



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

UDELAR | fcien.edu.uy

U D E L A R



**FACULTAD DE
QUÍMICA**



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADA EN
BIOQUÍMICA**

**Desarrollo de un calibrador para el
diagnóstico serológico de alergia al
antibiótico beta-lactámico aztreonam**

Paula Segovia de los Santos

Tutor: Dr. Gabriel Lassabe

Co-tutor: Dr. Gualberto González-Sapienza

**Área Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la
República**

Montevideo, Uruguay

Noviembre 2020

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Gabriel, por todas sus enseñanzas y su atención en cada momento del desarrollo de este trabajo. Gracias por tu paciencia, tu dedicación y tu apoyo.

A mi co-tutor, Gualberto, por recibirme en el laboratorio y siempre apoyarme en el transcurso de esta tesina. Gracias por esta oportunidad y por tu disposición para aportar y discutir ideas.

Al Dr. Agustín Correa, por aceptar corregir mi trabajo.

A todos los integrantes de la Cátedra de Inmunología, por crear un hermoso ambiente de trabajo y estar dispuestos a brindar ayuda cuando la necesité. Agradezco especialmente a los integrantes de la Casita del Fondo, por ayudarme y aconsejarme día a día.

A mis padres, por su apoyo incondicional de toda la vida. Gracias por inspirar mi interés en la ciencia, por su optimismo, y por estar presentes para escucharme y darme ánimo cuando más lo necesitaba. Llegar al final de esta etapa no hubiera sido posible sin su apoyo.

A mi hermana, Jimena, por estar siempre a mi lado durante la carrera. Gracias por tu buen humor, tu comprensión, y en especial las horas que pasaste acompañándome mientras escribía esta tesina en tiempos de cuarentena.

A mis amigas de siempre, la Fauna, por su apoyo, sus consejos, y porque su dedicación al perseguir sus metas me inspira día a día.

A todos ellos agradezco por hacer posible que pudiera completar esta etapa de mi formación y de mi vida. ¡Gracias!

RESUMEN

Los antibióticos beta-lactámicos son el grupo de medicamentos contra los cuales se reporta el mayor número de reacciones alérgicas, y son la principal causa de anafilaxis fatal asociada a medicamentos. Si bien es crucial que estas alergias sean diagnosticadas, un importante problema en la clínica es el “sobre-etiquetado” de pacientes como alérgicos sin confirmar la presencia de una verdadera alergia. Como consecuencia, se recurre a tratamientos con antibióticos alternativos que suelen ser más tóxicos, menos eficientes y más costosos, para un grupo de pacientes de los cuales se ha demostrado que más del 90% puede tolerar dosis terapéuticas de estos antibióticos. Es por lo tanto de suma importancia contar con eficientes métodos de diagnóstico que permitan confirmar o descartar la presencia de una alergia. El laboratorio donde se desarrolló esta tesina está llevando a cabo una colaboración con el Dr. Ángel Maquieira para desarrollar un inmunoensayo en formato ELISA que pueda contribuir al diagnóstico de estas alergias, mediante la detección en suero de IgE específica contra los determinantes antigénicos de diferentes antibióticos beta-lactámicos.

En el marco de esta tesina se propuso la generación de un calibrador recombinante para este ensayo serológico, que permita establecer, en forma estandarizada y reproducible, el cutoff para la clasificación de los sueros como positivos o negativos. Este calibrador se basa en anticuerpos monodominio denominados nanobodies, y consiste en un conjugado biespecífico (nanobody biespecífico) formado por la unión de dos de estos anticuerpos, que mimetice la IgE específica presente en suero. Un primer nanobody reconoce el determinante antigénico formado por el antibiótico, mimetizando el paratópe de la IgE específica, mientras que un segundo nanobody reconoce el paratópe del anticuerpo de detección de IgE (el anticuerpo monoclonal omalizumab), mimetizando la región Fc. Para la generación de este calibrador se tomó como modelo el determinante antigénico del antibiótico beta-lactámico aztreonam.

Se seleccionó mediante la técnica de Phage Display un conjunto de nanobodies contra cada uno de los antígenos, el determinante antigénico de aztreonam y el paratópe de omalizumab. En base a criterios definidos, se seleccionó un nanobody de cada grupo para generar el nanobody biespecífico. Este último pudo ser expresado en *E. coli* en forma soluble con buen rendimiento, y al ser evaluado mediante ensayos ELISA se evidenció que mantiene la reactividad de los nanobodies contra cada uno de los antígenos, demostrando su potencial aplicabilidad como calibrador para el ensayo de detección serológica de IgE. El nanobody anti-omalizumab seleccionado ha sido útil en el marco del mencionado proyecto de colaboración, combinándose con otros nanobodies para la obtención de calibradores a ser utilizados en la determinación de IgE específica contra determinantes de otros antibióticos beta-lactámicos.

Palabras clave

- Nanobodies o VHHs
- Tecnología Phage Display
- Bibliotecas de anticuerpos
- Inmunoensayo ELISA
- Serología
- Alergia

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

6xHis	Cola de 6 histidinas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Del inglés: <i>Bovine Serum Albumin</i> (seroalbúmina bovina)
CDR	Del inglés: <i>Complementarity-Determining Region</i> (región determinante de la complementariedad)
CH1, CH2, CH3	Dominios constantes de anticuerpos
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Del inglés: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas)
Fc	Fragmento cristalizante
FNU	Fracción No Unida
FR	Del inglés: <i>Framework Region</i>
HA	Epítotope de hemaglutinina
HcAbs	Del inglés: <i>Heavy chain Antibodies</i> (anticuerpos de cadena pesada)
HSA	Del inglés: <i>Human Serum Albumin</i> (seroalbúmina humana)
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KLH	Del inglés: <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> (hemocianina de lapa californiana)
Ni-NTA	Del inglés: <i>Nickel-Nitrilotriacetic Acid</i> (Niquel-ácido nitrilotriacético)
OmpA	Del inglés: <i>Outer membrane protein A</i>
ON	Del inglés: <i>overnight</i> (equivale a 16-20 horas)

pb	Pares de bases
PCR	Del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PM	Peso Molecular
PO	Peroxidasa
rpm	Revoluciones por minuto
scFv	Del inglés: <i>Single-chain variable fragment</i> (fragmento variable de cadena única)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
UA	Unidades de absorbancia
ufc	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
VH	Dominio variable de la cadena pesada de anticuerpos convencionales
VHH	Dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélidos
VL	Dominio variable de la cadena liviana

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Alergias a antibióticos beta-lactámicos.....	1
1.2 Nanobodies	6
1.3 Phage Display	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo general.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 Buffers y soluciones.....	13
3.2 Medios de cultivo	13
3.3 Protocolos generales.....	14
3.3.1 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	14
3.3.2 ELISA.....	14
3.3.3 PCR	14
3.3.4 Transformación	15
3.3.5 Extracción de ADN plasmídico, secuenciación y análisis de secuencias	15
3.3.6 Cuantificación de ADN y proteínas.....	15
3.3.7 Electroforesis SDS-PAGE.....	15
3.3.8 Electroforesis en gel de agarosa	15
3.3.9 Análisis de datos y generación de imágenes.....	15
3.4 Titulación de anticuerpos totales contra KLH-aztreonam en sueros de llama	16
3.5 Selección de nanobodies específicos contra el determinante antigénico de aztreonam. 16	
3.5.1 Selección por panning de nanobodies específicos contra KLH-aztreonam	16
3.5.2 Titulación de fagos	17
3.5.3 Cribado (screening) de clones anti-aztreonam mediante ensayos de ELISA	17
3.5.4 Ensayos de ELISA de titulación de los clones positivos anti-aztreonam	18
3.6 Selección de nanobodies específicos contra el parátipe del anticuerpo omalizumab	18
3.6.1 Screening y titulación de nanobodies anti-omalizumab.....	18
3.6.2 Verificación de la reactividad de clones anti-omalizumab contra el parátipe de este anticuerpo	19
3.7 Vectores de expresión utilizados	20

3.7.1 pINQ-BtH6	20
3.7.2 pINQ-Bis.....	22
3.8 Clonado de nanobodies en vectores de expresión	23
3.8.1 Clonado del nanobody anti-aztreonam en el vector pINQ-BtH6	23
3.8.2 Clonado de los nanobodies en el vector pINQ-Bis	24
3.9 Expresión de proteínas recombinantes	25
3.9.1 Evaluación de la expresión de nanobodies y nanobody biespecífico en cultivos de pequeña escala	25
3.9.2 Expresión a gran escala de nanobodies biotinilados	25
3.9.3 Expresión a gran escala del nanobody biespecífico	25
3.10 Purificación de nanobodies	26
3.10.1 Purificación de nanobodies y nanobody biespecífico por cromatografía de afinidad	26
3.10.2 Purificación de nanobodies y nanobody biespecífico por cromatografía de exclusión molecular.....	26
3.11 Evaluación de la reactividad por ambos antígenos del nanobody biespecífico.....	27
3.12 Análisis de la correlación entre la señal producida por el calibrador biespecífico y la de un suero artificial con anticuerpos anti-aztreonam.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 Selección de nanobodies específicos contra el determinante antigénico de aztreonam. 29	
4.1.1 Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-aztreonam inducida en la llama inmunizada	29
4.1.2 Panning y screening para la selección de nanobodies específicos contra el conjugado KLH-aztreonam.....	30
4.1.3 Selección del nanobody anti-aztreonam a utilizar en el calibrador	31
4.1.4 Clonado del nanobody anti-aztreonam en el vector pINQ-BtH6 y evaluación del nivel de expresión	32
4.1.5 Expresión a gran escala del nanobody anti-aztreonam	33
4.2 Selección de nanobodies específicos contra el parátipo del anticuerpo omalizumab	36
4.2.1 Selección por panning e identificación de clones productores de nanobodies específicos contra omalizumab.....	36
4.2.2 Evaluación de reactividad cruzada de nanobodies anti-omalizumab contra inmunoglobulinas humanas	37
4.2.3 Evaluación de la afinidad y el nivel de expresión de nanobodies anti-omalizumab..	38
4.2.4 Expresión y purificación de los nanobodies B6, E5 y E9 y selección del nanobody anti-omalizumab a utilizar en el calibrador.....	40

4.3 Clonado de los nanobodies en el vector pINQ-Bis para expresión de nanobody biespecífico.....	41
4.4 Producción del nanobody biespecífico	43
4.4.1 Evaluación de la expresión del nanobody biespecífico	43
4.4.2 Expresión a gran escala del nanobody biespecífico	43
4.5 Análisis de la reactividad de los nanobodies que conforman el biespecífico	45
4.6 Análisis de la correlación entre la señal producida por el calibrador biespecífico y la de un suero artificial con anticuerpos anti-aztreonam	47
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	50
6. REFERENCIAS	51

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Alergias a antibióticos beta-lactámicos

El término hipersensibilidad se utiliza para describir la condición de aquellas personas que experimentan un conjunto de síntomas reproducibles a raíz de la exposición a un estímulo definido, a una dosis que es tolerada por la mayoría de las personas. Cuando esta reacción es iniciada por mecanismos inmunológicos, la reacción se denomina alergia. Las reacciones alérgicas más comunes se conocen como reacciones de hipersensibilidad de tipo I y son mediadas por inmunoglobulinas de isotipo IgE¹, generadas a partir de una etapa denominada sensibilización en la cual los linfocitos B que reconocen el alérgeno realizan un cambio de clase hacia este isotipo. Estos anticuerpos se unen a receptores superficiales de mastocitos y basófilos a través de su región Fc, y cuando un alérgeno une más de un paratope de IgE presente en la superficie de una misma célula (un fenómeno denominado cross-linking), se induce la liberación de histamina, heparina, proteasas y citoquinas, desencadenando inmediatamente la aparición de los síntomas característicos de la alergia².

Los antibióticos beta-lactámicos, una clase de antibióticos nombrados así por la presencia de un anillo beta-lactámico en su estructura, son el grupo de medicamentos con más alto riesgo de generar reacciones alérgicas^{3,4} y desencadenar eventualmente anafilaxis fatal⁵. El correcto diagnóstico de alergias es de suma importancia para determinar correctamente la medicación a administrar. Por un lado, para evitar suministrar un antibiótico que puede generar complicaciones serias o poner en riesgo la vida del paciente, pero por otra parte, también es importante para evitar la errónea clasificación del mismo como alérgico a un dado antibiótico (“sobre-etiquetado”), cuando no lo es. En efecto, en muchos casos las personas son catalogadas como alérgicas en base a eventos adversos observados frente a la exposición al antibiótico, sin confirmar que el efecto sea efectivamente causado por el antibiótico, ni que se trate de una alergia verdadera. De hecho, si bien alrededor del 10% de la población es catalogada como alérgica a antibióticos beta-lactámicos de esta forma^{6,7}, se ha demostrado que más del 90% de los pacientes a los cuales se adjudica esta etiqueta pueden tolerar dosis terapéuticas de estos antibióticos cuando se realiza un desafío oral⁸.

El sobre-etiquetado de alergia a antibióticos tiene consecuencias muy negativas en relación al manejo de la terapia con estos fármacos. Cuando la historia clínica de un paciente reporta alergia a un cierto antibiótico beta-lactámico es necesario recurrir al uso de antibióticos alternativos que son en general menos eficientes, más costosos y de más amplio espectro⁹, y cuyo uso se correlaciona con un aumento en la prevalencia de infecciones por bacterias resistentes como *Clostridium difficile*, *Enterococcus sp*, y *Staphylococcus aureus*¹⁰. Estos problemas en muchos casos son evitables a través de la realización de pruebas diagnósticas que permitan confirmar o descartar la alergia reportada. La prueba considerada el “estándar de oro” (*gold standard*) para este diagnóstico es el desafío oral con dosis terapéuticas del antibiótico, seguido de una hora de observación¹¹. La desventaja de este método es que no es aplicable en pacientes que estén cursando infecciones serias o que justamente tengan antecedentes de reacciones graves ante la exposición al antibiótico⁶. Como alternativa, se

suelen utilizar pruebas de exposición en la piel, las cuales tienen las desventajas de no estar estandarizadas para todos los antibióticos¹² y de dar lugar a un número significativo de falsos positivos⁶, contribuyendo así al sobre-etiquetado de alergias en pacientes.

Una alternativa atractiva a estas pruebas de diagnóstico *in vivo* son los métodos de detección *in vitro* de IgE específica, ya que esta molécula funciona como biomarcador de alergia. De estar acompañado con una historia clínica compatible, un resultado positivo en una prueba de este tipo permite consolidar un diagnóstico de alergia clínicamente relevante¹³. Sin embargo, los principales métodos disponibles hasta el momento tienen importantes desventajas, como su alto costo y baja sensibilidad^{14,15}. Además, no existe disponibilidad a nivel comercial de ensayos de detección de IgE contra todo el repertorio de antibióticos suministrados en la clínica¹². Atendiendo a este problema, el laboratorio donde se desarrolló esta tesis está llevando a cabo un proyecto en colaboración con el Dr. Ángel Maquieira para el desarrollo de inmunoensayos de diagnóstico de alergias contra antibióticos beta-lactámicos. Estos inmunoensayos se basan en la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* o ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) para detectar en suero IgE específica contra diferentes determinantes antigénicos derivados de antibióticos beta-lactámicos.

Los determinantes antigénicos que desencadenan la respuesta inmune son aductos derivados de la conjugación espontánea que sufren *in vivo* los antibióticos beta-lactámicos a proteínas del paciente. Dicha conjugación sucede mediante un ataque nucleofílico por parte de las aminas en residuos de lisina sobre el carbonilo del anillo beta-lactámico¹⁶ (**Figura 1.1**). El Dr. Maquieira ha desarrollado, en colaboración con compañías europeas y la clínica, cinco determinantes antigénicos que representan diferentes clases de antibióticos beta-lactámicos, para ser aplicados en el mencionado inmunoensayo: aztreonam, ceftriaxona, meropenem, penicilina G y amoxicilina (**Figura 1.2**). Para generar estos determinantes, los antibióticos son conjugados a la proteína KLH (hemocianina de lapa californiana), utilizada como carrier. Para dicha conjugación se realiza una reacción química análoga a la observada *in vivo*, de modo de reproducir los determinantes antigénicos que se originan naturalmente y contra los cuales los pacientes alérgicos desarrollan anticuerpos IgE.

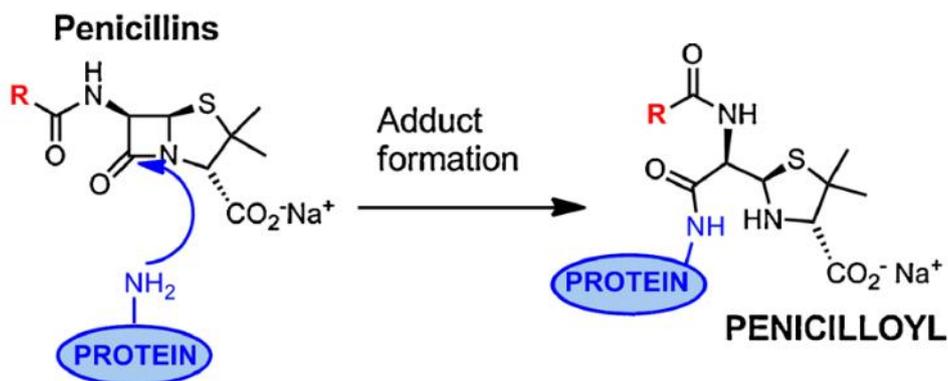


Figura 1.1 | Mecanismo de conjugación de los antibióticos beta-lactámicos a proteínas del paciente para constituir los determinantes antigénicos desencadenantes de alergia. Un ataque nucleofílico por parte de aminas presentes en residuos de lisina sobre el carbonilo del anillo beta-lactámico lleva a la formación del aducto. Imagen modificada de Montañez, M.I. et al.; 2015 (¹⁷).

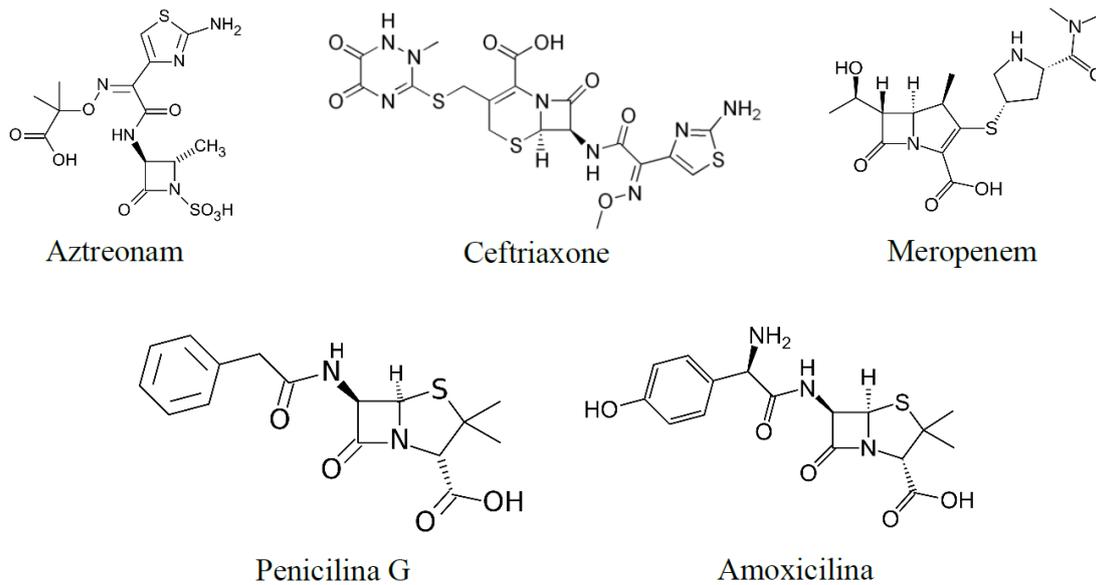


Figura 1.2 | Estructuras de los antibióticos beta-lactámicos para los cuales se generaron determinantes antigénicos en el marco del proyecto para el desarrollo de un inmunoensayo de detección en suero de IgE específica.

El inmunoensayo en formato de ELISA para detección de IgE específica (**Figura 1.3A**) comienza con una etapa de inmovilización de cada uno de los determinantes antigénicos en pocillos de una placa de ELISA. Este proceso, denominado sensibilización, implica la adsorción inespecífica de proteínas mediante el establecimiento de interacciones entre residuos aminoacídicos no polares y el poliestireno que compone la placa. A continuación, se realiza una etapa de bloqueo, en la cual se incubaba una solución de proteínas irrelevantes que se unirán a los sitios libres de la superficie de los pocillos, de forma que en posteriores incubaciones ninguna proteína sea retenida inespecíficamente sobre los mismos. En un siguiente paso, los sueros de pacientes son incubados para promover que los anticuerpos específicos se unan a los determinantes antigénicos inmovilizados, y mediante una etapa de lavados se remueven todos los componentes no unidos o unidos al antígeno en forma inespecífica. Seguidamente los anticuerpos IgE retenidos son detectados utilizando un anticuerpo anti-IgE. Uno comúnmente utilizado es el omalizumab (Novartis), el cual es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1 que reconoce la región Fc de IgE humana con alta afinidad, por lo cual es ampliamente utilizado con fines terapéuticos para el tratamiento de asma y otras enfermedades respiratorias alérgicas¹⁸. Éste puede a su vez detectarse con un anticuerpo conjugado anti-IgG humana que permita generar la señal del inmunoensayo. La generación de señal puede ser luminiscente, colorimétrica o electroquímica, dependiendo de la enzima conjugada al anticuerpo y el sustrato utilizado.

Para el desarrollo de un ensayo de diagnóstico serológico es esencial contar con un calibrador que permita establecer un valor de corte (cutoff) para la clasificación de los sueros analizados como positivos o negativos. Este cutoff se establece a partir del análisis de un panel de sueros de pacientes confirmados como positivos o negativos mediante el método de referencia (desafío oral en el caso de alergias). Tradicionalmente, los calibradores validados para inmunoensayos consisten en sueros positivos en diluciones que permiten generar los valores correspondientes al cutoff establecido¹⁹.

Por otra parte, si se desea que la determinación de IgE específica sea cuantitativa, debe recurrirse a un suero estándar de referencia. Dado que no existen estándares de calibración internacionalmente aceptados para la detección de IgE específica para la mayoría de los alérgenos, los sueros se titulan indirectamente utilizando un estándar de IgE total establecido por la Organización Mundial de la Salud (WHO 11/234)²⁰. Al interpolar en la curva de calibración de IgE total las señales obtenidas en un ensayo de detección de IgE específica, es posible obtener un valor de concentración de IgE específica expresado en una unidad arbitraria conocida como unidad internacional por mililitro (IU/mL), que se utiliza en la cuantificación de IgE²¹. Este método, denominado calibración heteróloga, se basa en la suposición de que la señal producida por la IgE retenida en ambos ensayos (IgE total e IgE específica) es equivalente, lo cual es particularmente válido cuando se utilizan las mismas condiciones para detectarla (por ejemplo el mismo conjugado anti-IgE y sustrato).

