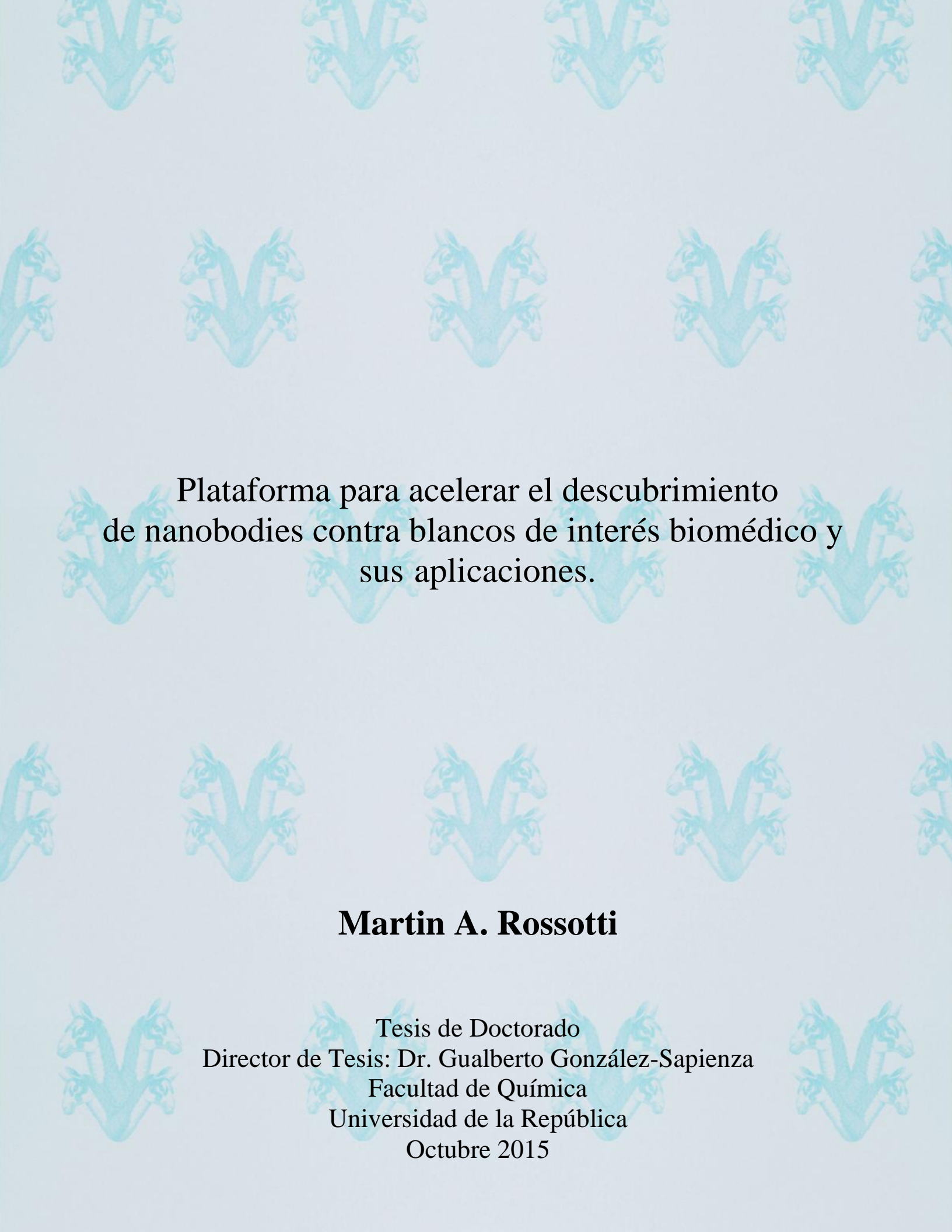




Plataformas para acelerar el descubrimiento  
de nanobodies contra blancos de interés  
biomédico y sus aplicaciones

Tesis de doctorado  
Martin Rossotti



Plataforma para acelerar el descubrimiento  
de nanobodies contra blancos de interés biomédico y  
sus aplicaciones.

