una mínima tendencia de aumento respecto a NIK- β , si bien no significativa, en el porcentaje de células GFP⁺ en ambos casos (3,1%), lo que podría indicar que es capaz de inducir cierta activación, sin embargo, es probable que la degradación constante de la proteína no permita que se observen cambios cuando es expresada en mayor concentración. A su vez, es posible que el gran tamaño de esta proteína (947 aminoácidos) dificulte el empacamiento de este transgen en la partícula viral, por lo que se producirían menos partículas transducentes. Justamente, se ha visto que al aumentar el tamaño del transgen, la eficiencia de empacamiento, y por ende, de producción de partículas viables es menor²¹³. Es probable que, por esta razón, al haber transducido las células con sobrenadante sin cuantificar, el número de partículas viables para el caso de la NIK- α haya sido menor. Por otro lado, en concordancia con lo esperado, la NIK- ϵ fue capaz de inducir activación en las HT-29(GFP), siendo la diferencia con NIK- β de alta significancia. Cabe recordar que esta construcción contiene el dominio quinasa y una porción truncada del dominio de unión a factores celulares, y ya fue reportada como activa en ensayos de fosforilación *in-vitro*²¹⁰. Resulta interesante que al utilizar esta construcción sí se observa una diferencia significativa en el porcentaje de células GFP⁺ entre la expresión por SFFV y por CMV, la cual es el triple para CMV (8,6% vs 23,8%). Por otra parte, la NIK- γ demostró ser la construcción que exhibe un mayor poder de activación, rindiendo en ambos casos un 40,0% de células GFP⁺. Este resultado concuerda con la teoría, debido a que esta construcción posee el dominio quinasa y el dominio de unión a factores celulares completo, pero carece de los elementos de regulación negativa. Interesantemente, el nivel de activación alcanzado por la expresión con el SFFV no mejoró al ser expresada en mayor medida por el CMV. Esto nos indica que, por un lado, se alcanzó un tope de activación mediada por NIK (al menos, en las concentraciones determinadas por la MOI de transducción), y, por otro lado, confirma que se puede utilizar el plásmido pSIN-DP-SFFV/CMV para la expresión de este activador y un antígeno, ya que, a pesar de la menor expresión mediada por el primer promotor, este fragmento es igualmente capaz de inducir activación.

En resumen, comprobamos que el fragmento de NIK denominado NIK- γ es capaz de activar células de origen humano, y que su expresión bajo control del promotor SFFV (de menor potencia) es suficiente para alcanzar el nivel de activación esperado. A continuación, para aproximarnos a un modelo de inducción de activación, decidimos analizar el potencial de activación de esta construcción en células del sistema inmune.

4.19. Tras la transducción con VSV-G-LV(NIK- γ) las células THP-1 se activan induciendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.

Debido a que el desarrollo del vector dual se basó en la necesidad de activar las células inmunes que a su vez expresan el antígeno deseado, se analizó la activación de una línea celular de monocitos humanos (THP-1) utilizando la construcción NIK- γ .

Sin embargo, para poder obtener una transducción con altos niveles, antes nos planteamos generar un VSV-G-LV(GFP) y determinar el porcentaje de transducción a distintas MOI. Para ello, se produjo el VSV-G-LV(GFP) de acuerdo al protocolo indicado en la sección 3.5.1.2 y se transdujeron células THP-1 a MOI de 5, 10 y 20 mediante spinfección (ver sección 3.6.1.). En la **figura-51** se observan los *dot plot* correspondientes a la transducción en las distintas condiciones y un control sin transducir.

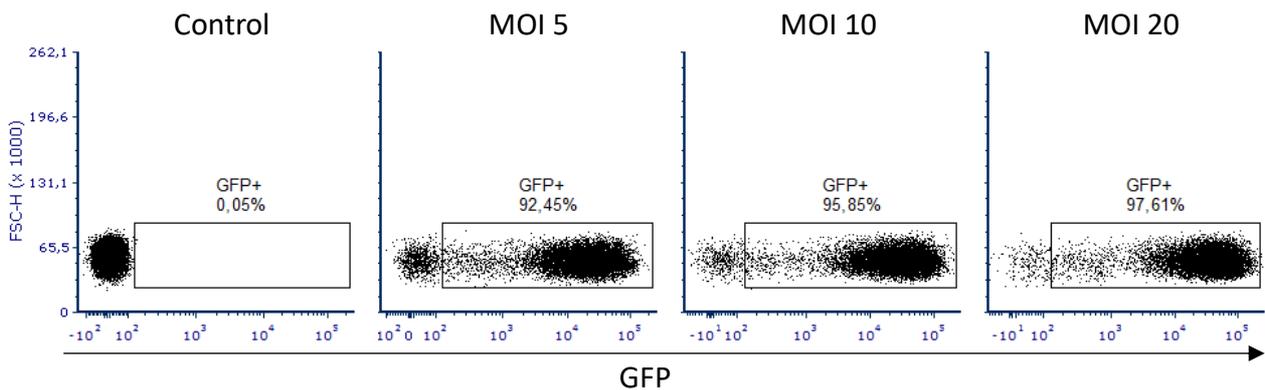


Figura-51. Transducción de THP-1 con el VSV-G-LV(GFP). Para ello, se generó el VSV-G-LV siguiendo el protocolo detallado en la sección 3.5.1.2 y luego se transdujeron células THP-1 a MOI de 5, 10 y 20 mediante spinfección (centrifugación a 800g durante 1 hora a 32°C). 72 h luego se evaluó la transducción por citometría de flujo. Como control se utilizaron células sin transducir.

Como se muestra en la **figura-51**, a una MOI=5 ya se observa un 93% de transducción, que apenas mejora a MOI de 10 y 20. Probablemente, la alta eficiencia de transducción del VSV-G-LV en estas células se deba al protocolo de spinfección (o spinoculation), que se ha demostrado especialmente eficiente en la transducción de células en suspensión²¹⁴. Habiendo determinado que una MOI=5 era suficiente para transducir más del 90% de los THP-1, se generaron de forma paralela los vectores VSV-G-LV(CMV-GFP) y el VSV-G-LV(SFFV-NIK- γ). Debido a que no se pudo titular la producción del VSV-G-LV(SFFV-NIK- γ), para el ensayo de transducción se calculó una MOI=5 con el VSV-G-LV(CMV-GFP) y se agregó el mismo volumen del vector acarreando la NIK- γ . Se consideró que el

título de producción del VSV-G-LV(SFFV-NIK- γ) nunca va a ser mayor al obtenido para el VSV-G-LV(CMV-GFP), en parte debido a que el tamaño del transgen es el doble. Por lo tanto, se procedió a transducir THP-1 con iguales volúmenes del VSV-G-LV(CMV-GFP) y el VSV-G-LV(SFFV-NIK- γ).