Los sueros de referencia utilizados para determinaciones tanto cualitativas como cuantitativas son útiles pero constituyen un recurso finito, lo que hace necesario reponerlos con nuevos sueros caracterizados cuando los anteriores se agotan. Esto es una clara desventaja debido a que, dependiendo del diagnóstico a realizar, puede ser muy difícil conseguir nuevos sueros para sustituirlos; y cuando se consiguen, deben ser nuevamente validados ante los entes regulatorios correspondientes, implicando complejidades y un costo alto en el desarrollo de inmunoensayos.

Para evitar las dificultades asociadas a la obtención de sueros humanos de pacientes que presenten alergias específicas, una alternativa que ha surgido es el llamado “suero artificial”, desarrollado por la empresa Dr. Fooke Laboratorien²². Este reactivo se genera utilizando una proteína de fusión formada por la región Fc de IgE unida a los dominios extracelulares del receptor humano FcγRI. Este receptor une con alta afinidad la región Fc de IgG humana, pero presenta a su vez una alta reactividad cruzada por IgG de otras especies, incluyendo ratón, conejo y oveja, entre otros. Esta proteína de fusión es incubada con anticuerpos IgG obtenidos del suero de un conejo inmunizado con el alérgeno, de forma que se obtiene un reactivo formado por la IgG policlonal (incluyendo anticuerpos específicos contra el antígeno de interés) asociada a través de los dominios extracelulares del receptor FcγRI a la región Fc de IgE (**Figura 1.4**). La principal desventaja asociada a la utilización de este reactivo es que, dado que se basa en el suero de animales inmunizados, no es completamente reproducible.

En el marco de la antes mencionada colaboración, el laboratorio en que se desarrolló esta tesina plantea la generación de reactivos sintéticos y reproducibles como alternativa al uso de sueros humanos para aplicar como calibradores en los inmunoensayos para diagnóstico de alergias contra beta-lactámicos. La propuesta implica la expresión recombinante de proteínas de fusión formadas por dos anticuerpos monodominio denominados nanobodies, que formarán reactivos con doble especificidad (bienespecíficos) capaces de mimetizar la IgE específica del suero de pacientes positivos. Un primer nanobody reconocerá el determinante antigénico inmovilizado, mimetizando la región de reconocimiento de las IgE, y un segundo nanobody reconocerá el parátipe de omalizumab, mimetizando la región Fc de las IgE del suero (**Figura 1.3B**). Un punto crítico en el desarrollo de estos calibradores es lograr una buena expresión recombinante y que las especificidades de cada nanobody no se vean afectadas dentro de las construcciones bienespecíficas. En este sentido, el grupo de este laboratorio ya ha

generado previamente constructos biespecíficos funcionales basados en nanobodies y expresados en *E. coli* con buenos rendimientos²³. La naturaleza modular de la construcción génica de nanobodies biespecíficos permite que, mediante la sustitución del nanobody que reconoce el determinante antigénico, se generen fácilmente construcciones que pueden utilizarse como calibradores para los ensayos que detectan IgE específica contra los distintos determinantes antigénicos. Además, al ser producidos en forma recombinante, estos calibradores presentan la gran ventaja de poder ser reproducidos indefinidamente a partir de su secuencia codificante.

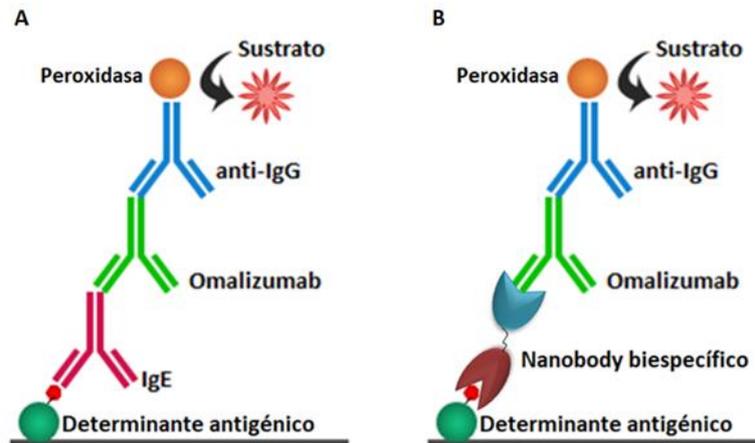


Figura 1.3 | Inmunoensayo en desarrollo. A) Esquema de la detección de IgE específica en suero. B) Esquema del rol del nanobody biespecífico propuesto para la calibración del ensayo.

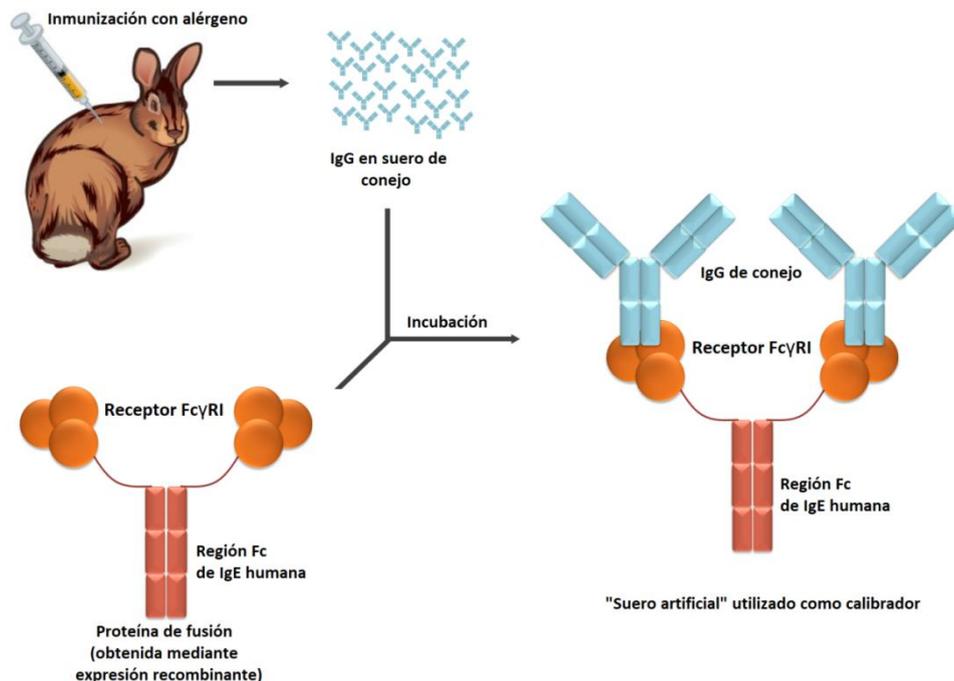


Figura 1.4 | Proceso de obtención de “suero artificial”, un reactivo que funciona como calibrador en inmunoensayos de detección de IgE específica contra alérgenos. En primer lugar, se expresa en forma recombinante la región Fc de IgE humana fusionada a los dominios extracelulares del receptor humano FcγRI. A continuación esta proteína de fusión se incuba con anticuerpos IgG obtenidos luego de la inmunización de un conejo con el antígeno de interés.

1.2 Nanobodies

Los camélidos son una familia de mamíferos artiodáctilos que comprende tres géneros: *Camelus*, nativo de Europa y Asia, que incluye al camello bactriano (*Camelus bactrianus*), camello salvaje (*Camelus ferus*) y dromedario (*Camelus dromedarius*); y los géneros *Vicugna* y *Lama*, nativos de América del Sur, que incluyen a la vicuña (*Vicugna vicugna*), alpaca (*Vicugna pacos*), guanaco (*Lama guanicoe*) y llama (*Lama glama*). Los miembros de esta familia producen, además de los anticuerpos convencionales heterotetraméricos, un tipo particular de anticuerpos que carecen de cadena liviana y consisten de un homodímero de cadenas pesadas²⁴. Los mismos forman parte de la respuesta inmune normal de estos animales ante infecciones, representando un 25% de los anticuerpos circulantes en llamas²⁵ y un 80% en el caso de los camellos²⁶. Estos anticuerpos de cadena pesada (HcAbs), que pertenecen a la clase IgG, están compuestos por un dominio variable característico denominado VHH unido mediante una región bisagra a los dominios CH2 y CH3, pero carecen del dominio CH1 que en anticuerpos convencionales interacciona con la cadena liviana²⁴ (el mismo es excluido durante el proceso de maduración del ARNm mediante splicing²⁷) (**Figura 1.5**). En función de su región Fc, existen dos subclases exclusivas de los HcAbs, IgG2 e IgG3²⁴. Los dominios VHH se forman como resultado de reordenamientos durante la recombinación somática entre segmentos génicos V específicos para VHH dentro del locus de cadena pesada (locus IGH), y segmentos DJ comunes tanto para dominios VH como VHH^{28,29} (**Figura 1.6**).

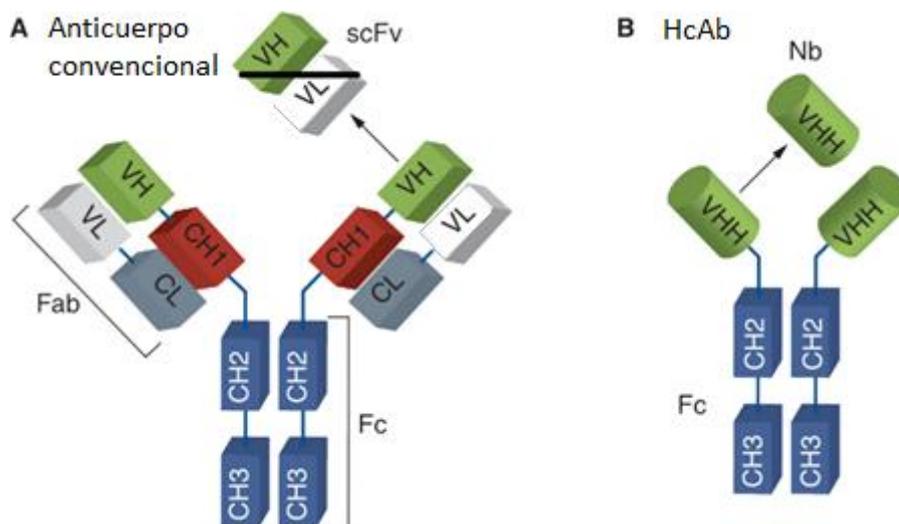


Figura 1.5 | Representación esquemática de un anticuerpo IgG convencional (A) y un anticuerpo de cadena pesada (HcAb) (B). Los anticuerpos convencionales constan de dos cadenas pesadas idénticas compuestas por los dominios VH y CH1 unidos mediante una región bisagra a los dominios CH2 y CH3, y dos cadenas livianas idénticas compuestas por los dominios VL y CL. Los HcAbs poseen únicamente dos cadenas pesadas, compuestas por el dominio variable VHH unido mediante una región bisagra a los dominios constantes CH2 y CH3, carecen del dominio CH1. Los mínimos fragmentos funcionales que pueden obtenerse a partir de anticuerpos convencionales se denominan scFv, y consisten de los dominios VH y VL unidos mediante un péptido linker. Los mínimos fragmentos funcionales que pueden obtenerse a partir de HcAbs consisten únicamente de los dominios VHH, y se conocen como nanobodies (Nb). Imagen modificada de Hassanzadeh-Ghassabeh, G. et al.; 2013 (³⁰).

El dominio VHH es similar al dominio variable de los anticuerpos convencionales (VH) en su estructura general: está compuesto por cuatro regiones framework (FR) y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) (**Figura 1.6**). Sin embargo, presenta ciertas diferencias destacables, como la sustitución de ciertos residuos conservados que participan en la interacción con la cadena liviana por residuos más hidrofílicos que aumentan la solubilidad de este dominio: Val42, Gly49, Leu50 y Trp52 son sustituidos por Phe/Tyr42, Glu49, Arg/Cys50 y Gly52^{31,32}. Asimismo, presenta residuos de cisteína no canónicos en CDRs y FRs y una región CDR3 más larga que el promedio, siendo este último uno de los aspectos que permite ampliar su espectro de reconocimiento, compensando en parte la pérdida de diversidad causada por la ausencia de la cadena liviana³². La presencia del CDR3 extendido y la forma convexa del parátipe son características que permiten la unión del VHH a epítopes que generalmente no son accesibles a los anticuerpos convencionales, como sitios activos de enzimas y epítopes crípticos virales³³. Se cree que este fue el factor principal que impulsó la evolución de los HcAbs, ya que adicionados a los anticuerpos convencionales permiten ampliar el espectro de reconocimiento inmune³⁴.

Dentro del grupo de HcAbs, alrededor de 10% de los anticuerpos está conformado por dominios denominados VH soluble. Estos son similares a los VH de los anticuerpos convencionales, pero pueden presentarse en forma soluble a pesar de no estar asociados a un dominio VL. Esto es debido a que presentan un CDR3 largo capaz de compensar interacciones perdidas por la ausencia de la cadena liviana, y a la incorporación de un residuo de arginina en sustitución del residuo Trp118, que es esencial en la interacción con la cadena liviana en los anticuerpos convencionales³⁵.

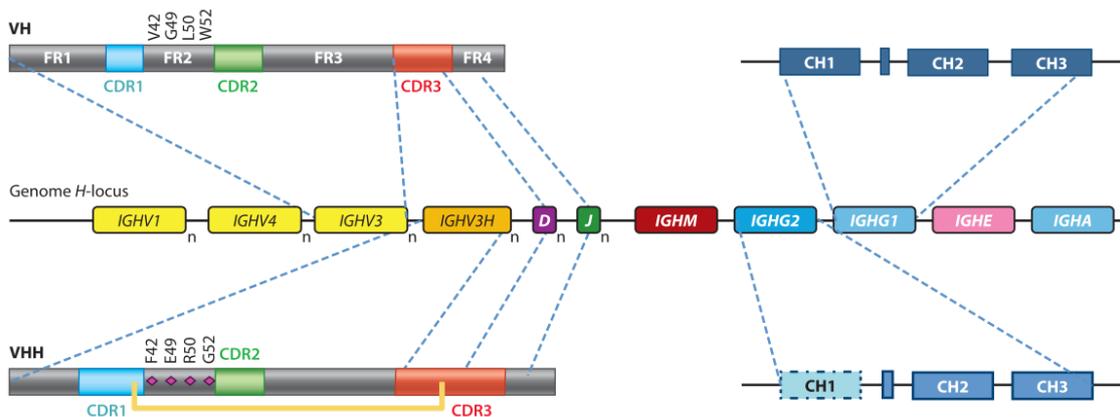


Figura 1.6 | Esquema simplificado del locus IGH de camélidos. Los segmentos génicos V que dan lugar a dominios VH pertenecen a los grupos IGHV1, IGHV4 e IGHV3, mientras que aquellos que dan lugar a dominios VHH pertenecen al grupo IGHV3H. Mediante recombinación somática estos segmentos se unen a segmentos D y J, que se agrupan en un cluster “compartido” por ambos tipos de segmentos V. Corriente abajo se observan los segmentos codificantes para las regiones constantes de las diferentes clases de anticuerpos (se omiten algunas por simplicidad). El dominio CH1 codificado por el segmento IGHG2 (que da lugar a la región constante de IgG2, un HcAb) se muestra rodeado por una línea punteada porque es eliminado durante el proceso de splicing. En la parte superior e inferior izquierda de la figura se esquematizan los dominios VH y VHH, destacando las sustituciones aminoacídicas más relevantes presentes en la región FR2, así como un enlace disulfuro que conecta las regiones CDR1 y

CDR3 (este enlace se presenta con mayor frecuencia en camellos que en otros camélidos³⁶). Imagen modificada de Muyldermans, S.; 2013 (³⁷).

Dado que en los HcAbs la unión al antígeno se da a través de un único dominio, ya sea VHH o VH soluble, es posible generar a partir de ellos fragmentos monodominio de unión a antígeno. Estos dominios aislados, denominados nanobodies, constituyen una herramienta biotecnológica con un amplio rango de aplicaciones, y presentan diversas ventajas respecto a los anticuerpos convencionales y sus fragmentos derivados, como los scFv, que son la mínima unidad funcional de unión a antígeno que puede obtenerse a partir de un anticuerpo heterotetramérico, formada por la fusión de los dominios variables de la cadena pesada y liviana a través de un péptido linker (**Figura 1.5**).

Los nanobodies son proteínas de pequeño tamaño, con un peso molecular que ronda los 15 kDa, pueden ser expresados con buenos rendimientos en sistemas bacterianos³⁸ y son fácilmente subclonados en distintos vectores para permitir su expresión en distintas condiciones y fusionados a proteínas o pequeñas secuencias peptídicas de interés. Se ha logrado generar nanobodies contra una gran diversidad de antígenos, con afinidades que rivalizan las de anticuerpos convencionales³⁹, alcanzando constantes de disociación en el extremo bajo del rango nanomolar e incluso en el orden picomolar^{40,41}. Los nanobodies se caracterizan por su estabilidad ante condiciones como altas temperaturas (en algunos casos manteniendo su unión al antígeno a 70 °C o más)^{39,42,43} y presencia de agentes desnaturizantes y de solventes en altas concentraciones^{39,44,45}, lo cual los convierte en muy buenas alternativas a los anticuerpos convencionales para su aplicación en inmunoensayos que requieren la incubación de muestras en estas condiciones. Adicionalmente, esta estabilidad implica que los nanobodies pueden ser almacenados durante meses a 4 °C o -20 °C, sin afectarse su capacidad de unión al antígeno³⁷. Todas estas características, sumadas a la posibilidad de reproducirlos en forma indefinida a partir de su secuencia codificante, convierten a los nanobodies en herramientas de sumo valor como reactivos en el desarrollo de inmunoensayos.

Para la selección de anticuerpos contra un determinado antígeno, es posible generar bibliotecas de virus bacteriófagos (fagos) con representación de los anticuerpos en superficie (Phage Display) que reflejen el repertorio inmune de unión a antígeno presente en el animal inmunizado. En la **Figura 1.7** se ilustra este proceso para la construcción de dos tipos de bibliotecas de fagos, con expresión de nanobodies o de fragmentos scFv. Dado que en el caso de los anticuerpos convencionales es requerida la amplificación mediante PCR de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana por separado, a la hora de construir los fragmentos scFv estos dominios son “barajados”, lo cual implica que los pares originales que fueron generados para el reconocimiento del antígeno se recuperan con baja frecuencia. Debido a que los nanobodies unen su antígeno a través de un único dominio, no está presente la etapa de barajado en la construcción de la biblioteca, lo que significa que una biblioteca de mucho menor tamaño puede proveer una buena representación del repertorio inmune³⁶.

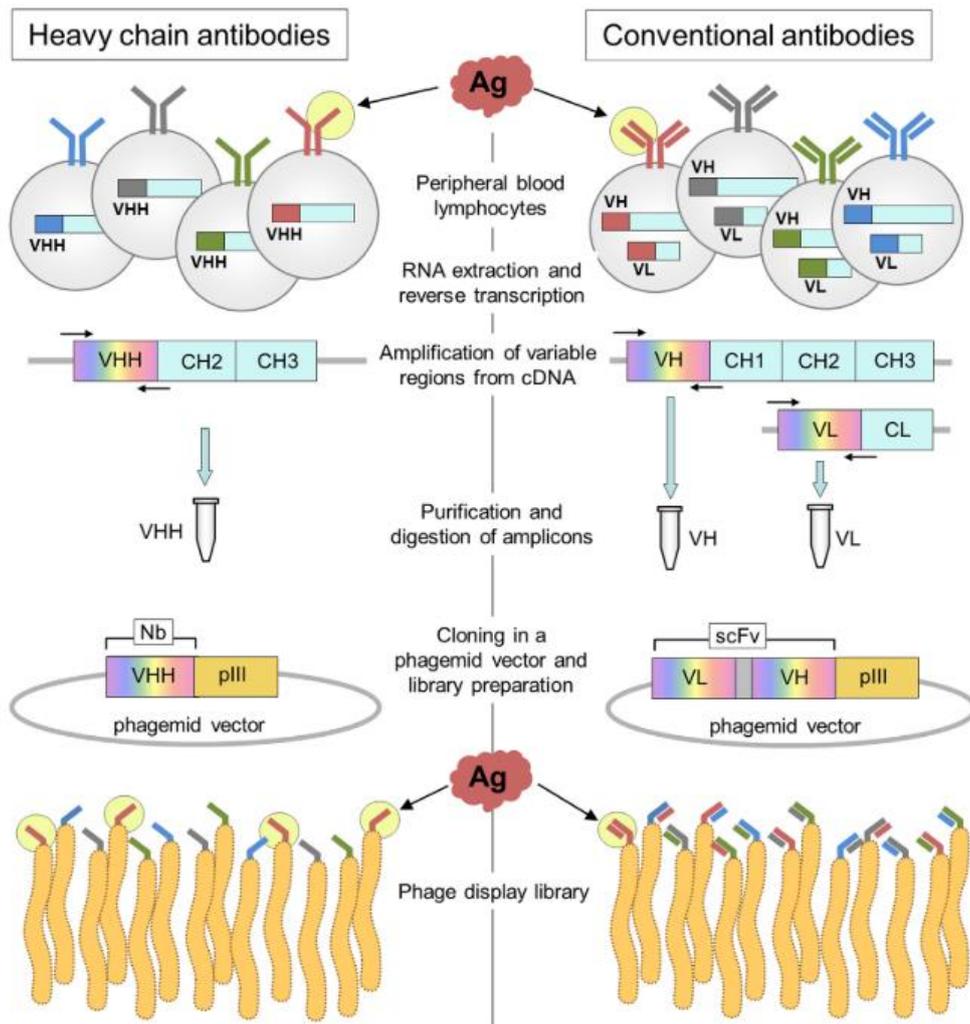


Figura 1.7 | Esquema comparativo del proceso de construcción de una biblioteca de nanobodies (izquierda) y de fragmentos scFv (derecha). En el segundo caso, se observa que durante el clonado de los dominios variables en el vector tiene lugar el “barajado” de los dominios VH y VL que causa la pérdida de los pares originales en la mayoría de los casos. Imagen obtenida de González-Sapienza, G. et al.; 2017 ⁽³⁶⁾.

1.3 Phage Display

Phage Display es una técnica de alto rendimiento (*high-throughput*) ampliamente utilizada para la selección de anticuerpos que se expresan en la superficie de fagos. Existen diferentes versiones de esta técnica basadas en distintas especies de fagos, siendo el sistema más ampliamente aplicado el basado en el fago filamentoso M13⁴⁶. El principio de Phage Display fue demostrado por primera vez en 1985, cuando se insertó el ADN codificante para un antígeno en el genoma del fago M13. El antígeno fue expresado fusionado a una de las proteínas de su cápside, pIII, sin afectar la infectividad del virión⁴⁷. En 1990, la técnica fue aplicada por primera vez en la selección de fragmentos de anticuerpos scFv específicos contra un antígeno⁴⁸. Su gran utilidad radica en la posibilidad de establecer, a través de la partícula viral, un lazo entre la proteína expresada en la superficie y el gen que la codifica, de modo que

luego de seleccionar en base al fenotipo (proteína expresada) los fagos que reconocen el antígeno, es posible aislar distintos clones y realizar la expresión de la proteína para su caracterización, a partir del genotipo asociado.