**Martin A. Rossotti**

Tesis de Doctorado  
Director de Tesis: Dr. Gualberto González-Sapienza  
Facultad de Química  
Universidad de la República  
Octubre 2015

*“And if I fly, or if I fall. Least I can say I gave it all. I’m on my way...”*

RuPaul Charles

*“El mundo está lleno de héroes anónimos que consiguieron reinventarse a sí mismos y que no figuran en ninguna enciclopedia. Cambiar es un gesto heroico, un acto de rebeldía, un grito de auxilio de quienes no se resignan a las cartas que les tocaron en el reparto de la vida, y quieren barajar y dar de nuevo”*

Beto Casella



---

## RESUMEN

---



Además de los anticuerpos convencionales, los camélidos poseen anticuerpos carentes de cadena liviana en los que un único dominio forma el sitio de unión al antígeno. Este dominio, denominado Nanobody o VHH, es uno de los fragmentos de reconocimiento de antígeno más pequeños conocidos en la naturaleza (~15 kDa) y se caracterizan por su alta estabilidad, solubilidad y especificidad. Estas características únicas de los VHHs junto a su facilidad de manipulación mediante biología molecular convierten a los VHH en una prometedora alternativa a los anticuerpos convencionales o fragmentos de anticuerpo para numerosas aplicaciones biotecnológicas.

Este trabajo de tesis tuvo como horizonte establecer tecnología local para la generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos a partir de linfocitos B de llamas (*Lama glama*). Asimismo se desarrollaron metodologías que facilitan la selección y caracterización de los nanobodies de interés contra una variedad de antígenos que van desde pequeñas moléculas hasta complejas estructuras celulares. La funcionalidad de los nanobodies seleccionados se demostró en diferentes aplicaciones biotecnológicas.

En la primera parte del trabajo se presenta el desarrollo de un vector de alto nivel de expresión y un sistema de biotinylation *in vivo* de los nanobodies que facilita el proceso de *screening* y caracterización paralela de cientos de clones en forma sistematizada y rápida. El sistema tiene gran versatilidad y facilita el estudio de la reactividad de los nanobodies mediante citometría de flujo, ELISA, microscopía, inmunoprecipitación, etc. Como primer aplicación de este sistema se desarrolló un método de ranqueo de afinidad relativa por el antígeno de la población de nanobodies aislados en la etapa de selección inicial (*panning*) y un sistema que permite la búsqueda de pares de nanobodies para la detección del antígeno en inmunoensayos tipo sándwich, lo que permitió el desarrollo de un ELISA ultrasensible para la cuantificación de la epoxi-hidrolasa humana.

En la segunda parte del trabajo se describe la preparación de una biblioteca de nanobodies contra células dendríticas murinas, y la adaptación de la plataforma de descubrimiento de nanobodies para aislar anticuerpos contra receptores celulares nativos utilizando células enteras para las etapas de aislamiento y caracterización. De esta forma se aislaron anticuerpos contra el componente CD11**b** del receptor Mac-1, la región no polimórfica del MHC-II y contra el receptor CD45, constituyendo un desarrollo de gran relevancia debido a que, a diferencia de los anticuerpos convencionales, los nanobodies pierden drásticamente la reactividad contra su antígeno ante pequeños cambios conformacionales. Debido a eso los nanobodies seleccionados contra receptores recombinantes inmovilizados sobre poliestireno (placa de ELISA) muy raramente reaccionan en forma cruzada con el receptor nativo en las células. A pesar de esto último, y dada la importancia de dirigir la selección utilizando receptores recombinantes, se mostró que la cuidadosa elección de la forma de inmovilización del receptor recombinante, sí permite aislar nanobodies contra receptores nativos. Esto fue demostrado seleccionando nanobodies contra la cadena CD11**c** del receptor CDR4 que es un marcador de células dendríticas.