Para determinar si el VSV-G-LV(SFFV-NIK- γ) era capaz de mediar activación e inducir la secreción de interleuquinas pro-inflamatorias, se realizó una transducción en las condiciones mencionadas anteriormente y 6 días después se recolectó el sobrenadante, el cual fue analizado por ELISA para IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α , como se indica en la sección 3.14. Como controles se utilizaron por un lado células sin transducir, y por otro, células transducidas con el VSV-G-LV(CMV-GFP).

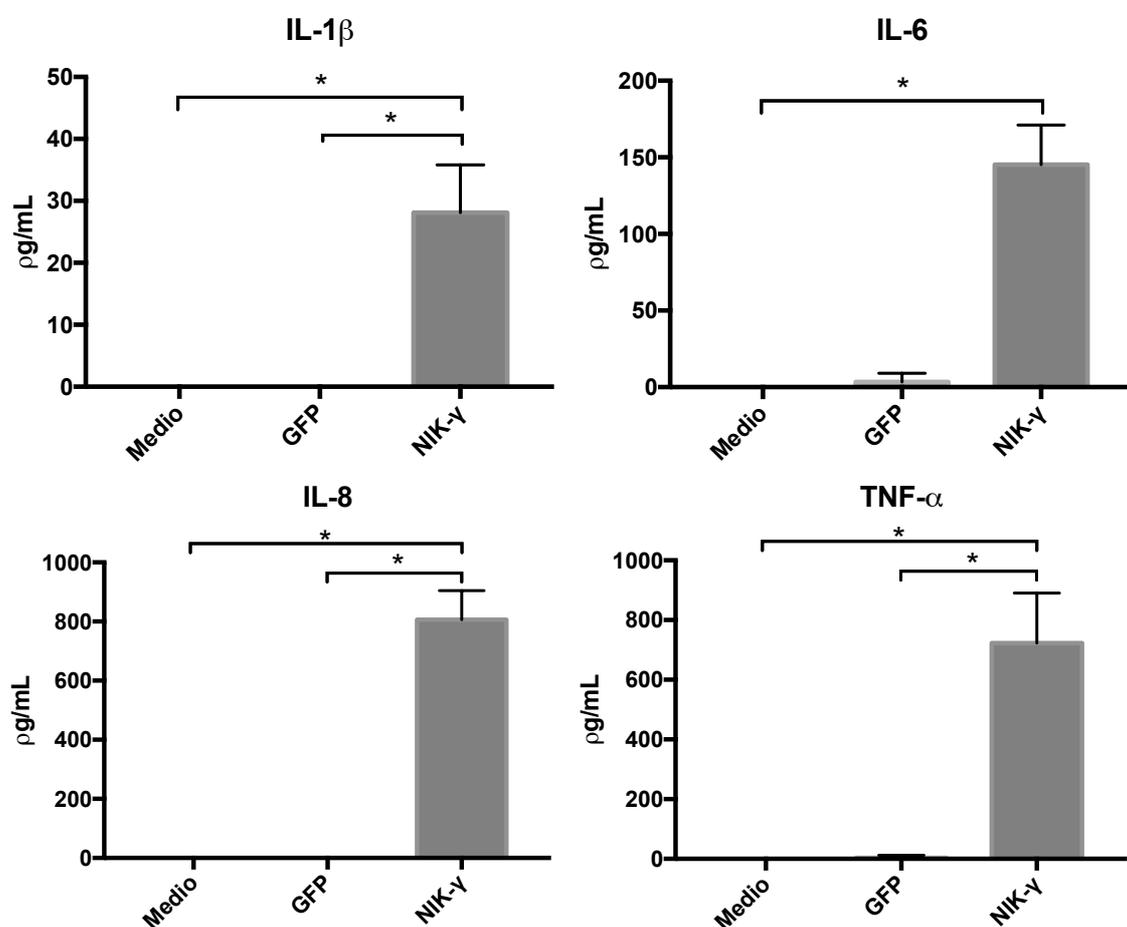


Figura-52. Medición de ILs en células THP-1 transducidas con el VSV-G-LV(NIK- γ). Para ello, se transdujeron 2×10^4 células THP-1 mediante spinfection (ver sección 3.6.1) con iguales volúmenes de ambos vectores. Al día 6 post-transducción se recolectaron los sobrenadantes y fueron analizados por ELISA para IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α , como se indica en la sección 3.14. Como controles se utilizaron células sin transducir (Medio) o un VSV-G-LV(GFP). Para determinar la significancia se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis con post-test de Dunn en donde $^* = P < 0,05$.

Como se observa en la **figura-52**, no se detecta secreción de ninguna IL en las células sin transducir. De forma similar, en el caso del VSV-G-LV(CMV-GFP), no se detectan niveles de IL-1 β ni IL-8 y se detecta en promedio apenas 3,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 3,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IL-6 y TNF- α , respectivamente. En cambio, la transducción de THP-1 con el VSV-G-LV(SFFV-NIK- γ) induce la secreción de las cuatro ILs analizadas, detectándose en niveles significativamente superiores a los de VSV-G-LV(CMV-GFP). Si bien en la IL-6 el cambio entre GFP y NIK- γ no es estadísticamente significativo, sí se observa una clara tendencia de aumento y probablemente al realizar más medidas se genere significancia. Estos resultados indican que el vector por sí mismo no es capaz de inducir una respuesta inflamatoria, y justamente por eso, se concluye que los efectos observados son directamente por acción de la NIK- γ , la cual es capaz de inducir una respuesta pro-inflamatoria en estas células, asociada a la activación de NF κ B. Hubiese sido interesante analizar las células por citometría de flujo para CD80 y CD86, entre otros marcadores de activación, sin embargo, no se poseían anticuerpos anti-humanos.

En resumen, se logró generar un vector de expresión dual para permitir la co-expresión de un antígeno y un activador de NF κ B, en nuestro caso, un fragmento de la quinasa NIK llamado NIK- γ . A su vez, se determinó que la expresión de este transgen desde el promotor SFFV (el más débil en nuestra construcción) es suficiente para activar células de origen humano como las HT-29(GFP) y los THP-1, por lo que el antígeno podría ser clonado bajo el control del promotor CMV. A futuro, sería interesante realizar experimentos de transducción *in-vivo* con LVs generados utilizando el DP-SFFV(NIK- γ)/CMV(Ag) como plásmido de transferencia para demostrar si aquellas células transducidas son capaces de madurar, migrar a los ganglios y generar una respuesta contra el Ag diana.