El fago M13 pertenece al género *Inovirus*, dentro de la familia *Inoviridae*, y forma parte de un grupo denominado Ff cuyos miembros se caracterizan por infectar bacterias *E. coli* que presentan pili F⁴⁹, el cual funciona como receptor para estos virus. Los fagos Ff poseen un genoma de ADN simple cadena circular que codifica 11 proteínas, incluyendo 5 proteínas de cápside (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX) (**Figura 1.8**) y 6 proteínas relacionadas con la replicación del genoma y el ensamblaje del virión (pl, pII, pIV, pV, pX y pXI)⁴⁶. La partícula viral presenta aproximadamente 2700 copias de la proteína de cápside más abundante, pVIII, que forma una envoltura alrededor del ADN, y aproximadamente 5 copias de cada una de las restantes proteínas de cápside⁴⁶. El fago M13 no puede clasificarse como lítico ni lisogénico sino que establece infecciones crónicas, no impidiendo el crecimiento y división de las células pero sí afectando la velocidad de estos procesos⁵⁰.

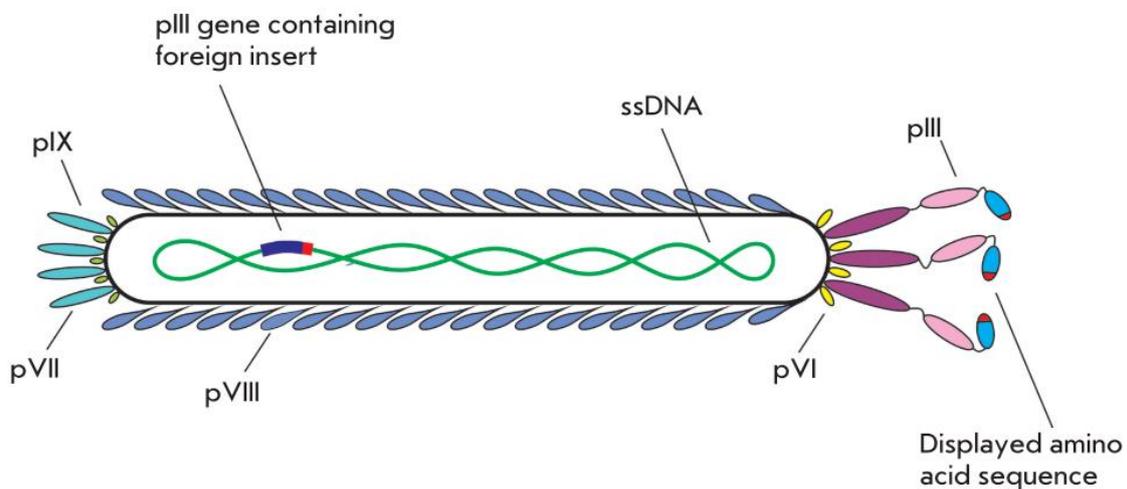


Figura 1.8 | Estructura de un fago filamentososo que presenta una proteína foránea (representada en rojo) fusionada a su proteína de cápside pIII. El fago posee ADN simple cadena circular, y su cápside está compuesta por 5 proteínas: pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX. Imagen modificada de Nemudraya, A.A. et al.; 2016⁽⁴⁹⁾.

El primer paso para seleccionar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos mediante Phage Display es la construcción de una biblioteca de fagos que expresen dichas proteínas en su superficie. Este proceso se ilustra en la **Figura 1.7** para el caso de nanobodies y fragmentos scFv, y comienza por la purificación de células mononucleares de sangre periférica del animal inmunizado y extracción de su ARN. A partir del mismo, se amplifican los dominios que se desean expresar en la biblioteca mediante retro-transcripción seguida de PCR con cebadores específicos para estos dominios. A continuación, las secuencias amplificadas pueden ser clonadas en un vector fagémido, el cual contiene un origen de replicación del fago M13, una señal de encapsidación y el gen que codifica el fragmento a expresar fusionado al gen de la proteína pIII (**Figura 1.9**). Dado que este vector no codifica todas las proteínas necesarias para la formación de la partícula viral, es necesario realizar una co-infección con un fago helper (fago auxiliar) cuyo genoma codifica estas proteínas. Los vectores fagémidos se utilizan como alternativa al clonado de los fragmentos directamente en el genoma del fago, y su principal

ventaja es que tienen mayor eficiencia de transformación en bacterias, permitiendo la construcción bibliotecas de mayor tamaño⁴⁶.

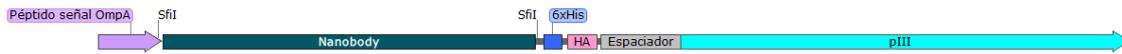


Figura 1.9 | Representación esquemática del cassette de expresión presente en el vector fagémido pComb3XSS. El cassette incluye un nanobody fusionado a la proteína pIII a través de una secuencia espaciadora, que incluye como etiquetas una cola de poli-histidina (6xHis) y el péptido HA (un epítipo de la proteína viral hemaglutinina).

Una vez construida la biblioteca, la selección de fragmentos de unión al antígeno se realiza mediante un proceso denominado panning, esquematizado en la **Figura 1.10**. En primer lugar, la biblioteca de fagos debe ser incubada en pocillos de ELISA sobre los cuales se ha inmovilizado el antígeno. A continuación, los fagos no unidos o unidos inespecíficamente son removidos mediante lavados, mientras que los fagos que permanecen unidos pueden ser luego eluidos mediante diferentes métodos, como el agregado de medios ácidos, moléculas competidoras o enzimas proteolíticas. En esta instancia la técnica se destaca por su potencial de amplificación de los fagos eluidos mediante una co-infección con fago helper de bacterias *E. coli* en crecimiento. Luego, los productos de amplificación pueden someterse a nuevas rondas de panning para promover el enriquecimiento de clones específicos⁵¹.

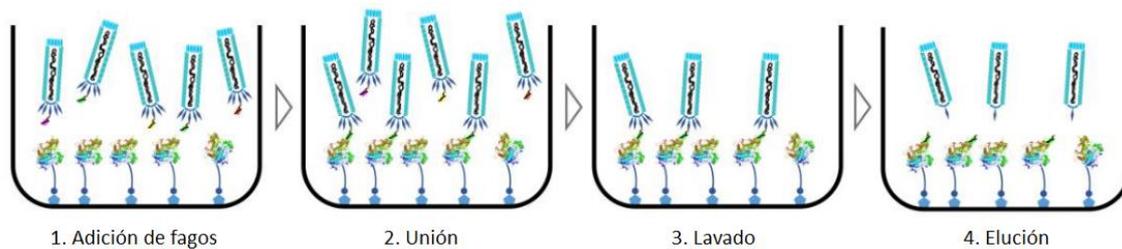


Figura 1.10 | Etapas del proceso de panning para la selección de anticuerpos a partir de una biblioteca de fagos filamentosos. 1. Adición de la biblioteca de fagos filamentosos en un pocillo en el cual se inmovilizó el antígeno. En el ejemplo de la figura, el antígeno fue inmovilizado en forma indirecta, uniéndose a través de una etiqueta a una proteína adherida al pocillo. 2. Unión de los fagos que presentan una proteína que interacciona con el antígeno. 3. Eliminación mediante lavados de los fagos que no interaccionan o que interaccionan inespecíficamente con el antígeno. 4. Elución de los fagos, en el ejemplo de la figura mediante digestión de la proteína fusionada a pIII. Imagen modificada de Ledsgaard, L. et al.; 2018⁽⁴⁶⁾.

Haciendo uso de la tecnología de Phage Display, en esta tesina se plantea la selección de nanobodies para su incorporación en un calibrador que pueda aplicarse a la detección de IgE específica contra uno de los determinantes antigénicos pertenecientes al panel generado por el Dr. Maquieira (**Figura 1.2**), derivado del antibiótico beta-lactámico aztreonam. Este antibiótico pertenece a la clase de los antibióticos monobactámicos, en los cuales el anillo beta-lactámico no se encuentra fusionado a otro anillo. Aztreonam posee un espectro reducido respecto a otros beta-lactámicos, siendo activo únicamente contra bacterias gram-negativas aeróbicas, como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*⁵².

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Generación de un calibrador basado en la expresión recombinante de una construcción biespecífica de nanobodies (nanobody biespecífico) para su aplicación en un ensayo de detección de IgE específica contra el determinante antigénico del antibiótico beta-lactámico aztreonam.

2.2 Objetivos específicos

- Selección de nanobodies específicos contra el determinante antigénico de aztreonam (nanobodies anti-aztreonam) y contra el parátipe del anticuerpo omalizumab (nanobodies anti-omalizumab) mediante la técnica Phage Display.
- Clonado de los genes de un nanobody anti-omalizumab y un nanobody anti-aztreonam en un vector diseñado para la expresión recombinante del nanobody biespecífico.
- Producción recombinante del nanobody biespecífico y de cada nanobody en forma individual.
- Estudio de funcionalidad del nanobody biespecífico mediante la evaluación de su reactividad contra cada uno de los antígenos en ensayos de ELISA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Buffers y soluciones

- **Buffer fosfato salino (PBS):** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 2 mM y Na_2HPO_4 10 mM en agua destilada, pH 7,5
- **Buffer Tris salino (TBS):** Tris 50 mM y NaCl 150 mM en agua Milli-Q, pH 7,5
- **Sustrato para la enzima peroxidasa (sustrato-PO):** Buffer acetato 0,1 M, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) 0,096 mg/mL y H_2O_2 0,004%, pH 5,5
- **Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE):** Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM en agua Milli-Q, pH 8,0
- **Buffer de carga 6X para electroforesis SDS-PAGE:** Tris-HCl 0,35 M, SDS (dodecilsulfato sódico) 10% m/v, glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,175 mM y DTT (ditiotreitól) 0,1 M
- **Buffer de corrida para electroforesis SDS-PAGE:** Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS (dodecilsulfato sódico) 0,1% m/v en agua destilada
- **Solución colorante para la tinción con azul de Coomassie:** Azul de Coomassie 1 g/L, ácido acético glacial 7,5% v/v y metanol 5% v/v en agua destilada
- **Solución decolorante para la tinción con azul de Coomassie:** Ácido acético glacial 7,5% v/v y metanol 5% v/v en agua destilada
- **Buffers para cromatografía de afinidad:**
 - **Buffer de equilibrio (buffer A):** NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM en agua Milli-Q, pH 8,0
 - **Buffer de elución (buffer B):** NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 500 mM en agua Milli-Q, pH 8,0
- **Buffer Tris-EDTA-Sacarosa (TES):** Tris-HCl 0,2 M, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,5 mM y sacarosa 0,5 M en agua destilada, pH 8,0

3.2 Medios de cultivo

- **Luria Bertani broth (LB, Sigma-Aldrich)**
- **Luria Bertani agar (LB agar, Sigma-Aldrich)**
- **Super Broth (SB):** triptona 30 g/L (Sigma-Aldrich), extracto de levadura 20 g/L (Sigma-Aldrich) y MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 10 g/L (Sigma-Aldrich) en agua destilada, pH 7,0
- **Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC):** triptona 20 g/L (Sigma-Aldrich), extracto de levadura 5 g/L (Sigma-Aldrich) y NaCl 0,5 g/L en agua Milli-Q, pH 7,0. Luego de autoclavar se agrega MgCl_2 a concentración final 10 mM y glucosa a concentración final 20 mM, a partir de soluciones stock esterilizadas mediante filtrado.

3.3 Protocolos generales

3.3.1 Cultivo de *Escherichia coli*

Los cultivos bacterianos de *E. coli* fueron incubados, excepto cuando se indique lo contrario, a 37 °C bajo agitación a 250 rpm. A no ser que sean especificadas, las concentraciones finales de los diferentes antibióticos utilizados para suplementar los medios de cultivo tanto sólidos como líquidos fueron las siguientes: tetraciclina 10 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL, kanamicina 40 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL.

3.3.2 ELISA

Para los diferentes ensayos realizados en formato ELISA se utilizaron placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One #655061), que fueron sensibilizados incubándolos con 100 µL de una solución de proteína en PBS, durante 1 hora a 37 °C o alternativamente ON (16-20 horas) a 4 °C. El bloqueo se realizó incubando los pocillos con 200 µL de PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37 °C, a no ser que se especifique lo contrario. A continuación se incubaron 100 µL por pocillo de la muestra a analizar durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación a 450 rpm. De igual forma se incubó la proteína de revelado (conjugada a peroxidasa), y en caso de utilizarse un anticuerpo primario y uno secundario los mismos se incubaron sucesivamente en iguales condiciones. Finalmente, se desarrolló la reacción de revelado incubando 100 µL por pocillo de la solución sustrato-PO durante 5-15 minutos en las mismas condiciones de temperatura y agitación, luego de lo cual la reacción fue detenida mediante el agregado de 50 µL de H₂SO₄ 2 M. Las diluciones de las muestras y de los anticuerpos de revelado fueron realizadas en PBS-BSA 0,1%. En todos los casos, luego de cada incubación se realizaron 6 lavados con PBS-Tween 0,05%. La lectura de las placas de ELISA se realizó en el equipo FLUOstar OPTIMA a 450 nm, corrigiendo la medida según el valor de absorbancia a 620 nm para eliminar contribuciones de absorbancia inespecífica.

3.3.3 PCR

Las reacciones de PCR destinadas a la amplificación de secuencias de nanobodies para su clonado se realizaron utilizando buffer Taq 1X (Thermo Scientific #B38), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada uno de los cebadores, 5 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific #EP0401) y 2 µL de ADN plasmídico como molde (entre 20 y 100 ng según en el caso), en un volumen final de 100 µL. Las reacciones se desarrollaron según el siguiente programa: 1 minuto a 95 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C; y 10 minutos a 72 °C, en un termociclador LifeECO (BIOER). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1 | Secuencias de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia
5 (directo)	5'-GTTACTCGCGGCCAGGCGGCCATG -3'
6 (reverso)	5'-CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAG-3'
Forward 2 nd bis (directo)	5'-AAAAAACTAGTGAGCTCATGGCCAGGTGCAGCTG-3'
Reverse 2 nd bis (reverso)	5'-AAAAAACTCGAGTGAGGAGACRGTGACCTGGGTCC-3'

3.3.4 Transformación

Las transformaciones se realizaron mediante electroporación en cubetas de 2 mm (Sigma-Aldrich) utilizando el equipo MicroPulser™ (BIO-RAD). Inmediatamente luego de la electroporación las células se incubaron en medio SOC a 37 °C con agitación a 250 rpm durante 1 hora, y fueron plaqueadas en placas de medio LB agar con el antibiótico correspondiente, las cuales fueron incubadas a 37 °C ON.

3.3.5 Extracción de ADN plasmídico, secuenciación y análisis de secuencias

Se realizaron cultivos ON en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado a partir de colonias aisladas, de los cuales el ADN plasmídico se extrajo utilizando el kit comercial Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen #27104).

Las secuencias fueron obtenidas a través de los servicios de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo o de la empresa Macrogen (Korea), y fueron analizadas utilizando el programa MEGA6.

3.3.6 Cuantificación de ADN y proteínas

Las medidas de concentración de ADN y proteínas fueron realizadas utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), midiendo absorbancia a 260 nm y 280 nm respectivamente. Para determinar la concentración de ADN se utilizó el coeficiente de absorptividad $0,020 \text{ (ng}/\mu\text{L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que para las proteínas se utilizaron los coeficientes de absorptividad molar estimados a partir de las secuencias aminoacídicas.

3.3.7 Electroforesis SDS-PAGE

Para la visualización de proteínas se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida 12,5% en presencia del agente desnaturizante dodecilsulfato sódico (SDS) y en condiciones reductoras, con posterior tinción con solución colorante de azul de Coomassie. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras fueron incorporadas en buffer de carga 6X y calentadas durante 5 minutos a 100 °C. En todos los casos se utilizó el marcador de peso molecular Pierce Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific #26610).

3.3.8 Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar y en algunos casos purificar ADN, se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE, preparado con el agente intercalante de ADN bromuro de etidio, que permite la visualización del ADN bajo luz UV. A las muestras se les agregó la cantidad correspondiente de buffer de carga 6X (Thermo Scientific #R0611) antes de ser sembradas. Excepto si se indica una alternativa, se utilizó en todos los casos el marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific #SM1331).

3.3.9 Análisis de datos y generación de imágenes

Para la generación de gráficos se utilizaron los programas Origin 6.0 y Microsoft Excel. Cuando se realizaron titulaciones, se aplicó a los datos un ajuste sigmoide utilizando Origin 6.0. Para la

generación de imágenes esquemáticas de secuencias de ADN se utilizó el programa SnapGene Viewer.

3.4 Titulación de anticuerpos totales contra KLH-aztreonam en sueros de llama

Se realizó un ensayo ELISA según se describe en la sección 3.3.2, utilizando placas sensibilizadas ON a 4 °C con KLH-aztreonam 5 µg/mL y bloqueadas con PBS-leche 5%. Líneas de 12 pocillos fueron incubadas con diluciones seriadas de sueros de llama en PBS-leche 1% (se comenzó por una dilución 1/200 y se realizaron diluciones seriadas 1/2) provenientes de 4 extracciones a partir del día de la inmunización con HSA-aztreonam: día 0 (suero pre-inmune), día 16, día 37 y día 80. Para el revelado se incubó con una dilución 1/50000 de un suero de conejo que contiene anticuerpos anti-llama en PBS-leche 1%-Tween 0,05%, y como anticuerpo secundario se utilizó un anti-conejo-PO (Thermo Scientific #31462) en una dilución 1/30000 en PBS-leche 1%-Tween 0,05% a la que se adicionó una dilución 1/100 de suero del día 0, para evitar la unión inespecífica de este anticuerpo. Finalmente se incubó con la solución sustrato-PO durante 10 minutos.

En la placa se incluyeron líneas control para evaluar reactividades inespecíficas, en un caso sin adición de suero de llama y en otro sin adición de suero de llama ni de suero anti-llama (en todos los casos incubando en su lugar con PBS-leche 1%-Tween 0,05%). También se realizó un control para evaluar reactividad contra KLH, sensibilizando una línea de 6 pocillos con esta proteína en lugar del conjugado e incubándola posteriormente con diluciones seriadas de la última extracción.

3.5 Selección de nanobodies específicos contra el determinante antigénico de aztreonam

3.5.1 Selección por panning de nanobodies específicos contra KLH-aztreonam

El punto de partida para esta selección fue una biblioteca de fagos filamentosos generada previamente a partir de la sangre de una llama inmunizada con el conjugado HSA-aztreonam. El proceso de panning se realizó en dos pocillos de ELISA que fueron sensibilizados incubando 100 µL de una solución de KLH-aztreonam 1 µg/mL en PBS durante 1 hora a 37 °C y posteriormente bloqueados incubando 300 µL de PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37 °C. Se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 0,05% y a continuación se incubaron durante 1 hora 100 µL por pocillo de una dilución 1/10 de la biblioteca de fagos filamentosos en PBS-BSA 1% (correspondiente a 100 equivalentes de cada clon en función de la diversidad y el título de la biblioteca), a temperatura ambiente con agitación. Para eliminar los fagos que no se unieron al antígeno, se realizaron 10 lavados con PBS-Tween 0,05%, a continuación se incubó la placa con este buffer durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se realizaron 10 lavados más. Finalmente, los fagos fueron eluidos agregando 50 µL de tripsina 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, #T4799) en TBS e incubando durante 30 minutos a 37 °C.

La elución obtenida (output 1) fue sometida a un proceso de amplificación, para el cual una alícuota de 2 mL de un cultivo de bacterias *E. coli* ER2738, crecido en medio SB-tetraciclina hasta una $DO_{600nm} = 0,8-1$ UA, fue infectado con 100 μ L del output mediante una incubación de 20 minutos a 37 °C sin agitación. Las células infectadas fueron diluidas en 6 mL de SB suplementado con ampicilina 20 μ g/mL y crecidas durante 1 hora a 37 °C, 250 rpm. A continuación se agregó ampicilina para alcanzar una concentración final de 50 μ g/mL y se continuó la incubación en las mismas condiciones durante 1 hora, luego de lo cual se realizó una nueva dilución, esta vez en 12 mL de SB-ampicilina 50 μ g/mL, y se añadieron 50 μ L de fago helper M13KO7 (multiplicidad de infección fago:célula aproximadamente 10:1). Se incubó nuevamente en las mismas condiciones durante 2 horas. Finalmente, se suplementó el medio con kanamicina 56 μ g/mL y se incubó el cultivo ON.

Para la recuperación de los fagos a partir del sobrenadante de cultivo, al día siguiente se centrifugó la suspensión celular a 12000g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo al que se agregaron 0,2 volúmenes de polietilenglicol (PEG) 20%, y se incubó en hielo durante 1 hora para permitir la precipitación de los fagos. Se realizó una nueva centrifugación en las mismas condiciones para obtener los fagos precipitados, y los mismos fueron resuspendidos en 1 mL de PBS-BSA 1%. Estos fagos fueron sometidos a una centrifugación a 17000g durante 1 minuto para separar posibles células que hayan permanecido luego de la centrifugación inicial. El sobrenadante de esta centrifugación constituye el amplificado 1.

Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, se realizó una segunda ronda de panning, esta vez incubando los pocillos con el amplificado 1 en lugar de la biblioteca de fagos.

3.5.2 Titulación de fagos

Para realizar la titulación se infectaron alícuotas de un cultivo de bacterias *E. coli* ER2738 en medio SB-tetraciclina con una $DO_{600nm} = 0,8-1$ UA con diluciones seriadas de una solución de fagos (output o amplificado). Esta infección consistió en incubar 10 μ L de estas diluciones con alícuotas de 100 μ L de células durante 30 minutos a 37 °C, sin agitación. Posteriormente las células fueron plaqueadas en placas de LB agar-ampicilina e incubadas ON. En estas placas sólo forman colonias las células que fueron infectadas ya que el vector fagémido les confiere resistencia a ampicilina, por lo cual el conteo de colonias permite cuantificar los fagos presentes en un output o amplificado (como unidades formadoras de colonias, ufc). Al día siguiente se realizó el conteo de colonias, determinando así la cantidad de unidades formadoras de colonias/mL (ufc/mL) teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

3.5.3 Cribado (screening) de clones anti-aztreonam mediante ensayos de ELISA

Se seleccionaron colonias aisladas en una de las placas de LB agar-ampicilina empleadas en la titulación del segundo output, y se realizaron cultivos de las mismas en 2 mL de SB-ampicilina (en paralelo se realizaron cultivos para la extracción de ADN plasmídico, ver sección 3.3.5). Los cultivos fueron crecidos hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,5$ UA, se indujo la expresión de los nanobodies con IPTG 1 mM y se incubaron ON a 37 °C. Al día siguiente los cultivos fueron centrifugados a 5000g durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron analizados mediante ELISA.