Por último se realizó una prueba de concepto sobre la utilidad de los nanobodies como dominios de funcionalización, en este caso para conferir funciones efectoras a nanobodies con capacidad de neutralizar la toxina tetánica. Una vez aislados los nanobodies anti-toxina, se prepararon anticuerpos biespecíficos fusionándolos a los nanobodies anti- CD11**b**, MHCII y CD45, y se estudió su poder de neutralización y biodistribución *in vivo*, encontrando un dramático incremento del poder neutralizante cuando los anticuerpos neutralizantes se funcionalizaron con el nanobody anti-CD11**b** (que reacciona con un receptor endocítico), pero no con el anti-MHC-II o anti-CD45.



---

# INDICE

---



<b>A. Resumen.</b>	
<b>B. Abreviaciones.</b>	
<b>C. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Anticuerpos convencionales .....</b>	<b>1</b>
1.1 Estructura y función.	2
1.2 Estructura génica y generación de diversidad.	4
1.3 Aplicaciones biotecnológicas de los anticuerpos.	6
1.4 Formatos de anticuerpos recombinantes.	8
1.4.1 Fragmentos scFv.	8
1.4.2 Fragmentos Fab.	9
1.4.3 Anticuerpo biespecíficos .	9
<b>2. Anticuerpos de cadena pesada.....</b>	<b>10</b>
2.1 Respuesta humoral en camélidos.	11
2.2 Aparición de los hcAb.	12
2.3 Estructura y organización de los genes.	13
2.3.1 Ausencia de dominio constante CH1.	14
2.3.1 Sustituciones aminoacídica sobre el FR2 de los VHHs.	15
2.3.1 Eventos de recombinación que dan lugar a los hcAbs.	16
2.4 Diversidad y forma de reconocimiento.	17
2.5 Aplicaciones biotecnológicas de los nanobodies.	19
2.5.1 Nanobodies como herramientas de investigación.	20
2.5.2 Nanobodies como herramientas diagnósticas.	21
2.5.3 Nanobodies terapéuticos.	22
2.6 Nanobodies multivalentes.	24
2.7 Métodos para la generación y selección de nanobodies.	25

<b>3. Principios y características de la técnica de <i>phage display</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>D. Objetivos de la Tesis .....</b>	<b>31</b>
<b>E. Resultados y discusión.</b>	
<b>1. Capítulo I: Construcción de bibliotecas de nanobodies y optimización del sistema de expresión ....</b>	<b>32</b>
1.1 Construcción de biblioteca de nanobodies.	32
1.2 Estudio del sistema de expresión de Nbs desde el vector fagémido.	33
1.3 Generación de un vector de expresión de alto rendimiento de los VHH.	34
1.4 Comparación de la expresión de TC7 desde pComb3X y pINQ-H6HA.	35
1.5 Optimización de la expresión de TC7 desde el sistema pINQ-H6HA/BL21(DE3).	36
<b>2. Capítulo II: Desarrollo de un sistema de biotinylación in vivo de nanobodies .....</b>	<b>38</b>
2.1 Desarrollo de un sistema de biotinylación <i>in vivo</i> de los nanobodies.	39
2.2 Optimización del sistema de biotinylación <i>in vivo</i> de los nanobodies.	40
2.3 Determinación del porcentaje de biotinylación <i>in vivo</i> de los Nbs.	41
<b>3. Capítulo III: Desarrollo de un sistema de selección de nanobodies por su afinidad relativa contra el antígeno marcado y por su capacidad de formar pares en inmunoensayos de dos sitios.....</b>	<b>43</b>
3.1 Selección de nanobodies contra la sEH humana.	43
3.2 Aplicación I: Desarrollo de un método de comparación de la afinidad relativa por el antígeno conjugado a la HRP.	45
3.3 Aplicación II: Selección de pares de Nbs para la detección de la sEH.	48
3.3.1 Desarrollo de un ELISA sándwich para la cuantificación de la sEH.	52
3.3.2 Performance analítica del ELISA sándwich basado en nanobodies.	52
<b>4. Selección de nanobodies contra receptores de células .....</b>	<b>54</b>
4.1 Inmunización y evaluación de la respuesta humoral de la llama 1053 inmunizada con células dendríticas murinas.	55
4.2 Selección de nanobodies contra proteínas de superficie de BMDCs.	55
4.3 Análisis en paralelo de alto número de Nbs mediante citometría de flujo Selección de nanobodies contra proteínas de superficie de BMDCs.	57
4.4 Identificación de los antígenos reconocidos por los Nbs seleccionados.	58
4.5 Caracterización de los nanobodies anti-CD11b.	62
4.5.1 Afinidad relativa y comportamiento en <i>Western Blot</i> .	62
4.5.2 Mapeo de epítomos sobre CD11b .	63
4.6 Los Nbs biotinylados presentan importantes ventajas en aplicaciones de citometría de flujo respecto a los anticuerpos convencionales.	63