5. Conclusión y perspectivas

5.1. Conclusión

En este trabajo de tesis se planteó el uso de nanobodies para el re-direccionamiento de vectores lentivirales (LVs) a células dendríticas en un modelo de vacunas. En resumen, como conclusión, se logró cumplir la mayoría de los objetivos planteados en este trabajo. En este sentido, a pesar del fracaso inicial y las constantes dificultades, se logró producir LVs que fueron efectivos en la transferencia génica a mBMDCs y que demostraron, a excepción del anti-CD11c del cual no se pudo concluir, ser re-direccionados a los receptores *target*. A su vez, se demostró de forma preliminar su capacidad de transducción en un modelo *in-vivo* utilizando ratones C57BL/6. De forma paralela, se desarrolló un vector de transferencia codificante para un activador de NF κ B que resultó ser eficiente en la activación de células y permitió la inducción de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en un modelo *in-vitro*. No menos importante, este proyecto generó una colaboración entre nuestro grupo e investigadores del instituto NIBSC de Inglaterra y del PEI de Alemania. Consecuentemente, este trabajo permitió la transferencia de la tecnología para la generación de LVs desde estos dos institutos hacia nuestro grupo, la cual actualmente está siendo utilizada para dos proyectos.

5.2. Perspectivas

Como resultado de este trabajo se generaron herramientas que permitirían continuar explorando el potencial de los nanobodies como elementos para modificar el *targeting* de los vectores lentivirales. Ha quedado pendiente, la comparación de la transducción de mBMDCs con los vectores acarreando BiVHHs (tanto en sus versiones de MV-LVs como NiV-LVs) frente los que acarrean VHHs monovalentes para comprobar si los primeros pueden dar lugar a una mayor capacidad de transducción y que puede ocurrir cuando se utilizan BiVHHs con dos especificidades distintas (ej. CD11c-CD11b). Dado que en general el porcentaje de células transducidas es modesto, sería importante trabajar en la optimización del modelo *in-vivo*, en particular reintentando la vía de inyección intravenosa que involucra poblaciones celulares más fáciles de estudiar experimentalmente y más cercana a las estrategias de inmunización convencionales. Para esto será necesario optimizar y escalar la cantidad de LVs a producir. En relación a esto último, sería muy interesante analizar la capacidad del vector pSIN-DP-SFFV/CMV codificante para NIK- γ de activar y madurar células dendríticas en un ensayo *in-vivo*, y en una etapa posterior, realizar inmunizaciones de ratones con LVs

codificantes para NIK- γ y un antígeno como modelo usando el vector pSIN-DP-SFFV/CMV. En este sentido, en el grupo poseemos el gen codificante para el antígeno Ii-OVA, fusión de péptidos de OVA a la cadena invariante (Ii) de MHCII, en el cual la cadena Ii dirige parte del antígeno a la vía de presentación del MHCII dando una respuesta con un mejor balance CD4/CD8 que la sola expresión citosólica del antígeno. Este sistema, sería particularmente útil acoplado a un modelo de cáncer en ratones con tumores que expresan OVA (EG.7-OVA), en el cual los animales se tratarían con un LV anti-CD11c acarreando el transgen pSIN-DP-SFFV(NIK- γ)/Ii-OVA y se analizaría la respuesta anti-tumoral.

6. Referencias bibliográficas

1. Naldini, L. *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* (80-). 272, 263 – 267 (1996).
2. Curran, M. A., Kaiser, S. M., Achacoso, P. L. & Nolan, G. P. Efficient Transduction of Nondividing Cells by Optimized Feline Immunodeficiency Virus Vectors. *Mol. Ther.* 1, 31 – 38 (2000).
3. Sakuma, T., Barry, M. A. & Ikeda, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem.J.* 443, 603 – 618 (2012).
4. Durand, S. & Cimarelli, A. The Inside out of Lentiviral Vectors. *Viruses* 3, 132 – 159 (2011).
5. German Advisory Committee Blood. Subgroup Assesment of Pathogens Transmissible by Blood. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus. Med. Hemotherapy* 43, 203 – 222 (2016).
6. Acheampong, E., Rosario-Otero, M., Dornburg, R. & Pomerantz, R. J. Replication of Lentiviruses. *Front. Biosci.* 156 – 174 (2003).
7. Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V. & Melikyan, G. B. HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. *Cell* 137, 433 – 444 (2009).
8. Melikyan, G. B. HIV entry: a game of hide-and-fuse? *Curr. Opin. Virol.* 4, 1 – 7 (2014).
9. Liechtenstein, T., Perez-Janices, N. & Escors, D. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy and clinical applications. *Cancers (Basel).* 5, 815 – 837 (2013).
10. Lasaro, M. O. & Ertl, H. C. J. New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol. Ther.* 17, 1333 – 1339 (2009).
11. Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L. & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31, 317 – 334 (2017).
12. Ono, C., Okamoto, T., Abe, T. & Matsuura, Y. Baculovirus as a tool for gene delivery and gene therapy. *Viruses* 10, (2018).
13. Hukkanen, V. Herpesvirus Vectors in Gene Therapy. *Open Virol. J.* 4, 94 – 95 (2010).
14. Hu, W. S. & Pathak, V. K. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol. Rev.* 52, 493 – 511 (2000).
15. Howarth, J. L., Lee, Y. B. & Uney, J. B. Using viral vectors as gene transfer tools. *Cell Biol. Toxicol.* 26, 1 – 20 (2010).
16. Abordo-adesida, E. *et al.* Stability of Lentiviral Vector-Mediated Transgene Expression in the Brain in the Presence of Systemic Antivector Immune Responses. *Hum. Gene Ther.* 16, 741 – 751 (2009).
17. Schambach, A., Zychlinski, D., Ehrnstroem, B. & Baum, C. Biosafety Features of Lentiviral Vectors. *Hum. Gene Ther.* 24, 132 – 142 (2013).
18. Joglekar, A. V. & Sandoval, S. Pseudotyped Lentiviral Vectors: One Vector, Many Guises. *Hum. Gene Ther. Methods* 28, 291 – 301 (2017).
19. Vigna, E. & Naldini, L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gene Med.* 2, 308 – 316 (2000).
20. Merten, O.-W., Hebben, M. & Bovolenta, C. Production of lentiviral vectors. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 1 – 14 (2016). doi:10.1038/mtm.2016.17
21. Richardson, J. H., Child, L. A. & Lever, A. M. Packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA requires cis-acting sequences outside the 5' leader region. *J. Virol.* 67, 3997 – 4005 (1993).

22. Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W. & Burrascano, M. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8033 – 8037 (1993).
23. Akkina, R. K. & Chen, I. S. Y. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J. Virol.* **70**, 2581 – 5 (1996).
24. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. & Trono, D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* **15**, 871 – 875 (1997).
25. Kim, V. N., Kyriacos, M., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **72**, 811 – 816 (1998).
26. Sadaie, M. R. & Arya, S. K. HIV-Derived Lentiviral Vectors : Current Progress toward Gene Therapy and DNA Vaccination. *Iran. Biomed. J.* **2**, 95 – 103 (1998).
27. Strayer, D. S. *et al.* Current status of gene therapy strategies to treat HIV/AIDS. *Mol. Ther.* **11**, 823 – 842 (2005).
28. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science (80-)*. **302**, 415 – 419 (2003).
29. Yu, S. F. *et al.* Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 3194 – 3198 (1986).
30. Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, F. H. & Verma, I. M. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* **72**, 8150 – 7 (1998).
31. Dull, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* **72**, 8463 – 71 (1998).
32. Vink, C. A. *et al.* Eliminating HIV-1 Packaging Sequences from Lentiviral Vector Proviruses Enhances Safety and Expedites Gene Transfer for Gene Therapy. *Mol. Ther.* **25**, 1790 – 1804 (2017).
33. Hu, T., Fu, Q., Chen, P., Zhang, K. & Guo, D. Generation of a stable mammalian cell line for simultaneous expression of multiple genes by using 2A peptide-based lentiviral vector. *Biotechnol. Lett.* **31**, 353 – 359 (2009).
34. Tandon, N., Thakkar, K. N., LaGory, E. L., Liu, Y. & Giaccia, A. J. Generation of Stable Expression Mammalian Cell Lines Using Lentivirus. *Bio Protoc.* **8**, (2018).
35. Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. **11**, 783 – 784 (2014).
36. Aubrey, B. J. *et al.* An Inducible Lentiviral Guide RNA Platform Enables the Identification of Tumor-Essential Genes and Tumor-Promoting Mutations InVivo. *Cell Rep.* **10**, 1422 – 1432 (2015).
37. Jakobsson, J. & Lundberg, C. Lentiviral vectors for use in the central nervous system. *Mol. Ther.* **13**, 484 – 493 (2006).
38. Gray, S. J., Woodard, K. T. & Samulski, R. J. Viral vectors and delivery strategies for CNS gene therapy. *Ther. Deliv.* **1**, 517 – 534 (2010).
39. Pfeifer, A. *et al.* Transduction of liver cells by lentiviral vectors: Analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol. Ther.* **3**, 319 – 322 (2001).
40. Nguyen, T. H. *et al.* Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol. Ther.* **6**, 199 – 209 (2002).
41. Pichard, V., Boni, S., Baron, W., Nguyen, T. H. & Ferry, N. Priming of Hepatocytes Enhances In Vivo Liver Transduction with Lentiviral Vectors in Adult Mice. *Hum. Gene Ther. Methods* **23**, 8 – 17 (2012).
42. Li, S. *et al.* Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther.*

- 12, 1099 – 1108 (2005).
43. Suga, T. *et al.* Muscle fiber type-predominant promoter activity in lentiviral-mediated transgenic mouse. *PLoS One* **6**, 1 – 8 (2011).
 44. Doi, K. *et al.* Lentiviral transduction of green fluorescent protein in retinal epithelium: Evidence of rejection. *Vision Res.* **42**, 551 – 558 (2002).
 45. Castellani, S., Di Gioia, S., Trotta, T., Maffione, A. B. & Conese, M. Impact of lentiviral vector-mediated transduction on the tightness of a polarized model of airway epithelium and effect of cationic polymer polyethylenimine. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, (2010).
 46. Swainson, L., Mongellaz, C., Adjali, O., Vicente, R. & Taylor, N. Lentiviral Transduction of Immune Cells. *Innate Immun.* **415**, 301 – 320 (2008).
 47. Olbrich, H., Slabik, C. & Stripecke, R. Reconstructing the immune system with lentiviral vectors. *Virus Genes* **53**, 723 – 732 (2017).
 48. Van Damme, A. *et al.* Efficient Lentiviral Transduction and Improved Engraftment of Human Bone Marrow Mesenchymal Cells. *Stem Cells* **24**, 896 – 907 (2006).
 49. Ye, Z., Yu, X. & Cheng, L. Lentiviral Gene Transduction of Mouse and Human Stem Cells. *Methods Mol. Biol.* **430**, 243 – 253 (2008).
 50. Canté-Barrett, K. *et al.* Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: Size matters. *BMC Res. Notes* **9**, 1 – 6 (2016).
 51. J, D., Mansfield, S. & Humeau, L. M. Lentiviral vectors in clinical trials: Current status. *Curr Opin Mol Ther* **11**, 554 – 564 (2009).
 52. Levine, B. L. *et al.* Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 17372 – 17377 (2006).
 53. McGarrity, G. J. *et al.* Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials. *J. Gene Med.* **15**, 78 – 8 (2013).
 54. Thomas, R. *et al.* NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: Current perspectives. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
 55. Rapoport, A. P. *et al.* NY-ESO-1 specific TCR engineered T-cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat. Med.* **21**, 914 – 921 (2015).
 56. Ma, C. *et al.* Multifunctional T-cell Analyses to Study Response and Progression in Adoptive Cell Transfer Immunotherapy. *Cancer Discov.* **3**, 418 – 429 (2013).
 57. Chodon, T. *et al.* Adoptive transfer of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2457 – 2465 (2014).
 58. June, C. H. & Sadelain, M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N. Engl. J. Med.* **379**, 64 – 73 (2018).
 59. Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 10024 – 10028 (1989).
 60. Androulla, M. N. & Lefkothea, P. C. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **19**, 5 – 18 (2018).
 61. Maude, S. L. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1507 – 1517 (2014).
 62. Turtle, C. J. *et al.* CD19 CAR – T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients Find the latest version: CD19 CAR – T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* **126**, 2123 – 2138 (2016).
 63. Sauter, C. S. *et al.* Interim Safety Analysis: a Phase I trial of 19-28z chimeric antigen receptor modified T cells (19-28z CAR-T) post-high dose therapy and autologous stem cell transplant (HDT-ASCT) for relapsed and refractory