El ELISA de screening se llevó a cabo sensibilizando los pocillos ON a 4 °C con KLH y KLH-aztreonam 5 µg/mL. Se incluyeron además en el screening otros determinantes antigénicos para evaluar si los clones presentaban reactividad cruzada, sensibilizando pocillos con la misma concentración de KLH-ceftriaxona, KLH-meropenem, KLH-penicilina G y KLH-amoxicilina. Se bloqueó la placa con PBS-BSA 1% durante 30 minutos y posteriormente se incubaron los sobrenadantes de cultivo en una dilución 1/2. Para el revelado se realizó una incubación de una hora con un anticuerpo anti-HA-PO (Roche #12013819001) en una dilución 1/3000, seguido de una incubación con la solución sustrato-PO durante aproximadamente 10 minutos.

3.5.4 Ensayos de ELISA de titulación de los clones positivos anti-aztreonam

Luego de identificarse distintos clones positivos anti-aztreonam, éstos fueron crecidos en cultivos de 2 mL para inducir la expresión de los nanobodies según se explica en el punto anterior. Para comparar sus reactividades contra KLH-aztreonam, los sobrenadantes fueron analizados en un ensayo ELISA para el cual se sensibilizaron pocillos con una solución 5 µg/mL de KLH-aztreonam a 4 °C ON. Luego del bloqueo, se realizó la incubación con diluciones seriadas 1/3 de los sobrenadantes, partiendo de una dilución 1/2. El revelado se realizó incubando con un anticuerpo anti-HA-PO en una dilución 1/3000, y a continuación con la solución sustrato-PO durante 10 minutos.

3.6 Selección de nanobodies específicos contra el parátipe del anticuerpo omalizumab

Se partió de una selección de clones realizada previamente en el laboratorio mediante un proceso de panning similar al descrito en la sección 3.5.1, aunque con algunas diferencias. La biblioteca de fagos fue previamente incubada en pocillos sensibilizados con una mezcla de inmunoglobulinas humanas IgG1, IgG2, IgG3 e IgA, de forma de excluir de la misma aquellos clones que reconocieran la región constante de omalizumab. Posteriormente, esta biblioteca fue co-incubada con una dilución de la misma mezcla de inmunoglobulinas en pocillos sensibilizados con omalizumab, de forma de seleccionar los clones con especificidad contra el parátipe de este anticuerpo. Se realizaron dos rondas de panning, y el pool de genes codificantes para nanobodies presente en el output 2 fue clonado en el vector pINQ-BtH6 (descrito en la sección 3.7.1), que permite la alta expresión de proteínas marcadas con biotina.

3.6.1 Screening y titulación de nanobodies anti-omalizumab

Para realizar el screening inicial se indujo la expresión de nanobodies biotinilados (ver sección 3.7.1) en un bloque de cultivo de 96 pocillos (Greiner Bio-One #780201). Para esto, se transformaron células *E. coli* BL21(DE3)-pBir (según se describe en la sección 3.3.4) con el pool de nanobodies clonados en el vector pINQ-BtH6 y se plaquearon en placas de LB agar-kanamicina-cloranfenicol. Se tomaron colonias aisladas y se inocularon en pocillos de un bloque de cultivo con 500 µL de LB-kanamicina-cloranfenicol, suplementado con arabinosa 0,04 % (inductor de la expresión de la biotina ligasa BirA) y biotina 100 µM. El cultivo fue

crecido a 37 °C, 200 rpm, y al alcanzar una $DO_{600nm} = 0,5$ UA se indujo la expresión de los nanobodies mediante el agregado de IPTG a concentración final 10 μ M, luego de lo cual se incubó ON a 37 °C. Como respaldo de estos clones se realizó una réplica de este bloque denominada bloque maestro, que fue inoculado con los mismos clones. Este cultivo fue incubado a 37 °C ON y posteriormente almacenado a -80 °C con glicerol 15%. Cada bloque de cultivo presentó pocillos con medio de cultivo sin inocular que fueron utilizados como control del proceso.

Al día siguiente el bloque en el cual se indujo la expresión de nanobodies se centrifugó a 1238g durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 200 μ L de PBS suplementado con biotina 250 μ M. La lisis celular se llevó a cabo mediante 4 ciclos de congelado/descongelado (a -80 °C y en baño a 37 °C respectivamente) seguidos de 30 minutos de sonicación en baño. Seguidamente se incubó el bloque a 37 °C con agitación durante 2 horas para dar lugar a la reacción de post-biotinilación *in vitro*. Finalmente se realizó una nueva centrifugación a 1238g durante 20 minutos a 4 °C, y se recuperaron los sobrenadantes.

Para analizar los sobrenadantes obtenidos se sensibilizaron 4 placas de ELISA con una solución de omalizumab 2 μ g/mL en PBS durante 1 hora a 37 °C, y se realizó el bloqueo con PBS-BSA 1%. En cada una de las placas se incubó una dilución ($1/10^4$, $1/10^5$, $1/10^6$ o $1/10^7$) de los sobrenadantes de extractos celulares con nanobodies biotinilados. Para la detección de los nanobodies se incubaron los pocillos con una dilución 1/10000 de estreptavidina-PO (Thermo Scientific #S911), y se procedió al revelado incubando las placas con la solución de sustrato-PO durante 10 minutos. En paralelo se realizó un blanco en la placa a partir del sobrenadante de un pocillo sin inocular para obtener una señal de *background* o señal de ruido de fondo del ensayo.

Por otra parte, para estudiar en mayor profundidad la reactividad de una selección de clones se realizó un ensayo de titulación en las mismas condiciones que el screening, pero en este caso incubando los sobrenadantes en diluciones seriadas 1/2 a partir de una dilución 1/1000.

En otro ensayo, se titularon nanobodies anti-omalizumab purificados (producidos según se describe en las secciones 3.9.2 y 3.10.1) en un ensayo similar al screening, en este caso incubando por duplicado diluciones seriadas 1/3 de los diferentes nanobodies, cubriendo un rango de concentración entre 1×10^{-4} y 25 nM.

3.6.2 Verificación de la reactividad de clones anti-omalizumab contra el parátipe de este anticuerpo

Para verificar que el epítipo del nanobody corresponda efectivamente al parátipe de omalizumab, se realizó un ensayo para evaluar la reactividad cruzada de un conjunto de clones contra distintas clases de inmunoglobulinas humanas. La reactividad de los clones se evaluó desde los sobrenadantes de extractos celulares generados en el punto anterior, sobre pocillos de ELISA sensibilizados durante 1 hora a 37 °C con las diferentes proteínas en PBS: omalizumab 2 μ g/mL, BSA 10 mg/mL, IgG1 humana 2 μ g/mL, pool de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas 10 μ g/mL, IgM humana 2 μ g/mL e IgE humana 2 μ g/mL. A continuación, se bloqueó la placa y se procedió a incubar cada sobrenadante en una dilución 1/50 sobre cada una de las proteínas

inmovilizadas. Para el revelado se utilizó una dilución 1/10000 de estreptavidina-PO y finalmente se incubó la solución sustrato-PO durante 10 minutos antes de detener la reacción.

Por otra parte, para confirmar que la reactividad de los nanobodies fuera contra el parátipe de omalizumab se realizó un ensayo de inhibición con nanobodies purificados, en el cual se evaluó la capacidad de los diferentes nanobodies de inhibir la unión de omalizumab a su antígeno (IgE). Previamente, se determinó la concentración de omalizumab que daba lugar a una $DO_{450nm} = 0,5-1$ UA para utilizarla en las pruebas de inhibición, para lo cual se incubaron diluciones seriadas de omalizumab sobre pocillos de ELISA sensibilizados con IgE 1 $\mu\text{g/mL}$, y se detectó la unión del mismo mediante el agregado de una dilución 1/10000 de un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa (Abcam #ab97225), revelando finalmente el ensayo incubando la solución sustrato-PO durante 10 minutos. Para las pruebas de inhibición se realizó un ensayo en las mismas condiciones, incubando esta vez diluciones seriadas 1/3 de los diferentes nanobodies por triplicado, cubriendo un rango entre 8×10^{-5} y 5 nM, en presencia de una concentración fija de 1,4 ng/mL de omalizumab. Las señales obtenidas fueron normalizadas respecto a la señal obtenida en ausencia de nanobody (señal máxima).

3.7 Vectores de expresión utilizados

Durante la etapa de selección de nanobodies mediante panning, los mismos se expresan a partir del vector fagémido pComb3XSS. Para escalar la producción de los mismos, es necesario clonar sus secuencias en un vector de expresión fuerte, para lo cual se utilizó el vector pINQ-BtH6. Por otra parte, el nanobody biespecífico fue generado mediante el clonado de ambos nanobodies en el vector pINQ-Bis, el cual fue diseñado para la producción de biespecíficos conformados por nanobodies, y comparte muchas características con el vector pINQ-BtH6.

3.7.1 pINQ-BtH6

El vector pINQ-BtH6 (**Figura 3.1**) es un derivado del vector pET-28a(+) (Novagen), y como tal posee el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección. Presenta sitios de restricción para la enzima Sfil (GGCCNNNN↓NGGCC) en ambos extremos de la secuencia del nanobody. Dado que es posible generar secuencias distintas de reconocimiento para la enzima en ambos extremos de la secuencia a ser clonada variando los nucleótidos N, la enzima permite realizar clonados direccionales en el vector.

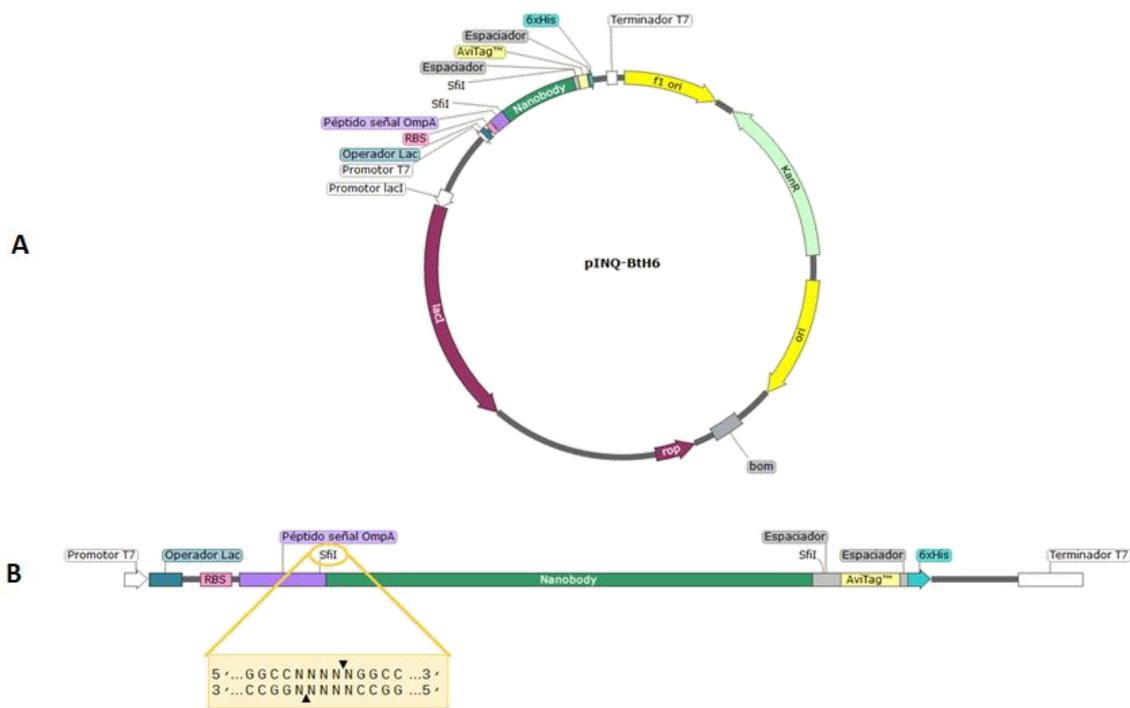


Figura 3.1 | Representación esquemática del vector pINQ-BtH6. A) Esquema del plásmido completo. **B)** Detalle del cassette de expresión, que incluye el promotor y terminador reconocidos por la ARN polimerasa de T7, el operador lac, el péptido señal OmpA de exportación al periplasma y como etiquetas presenta una cola de poli-histidina (6xHis) y el péptido aceptor de biotina AviTag™. En la parte inferior de la figura se indica la secuencia reconocida y el sitio de clivaje de SfiI, que permite el clonado en este vector.

El vector pINQ-BtH6 permite que la expresión de la proteína recombinante sea inducible, evitando que su posible toxicidad afecte el crecimiento del cultivo. Dicha expresión se encuentra bajo el control del promotor T7, reconocido por la ARN polimerasa del bacteriófago T7; y del operador lac, secuencia a la cual se une el represor de la expresión LacI, también codificado en el vector. Para posibilitar la expresión, el vector debe ser transformado en una cepa que posea en su genoma la secuencia codificante para la ARN polimerasa de T7, como lo es *E. coli* BL21(DE3), donde la expresión de esta enzima se encuentra bajo el control del promotor lacUV5 y el operador lac. En ausencia del inductor, el represor LacI, codificado tanto en el plásmido como en el genoma, impide la expresión de la ARN polimerasa de T7 y la proteína de interés, minimizando la expresión basal de esta última que podría resultar tóxica. En presencia del inductor IPTG, el mismo se une al represor LacI favoreciendo su desunión al operador lac, y de esta forma promueve la expresión de la ARN polimerasa de T7 y subsecuentemente la de la proteína clonada en el vector (**Figura 3.2**).

La incorporación al vector permite la fusión del nanobody a algunas secuencias de interés. La secuencia OmpA, posicionada en el extremo amino-terminal de la secuencia traducida, codifica un péptido señal que promueve la localización de la proteína en el espacio periplasmático, donde el ambiente oxidante favorece la formación de los enlaces disulfuro que forman parte de la estructura de los nanobodies. Por otra parte, en el extremo carboxilo-terminal del nanobody se incorpora una cola de poli-histidina compuesta por 6 residuos de este aminoácido, que facilita la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad

además de posibilitar su detección mediante anticuerpos que reconocen esta etiqueta. Asimismo, se incorpora el péptido AviTagTM (GLNDIFEAQKIEWHE), reconocido por la enzima biotina ligasa BirA, que añade una molécula de biotina en forma sitio-específica sobre el residuo de lisina de este péptido. Para la biotilación de nanobodies, el vector pINQ-BtH6 debe ser transformado en la cepa *E. coli* BL21(DE3)-pBir, que sobre-expresa la enzima BirA a partir del vector pCY216, el cual presenta resistencia a cloranfenicol como marcador de selección y cuya expresión es inducible mediante el agregado de arabinosa. La co-expresión de BirA y el nanobody de interés permite que la biotilación tenga lugar *in vivo*, aunque con baja eficiencia. Para aumentar esta eficiencia también se puede realizar una etapa de post-biotilación, que consiste en la incubación a 37 °C del extracto celular en presencia de un exceso de biotina para permitir la biotilación de la totalidad del nanobody. De esta forma, esta etiqueta permite la detección del nanobody mediante el uso de estreptavidina conjugada a peroxidasa.

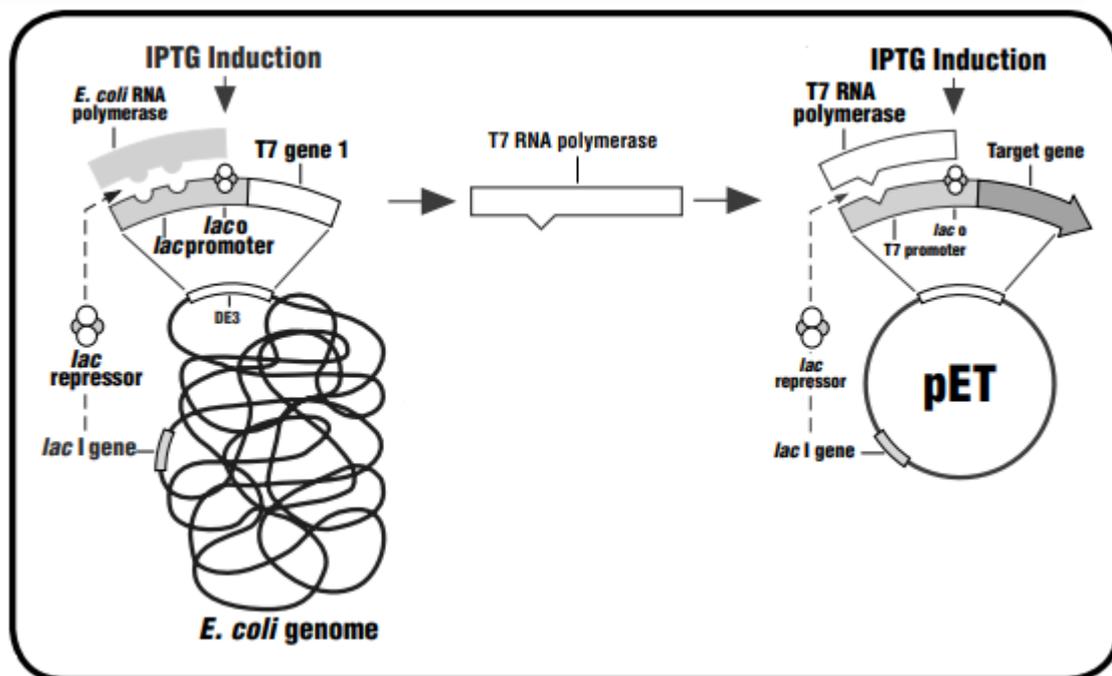


Figura 3.2 | Esquema del sistema de regulación de la expresión del vector pINQ-BtH6. El represor LacI, expresado tanto a partir del cromosoma bacteriano como del plásmido, se une a los operadores lac impidiendo la expresión de la ARN polimerasa de T7 y de la proteína de interés. La inducción con IPTG revierte esta represión, y la expresión de la ARN polimerasa de T7 lleva a la transcripción del gen de interés y producción de la proteína que codifica. Imagen modificada a partir de pET System Manual; 2005⁽⁵³⁾.

3.7.2 pINQ-Bis

El vector pINQ-Bis (**Figura 3.3**) fue diseñado para permitir la construcción de un nanobody biespecífico formado por dos nanobodies separados por una secuencia espaciadora (GQAGRGGGGSGGGSGGGGSTSEL). Al igual que pINQ-BtH6, presenta sitios de restricción para la enzima SfiI que permiten el clonado direccional del nanobody que ocupa la posición amino-terminal, pero presenta además sitios de restricción para las enzimas SpeI y XhoI, que permiten el clonado direccional del nanobody que ocupa la posición carboxilo-terminal.

Presenta las mismas características que pINQ-BtH6 en cuanto a la regulación de la expresión de la proteína clonada e incluye también la secuencia OmpA para promover la exportación de la proteína al periplasma. Posee como única etiqueta una cola de poli-histidina.

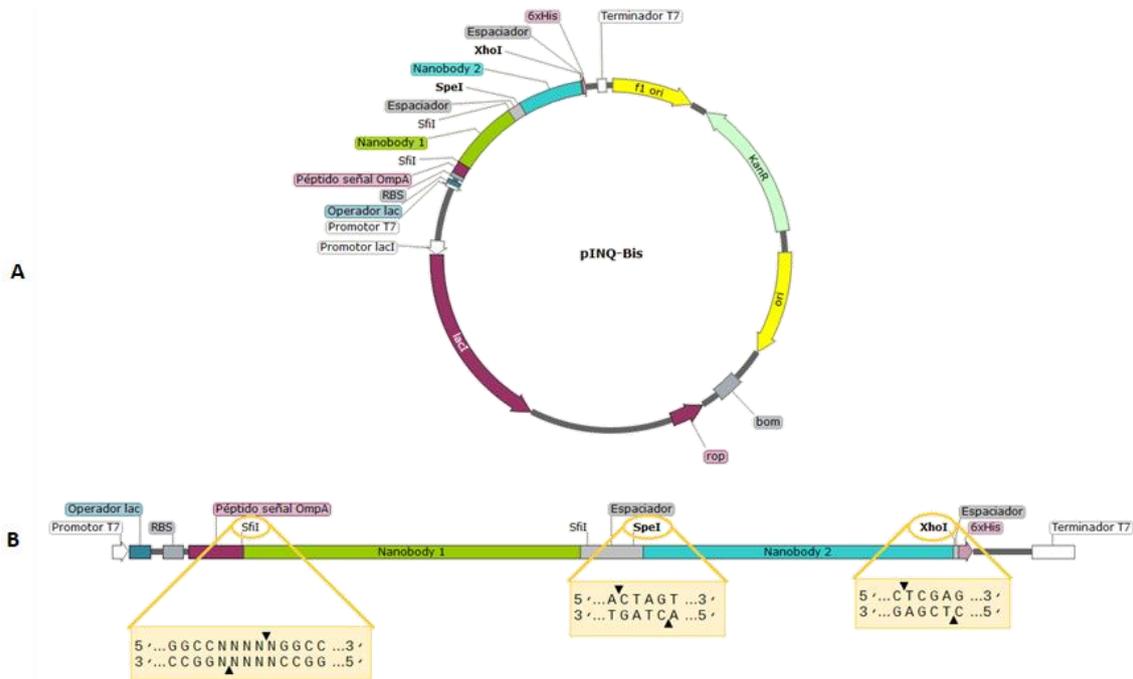


Figura 3.3 | Representación esquemática del vector pINQ-Bis. A) Esquema del plásmido completo. **B)** Detalle del cassette de expresión. La expresión de la proteína heteróloga está bajo el control de las mismas secuencias reguladoras que en el caso del vector pINQ-BtH6. En este caso la proteína es expresada con una cola de poli-histidina (6xHis) como única etiqueta. En la parte inferior de la figura se indican las secuencias reconocidas y los sitios de clivaje de las enzimas de restricción que permiten el clonado en este vector: SfiI, SpeI y XhoI.

3.8 Clonado de nanobodies en vectores de expresión

3.8.1 Clonado del nanobody anti-aztreonam en el vector pINQ-BtH6

La secuencia del nanobody anti-aztreonam fue amplificada a partir del vector pComb3XSS mediante PCR según se describe en la sección 3.3.3, utilizando el cebador directo 5 y el cebador reverso 6, que incorporan en cada extremo del amplicón un sitio de restricción para la enzima SfiI. El producto fue purificado mediante el kit comercial GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific #K0701) y digerido en presencia de buffer G 1X (Thermo Scientific #BG5) con 10 U de SfiI (Thermo Scientific #ER1821) por microgramo de amplicón, desarrollándose la reacción a 50 °C ON. El producto de digestión fue purificado mediante el kit comercial GeneJET PCR Purification. Por otra parte, el vector pINQ-BtH6 fue extraído mediante el kit comercial Qiaprep Spin Miniprep a partir de un cultivo ON en LB-kanamicina, digerido en las mismas condiciones que el inserto y purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y utilizando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction (Qiagen). Los extremos del vector fueron

desfosforilados utilizando 1 U de la enzima rSAP (New England Biolabs #M0371S) por microgramo de vector en presencia del buffer CutSmart 1X (New England Biolabs #B7204S), incubando la reacción a 37 °C durante 30 minutos y realizando una etapa de inactivación de la enzima a 60 °C durante 5 minutos. La ligación se realizó utilizando una relación molar 1:3 vector:inserto, en buffer T4 1X (Thermo Scientific #B69) con 1,25 U de la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific #EL0011) cada 50 ng de vector, desarrollándose la reacción a 37 °C durante 3 horas con una etapa de inactivación de la enzima a 70 °C durante 5 minutos. El producto de ligación fue transformado en células *E. coli* DH5- α y plaqueado en placas de LB agar-kanamicina.