<b>5. Selección de nanobodies contra epítopes nativos de CD11c.....</b>	<b>65</b>
5.1 Primera estrategia de selección de nanobodies anti-CD11c.	66
5.2 Segunda estrategia de selección de nanobodies anti-CD11c.	67
5.3 Evaluación de los Nbs anti-CD11c para su uso en la determinación del porcentaje de células dendríticas de preparaciones de BMDCs.	69
<b>6. Selección de nanobodies contra receptores de células.....</b>	<b>72</b>
6.1 Selección y caracterización de nanobodies contra la toxina tetánica.	73
6.2 Evaluación de los Nb anti-TT para la neutralización de la toxina <i>in vivo</i> .	74
6.3 Nanobodies como dominios de funcionalización.	75
6.4 Biodistribución de los nanobodies anti-CD11b y anti-CD45.	79
<b>E. Discusión Final .....</b>	<b>81</b>
<b>F. Lista de Artículos presentados en el marco de esta tesis .....</b>	<b>86</b>
<b>G. Referencias .....</b>	<b>89</b>
<b>H. Artículos.</b>	
<b>I. Agradecimientos.</b>	



# **Introducción**

**E**l éxito de la respuesta inmune humoral, mediada por células B, se basa en la capacidad de producir proteínas con diferentes especificidades para proteger al huésped de posibles agentes invasores. Esta especificidad de reconocimiento antigénico está mediada por los anticuerpos, los cuales muestran una importante flexibilidad y diversidad.

Fue justamente el rol protector de los anticuerpos lo que condujo a su descubrimiento. El hecho de que las personas que contraían una enfermedad resultaran inmunes a la misma tuvo su aplicación profiláctica en la “variolización”, que ya se practicaba en China e India varios siglos antes de nuestra era. En el proceso de variolización, el virus *smallpox* vivo tomado del líquido de heridas de pacientes infectados se inoculaba por inhalación o aplicación sobre heridas a quien se buscaba proteger (1). En 1798, Edward Jenner mostró que era posible sustituir la variolización y llevar a cabo una vacunación más segura y semejante a la que conocemos hoy en día, utilizando el virus *cowpox*, causante de la peste bovina, confiriendo protección eficiente contra un virus similar, pero mucho más severo (2, 3). Sin embargo, durante mucho tiempo no se entendía en qué consistía la protección hasta que Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato en 1890 mostraron que la transferencia del suero de animales afectados por difteria a animales sanos los protegía ante un desafío con la toxina. Postularon que los animales inmunizados presentaban esta cualidad porque debían disponer de alguna sustancia capaz de controlar la infección, a las cuales llamaron “antitoxinas” (3). El potencial para el tratamiento en humanos fue inmediato, y los anti-sueros constituyeron los agentes anti-infecciosos más potentes con los que contó la medicina hasta el advenimiento de los antibióticos. En 1900 Paul Ehrlich, propuso la teoría de la “inmunidad de cadena lateral” que establecía la base química para la especificidad de la respuesta inmune. Su teoría era que las células tienen en su superficie moléculas receptoras específicas (denominadas “cadenas laterales”) que sólo se unen a determinados grupos químicos de las moléculas de toxina; si las células sobreviven a esta unión, se produce un excedente de “cadenas laterales”, algunas de las cuales son liberadas a la sangre en forma de antitoxinas circulantes (lo que hoy llamamos anticuerpos) (4).