- (rel/ref) aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 124, 677 (2014).
64. Schuster, S. J. *et al.* Recovery of humoral immunity in patients with durable complete responses following chimeric antigen receptor modified t cells directed against CD19 (CTL019). *J. Clin. Oncol.* 34, 7564 (2016).
 65. Zheng, P. P., Kros, J. M. & Li, J. Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discov. Today* 23, 1175 – 1182 (2018).
 66. Cartier, N. *et al.* Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science* (80-.). 326, 818 – 823 (2009).
 67. Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* 467, 318 – 322 (2010).
 68. Aiuti, A. *et al.* Lentivirus-based Gene Therapy of Hematopoietic Stem Cells in Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science* (80-.). 341, (2013).
 69. Biffi, A. *et al.* Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* (80-.). 341, (2013).
 70. Sessa, M. *et al.* Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 388, 476 – 487 (2016).
 71. Campochiaro, P. A. *et al.* Lentiviral Vector Gene Transfer of Endostatin/Angiostatin for Macular Degeneration (GEM) Study. *Hum. Gene Ther.* 28, 99 – 111 (2017).
 72. Cronin, J., Zhang, X.-Y. & Reiser, J. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* 5, 387 – 398 (2005).
 73. Wilen, C. B., Tilton, J. C. & Doms, R. W. HIV : Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1 – 13 (2012).
 74. Johnson, M. C. Mechanisms for Env Glycoprotein Acquisition by Retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27, (2011).
 75. Dietzgen, R. G., Kondo, H., Goodin, M. M., Kurath, G. & Vasilakis, N. The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Res.* 158 – 170 (2017). doi:10.1002/stem.1868.Human
 76. Sun, X., Roth, S. L., Bialecki, M. A. & Whittaker, G. R. Internalization and fusion of vesicular stomatitis virus and related rhabdoviruses. *Future Virol.* 5, 85 – 96 (2010).
 77. Roberts, P. C., Kipperman, T. & Compans, R. W. Vesicular Stomatitis Virus G Protein Acquires pH-Independent Fusion Activity during Transport in a Polarized Endometrial Cell Line. *J. Virol.* 73, 10447 – 10457 (1999).
 78. Carneiro, F. A., Ferradosa, A. S. & Da Poian, A. T. Low pH-induced conformational changes in vesicular stomatitis virus glycoprotein involve dramatic structure reorganization. *J. Biol. Chem.* 276, 62 – 67 (2001).
 79. Kim, I. S. *et al.* Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E28 – E36 (2017).
 80. Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S. & Rubinstein, M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7306 – 7311 (2013).
 81. Amirache, F. *et al.* Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* 123, 1422 – 1425 (2014).
 82. Schlegel, R., Tralka, T. S., Willingham, M. C. & Pastan, I. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: Is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* 32, 639 – 646 (1983).
 83. Coil, D. A. & Miller, A. D. Phosphatidylserine Is Not the Cell Surface Receptor for Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* 78, 10920 – 10926 (2004).

84. Carneiro, F. A. *et al.* Probing the interaction between vesicular stomatitis virus and phosphatidylserine. *Eur. Biophys. J.* 35, 145 – 154 (2006).
85. Ichim, C. V. & Wells, R. A. Generation of high-titer viral preparations by concentration using successive rounds of ultracentrifugation. *J. Transl. Med.* 9, 137 (2011).
86. Wollebo, H. S., Woldemichaele, B. & White, M. K. Lentiviral transduction of neuronal cells. *Methods Mol. Biol.* 1078, 141 – 146 (2013).
87. van Hooijdonk, L. W. A. *et al.* Lentivirus-mediated transgene delivery to the hippocampus reveals sub-field specific differences in expression. *BMC Neurosci.* 10, 1 – 19 (2009).
88. Li, M., Husic, N., Lin, Y. & Snider, B. J. Production of Lentiviral Vectors for Transducing Cells from the Central Nervous System. *J. Vis. Exp.* 3 – 7 (2012). doi:10.3791/4031
89. Miyoshi, H. *et al.* Vectors Transduction of Human CD34 Cells That Mediate Long-Term Engraftment of NOD / SCID Mice by HIV Vectors. *Science (80-.)*. 283, 682 – 686 (1999).
90. Chen, W. *et al.* Lentiviral Vector Transduction of Hematopoietic Stem Cells that Mediate Long-Term Reconstitution of Lethally Irradiated Mice. *Stem Cells* 18, 352 – 359 (2000).
91. Barrette, S., Douglas, J. L., Seidel, N. E., Bodine, D. M. & Dc, W. Lentivirus-based vectors transduce mouse hematopoietic stem cells with similar efficiency to Moloney murine leukemia virus – based vectors. *Blood* 96, 3385 – 3391 (2013).
92. DePolo, N. J. *et al.* VSV-G Pseudotyped Lentiviral Vector Particles Produced in Human Cells Are Inactivated by Human Serum. *Mol. Ther.* 2, 218 – 222 (2000).
93. Yee, J. K. *et al.* A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 9564 – 9568 (1994).
94. Pan, D. *et al.* Biodistribution and toxicity studies of VSVG-pseudotyped lentiviral vector after intravenous administration in mice with the observation of in vivo transduction of bone marrow. *Mol. Ther.* 6, 19 – 29 (2002).
95. Croyle, M. A. *et al.* PEGylation of a vesicular stomatitis virus G pseudotyped lentivirus vector prevents inactivation in serum. *J. Virol.* 78, 912 – 21 (2004).
96. Hwang, B. Y. & Schaffer, D. V. Engineering a serum-resistant and thermostable vesicular stomatitis virus G glycoprotein for pseudotyping retroviral and lentiviral vectors. *Gene Ther.* 20, 807 – 815 (2013).
97. Cox, R. M. & Plemper, R. K. Structure and Organization of Paramyxovirus Particles. *Curr. Opin. Virol.* 24, 105 – 114 (2017).
98. Pempfer, K. R. Cell Entry of Enveloped Viruses. *Curr Opin Virol.* 1, 92 – 100 (2012).
99. Chang, A. & Dutch, R. E. Paramyxovirus fusion and entry: Multiple Paths to a common end. *Viruses* 4, 613 – 636 (2012).
100. Aguilar, H. C. *et al.* Paramyxovirus Glycoproteins and the Membrane Fusion Process. *Curr Clin Microbiol Rep* 3, 142 – 154 (2016).
101. Lin, L. T. & Richardson, C. D. The host cell receptors for measles virus and their interaction with the viral Hemagglutinin (H) Protein. *Viruses* 8, 1 – 29 (2016).
102. Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. & Yanagi, Y. Slam (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406, 893 – 897 (2000).
103. Noyce, R. S. *et al.* Tumor cell marker pvr14 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* 7, (2011).
104. Mühlebach, M. D. *et al.* Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480, 530 – 533 (2011).