3.8.2 Clonado de los nanobodies en el vector pINQ-Bis

Los nanobodies anti-aztreonam y anti-omalizumab fueron clonados en el vector pINQ-Bis de forma tal que permitiría la expresión del biespecífico con el nanobody anti-aztreonam en la posición amino-terminal y el anti-omalizumab en la posición carboxilo-terminal. Se realizó en primer lugar el clonado del gen del nanobody anti-omalizumab, para lo cual su secuencia fue amplificada mediante PCR utilizando el cebador directo Forward 2nd bis y el cebador reverso Reverse 2nd bis, que incorporan al amplicón sitios de restricción para las enzimas SpeI y XhoI respectivamente. El amplicón (purificado mediante el kit comercial GeneJET PCR Purification) y el vector (obtenido según se describe en el punto anterior) fueron digeridos en forma secuencial utilizando las enzimas SpeI y XhoI. Se realizó en primer lugar una digestión en buffer Tango 1X (Thermo Scientific #BY5), con 10 U de SpeI (Thermo Scientific #ER1251) por microgramo de ADN, a 37 °C durante 4 horas. Los productos de digestión fueron purificados mediante el kit comercial GeneJET PCR Purification, y a continuación se llevó a cabo una segunda digestión en buffer R 1X (Thermo Scientific #BR5), con 10 U de XhoI (Thermo Scientific #ER0691) por microgramo de ADN, desarrollándose la reacción en las mismas condiciones que la anterior pero incluyendo además un paso de inactivación de la enzima a 80 °C durante 20 minutos. Los productos de digestión fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction. La desfosforilación del vector, la ligación y la posterior transformación se realizaron según se describe en el punto anterior.

Para verificar el correcto clonado del nanobody anti-omalizumab se llevó a cabo una PCR de colonia seguida de la digestión del amplicón con las enzimas HaeIII y MvaI, y posteriormente visualización de los productos de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa. Para la PCR de colonia se resuspendieron colonias aisladas en 100 μ L de agua de calidad para biología molecular, de la cual se tomaron 5 μ L como molde para realizar reacciones de PCR (ver sección 3.3.3) utilizando cebadores Forward 2nd bis y Reverse 2nd bis.

Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit comercial GeneJET PCR Purification y se sometieron a digestión de manera independiente con las enzimas HaeIII (Thermo Scientific #ER0151) y MvaI (Thermo Scientific #ER0551), constanding cada mezcla de reacción de buffer R 1X y 1 U de la enzima correspondiente cada 60 ng del producto de PCR purificado. Las reacciones se llevaron a cabo incubando a 37 °C durante 1 hora. Los patrones de digestión fueron visualizados realizando una electroforesis en gel de agarosa 4% y comparados con el marcador de peso molecular GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific #SM1211). Por otra parte, el patrón de digestión esperado se predijo *in silico* utilizando el

programa SnapGene. Los clones con el correcto clonado fueron crecidos en cultivos de 2 mL de LB-kanamicina ON para extraer el ADN plasmídico.

A continuación se realizó el clonado del gen del nanobody anti-aztreonam, para lo cual se amplificó su secuencia mediante PCR utilizando el cebador directo 5 y el cebador reverso 6. El clonado procedió con la digestión del vector y el inserto y la ligación de ambos productos, en las condiciones descritas en el punto anterior. El resultado final del clonado fue verificado mediante secuenciación, como se describe en la sección 3.3.5.

3.9 Expresión de proteínas recombinantes

3.9.1 Evaluación de la expresión de nanobodies y nanobody biespecífico en cultivos de pequeña escala

Células *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido de interés se crecieron al inocular colonias aisladas (o cultivos almacenados del bloque maestro) en cultivos de 2 mL de LB-kanamicina. El cultivo fue incubado hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,5$ UA, tras lo cual se agregó IPTG 10 μ M y se incubó ON a 28 °C. Al día siguiente se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó a 17000g durante 1 minuto, descartando el sobrenadante e incubando el pellet con 200 μ L del reactivo de lisis celular B-PER™ (Thermo Scientific #78243) durante 20 minutos. Se realizó una centrifugación a 15000g durante 5 minutos para recuperar en el sobrenadante y en el pellet las proteínas que constituyen el material soluble e insoluble de las células, respectivamente. Las fracciones solubles fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE.

3.9.2 Expresión a gran escala de nanobodies biotinilados

Células *E. coli* BL21(DE3)-pBir transformadas con los plásmidos correspondientes a cada nanobody se crecieron al inocular colonias aisladas en 2 mL de LB-kanamicina-cloranfenicol suplementado con glucosa 4%, ON a 37 °C. Al día siguiente se realizó una dilución 1/100 del cultivo en 200 mL de LB-kanamicina-cloranfenicol suplementado con biotina 100 μ M y arabinosa 0,04% y se incubó hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,5$ UA. En esta instancia se indujo la expresión del nanobody mediante el agregado de IPTG 10 μ M, y la misma procedió ON a 28 °C, con agitación a 250 rpm. Al día siguiente se realizó la lisis celular y post-biotinilación, para lo cual se centrifugó el cultivo a 5000g durante 10 minutos y se resuspendieron las células en 20 mL de PBS suplementado con biotina 1 mM. Se realizó un ciclo de congelado/descongelado (a -80 °C y en baño a 37 °C respectivamente) seguido de sonicación (15 minutos, potencia 80%, pulso de 30 ms). La reacción de post-biotinilación procedió durante 2 horas bajo agitación a 37 °C y finalmente se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a 20000g durante 30 minutos. El nanobody fue purificado a partir de este sobrenadante mediante cromatografía de afinidad (ver sección 3.10.1).

3.9.3 Expresión a gran escala del nanobody biespecífico

Se procedió de forma similar a la expresión de nanobodies biotinilados descrita en el punto anterior, las modificaciones en el protocolo responden a que en este caso el nanobody biespecífico no fue biotinilado. La expresión de estos nanobodies se realizó a partir de cultivos

de células BL21(DE3) transformadas con el plásmido de interés en medio de cultivo LB-kanamicina.

La lisis celular se realizó según el protocolo de shock osmótico reportado por Olichon, A. et al. (⁵⁴). Se centrifugó el cultivo a 5000g durante 10 minutos y las células fueron resuspendidas en 1 mL de buffer TES. La suspensión fue congelada a -80 °C y descongelada en hielo, posteriormente se le agregó 1 mL de buffer TES y fue incubada en hielo durante 30 minutos. El paso final de la lisis consistió en inducir el shock osmótico suplementando la suspensión celular con 3 mL de una dilución 1/4 de buffer TES e incubar en hielo durante 30 minutos. Mediante una centrifugación a 20000g durante 30 minutos se eliminaron los restos celulares, y se recuperó el sobrenadante a partir del cual el nanobody biespecífico fue posteriormente purificado mediante cromatografía de afinidad (ver sección 3.10.1).

3.10 Purificación de nanobodies

3.10.1 Purificación de nanobodies y nanobody biespecífico por cromatografía de afinidad

La purificación de nanobodies se llevó a cabo utilizando una columna de Ni-NTA (HisTrap HP, GE Healthcare) en el equipo AKTA *purification system* (GE Healthcare), en virtud de la cola 6xHis incorporada en los nanobodies por los vectores de expresión utilizados.

La columna cromatográfica fue equilibrada con buffer de equilibrio (buffer A), y a las fracciones a purificar se les agregó imidazol a concentración final 20 mM y NaCl a concentración final 300 mM, de forma de igualar las concentraciones de estos componentes en dicho buffer. Luego de la inyección de la muestra en la columna se realizó un lavado con aproximadamente 5 mL de buffer A, seguido de etapas adicionales de lavado con adición gradual de buffer de elución (buffer B), aumentando la concentración de imidazol a 39 y 68 mM. Finalmente, la elución se realizó con 116 mM de imidazol. Durante el proceso la presencia de proteína fue monitoreada en forma continua por absorbancia a 280 nm.

Luego de la purificación las fracciones de interés fueron dializadas ON utilizando membranas de cutoff de 13 kDa (Sigma-Aldrich) en 4 L de PBS a 4 °C en agitación, realizando un cambio de buffer al día siguiente e incubando durante 4 horas más en las mismas condiciones. El contenido proteico de las fracciones fue visualizado por electroforesis SDS-PAGE (ver sección 3.3.7) y cuantificado utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) (ver sección 3.3.6).

3.10.2 Purificación de nanobodies y nanobody biespecífico por cromatografía de exclusión molecular

Previo a esta purificación las proteínas fueron concentradas utilizando tubos concentradores con un cutoff de 9 kDa (Thermo Scientific #89884A) hasta alcanzar un volumen igual o menor a 250 µL. La purificación se realizó utilizando una columna Superose 12 HR 10/30 (Amersham) con un rango de resolución óptimo entre 1000 y 300000 Da, en el equipo AKTA *purification system*. La columna fue equilibrada con PBS o PBS-Tween 0,2% según el caso, y a partir del momento de inyección de la muestra la presencia de proteína fue monitoreada en forma

continua por espectrofotometría a 280 nm. Posteriormente la concentración de proteínas presente en las fracciones fue determinada utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) (ver sección 3.3.6) y las mismas fueron visualizadas por electroforesis SDS-PAGE (ver sección 3.3.7).

Para poder estimar el peso molecular correspondiente a cada pico obtenido, se realizó una curva de calibración utilizando los estándares de peso molecular que se detallan en la **Tabla 3.2**, preparando la solución en PBS. Para construir la curva de calibración se utilizó el coeficiente de distribución K_{av} , definido como:

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

Donde V_e es el volumen de elución, V_t el volumen total de la columna y V_0 el volumen de exclusión de la columna, determinado como el volumen al que eluye el azul dextrano, una molécula de gran tamaño por fuera del intervalo de resolución. K_{av} es graficado en función del $\log(\text{PM})$ para obtener la curva de calibración, y determinando K_{av} para las proteínas de interés este valor puede interpolarse para obtener una medida de su peso molecular.

Tabla 3.2 | Estándares de peso molecular utilizados en la elaboración de la curva de calibración para la cromatografía de exclusión molecular.

Estándar	Peso molecular (kDa)
Azul dextrano	2000
Tiroglobulina	660
Ferritina	440
Aldolasa	160
Ovoalbúmina	45
Quimiotripsinógeno A	25,6
Ribonucleasa	13,7

3.11 Evaluación de la reactividad por ambos antígenos del nanobody biespecífico

En un primer ensayo, se comparó la reactividad de los nanobodies individuales con la del biespecífico contra cada uno de los antígenos, KLH-aztreonam y omalizumab. Para esto se realizaron ensayos de ELISA en placas sensibilizadas con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada antígeno, sobre las que se incubaron diluciones seriadas por triplicado de los nanobodies cubriendo el rango de concentración de 0,004 a 25 nM. Dado que las construcciones de los nanobodies individuales y biespecífico incluían una cola de poli-histidina, se realizó el revelado del ensayo incubando con una dilución 1/10000 de anticuerpo anti-His-PO (Abcam #ab1187) y posteriormente con la solución sustrato-PO durante 5 minutos.

Un segundo ensayo de ELISA fue realizado para verificar la funcionalidad de ambos nanobodies del biespecífico y demostrar su aplicabilidad como calibrador. En este caso se incubaron por triplicado diluciones seriadas del nanobody biespecífico cubriendo un rango de concentración entre 0,004 y 8,3 nM sobre pocillos de ELISA sensibilizados con KLH-aztreonam 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente se realizó una incubación con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de omalizumab para promover su unión al extremo libre del biespecífico, y finalmente la unión fue revelada utilizando una

dilución 1/10000 de un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa, seguido de la adición de solución sustrato-PO durante 5 minutos.

3.12 Análisis de la correlación entre la señal producida por el calibrador biespecífico y la de un suero artificial con anticuerpos anti-aztreonam

Se realizó un ensayo ELISA para comparar el comportamiento del nanobody biespecífico con el de un suero artificial anti-aztreonam generado por la empresa Dr. Fooke Laboratorien²²²²²¹. Este suero fue previamente caracterizado mediante el método de calibración heteróloga, por lo cual se conoce su concentración de IgE específica en IU/mL.

Para correlacionar la señal producida por el calibrador biespecífico con la del suero artificial, se incubaron por triplicado diluciones seriadas 3/5 de este suero (cubriendo un rango de concentración entre 0,03 y 8,5 IU/mL) y del nanobody biespecífico (cubriendo un rango de concentración entre 0,003 y 1 nM) sobre pocillos de ELISA sensibilizados con KLH-aztreonam 2 µg/mL. Posteriormente se adicionó omalizumab 10 µg/mL, el cual establece una interacción específica tanto con la región Fc de IgE presente en el suero artificial como con el nanobody biespecífico. Finalmente esta unión fue revelada utilizando una dilución 1/10000 de anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa, seguido de la incubación con la solución sustrato-PO durante 5 minutos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de nanobodies específicos contra el determinante antigénico de aztreonam

El proyecto en el cual se enmarca esta tesina tiene como uno de sus principales objetivos el desarrollo de calibradores para inmunoensayos serológicos de detección de IgE que reconozca específicamente determinantes antigénicos derivados de antibióticos beta-lactámicos. Para llevar esto a cabo, se cuenta con una biblioteca de fagos filamentosos que presentan nanobodies en su superficie, construida a partir de los linfocitos B de una llama que fue inmunizada con el anticuerpo monoclonal omalizumab y los distintos determinantes antigénicos. Esta biblioteca constituye el punto de partida para la obtención de los nanobodies a ser incorporados en los calibradores.

4.1.1 Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-aztreonam inducida en la llama inmunizada

La construcción de la biblioteca se inició con la extracción de sangre de la llama una vez que el animal desarrolló una respuesta de anticuerpos suficiente contra los antígenos de interés. Para evaluar la evolución de esta respuesta, se analizaron sueros extraídos periódicamente durante el proceso de inmunización mediante ensayos de ELISA que permitieron medir la respuesta de anticuerpos contra los determinantes antigénicos (antibióticos conjugados a KLH) inmovilizados en las placas. Al evaluar la respuesta de anticuerpos anti-aztreonam, se obtuvo que el título de anticuerpos (definido como el factor de dilución del suero que da lugar al 50% de la señal máxima) en el suero pre-inmune (día 0) fue $4,1 \times 10^2$, el mismo ascendió a $3,2 \times 10^3$ el día que se administró el booster (día 16) y a $1,5 \times 10^4$ en el día 37. Al día 80 luego de la primera inmunización se realizó la última extracción, obteniendo un título de anticuerpos de $2,0 \times 10^4$, indicando que se había alcanzado una saturación dado que el valor se había mantenido prácticamente constante desde el día 37 (**Figura 4.1**). Esta última extracción también fue evaluada contra la proteína KLH (utilizada como carrier del antibiótico de interés), obteniéndose un título de $5,6 \times 10^2$, notoriamente inferior al obtenido para el conjugado, permitiendo concluir que los anticuerpos titulados efectivamente reconocían al determinante antigénico y no a la proteína carrier. El título obtenido para la extracción final reflejó una muy buena respuesta de anticuerpos, y dado que además se obtuvieron resultados similares para otros determinantes, se procedió a la construcción de la biblioteca.

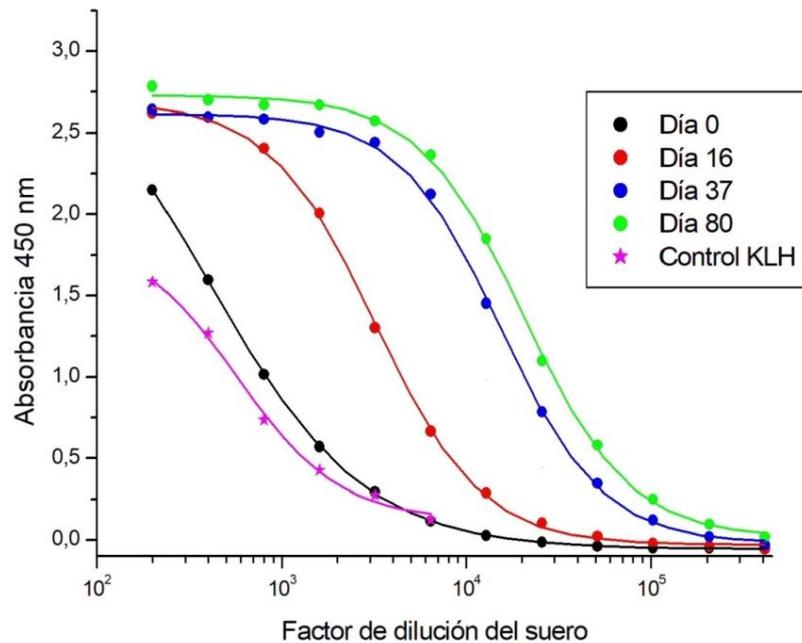


Figura 4.1 | Titulación de anticuerpos totales contra aztreonam en sueros de llama inmunizada con HSA-aztreonam. La titulación se realizó mediante un ELISA en que se sensibilizó una placa con KLH-aztreonam, posteriormente se incubaron los sueros, y se reveló el ensayo utilizando un suero de conejo con anticuerpos anti-llama y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa. Se incluyó un control en que se tituló el suero del día 80 sobre pocillos sensibilizados con KLH.

4.1.2 Panning y screening para la selección de nanobodies específicos contra el conjugado KLH-aztreonam

A partir de la biblioteca generada, que presentaba un valor de diversidad de 2×10^8 y un título de fagos de 2×10^{12} ufc/mL, se seleccionaron clones de fagos que expresaran nanobodies anti-aztreonam mediante un proceso de panning. El mismo consistió en la incubación de la biblioteca de fagos en pocillos de ELISA sobre los cuales se había inmovilizado el conjugado KLH-aztreonam. Dado que se trata de un conjugado distinto al HSA-aztreonam que fue utilizado para la inmunización de la llama, se promovió la inmovilización de aquellos clones que reconocieran específicamente el determinante antigénico. Al cabo de la incubación y luego de lavados exhaustivos los fagos unidos fueron eluidos mediante la acción de tripsina. Este primer eluido (output) de fagos presentó un título de $2,1 \times 10^6$ ufc/mL, y fue amplificado para realizar una segunda ronda de selección con el objetivo promover el enriquecimiento de clones específicos contra el antígeno de interés. El segundo output presentó un título de $5,6 \times 10^5$ ufc/mL, y si bien no representó un aumento respecto al título del primero, se procedió a identificar clones con reactividad anti-aztreonam desde el segundo output (screening).

Para el screening se tomaron 10 colonias aisladas que habían crecido en placas de LB agar luego de infectar células con el segundo output. Cada colonia se creció de forma independiente en condiciones que promovían la expresión de los nanobodies y los sobrenadantes de cultivo fueron analizados mediante ELISA, donde se evaluó la reactividad de los nanobodies contra el determinante antigénico de aztreonam y sus reactividades cruzadas contra los determinantes de meropenem, penicilina G, amoxicilina y ceftriaxona. Para ello cada sobrenadante se incubó en pocillos sensibilizados con los distintos antígenos, la unión

nanobody-antígeno fue revelada con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (siendo HA un péptido expresado como etiqueta en los nanobodies). Los 10 clones analizados presentaron reactividad contra KLH-aztreonam pero no contra KLH (**Figura 4.2**), indicando que eran clones específicos contra el determinante antigénico. A su vez se observaron diferencias en los niveles de señal entre clones, las cuales pueden ser el resultado de diferencias en la afinidad y/o en los niveles de expresión de los nanobodies. La mayoría de los clones presentaron un bajo nivel de reactividad cruzada con el determinante antigénico de penicilina G, y ninguno presentó reactividad contra el resto de los determinantes.

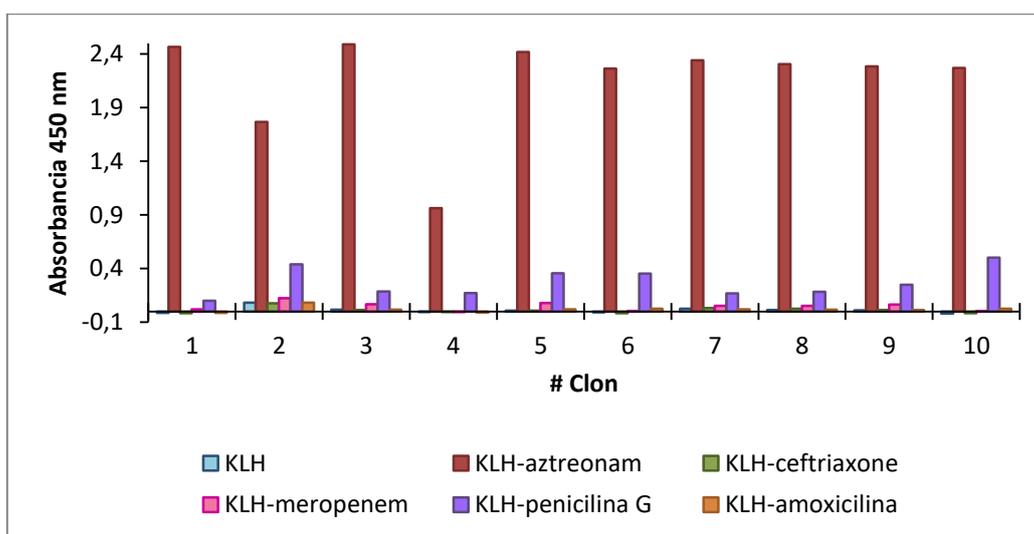


Figura 4.2 | Screening de clones anti-aztreonam. El screening se realizó incubando sobrenadantes de cultivo de cada uno de los clones en pocillos de ELISA sensibilizados con los distintos antígenos, y revelando el ensayo con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa.

4.1.3 Selección del nanobody anti-aztreonam a utilizar en el calibrador

La secuenciación de los 10 clones incluidos en el screening reveló que se trataba de 6 clones diferentes (**Figura 4.3**). Cinco de ellos presentaron la secuencia de aminoácidos GLEW, ubicada cerca del final del FR2, indicando que se trata de dominios de tipo VH soluble en lugar de VHH, mientras que un solo clon (clon 6) fue identificado como VHH. Si bien es sorprendente la alta frecuencia de clones derivados de VH considerando que sólo son aproximadamente el 10% de los HcAbs, esta diferencia no fue considerada a la hora de seleccionar el nanobody, dado que ambos tipos de dominio provienen de HcAbs y por lo tanto pueden ser igualmente funcionales en forma aislada³⁶.