## **1. Anticuerpos convencionales.**

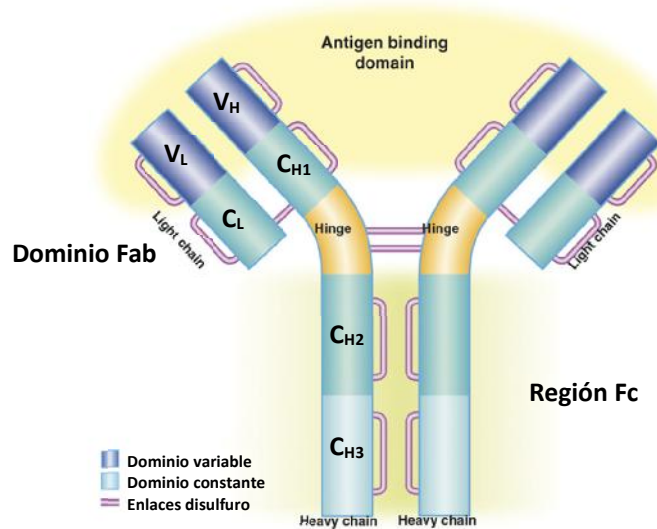
Frente a la infección, se dispara en los mamíferos una rápida respuesta activada por receptores para motivos conservados en patógenos que inician una batería de mecanismos efectores contra el agente agresor (5, 6). Como resultado de esta actividad inicial de mecanismos de protección innatos se desencadena además una respuesta adaptada al patógeno, la cual se caracteriza por la expansión y diferenciación de poblaciones de linfocitos que reconocen específicamente

componente particulares (antígenos) del agente infeccioso, que contribuyen a su eliminación y que persisten en el tiempo generando la memoria inmunológica contra dicho agente. En este proceso participan dos tipos de linfocitos, las células B y T. Mientras que estas últimas son las responsables de la respuesta inmune celular, los linfocitos B son las células involucradas en la respuesta de anticuerpos. En ambos casos, la respuesta es estimulada por un antígeno particular, que en el caso de las células T se limita a péptidos asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), pero que en el caso de las células B va desde pequeñas estructuras químicas hasta todo tipo de macromoléculas (7, 8).

La activación de las células B se produce una vez que el antígeno se une a su superficie por medio del receptor de células B (BCR), siendo de esta forma internalizado y procesado en péptidos que serán presentados sobre la superficie celular en el contexto del MHC de clase II para el reconocimiento por células T colaboradoras específicas (9, 10). La interacción con células colaboradoras es crítica para que se produzcan los fenómenos de maduración de la afinidad, cambio de clase y generación de células plasmáticas de larga vida que darán lugar una eficiente respuesta de anticuerpos (11). Dependiendo del agente infeccioso, los anticuerpos colaborarán a contrarrestar los efectos de la infección ya sea, neutralizando sus productos tóxicos o su mecanismo de infección, opsonizándolos y promoviendo su fagocitosis, activando el complemento, y reclutando células citotóxicas (*natural killers* (NK), eosinófilos, etc.) promoviendo así la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC).

### 1.1 Estructura y función.

Los anticuerpos convencionales, también denominados inmunoglobulinas (Ig), tienen una estructura básica compuesta de dos cadenas pesadas idénticas (H, por *heavy*) y dos cadenas livianas también idénticas (L, por *light*), unidas de forma covalente por puentes disulfuro (12). Cada cadena liviana consiste de un dominio variable ( $V_L$ ) y uno constante ( $C_L$ ), mientras que la cadena pesada consiste de un dominio variable ( $V_H$ ) y hasta cuatro dominios constantes ( $C_{H1-3}$ ) (**figura 1**). Asimismo, en la cadena pesada hay una región bisagra (*hinge*) que confiere flexibilidad a la molécula y a través de donde tiene lugar la interacción de cada heterodímero ( $V_L/C_L:V_H/C_H$ ) para formar el anticuerpo con su estructura típica en forma de Y (13-15). La asociación de los dominios variables de cada cadena forma el sitio de unión al antígeno (Fab, por *antigen binding fragment*), que representa el paratopo del anticuerpo. El apareamiento de la región constante de las Ig forma la región Fc (por **fragmento cristalizable**) el cual media la mayoría de las funciones efectoras.