105. Dörig, R. E., Marcil, A., Chopra, A. & Richardson, C. D. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75, 295 – 305 (1993).
106. Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S. & Hashiguchi, T. Measles virus receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 329, 13 – 30 (2009).
107. Bishop, K. A. & Broder, C. C. Hendra and Nipah Viruses: Lethal Zoonotic Paramyxoviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 155 – 187 (2008). doi:10.1128/9781555815592.ch9
108. Bossart, K. N. *et al.* Membrane Fusion Tropism and Heterotypic Functional Activities of the Nipah Virus and Hendra Virus Envelope Glycoproteins. *J. Virol.* 76, 11186 – 11198 (2002).
109. Negrete, O. A. *et al.* EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus , an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* 436, 401 – 405 (2005).
110. Bonaparte, M. I. *et al.* Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 10652 – 10657 (2005).
111. Negrete, O. A. *et al.* Two Key Residues in EphrinB3 Are Critical for Its Use as an Alternative Receptor for Nipah Virus. *PLoS Pathog.* 2, 78 – 86 (2006).
112. Buchholz, C. J., Friedel, T. & Büning, H. Surface-Engineered Viral Vectors for Selective and Cell Type-Specific Gene Delivery. *Trends Biotechnol.* 33, 777 – 790 (2015).
113. Frecha, C., Szecsi, J., Cosset, F.-L. & Verhoeven, E. Strategies for Targeting Lentiviral Vectors. *Curr. Gene Ther.* 8, 449 – 460 (2008).
114. Buchholz, C. J., Mühlebach, M. D. & Cichutek, K. Lentiviral vectors with measles virus glycoproteins - dream team for gene transfer? *Trends Biotechnol.* 27, 259 – 265 (2009).
115. Sandrin, V., Russell, S. J. & Cosset, F. L. Targeting retroviral and lentiviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 281, 137 – 178 (2003).
116. Dreja, H. & Piechaczyk, M. The effects of N-terminal insertion into VSV-G of an scFv peptide. *Virol. J.* 3, 1 – 8 (2006).
117. Marsh, M. & Helenius, A. Virus entry: Open sesame. *Cell* 124, 729 – 740 (2006).
118. White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M. & Schornberg, K. Structures and Mechanisms of Viral Fusion Proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43, 189 – 219 (2008).
119. Norton, T. D. & Miller, E. A. Recent advances in lentiviral vaccines for HIV-1 infection. *Front. Immunol.* 7, 1 – 8 (2016).
120. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446 – 448 (1993).
121. Van der Linden, R. H. . *et al.* Comparison of physical chemical properties of llama V HH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1431, 37 – 46 (1999).
122. Gonzalez-Sapienza, G., Rossotti, M. A. & Tabares-da Rosa, S. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications. *Front. Immunol.* 8, 1 – 12 (2017).
123. Cortez-Retamozo, V. *et al.* Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer* 462, 456 – 462 (2002).
124. Vincke, C. *et al.* General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold *. *J. Biol. Chem.* 284, 3273 – 3284 (2009).
125. Bannas, P., Hambach, J. & Koch-Nolte, F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front. Immunol.* 8, 1 – 13 (2017).
126. Yamagata, M. & Sanes, J. R. Reporter – nanobody fusions (RANbodies) as versatile, small, sensitive immunohistochemical reagents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 2126 – 2131 (2018).

127. Rossotti, M. A. *et al.* Increasing the potency of neutralizing single-domain antibodies by functionalization with a CD11b/CD18 binding domain. *MAbs* 7, 820 – 828 (2015).
128. Goyvaertis, C. *et al.* Development of the Nanobody display technology to target lentiviral vectors to antigen-presenting cells *C. J. Physiol.* 19, 1133 – 1140 (2012).
129. Ahani, R. *et al.* Sindbis Virus-Pseudotyped Lentiviral Vectors Carrying VEGFR2-Specific Nanobody for Potential Transductional Targeting of Tumor Vasculature. *Mol. Biotechnol.* 58, 738 – 747 (2016).
130. Pulendran, B. & Ahmed, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* 12, 509 – 517 (2011).
131. Clem, A. S. Fundamentals of Vaccine Immunology. *J. Glob. Infect. Dis.* 3, 73 – 78 (2011).
132. Poland, G. & Barrett, A. The Old and the New: successful vaccines of the 20th century and approaches to making vaccines for the important diseases of the 21st century. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 305 – 307 (2009).
133. Greenwood, B. The contribution of vaccination to global health : past , present and future. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, (2014).
134. Robinson, H. L. HIV / AIDS Vaccines : 2018. *Clin. Pharmacol. and Therapeutics* 104, 1062 – 1073 (2018).
135. Song, Q., Zhang, C. & Wu, X. Therapeutic cancer vaccines : From initial findings to prospects. *Immunol. Lett.* 196, 11 – 21 (2018).
136. Plotkin, S. A. Correlates of Protection Induced by Vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 1055 – 1065 (2010).
137. Gilbert, S. C. T-cell-inducing vaccines – what ’ s the future. *Immunology* 135, 19 – 26 (2011).
138. Reis e Sousa, C. Activation of dendritic cells : translating innate into adaptive immunity Caetano Reis e Sousa. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 21 – 25 (2004).
139. Cruse, J. M., Lewis, R. E. & Wang, H. Antigen presentation. in *Immunology Guidebook* 267 – 276 (2004).
140. Guernonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 621 – 667 (2002).
141. Takeuchi, O. & Akira, S. Review Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805 – 820 (2010).
142. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245 – 252 (1998).
143. Cohn, L. & Delamarre, L. Dendritic cell-targeted vaccines. *Front. Immunol.* 5, 1 – 11 (2014).
144. Shah, R. R., Hassett, K. J. & Brito, L. A. Overview of Vaccine Adjuvants : Introduction , History , and Current Status. *Methods Mol. Biol.* 1494, 1 – 13 (2017).
145. Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B. M. J., Brennan, F. M. & Feldmann, M. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent : coordinate regulation of MHC , co-stimulatory molecules and cytokines. *Int. Immunol.* 13, 675 – 683 (2001).
146. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132, 344 – 362 (2008).
147. Sun, S. C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 545 – 558 (2017).
148. Sanjo, H., Zajonc, D. M., Braden, R., Norris, P. S. & Ware, C. F. Allosteric regulation of the ubiquitin:NIK and ubiquitin:TRAF3 E3 ligases by the lymphotoxin- β receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 17148 – 17155 (2010).
149. Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. & Goeddel, D. V. I κ B Kinase-P: NF- κ B Activation and Complex Formation with I κ B Kinase- α and NIK. *Science (80-)*. 278, 866 – 869 (1997).
150. Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V & Wallach, D. MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540 – 544 (1997).
151. Zarnegar, B., Yamazaki, S., He, J. Q. & Cheng, G. Control of canonical NF- κ B activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3503 – 3508 (2008).
152. Chen, P. *et al.* Dendritic cell targeted vaccines : Recent progresses and challenges. *Hum. Vaccin. Immunother.* 12,