Para profundizar en el estudio de la reactividad anti-aztreonam de los 6 clones identificados, los sobrenadantes utilizados en el screening fueron analizados en un ensayo de ELISA de titulación, para el cual se incubaron diluciones seriadas de cada sobrenadante en pocillos sensibilizados con KLH-aztreonam para titularlos. Extrañamente, los clones 2 y 4 no mostraron reactividad (**Figura 4.4**); en cuanto al resto, el clon 1 mostró el mayor título (factor de dilución del sobrenadante que da lugar al 50% de la señal máxima) con un valor de $1,8 \times 10^3$, por lo cual fue seleccionado para utilizar en la construcción del nanobody biespecífico a ser aplicado como calibrador.

FR1	CDR1	FR2	CDR2
01-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	GFTFSRYQ	MAWVRKEPGK GLEW VS	TIRGDGITT
02-Q...Q.....A. .A.N.W .Y...QA.....	A..N.W	.Y...QA.....	A.ST..G..
03-Q...Q.....L.....E.....	..L.....E.....	.M...ET.A
04-.....A.S.Y .H...QA.....S.Y	.H...QA.....	RV.PG.GI.
06-Q...Q.....VA. ...VNSIG	...VNSIG	IG.F.QA...ER.G..	CVSR-FSR.
07-Q...Q.....S...E.....S...E.....S...E.....

FR3	CDR3	FR4
01-YYADSVKGRFTISRDNGENMIYLMNNLKSEDTAVYYC	ARPSWPYSSSWRGSSWSYDHY	RGQGTQTVVSS (3)
02-...E.M.....AK.TL.....S.....	.NS---G...L.RPFG---	W..... (2)
03-.....D..M.....	...R..... (2)
04-T...FA.....AN.TL.....P...R...	.AA-----LDYVF.---	W..... (1)
06-..E.....I.....AKSTV.....D..P.....	.TV.----CRPV.FESGPPN.	W..... (1)
07-.....L.....	.KAR..... (1)

Figura 4.3 | Secuencias aminoacídicas presentes en los 10 clones anti-aztreonam analizados en el screening. Se denota con un punto (.) a los aminoácidos conservados en referencia al clon 1, y con un guión (-) la ausencia de aminoácidos. Al final de cada secuencia se indica entre paréntesis la frecuencia con la cual se observó. Se resalta en amarillo la secuencia aminoacídica GLEW presente en la región FR2.

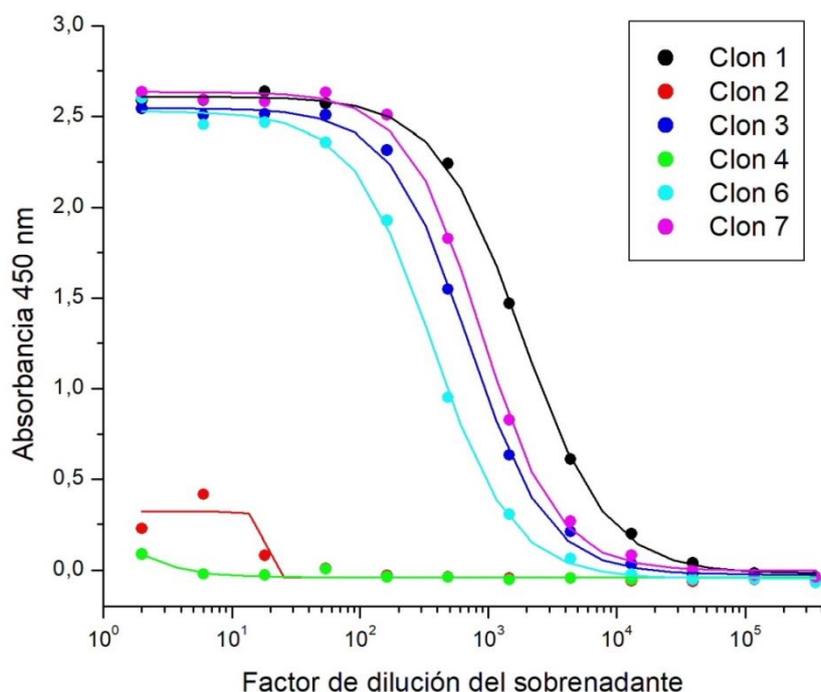


Figura 4.4 | Titulación de 6 clones de nanobodies anti-aztreonam presentes en los sobrenadantes de cultivo. El ensayo se realizó sobre pocillos de ELISA sensibilizados con KLH-aztreonam, incubando diluciones seriadas de los sobrenadantes y revelando el ensayo con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa.

4.1.4 Clonado del nanobody anti-aztreonam en el vector pINQ-BtH6 y evaluación del nivel de expresión

Si bien el nanobody anti-aztreonam fue seleccionado con el fin de incorporarlo en una construcción biespecífica, era de interés producirlo como reactivo mono-específico para

utilizarlo como referencia a la hora de evaluar eventuales variaciones en su reactividad al expresarlo en el formato biespecífico. Para esto la secuencia del nanobody del clon 1 fue clonada en el vector de expresión fuerte pINQ-BtH6. Éste permite la expresión del nanobody fusionado en el extremo carboxilo terminal a una cola de poli-histidina y al péptido AviTag™, que permite la biotilación de la proteína durante su expresión.

A fin de evaluar el nivel de expresión del nanobody se indujo la misma en un cultivo de 2 mL, determinándose que podía ser expresado en la fracción soluble del extracto bacteriano realizando una inducción del cultivo a una $DO_{600nm} = 0,5$ UA con IPTG 10 μ M, ON a 28 °C (**Figura 4.5**). Dado que había una cantidad considerable de proteína de interés soluble, se usaron estas mismas condiciones para realizar una expresión a mayor escala y purificación del nanobody.

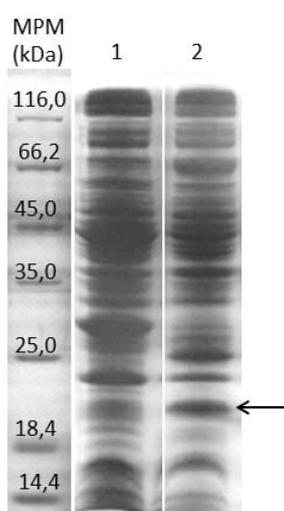


Figura 4.5 | Electroforesis SDS-PAGE de la fracción soluble de extractos de cultivo evaluando la expresión del nanobody anti-aztreonam. Carril 1: Cultivo de células BL21(DE3) sin transformar. Carril 2: Cultivo inducido con IPTG 10 μ M ON a 28 °C para la expresión del nanobody anti-aztreonam. Se señala la banda correspondiente al nanobody con una flecha negra.

4.1.5 Expresión a gran escala del nanobody anti-aztreonam

El nanobody fue producido en un cultivo de 200 mL y purificado mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni-NTA. La fracción principal de purificación fue analizada mediante electroforesis SDS-PAGE, observándose que el nivel de pureza obtenido no fue tan bueno como se esperaba (**Figura 4.6**), presentando varias bandas correspondientes a contaminantes. Dado que se apuntaba a usar a esta proteína como una herramienta comparativa frente al nanobody biespecífico, se decidió mejorar su pureza realizando una purificación adicional mediante cromatografía de exclusión molecular.

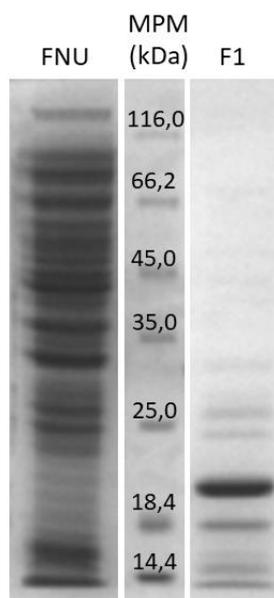


Figura 4.6 | Electroforesis SDS-PAGE del resultado de la purificación del nanobody anti-aztreonam. La purificación fue realizada por cromatografía de afinidad en una columna de Ni-NTA, eluyendo la proteína con imidazol 116 mM. FNU: Fracción No Unida, F1: fracción principal colectada durante la purificación.

La cromatografía de exclusión molecular se realizó en columna de matriz sefarosa y rango de resolución óptimo entre 1000 y 300000 Da y se estimó el peso molecular del nanobody utilizando una curva de calibración generada a partir de los volúmenes de elución de distintos estándares de peso molecular conocido (**Figura 4.7**). El cromatograma correspondiente a la purificación del nanobody anti-aztreonam mostró un pico principal a un volumen de elución de 14,74 mL (**Figura 4.8A**), que de acuerdo a la curva de calibración corresponde a un peso molecular de 17,7 kDa, muy cercano al valor de 17,9 kDa correspondiente al peso esperado del nanobody. Esto mostró que este nanobody existe en forma monomérica, descartando la formación de dímeros que con cierta frecuencia se observa con algunos nanobodies. Se observaron además en el cromatograma pequeños picos correspondientes a contaminantes que pudieron ser separados del pico principal. Al analizar las fracciones eluidas mediante electroforesis SDS-PAGE se pudo observar que la proteína había sido obtenida con mayor pureza al verse disminuido el número de bandas contaminantes (**Figura 4.8B**). Como resultado de la expresión y de esta doble purificación, la producción de nanobody anti-aztreonam tuvo un rendimiento bajo, estimado en 0,8 mg por litro de cultivo.

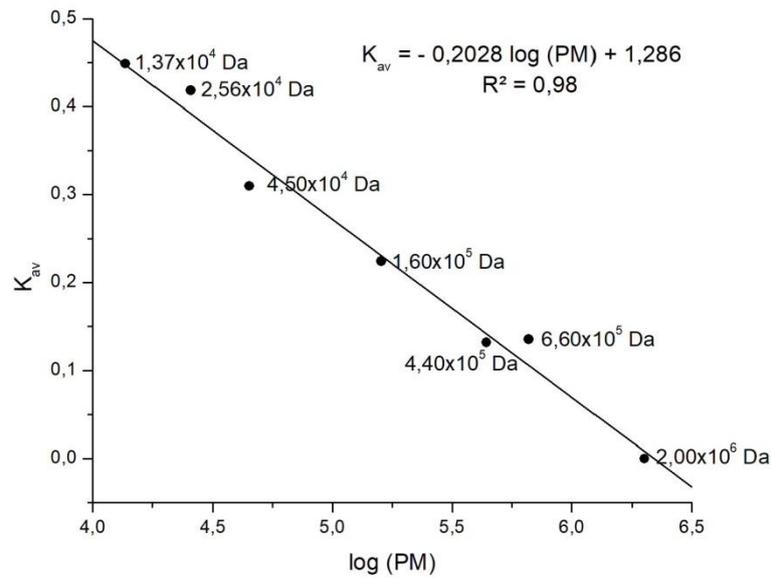


Figura 4.7 | Curva de calibración para determinar pesos moleculares a partir de volúmenes de elución en la cromatografía de exclusión molecular. Se grafica, en función del log (PM), el coeficiente de distribución K_{av} , definido como $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, donde V_e es el volumen de elución, V_t el volumen total de la columna y V_0 el volumen de exclusión de la columna.

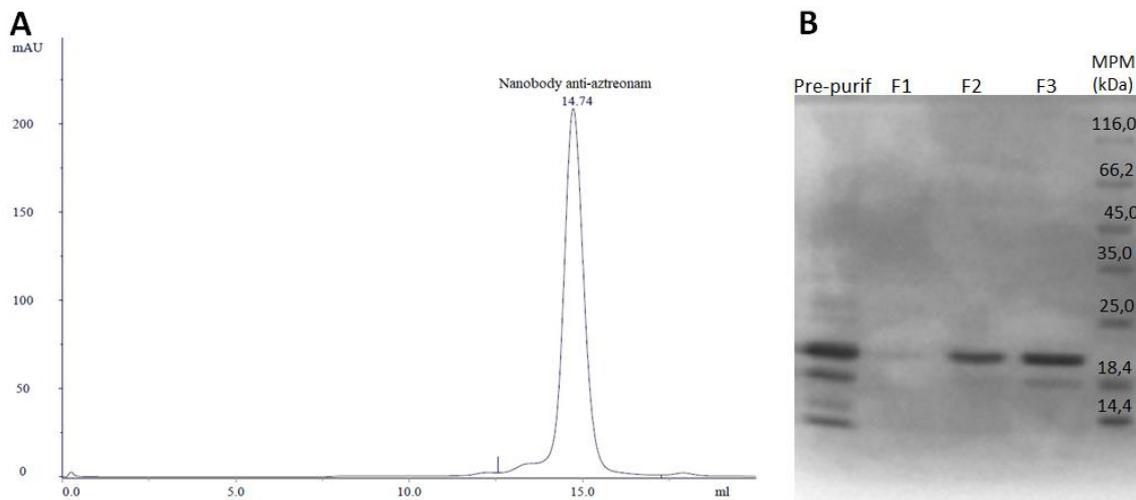


Figura 4.8 | Purificación del nanobody anti-aztreonam mediante cromatografía de exclusión molecular en PBS. **A)** Cromatograma. **B)** Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones de purificación obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular del nanobody anti-aztreonam. Pre-purif: fracción resultante de la purificación por cromatografía de afinidad, que fue inyectada a la columna de exclusión molecular; F1, F2, F3: Fracciones 1, 2 y 3 recolectadas durante la purificación.

4.2 Selección de nanobodies específicos contra el parátipe del anticuerpo omalizumab

Los calibradores son expresados en forma recombinante a partir de una construcción génica compuesta por un nanobody que reconoce el parátipe de omalizumab y otro que reconoce el determinante antigénico. Esto implica que mediante el clonado de diferentes nanobodies en tándem con el anti-omalizumab pueden generarse calibradores para ensayos de detección de IgE específica contra distintos determinantes antigénicos. Por esta razón, la selección de un clon anti-omalizumab de alta afinidad y con un buen nivel de expresión fue de particular interés en este trabajo.

4.2.1 Selección por panning e identificación de clones productores de nanobodies específicos contra omalizumab

La selección de nanobodies anti-omalizumab se realizó previo a esta tesina mediante 2 rondas iterativas de selección por panning diseñadas con el fin de promover el enriquecimiento de clones específicos contra el parátipe. Con este objetivo el panning se realizó en forma similar al descrito para KLH-aztreonam, con la adición de un paso previo de pre-adsorción de la solución de fagos en pocillos sensibilizados con una mezcla de inmunoglobulinas humanas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgA) para promover la remoción de fagos reactivos contra los dominios conservados de inmunoglobulinas. Finalizado el panning se extrajo el ADN proveniente del pool de fagos de la segunda elución (output 2), se aislaron los genes de nanobodies específicos y se clonaron en el vector de expresión pINQ-BtH6. Ya en el marco de esta tesina, se transformaron células BL21(DE3) con el producto de ligación, obteniéndose colonias aisladas de las cuales se tomaron 89 y se crecieron de forma independiente en condiciones que promovían la expresión de los nanobodies y la biotilación de los mismos.

Se realizó el screening analizando diluciones seriadas 1/10 de los extractos celulares de los cultivos, al incubarlos en ensayos de ELISA con omalizumab inmovilizado y revelando con estreptavidina conjugada a peroxidasa. En este ensayo se observó que, de los 89 clones, al menos 84 fueron reactivos contra omalizumab (**Figura 4.9**), indicando que el material de partida de la biblioteca y las estrategias de selección por panning utilizadas habían sido adecuados. El efecto de las diluciones seriadas permitió identificar a 34 clones con mayor reactividad (indicados en la **Figura 4.9**), en base a la intensidad de señal obtenida para la dilución 1/10⁷. Esta elevada reactividad es indicativa de altas afinidades, altos niveles de expresión o ambas características para los nanobodies, y por lo tanto estos fueron seleccionados para continuar con los ensayos subsiguientes.

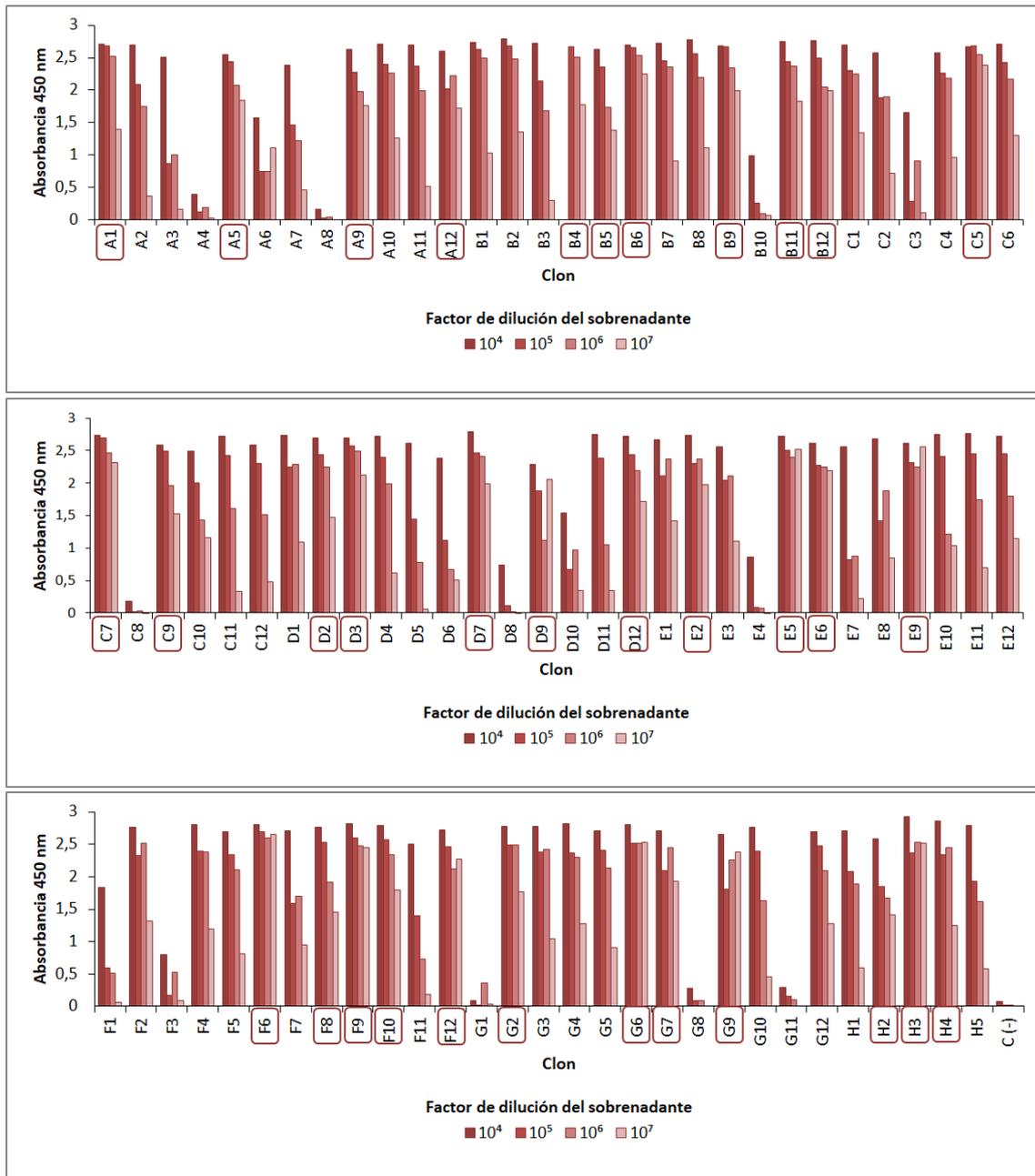


Figura 4.9 | Screening de 89 clones anti-omalizumab. Se incubaron diluciones seriadas de los sobrenadantes que contienen nanobodies biotinilados en pocillos de ELISA sensibilizados con omalizumab, y se reveló el ensayo con estreptavidina conjugada a peroxidasa. Se incluyó como control negativo un sobrenadante proveniente de un cultivo sin inocular. Se indican con un recuadro los 34 clones que fueron seleccionados por presentar una alta señal en la dilución 1/10⁷.

4.2.2 Evaluación de reactividad cruzada de nanobodies anti-omalizumab contra inmunoglobulinas humanas

Para la selección del nanobody anti-omalizumab a ser implementado en el calibrador fue necesario descartar los clones que no reconocieran específicamente el parátipe de este anticuerpo. Con este objetivo, se realizó un ensayo de reactividad cruzada contra otras inmunoglobulinas humanas, en particular la subclase IgG1 a la cual pertenece omalizumab.

Los sobrenadantes de los 34 clones elegidos en base al ensayo anteriormente descrito fueron analizados en una dilución 1/50 sobre pocillos de ELISA sensibilizados con distintas clases y subclases de inmunoglobulinas humanas. No se observó reactividad cruzada para ninguno de los clones (**Figura 4.10**), indicando que los epítopes reconocidos por todos los nanobodies se encontraban en el parátipo de omalizumab y por lo tanto no fue posible discriminarlos utilizando este criterio. Este resultado era esperado ya que la estrategia de panning se había diseñado con el objetivo de favorecer el enriquecimiento de clones con esta especificidad.

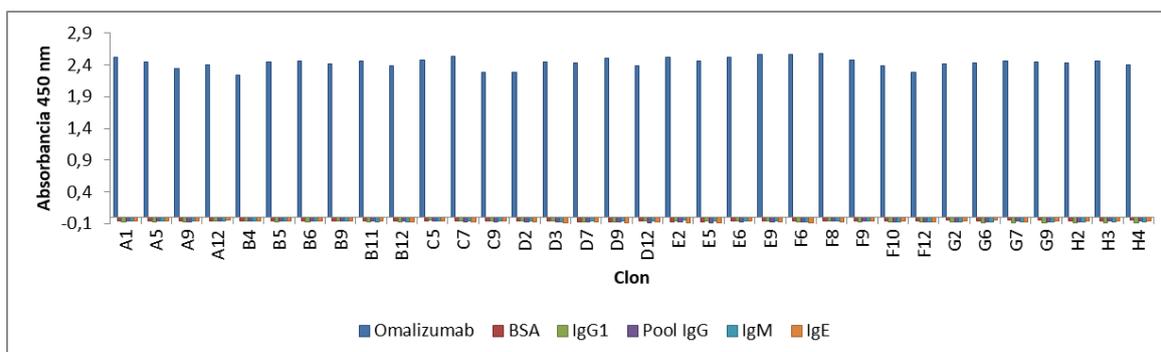


Figura 4.10 | Reactividad cruzada de 34 clones seleccionados anti-omalizumab contra inmunoglobulinas humanas. Se sensibilizaron pocillos de ELISA con omalizumab, BSA, IgG1, pool de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgM e IgE. El ensayo se reveló con estreptavidina conjugada a peroxidasa.

4.2.3 Evaluación de la afinidad y el nivel de expresión de nanobodies anti-omalizumab

Dado que 34 era un número de clones muy alto, se seleccionaron 9 (B6, C5, C7, E5, E6, E9, F6, F9 y G6) en función de la intensidad de señal para la dilución 1/10⁷ del ensayo de screening inicial (**Figura 4.9**), y con el objetivo de continuar su caracterización se determinó mediante secuenciación la diversidad de secuencias presentes en este conjunto de nanobodies. De los 9 clones secuenciados se identificaron 6 secuencias de nanobodies diferentes, que en este caso presentaron los aminoácidos característicos de dominios VHH (**Figura 4.11**).

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
B6	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLS	CAAS	GSISGVN--A	MAWYRQAPGKQREI
C5	..K.L.T.....	..ASI.--G	.G....V.....	..FTHDN..
E5	...Q.....V..	..GFSF.AMD	.N...P.....I	I. G.TST.N.
E9	...Q.....P	.T.FSG.--VR..	T.TS...A
F6	...Q.....	..FSI.--GR.....	..TS..N.
G6	...Q.....	T..FSI.--	IR.....W..	S.TPS.S.

	FR3	CDR3	FR4		
B6	YLIDGVKGRFTISRDN	AKNTVYLQMN	SLKPEDTAVYFC	YTNTPARG--Y	WGQGTQTVVSS (2)
C5	IYP.S.....V...I.....D.....Y.	.A..WG..--	(1)
E5	KYANS.....T.....Y.	NASL.D.LGV.	G.....	(1)
E9	NYA.S.....R.....Y.	FV.S...P--	(1)
F6	.YA.S.....HDG-.LT...M.....V.	.A..E..P--	(3)
G6	KYVPS.....D.....I.....Y.	NA..E...--	(1)

Figura 4.11 | Secuencias aminoacídicas presentes en los 9 clones anti-omalizumab seleccionados. Se denota con un punto (.) a los aminoácidos conservados en referencia al clon B6, y con un guión (-) la ausencia de aminoácidos. Los aminoácidos característicos de los dominios VHH están enmarcados en rojo.

Se evaluó el nivel de expresión en bacterias de los 6 nanobodies identificados, comparando las cantidades de nanobody presentes en extractos celulares mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 4.12A). Los clones C5, E5, E9 y en particular el F6 se destacaron por sus mayores niveles de expresión. Por otra parte, para comparar la reactividad de estos nanobodies se realizó una titulación de los 6 clones, al incubar diluciones seriadas de extractos celulares con nanobodies biotinilados sobre pocillos de ELISA sensibilizados con omalizumab y revelando el ensayo con estreptavidina conjugada a peroxidasa. Se incluyó un blanco como control negativo y un clon que presentaba una señal débil en ensayos anteriores (B10) para verificar la concordancia de resultados. Los clones B6, C5, E5, E9 y F6 presentaron títulos en el rango entre $6,0 \times 10^4$ y $8,5 \times 10^4$, y algo mayores a G6 cuyo título fue de $3,5 \times 10^4$. Por su parte el clon B10, como era esperado, presentó un título bajo, correspondiente a 10^3 (Figura 4.12B). Como se ha señalado anteriormente, las diferencias en los títulos reflejan diferencias en la afinidad de los nanobodies pero además diferencias en su nivel de expresión, que determina la concentración de los mismos en los extractos. Por lo tanto, los resultados obtenidos en la titulación fueron evaluados en conjunto con los resultados obtenidos en las pruebas de expresión. A partir de esta evaluación se eligieron los clones E5 y E9 por presentar altos títulos y un buen nivel de expresión, y el clon B6 por presentar un alto título a pesar de tener un nivel de expresión bajo, indicando que podría tratarse de un clon de alta afinidad. Estos tres nanobodies fueron expresados a gran escala y purificados para realizar una comparación entre ellos basada exclusivamente en su afinidad.

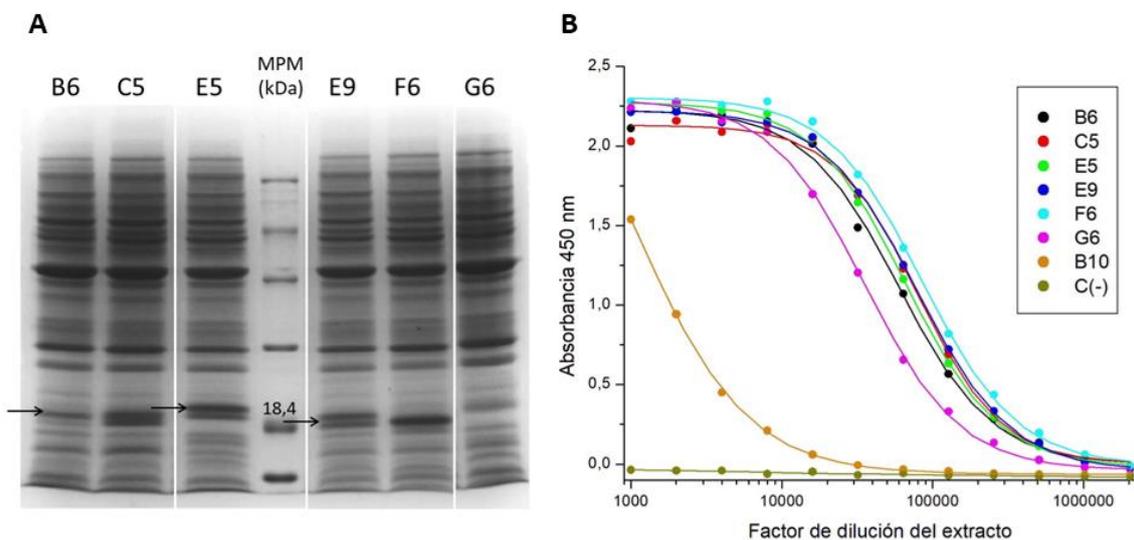


Figura 4.12 | Pruebas de nivel de expresión y titulación de nanobodies anti-omalizumab. A) Electroforesis SDS-PAGE de la fracción soluble de extractos de cultivos en los que se indujo la expresión de los 6 nanobodies anti-omalizumab seleccionados. Se indica con una flecha la banda correspondiente a los nanobodies que fueron seleccionados para expresar a gran escala. **B)** Titulación de los 6 nanobodies en estudio. Como control se agregó un clon que presentó una señal débil en el screening (B10) y una muestra sin nanobody. El ensayo se realizó sobre pocillos de ELISA sensibilizados con omalizumab, revelando la presencia de los nanobodies biotinilados con estreptavidina conjugada a peroxidasa.

4.2.4 Expresión y purificación de los nanobodies B6, E5 y E9 y selección del nanobody anti-omalizumab a utilizar en el calibrador

Se realizó una producción a mayor escala de los nanobodies biotinilados B6, E5 y E9 en cultivos de 200 mL, y los mismos fueron purificados mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni-NTA. Se obtuvieron nanobodies con muy buenos niveles de pureza (**Figura 4.13**) y con los siguientes rendimientos por litro de cultivo: 4,3 mg de B6, 7,5 mg de E5 y 83,5 mg de E9. Disponiendo de estos nanobodies purificados fue posible realizar curvas de titulación con concentraciones iguales de cada uno, de forma de poder comparar las afinidades de los mismos. Para esta comparación se determinó la concentración de cada nanobody que da lugar al 50% de la señal de saturación del ensayo (SC50). El clon E5 resultó ser el de mayor afinidad (**Figura 4.14A**), con un SC50 de 0,020 nM, mientras que para B6 y E9 los valores fueron 0,033 nM y 0,056 nM respectivamente. Por esta razón, el nanobody E5 fue seleccionado para utilizar en la construcción del nanobody biespecífico a ser aplicado como calibrador.

Finalmente, se confirmó que el sitio de unión a omalizumab de estos tres nanobodies correspondiera al parátipe de este anticuerpo. Para esto se realizó un ensayo de inhibición en el cual se co-incubó omalizumab con distintas concentraciones de los nanobodies sobre pocillos sensibilizados con IgE, y se reveló la unión de omalizumab a su antígeno con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa. Los tres nanobodies purificados fueron capaces de inhibir la unión de omalizumab a IgE (**Figura 4.14B**), con valores de IC50 (concentración de nanobody que reduce al 50% la unión de omalizumab a su antígeno) de 0,042 nM, 0,073 nM y 0,199 nM para B6, E5 y E9 respectivamente, indicando que los tres nanobodies se unen al parátipe de omalizumab.

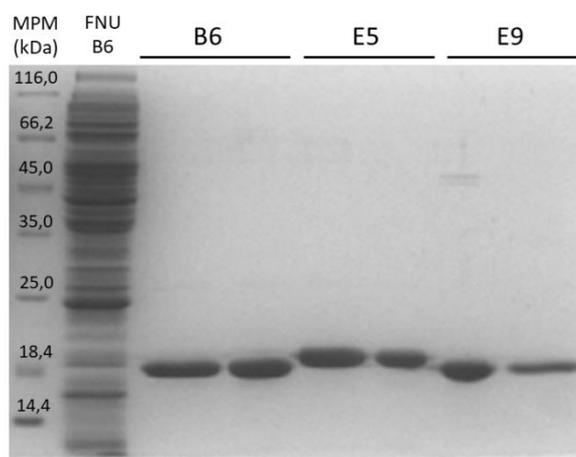


Figura 4.13 | Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la purificación de los nanobodies anti-omalizumab B6, E5 y E9. La purificación fue realizada por cromatografía de afinidad en una columna de Ni-NTA. Cada nanobody fue eluido en dos fracciones que fueron analizadas en carriles separados, la elución se realizó con imidazol 116 mM a excepción de la primera fracción de E9 que fue recolectada con imidazol 68 mM. FNU: Fracción No Unida.

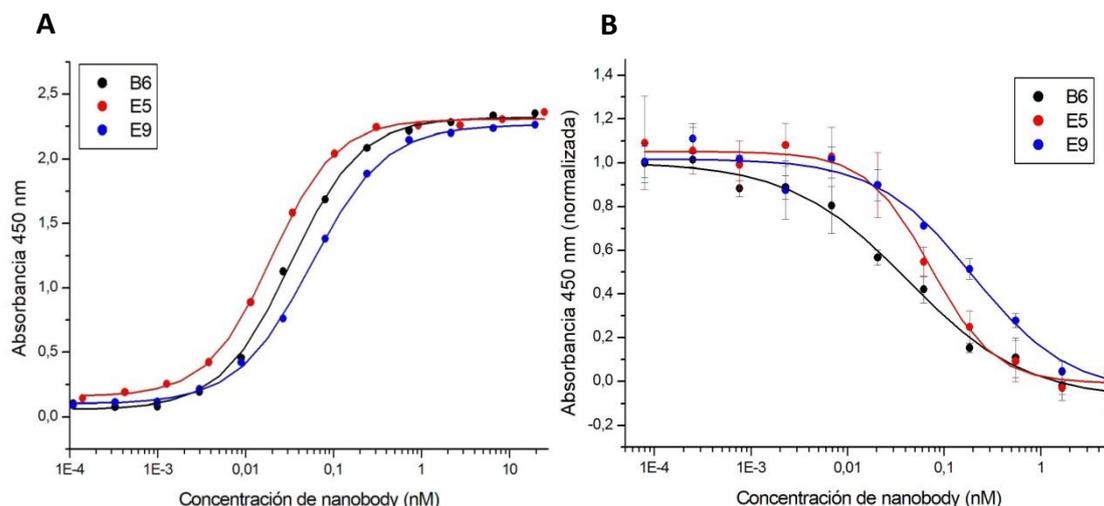


Figura 4.14 | Comparación de los nanobodies anti-omalizumab B6, E5 y E9 mediante ensayos de ELISA.

A) Ensayo de comparación de afinidad, en el cual distintas concentraciones de los nanobodies biotinilados purificados fueron incubadas por duplicado en pocillos de ELISA sensibilizados con omalizumab, y su presencia fue revelada con estreptavidina conjugada a peroxidasa. Se grafica el promedio de duplicados en cada caso. **B)** Ensayos de inhibición de la unión de omalizumab a IgE por la presencia de nanobodies purificados. Omalizumab fue co-incubado con distintas concentraciones de los nanobodies sobre pocillos sensibilizados con IgE, y la unión de omalizumab fue revelada con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa. La señal fue normalizada respecto a la señal máxima (obtenida en ausencia de nanobody). Se grafica el promedio de triplicados y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

4.3 Clonado de los nanobodies en el vector pINQ-Bis para expresión de nanobody biespecífico

Una vez seleccionados los dos nanobodies contra los antígenos de interés, se prosiguió con la ligación de los genes de ambos nanobodies de forma continua (en tándem) en el vector pINQ-Bis, el cual fue diseñado para expresar nanobodies biespecíficos. El gen del nanobody anti-omalizumab fue clonado utilizando las enzimas de restricción *SpeI* y *XhoI*, asegurando mediante el uso de un par de enzimas diferentes el clonado direccional de la secuencia. Para evaluar si el clonado fue exitoso, se realizó la amplificación mediante PCR de los genes de nanobodies en tres colonias que habían sido obtenidas luego de la transformación del producto de ligación en bacterias *E. coli* DH5- α . Cada producto de amplificación fue digerido con las enzimas *HaeIII* y *MvaI* en reacciones independientes, para comparar los patrones de digestión con los patrones teóricos obtenidos de un análisis *in silico*. Este análisis permitió simular el resultado de una electroforesis en gel de agarosa 4% del producto de digestión de las secuencias del nanobody anti-omalizumab y de un nanobody de especificidad irrelevante (nanobody I), el cual se encontraba originalmente en el vector pINQ-Bis (previo al clonado de nanobody anti-omalizumab).

Al realizar una corrida electroforética de los productos de digestión con la enzima *HaeIII* se pudo observar que los clones 2 y 3 presentaron dos fragmentos de 200 y 125 pb que coincidieron con los tamaños esperados generados por la secuencia del nanobody anti-omalizumab (**Figura 4.15**). Complementariamente, la enzima *MvaI* generó un fragmento mayor

a 300 pb para ambos clones, también coincidiendo con el producto esperado de la secuencia del nanobody anti-omalizumab. Contrariamente, el clon 1 mostró para ambas digestiones un patrón similar al esperado para el clon del nanobody I, indicando que se trataba de un producto de transformación con ADN plasmídico original. De esta forma, a pesar de que no todas las bandas predichas *in silico* pudieron visualizarse experimentalmente, los resultados indicaron que los clones 2 y 3 correspondían a un clonado exitoso y por lo tanto podían utilizarse para proceder con la construcción del biespecífico.

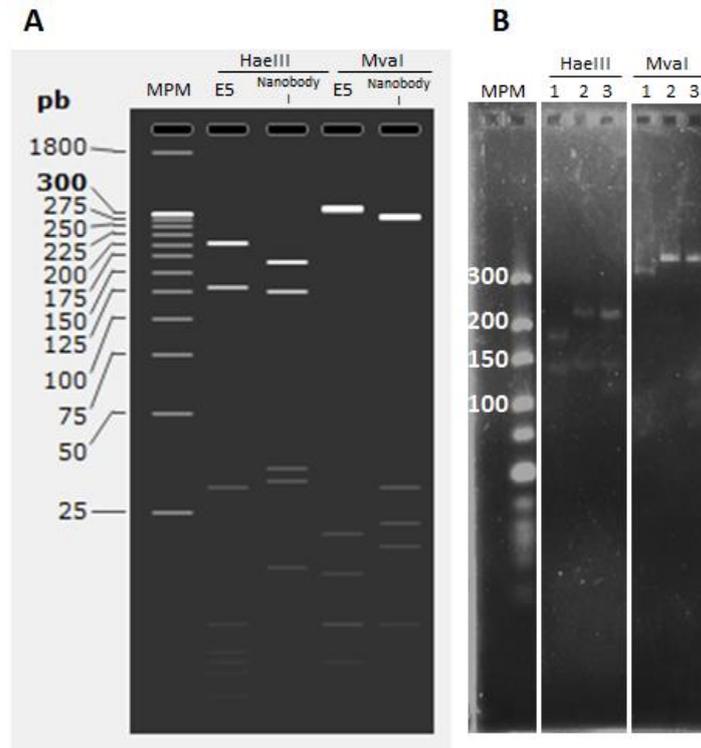


Figura 4.15 | Patrones de digestión con las enzimas HaeIII y MvaI, visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 4%. A) Patrones de digestión *in silico* de las secuencias del nanobody anti-omalizumab y el nanobody I (que ocupaba esa posición previamente en el vector). **B)** Patrones de digestión experimentales de las secuencias amplificadas a partir de la región entre los sitios de restricción de SpeI y XhoI, para tres colonias seleccionadas aleatoriamente.

Se continuó el proceso utilizando el ADN plasmídico obtenido del clon 2, en el cual se incorporó la secuencia del nanobody anti-aztreonam. Se siguió un procedimiento similar al clonado del anti-omalizumab, pero utilizando en este caso la enzima de restricción SfiI. Una vez realizado el clonado y transformación en *E. coli* DH5- α se evaluó el resultado mediante secuenciación de 3 clones aislados de los cuales 2 contaban con el clonado deseado (**Figura 4.16**).

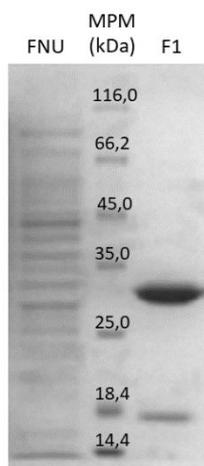


Figura 4.18 | Electroforesis SDS-PAGE del resultado de la purificación del nanobody biespecífico. La purificación fue realizada por cromatografía de afinidad en una columna de Ni-NTA, eluyendo la proteína con imidazol 116 mM. FNU: Fracción No Unida, F1: fracción principal colectada durante la purificación.

Se realizó a continuación una cromatografía de exclusión molecular, utilizando PBS como buffer del proceso de equilibrado y purificación. En el cromatograma correspondiente a la purificación del biespecífico se observa un único pico en un volumen de elución de 13,79 mL (**Figura 4.19A**), con el cual se pudo estimar interpolando en la curva de calibración de la **Figura 4.7** un peso molecular de 34,6 kDa, similar al valor calculado a partir de su secuencia (30,2 kDa). A pesar de la doble purificación, al analizar las fracciones eluidas mediante electroforesis SDS-PAGE se evidenció la presencia de la banda contaminante de 18 kDa (**Figura 4.19B**), lo cual podría ser el resultado de una interacción inespecífica entre el biespecífico y el contaminante. Por esta razón se procedió a repetir el proceso de expresión y purificación, pero en este caso la etapa de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular se realizó utilizando PBS-Tween 0,2% para desfavorecer las interacciones inespecíficas, y se recolectó el pico en forma fraccionada (**Figura 4.20A**). Esta vez se observó un pico más ancho que podría indicar una separación entre la proteína de interés y el contaminante. Las fracciones fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE, lo que permitió evidenciar que dos de ellas contenían la mayor parte de la proteína de interés y con un alto nivel de pureza, no observándose en ellas la banda contaminante (**Figura 4.20B**). Luego de ambas etapas de purificación, el rendimiento final de la expresión fue de 1 mg de nanobody biespecífico por litro de cultivo.

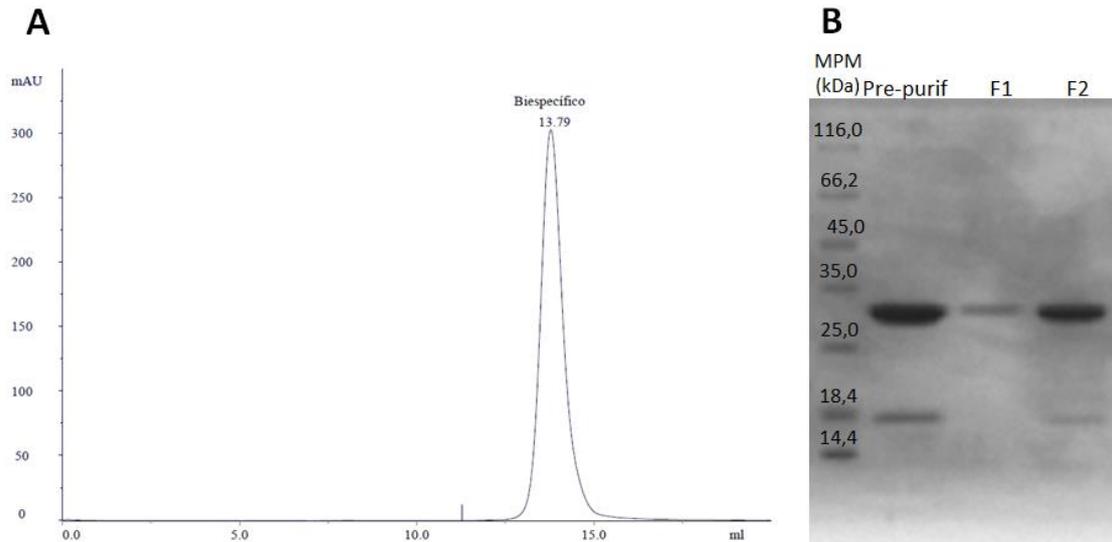


Figura 4.19 | Purificación del biespecífico mediante cromatografía de exclusión molecular en PBS. A) Cromatograma. **B)** Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones de purificación obtenidas. Pre-purif: fracción resultante de la purificación por cromatografía de afinidad, que fue inyectada a la columna de exclusión molecular; F1, F2: Fracciones 1 y 2 recolectadas durante la purificación.

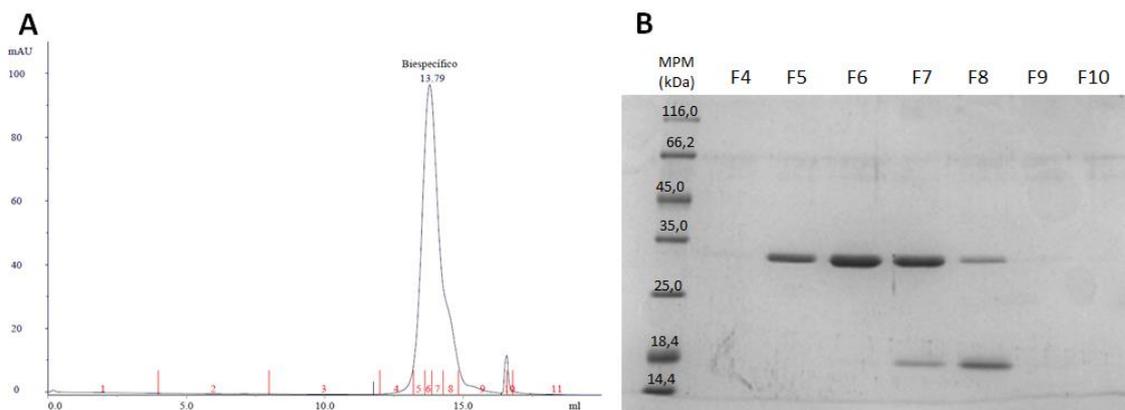


Figura 4.20 | Purificación del biespecífico mediante cromatografía de exclusión molecular en PBS-Tween 0,2%. A) Cromatograma correspondiente mostrando las fracciones que fueron recolectadas. **B)** Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones relevantes. F4-F10: Fracciones 4-10 recolectadas durante la purificación.