- 612 – 622 (2016).
153. Macri, C., Dumont, C., Johnston, A. P. R. & Mintern, J. D. Targeting dendritic cells : a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin. Transl. Immunol.* 5, e66-8 (2016).
 154. Kreutz, M., Tacke, P. J. & Figdor, C. G. Perspectives Targeting dendritic cells — why bother? *Blood* 121, 2836 – 2845 (2013).
 155. Bonifaz, L. *et al.* Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8 + T Cell Tolerance. *J. Exp. Med.* 196, 1627 – 1638 (2002).
 156. Apostolopoulos, V., Thalhammer, T., Tzakos, A. G. & Stojanovska, L. Targeting Antigens to Dendritic Cell Receptors for Vaccine Development. *J. Drug Deliv.* (2013).
 157. de Andrade Pereira, B. & Fraefel, C. Novel immunotherapeutic approaches in targeting dendritic cells with virus vectors. *Discov Med* 109, 111 – 119 (2015).
 158. Funke, S. *et al.* Targeted Cell Entry of Lentiviral Vectors. *Mol. Ther.* 16, 1427 – 1436 (2008).
 159. Frecha, C. *et al.* Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* 112, 4843 – 4852 (2008).
 160. Funke, S. *et al.* Pseudotyping lentiviral vectors with the wild-type measles virus glycoproteins improves titer and selectivity. *Gene Ther.* 16, 700 – 705 (2009).
 161. Frecha, C. *et al.* Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood* 114, 3173 – 3180 (2009).
 162. Humbert, J.-M. *et al.* Measles Virus Glycoprotein-Pseudotyped Lentiviral Vectors Are Highly Superior to Vesicular Stomatitis Virus G Pseudotypes for Genetic Modification of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Virol.* 86, 5192 – 5203 (2012).
 163. Lévy, C. *et al.* Measles virus envelope pseudotyped lentiviral vectors transduce quiescent human HSCs at an efficiency without precedent. *Blood Adv.* 1, 2088 – 2104 (2017).
 164. Khetawat, D. & Broder, C. C. A functional henipavirus envelope glycoprotein pseudotyped lentivirus assay system. *Virology* 7, 312 (2010).
 165. Palomares, K. *et al.* Nipah Virus Envelope-Pseudotyped Lentiviruses Efficiently Target ephrinB2-Positive Stem Cell Populations In Vitro and Bypass the Liver Sink When Administered In Vivo. *J. Virol.* 87, 4794 – 4794 (2013).
 166. Witting, S. R., Vallanda, P. & Gamble, A. L. Characterization of a third generation lentiviral vector pseudotyped with Nipah virus envelope proteins for endothelial cell transduction. *Gene Ther.* 20, 997 – 1005 (2013).
 167. Morizono, K., Bristol, G., Xie, Y.-M., Kam-Pun Kung, S. & Chen, I. S. Y. Antibody-Directed Targeting of Retroviral Vectors via Cell Surface Antigens. *J. Virol.* 75, 8016 – 8020 (2011).
 168. Morizono, K. *et al.* Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection. *Nat. Med.* 11, 346 – 352 (2005).
 169. Zhang, X. & Roth, M. J. Antibody-directed lentiviral gene transduction in early immature hematopoietic progenitor cells. *J. Gene Med.* 12, 945 – 955 (2010).
 170. Yang, L., Bailey, L., Baltimore, D. & Wang, P. Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11479 – 11484 (2006).
 171. Lei, Y., Joo, K. II & Wang, P. Engineering fusogenic molecules to achieve targeted transduction of enveloped lentiviral vectors. *J. Biol. Eng.* 3, 12 – 18 (2009).
 172. Yang, H., Joo, K. II, Ziegler, L. & Wang, P. Cell type-specific targeting with surface-engineered lentiviral vectors co-displaying OKT3 antibody and fusogenic molecule. *Pharm. Res.* 26, 1432 – 1445 (2009).

173. Froelich, S., Ziegler, L., Stroup, K. & Wang, P. Targeted Gene Delivery to CD117-expressing Cells In Vivo with Lentiviral Vectors Co-displaying Stem Cell Factor and a Fusogenic Molecule. *Biotechnol. Bioeng.* **104**, 206 – 215 (2009).
174. Nakamura, T. *et al.* Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nat. Biotechnol.* **23**, 209 – 214 (2005).
175. Anliker, B. *et al.* Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors. *Nat. Methods* **7**, 929 – 935 (2010).
176. Abel, T. *et al.* Specific gene delivery to liver sinusoidal and artery endothelial cells. *Gene Ther.* **122**, 2030 – 2039 (2013).
177. Bayin, N. S. *et al.* Selective lentiviral gene delivery to CD133-expressing human glioblastoma stem cells. *PLoS One* **9**, 1 – 22 (2014).
178. Brendel, C. *et al.* CD133-targeted gene transfer into long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Mol. Ther.* **23**, 63 – 70 (2015).
179. Zhou, Q. *et al.* T cell receptor gene transfer exclusively to human CD8 + cells enhances tumor cell killing. *Blood* **120**, 4334 – 4343 (2012).
180. Münch, R. C. *et al.* DARPins: An efficient targeting domain for lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **19**, 686 – 693 (2011).
181. Zhou, Q. *et al.* Exclusive Transduction of Human CD4 + T Cells upon Systemic Delivery of CD4-Targeted Lentiviral Vectors. *J. Immunol.* **195**, 2493 – 2501 (2015).
182. Kneissl, S. *et al.* Measles Virus Glycoprotein-Based Lentiviral Targeting Vectors That Avoid Neutralizing Antibodies. *PLoS One* **7**, 1 – 8 (2012).
183. Enkirch, T. *et al.* Targeted lentiviral vectors pseudotyped with the Tupaia paramyxovirus glycoproteins. *Gene Ther.* **20**, 16 – 23 (2013).
184. Bender, R. R. *et al.* Receptor-Targeted Nipah Virus Glycoproteins Improve Cell-Type Selective Gene Delivery and Reveal a Preference for Membrane-Proximal Cell Attachment. *PLoS Pathog.* **12**, 1 – 28 (2016).
185. Pfeiffer, A. *et al.* In vivo generation of human CD19 - CAR T cells results in B - cell depletion and signs of cytokine release syndrome. *EMBO Mol. Med.* **10**, e9158 (2018).
186. Yang, L. *et al.* Engineered lentivector targeting of dendritic cells for in vivo immunization. *Nat. Biotechnol.* **26**, 326 – 334 (2008).
187. Pollack, S. M. *et al.* First-in-Human Treatment with a Dendritic Cell-Targeting Lentiviral Vector expressing NY-ESO-1, LV305, Induces Deep, Durable Response in Refractory Metastatic Synovial Sarcoma Patient. *J. Immunother.* **40**, 302 – 206 (2017).
188. Gennari, F., Lopes, L., Verhoeyen, E., Marasco, W. & Collins, M. K. Single-Chain Antibodies That Target Lentiviral Vectors to MHC Class II on Antigen-Presenting Cells. *Hum. Gene Ther.* **562**, 554 – 562 (2009).
189. Ageichik, A., Buchholz, C. J. & Collins, M. K. Lentiviral Vectors Targeted to MHC II Are Effective in Immunization. *Hum. Gene Ther.* **22**, 1249 – 1254 (2011).
190. Andreakos, E., Williams, R. O., Wales, J., Foxwell, B. M. & Feldmann, M. Activation of NF- κ B by the intracellular expression of NF- κ B-inducing kinase acts as a powerful vaccine adjuvant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14459 – 14464 (2006).
191. Rossotti, M. *et al.* Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 1397 – 1404 (2015).
192. Friedel, T. *et al.* Receptor-targeted lentiviral vectors are exceptionally sensitive toward the biophysical properties of the displayed single-chain Fv. *Protein Eng. Des. Sel.* **28**, 93 – 105 (2015).