4.5 Análisis de la reactividad de los nanobodies que conforman el biespecífico

Una vez purificado el nanobody biespecífico, se evaluó mediante ensayos de ELISA si los nanobodies presentes en la construcción mantenían sus reactividades contra los antígenos por los cuales eran específicos. Por un lado, se realizaron curvas de titulación por triplicado para evaluar la reactividad del nanobody anti-omalizumab, al incubar diluciones seriadas del biespecífico con omalizumab inmovilizado, seguido de un revelado mediante el agregado de

un anticuerpo anti-His conjugado a peroxidasa. El SC50 obtenido para la curva del biespecífico fue de 0,13 nM mientras que las curvas de titulación realizadas similarmente con el nanobody anti-omalizumab individual (fuera de la construcción biespecífica) presentaron un valor SC50 de 0,08 nM (**Figura 4.21A**). En paralelo, también se realizaron curvas de titulación del biespecífico y del nanobody anti-aztreonam para evaluar su reactividad contra KLH-aztreonam inmobilizada, obteniéndose valores de SC50 de 0,16 y 0,21 nM, respectivamente (**Figura 4.21B**). Dado que en ninguno de los dos casos se observaron grandes diferencias entre la reactividad del nanobody individual y del biespecífico, se pudo concluir que las reactividades de los nanobodies anti-omalizumab y anti-aztreonam no habían sido afectadas al ser incorporados en la construcción biespecífica.

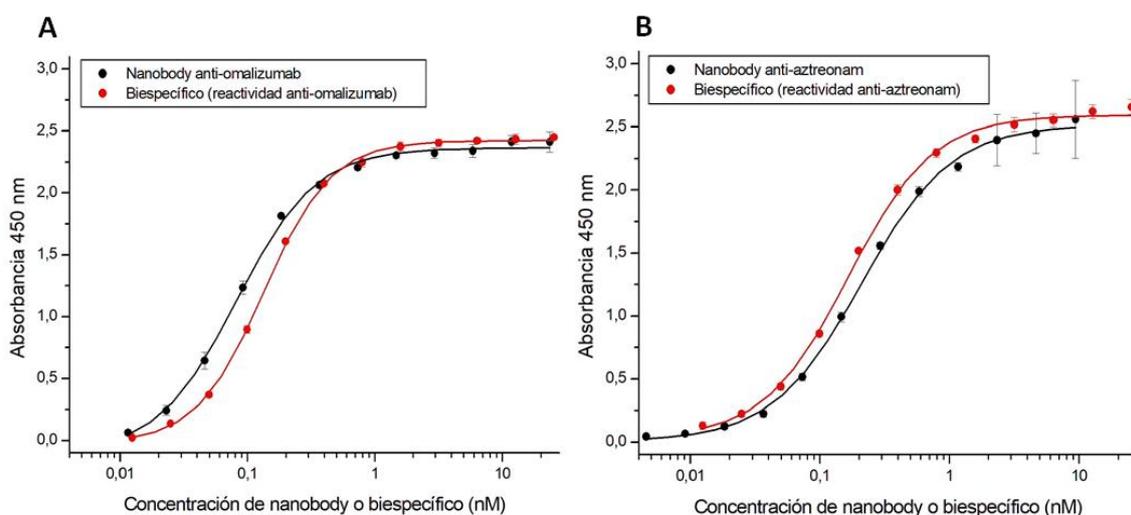


Figura 4.21 | Evaluación de ambas reactividades del nanobody biespecífico. El ensayo se realizó sobre pocillos sensibilizados con cada uno de los antígenos, en los cuales se incubó el biespecífico y cada uno de los nanobodies, revelando el ensayo con un anticuerpo anti-His conjugado a peroxidasa. Se grafica el promedio de triplicados en cada caso y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Adicionalmente, se evaluó la funcionalidad del biespecífico para ser aplicado como calibrador en el formato del inmunoensayo serológico de detección de IgE específica contra el determinante antigénico de aztreonam. En este ensayo de ELISA se incubaron diluciones seriadas del biespecífico en pocillos sensibilizados con KLH-aztreonam, seguido de una incubación con un exceso de omalizumab. En caso de darse las reacciones biespecífico-aztreonam y biespecífico-omalizumab en simultaneo, estas podrían ser detectadas mediante adición de un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa (**Figura 1.3B**). En consistencia con lo esperado, se observó un incremento de la señal conforme aumentaba la concentración del biespecífico generándose una curva con un valor SC50 de 0,04 nM (**Figura 4.22**). Esto no solo confirmó la funcionalidad de los nanobodies en la construcción, sino que también demostró el potencial del biespecífico para adecuarse como calibrador en ensayos de detección de IgE para el diagnóstico de alergias contra aztreonam.

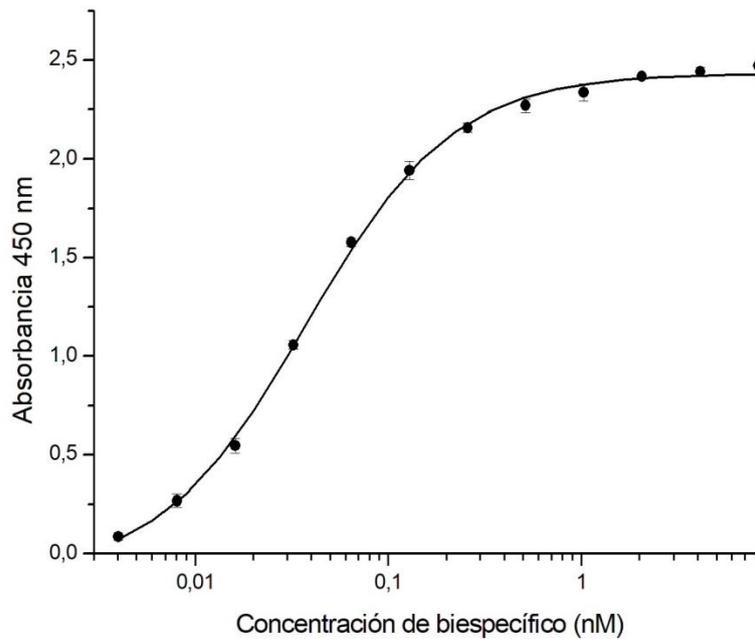


Figura 4.22 | Evaluación del nanobody biospecifico. El ensayo se realizó sobre pocillos sensibilizados con KLH-aztreonam, donde se realizaron diluciones seriadas del biospecifico por triplicado y seguidamente se incubó una concentración en exceso de omalizumab. El ensayo fue revelado con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa. Se grafica el promedio de triplicados y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

4.6 Análisis de la correlación entre la señal producida por el calibrador biospecifico y la de un suero artificial con anticuerpos anti-aztreonam

La señal generada en un ensayo ELISA por el nanobody biospecifico y la generada por un suero artificial anti-aztreonam (descrito en la sección 1.1) fueron comparadas con el fin de establecer una correlación entre la concentración del biospecifico y las unidades utilizadas para la cuantificación de IgE específica (IU/mL). Para este ensayo se incubaron diluciones seriadas de ambos sobre pocillos sensibilizados con KLH-aztreonam. La presencia del suero artificial y del nanobody biospecifico fue detectada mediante una incubación con omalizumab, seguida de la adición de un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa. Las curvas de titulación fueron analizadas en el rango de respuesta lineal para poder establecer una correlación entre ambas. Las señales obtenidas para el nanobody biospecifico (**Figura 4.23A**) fueron interpoladas en la curva correspondiente al suero artificial (**Figura 4.23B**), generando así una curva que permite asignar al nanobody biospecifico, en el rango 0,017 – 0,037 nM, una equivalencia en IU/mL, la unidad utilizada internacionalmente para la cuantificación de IgE específica (**Figura 4.23C**).

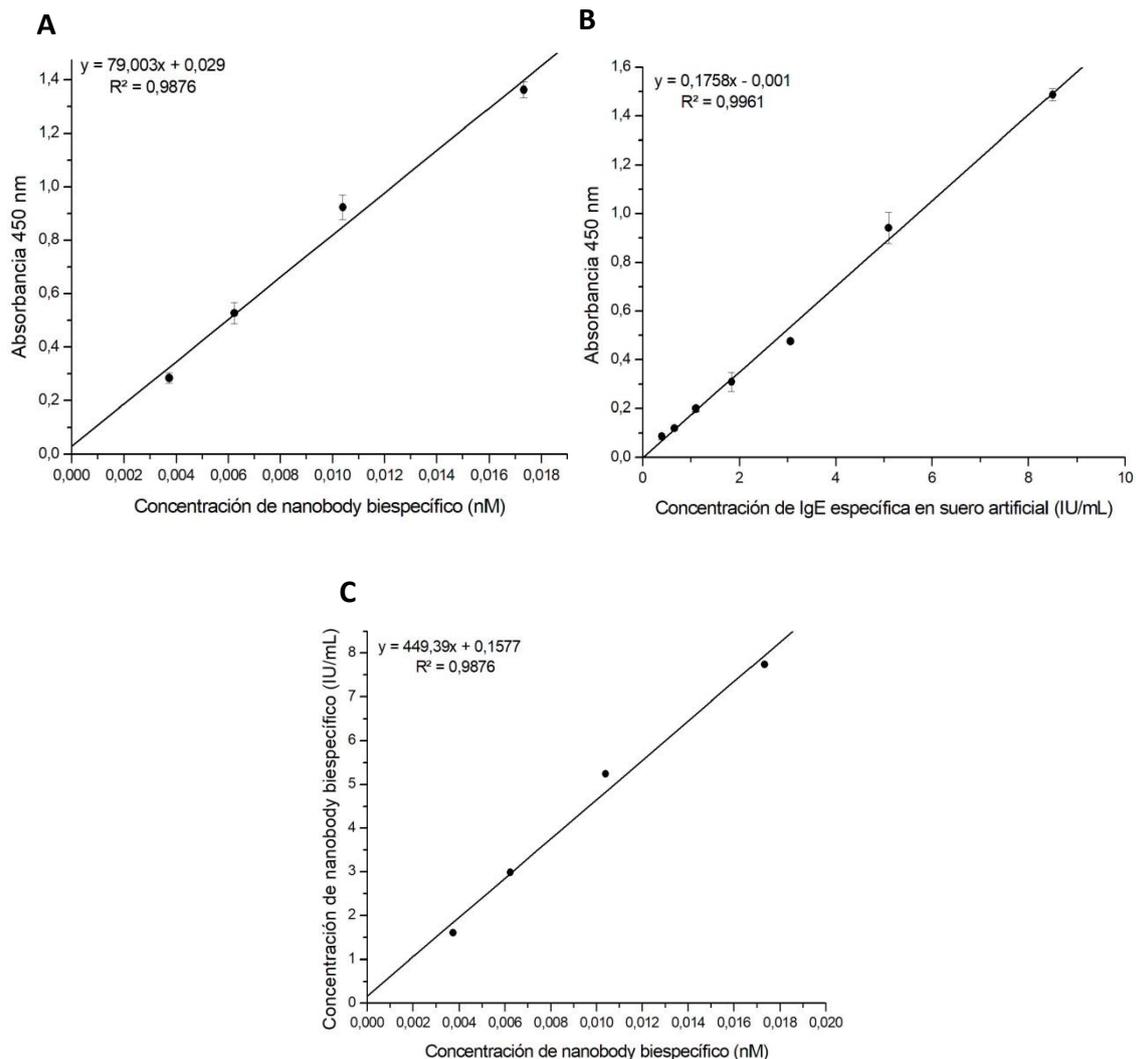


Figura 4.23 | Correlación de la señal generada en un ensayo ELISA por el nanobody biespecífico y un suero artificial con anticuerpos anti-aztreonam. Se grafica el rango lineal de la curva de titulación del biespecífico (A) y el suero artificial (B). Se grafica el promedio de triplicados y las barras de error corresponden a la desviación estándar. La curva (C) ilustra la correlación establecida para la concentración del nanobody biespecífico en nM y IU/mL.

El suero artificial que se utilizó en esta ocasión para comparar con el nanobody biespecífico constituye una alternativa para la calibración del ensayo serológico, y fue desarrollado, al igual que el biespecífico, con el fin de evitar las desventajas asociadas al uso de sueros humanos para la calibración, como su limitada disponibilidad. Frente al nanobody aquí desarrollado, presenta la ventaja de ser independiente del anticuerpo anti-IgE utilizado para la detección, ya que contiene la región Fc de IgE humana, mientras que el uso del nanobody biespecífico requiere la utilización del anticuerpo anti-IgE omalizumab. Si bien el uso del suero artificial puede solucionar el problema de la baja disponibilidad de sueros humanos, no constituye un reactivo que pueda reproducirse indefinidamente, ya que el suero de conejo utilizado es un recurso finito y por lo tanto el suero artificial debe volver a validarse al ser reemplazado. Por su parte, el nanobody biespecífico desarrollado presenta la ventaja de ser un reactivo que puede reproducirse indefinidamente a partir de su secuencia codificante y puede expresarse fácilmente en sistemas procariontes, constituyendo un reactivo altamente reproducible. Para

generar un calibrador sintético independiente del anticuerpo anti-IgE utilizado para la detección, una posible alternativa sería expresar el nanobody anti-aztreonam obtenido fusionado a la región Fc de IgE.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se seleccionaron nanobodies contra dos antígenos de interés a partir de una biblioteca de fagos que codifica los dominios variables VH y VHH de una llama inmunizada, utilizando estrategias de selección por panning que fueron diseñadas especialmente para cada antígeno. Por un lado, se obtuvieron nanobodies contra el parátipe del anticuerpo monoclonal omalizumab aplicando una estrategia que demostró ser muy eficiente, ya que la totalidad de los clones analizados en el screening fueron específicos contra esta región. La obtención de un nanobody con esta característica fue fundamental para la generación del calibrador biespecífico, ya que permitía mimetizar la región Fc de la IgE, que es reconocida precisamente por el parátipe de omalizumab.

Por otro lado se obtuvieron nanobodies contra el determinante antigénico derivado del antibiótico beta-lactámico aztreonam. La estrategia de panning utilizada en este caso facilitó la obtención de clones que no presentaron reactividad contra la proteína carrier del determinante antigénico. Por esta razón, los nanobodies seleccionados tenían el potencial de ser incorporados en la construcción biespecífica para mimetizar la región de reconocimiento de las IgE específicas en los ensayos de serología para el diagnóstico de alergias contra dicho determinante.

A fin de generar un calibrador recombinante, los nanobodies obtenidos fueron clonados al vector pINQ-Bis para la expresión de un nanobody biespecífico, el cual mantuvo la reactividad de ambos nanobodies individuales y resultó funcional en el contexto del ensayo serológico, demostrando la aplicabilidad del calibrador. La presencia en este vector de dos pares de sitios de restricción permite la incorporación simple de secuencias codificantes para distintos nanobodies, lo cual permitió que en el contexto del proyecto que se está llevando a cabo en este laboratorio se pudieran generar calibradores para tres más de los determinantes antigénicos propuestos, utilizando el clon anti-omalizumab aquí seleccionado. De igual manera, de obtenerse en el futuro nanobodies contra otros alérgenos se podrían generar fácilmente calibradores para la detección de IgE específica contra otros antígenos.

Asimismo, la estrategia aquí utilizada para obtener nanobodies anti-parátipe de omalizumab constituye una prueba de concepto que podría aplicarse para obtener nanobodies anti-parátipe contra otros anticuerpos de detección, permitiendo incorporar el uso de calibradores basados en nanobodies biespecíficos en otras clases de inmunoensayos serológicos. Esta potencial aplicación es de suma relevancia, ya que la dificultad de la obtención y validación de sueros para la calibración es un problema común a muchos ensayos serológicos, como por ejemplo ensayos de detección de IgG para el diagnóstico de infecciones virales. Los calibradores basados en nanobodies biespecíficos podrían encontrar aplicación en campos más allá del diagnóstico de alergia a antibióticos beta-lactámicos, pudiendo trasladarse a una diversidad de ensayos de detección de inmunoglobulinas específicas.

6. REFERENCIAS

1. Johansson, S. G. O. *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 832–836 (2004).
2. *Allergy Frontiers: Classification and Pathomechanisms. Volume 2.* (Springer, 2009).
3. Wong, A. *et al.* Drug Hypersensitivity Reactions Documented in Electronic Health Records within a Large Health System. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **7**, 1253-1260.e3 (2019).
4. Macy, E. & Poon K-Y, T. Self-reported Antibiotic Allergy Incidence and Prevalence: Age and Sex Effects. *Am. J. Med.* **122**, 778.e1-778.e7 (2009).
5. Jerschow, E., Lin, R. Y., Scaperotti, M. M. & McGinn, A. P. Fatal anaphylaxis in the United States, 1999-2010: Temporal patterns and demographic associations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 1318-1328.e7 (2014).
6. Macy, E. Penicillin and Beta-Lactam Allergy: Epidemiology and Diagnosis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **14**, 1–7 (2014).
7. Macy, E. & Ho, N. J. Multiple drug intolerance syndrome: Prevalence, clinical characteristics, and management. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **108**, 88–93 (2012).
8. Bourke, J., Pavlos, R., James, I. & Phillips, E. Improving the Effectiveness of Penicillin Allergy De-labeling. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **3**, 365-374.e1 (2015).
9. Sade, K., Holtzer, I., Levo, Y. & Kivity, S. The economic burden of antibiotic treatment of penicillin-allergic patients in internal medicine wards of a general tertiary care hospital. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 501–506 (2003).
10. Macy, E. & Contreras, R. Health care use and serious infection prevalence associated with penicillin ‘allergy’ in hospitalized patients: A cohort study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 790–796 (2014).
11. Bousquet, P. J., Pipet, A., Bousquet-Rouanet, L. & Demoly, P. Oral challenges are needed in the diagnosis of β -lactam hypersensitivity. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 185–190 (2008).
12. Doña, I., Torres, M. J., Montañez, M. I. & Fernández, T. D. In vitro diagnostic testing for antibiotic allergy. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* **9**, 288–298 (2017).
13. Tanno, L. K. *et al.* Dissemination of definitions and concepts of allergic and hypersensitivity conditions. *World Allergy Organ. J.* **9**, 1–9 (2016).
14. Fontaine, C. *et al.* Relevance of the determination of serum-specific IgE antibodies in the diagnosis of immediate β -lactam allergy. *Allergy* **62**, 47–52 (2007).
15. Torres, M. J. *et al.* Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy* **58**, 961–972 (2003).
16. Park, B. K. *et al.* Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of

- drug-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **192**, 30–36 (2011).
17. Montañez, M. I., Ariza, A., Mayorga, C., Fernandez, T. D. & Torres, M. J. Cross-Reactivity in Betalactam Allergy: Alternative Treatments. *Curr. Treat. Options Allergy* **2**, 141–154 (2015).
 18. Schulman, E. S. Development of a monoclonal anti-Immunoglobulin E antibody (omalizumab) for the treatment of allergic respiratory disorders. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 6–11 (2001).
 19. Hackett, J. *et al.* Recombinant mouse-human chimeric antibodies as calibrators in immunoassays that measure antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1277–1284 (1998).
 20. Thorpe, S. J., Heath, A., Fox, B., Patel, D. & Egner, W. The 3rd International Standard for serum IgE: International collaborative study to evaluate a candidate preparation. *Clin. Chem. Lab. Med.* **52**, 1283–1289 (2014).
 21. Kleine-Tebbe, J. & Jakob, T. Molecular allergy diagnostics using IgE singleplex determinations: methodological and practical considerations for use in clinical routine. *Allergo J. Int.* **24**, 185–197 (2015).
 22. Offermann, N. *et al.* Human serum substitution by artificial sera of scalable allergen reactivity based on polyclonal antibodies and chimeras of human Fc γ RI and IgE domains. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **71**, 1794–1799 (2016).
 23. 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).
 24. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446–448 (1993).
 25. De Simone, E. A., Saccodossi, N., Ferrari, A. & Leoni, J. Development of ELISAs for the measurement of IgM and IgG subclasses in sera from llamas (*Lama glama*) and assessment of the humoral immune response against different antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **126**, 64–73 (2008).
 26. Blanc, M. R. *et al.* A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type γ -globulins from camelid sera. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **54**, 207–212 (2009).
 27. Khong Nguyen, V., Hamers, R., Wyns, L. & Muyldermans, S. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol. Immunol.* **36**, 515–524 (1999).
 28. Achour, I. *et al.* Tetrameric and Homodimeric Camelid IgGs Originate from the Same IgH Locus. *J. Immunol.* **181**, 2001–2009 (2008).
 29. Ming, L. *et al.* Chromosome-level assembly of wild Bactrian camel genome reveals organization of immune gene loci. *Mol. Ecol. Resour.* **20**, 770–780 (2020).
 30. Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C. & Muyldermans, S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine* **8**, 1013–1026 (2013).
 31. Vu, K. B., Ghahroudi, M. A., Wyns, L. & Muyldermans, S. Comparison of llama VH

- sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol. Immunol.* **34**, 1121–1131 (1997).
32. Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A. R. G. & Hamers, R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* **7**, 1129–1135 (1994).
 33. De Genst, E. *et al.* Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4586–4591 (2006).
 34. Flajnik, M. F., Deschacht, N. & Muyldermans, S. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? *PLoS Biol.* **9**, (2011).
 35. Deschacht, N. *et al.* A Novel Promiscuous Class of Camelid Single-Domain Antibody Contributes to the Antigen-Binding Repertoire. *J. Immunol.* **184**, 5696–5704 (2010).
 36. González-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).
 37. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775–797 (2013).
 38. Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R. & Muyldermans, S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* **414**, 521–526 (1997).
 39. Van Der Linden, R. H. J. *et al.* Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 37–46 (1999).
 40. Hultberg, A. *et al.* Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. *PLoS One* **6**, (2011).
 41. Skottrup, P. D. *et al.* Diagnostic evaluation of a nanobody with picomolar affinity toward the protease RgpB from *Porphyromonas gingivalis*. *Anal. Biochem.* **415**, 158–167 (2011).
 42. Li, M., Zhu, M., Zhang, C., Liu, X. & Wan, Y. Uniform orientation of biotinylated nanobody as an affinity binder for detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac Toxin. *Toxins (Basel)*. **6**, 3208–3222 (2014).
 43. Ladenson, R. C., Crimmins, D. L., Landt, Y. & Ladenson, J. H. Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment. *Anal. Chem.* **78**, 4501–4508 (2006).
 44. Doña, V. *et al.* Single domain antibodies are specially suited for quantitative determination of gliadins under denaturing conditions. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 918–926 (2010).
 45. He, T. *et al.* Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol. *Anal. Chem.* **86**, 8873–8880 (2014).
 46. Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J. & Laustsen, A. H. Basics of

- antibody phage display technology. *Toxins (Basel)*. **10**, (2018).
47. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (80-.)*. **228**, 1315–1317 (1985).
 48. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552–554 (1990).
 49. Nemudraya, A. A., Richter, V. A. & Kuligina, E. V. Phage peptide libraries as a source of targeted ligands. *Acta Naturae* **8**, 48–57 (2016).
 50. Hemminga, M. A. *et al.* Viruses: Incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. *Eur. Biophys. J.* **39**, 541–550 (2010).
 51. Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. *Phage Display: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
 52. *Small Animal Critical Care Medicine*. (Elsevier Health Sciences, 2008).
 53. Novagen. *pET System Manual*. (2005).
 54. Olichon, A., Schweizer, D., Muyldermans, S. & de Marco, A. Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnol.* **7**, (2007).