193. Rasbach, A. *et al.* The Receptor Attachment Function of Measles Virus Hemagglutinin Can Be Replaced with an Autonomous Protein That Binds Her2/neu While Maintaining Its Fusion-Helper Function. *J. Virol.* **87**, 6246 – 6256 (2013).
194. Vermeire, J. *et al.* Quantification of Reverse Transcriptase Activity by Real-Time PCR as a Fast and Accurate Method for Titration of HIV, Lenti- and Retroviral Vectors. *PLoS One* **7**, (2012).
195. Ozog, S. *et al.* CD46 Null Packaging Cell Line Improves Measles Lentiviral Vector Production and Gene Delivery to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **13**, 27 – 39 (2019).
196. Toscano, M. G. *et al.* Dendritic cells transduced with lentiviral vectors expressing vip differentiate into vip-secreting tolerogenic-like DCs. *Mol. Ther.* **18**, 1035 – 1045 (2010).
197. Case, S. S. *et al.* Stable transduction of quiescent CD34+CD38- human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 2988 – 2993 (1999).
198. Costello, E. *et al.* Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther.* **7**, 596 – 604 (2000).
199. Carralot, J. P. *et al.* Automated high-throughput siRNA transfection in raw 264.7 macrophages: A case study for optimization procedure. *J. Biomol. Screen.* **14**, 151 – 160 (2009).
200. Zhou, H. *et al.* Microtubule-Associated Serine/Threonine Kinase-205 kDa and Fc Receptor Control IL-12 p40 Synthesis and NF- κ B Activation. *J. Immunol.* **172**, 2559 – 2568 (2014).
201. van Lookeren Campagne, M., Wiesmann, C. & Brown, E. J. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell. Microbiol.* **9**, 2095 – 2102 (2007).
202. Carrithers, M. D. *et al.* Expression of the voltage-gated sodium channel NaV1.5 in the macrophage late endosome regulates endosomal acidification. *J. Immunol.* **178**, 7822 – 32 (2007).
203. Jiang, X., Shen, C., Rey-Ladino, J., Yu, H. & Brunham, R. C. Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in Chlamydia muridarum antigen presentation and induction of protective immunity. *Infect. Immun.* **76**, 2392 – 2401 (2008).
204. Mock, U., Thiele, R., Uhde, A., Fehse, B. & Horn, S. Efficient Lentiviral Transduction and Transgene Expression in Primary Human B Cells. *Hum. Gene Ther. Methods* **23**, 408 – 415 (2012).
205. Follenzi, A. *et al.* Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* **103**, 3700 – 3709 (2004).
206. Ghosn, E. E. B. *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 2568 – 2573 (2010).
207. Altenburg, M., Johnson, L., Wilder, J. & Maeda, N. Apolipoprotein E4 in Macrophages Enhances Atherogenesis in a Low Density Lipoprotein Receptor-dependent Manner*. *J. Biol. Chem.* **282**, 7817 – 7824 (2007).
208. Nguyen, H.-H., Tran, B.-T., Muller, W. & Jack, R. S. IL-10 Acts As a Developmental Switch Guiding Monocyte Differentiation to Macrophages during a Murine Peritoneal Infection. *J. Immunol.* **189**, 3112 – 3120 (2012).
209. Cassado, A. A., D'Império Lima, M. R. & Bortoluci, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function. *Front. Immunol.* **6**, 1 – 9 (2015).
210. Liu, J. *et al.* Structure of the nuclear factor κ B-inducing kinase (NIK) kinase domain reveals a constitutively active conformation. *J. Biol. Chem.* **287**, 27326 – 27334 (2012).
211. Thu, Y. M. & Richmond, A. NF- κ B inducing kinase: A key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 213 – 226 (2010).
212. Mastropietro, G., Tiscornia, I., Perelmuter, K., Astrada, S. & Bollati-Fogolín, M. HT-29 and Caco-2 Reporter Cell Lines for Functional Studies of Nuclear Factor Kappa B Activation. *Mediators Inflamm.* **2015**, 1 – 13 (2015).

213. Kumar, M., Keller, B., Makalou, N. & Sutton, R. E. Systematic Determination of the Packaging Limit of Lentiviral Vectors. *Hum. Gene Ther.* 12, 1893 – 1905 (2002).
214. O'Doherty, U., Swiggard, W. J. & Malim, M. H. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Spinoculation Enhances Infection through Virus Binding. *J. Virol.* 74, 10074 – 10080 (2000).

7. Agradecimientos

Al tribunal, Mabel, Hugo y Analía

A Gualberto

A Mary (NIBSC) y Christian (PEI)

A Kam y a Ceci.C

A Noe S, Tri, Noe M, Romi, Maca, Nati, Gabi, Sofi, Ceci V y Andy

A Yami, Fofi, Emi, Clau R, Lu V y Martín

A la Cátedra de Inmuno completa

A mis amigos

A los que me dejaron dormir en sus casas

A mi Familia

A Juan