**Figura 1. Estructura general de los anticuerpos convencionales del tipo IgG.** La proteína consiste de dos cadenas pesadas idénticas de ~55 kDa cada una y dos livianas idénticas de ~25 kDa, las cuales están unidas covalentemente por enlaces disulfuro. Muchos anticuerpos están glicosilados con estructuras de polisacáridos unidos covalentemente a la proteína en diferentes sitios de la molécula. La proteína tiene regiones con diferentes funciones, por ejemplo la región Fc (fragmento cristalizante) media las funciones efectoras de los anticuerpos, y la región variable (V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>) ubicada en el extremo amino-terminal de ambas cadenas (Fab) representa el sitio de unión al antígeno. C<sub>L</sub>, dominio constante de la cadena liviana y C<sub>H#</sub>, dominios constantes de la cadena pesada. Adaptado y modificado de Steinmeyer et al., 2008 (16).

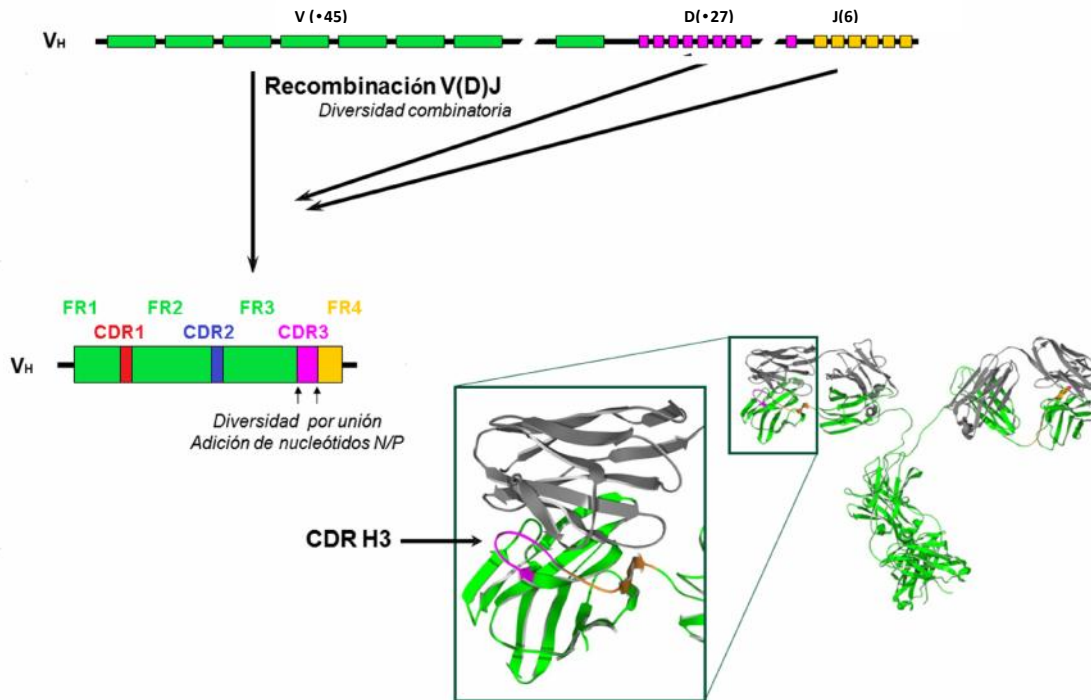
Si bien hay grandes variaciones en el tipo de anticuerpos producidos por distintas especies, en los humanos existen dos tipos de cadenas livianas (  $\kappa$  ,  $\lambda$  ) y cinco tipos de cadenas pesadas (  $\mu$  ,  $\delta$  ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  ), y de acuerdo a estas últimas las Ig se clasifican en cinco isotipos: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Las IgMs, con una estructura pentamérica, constituye el primer isotipo de anticuerpo producido, con una potente capacidad de activación del complemento y promoción de la fagocitosis para la contención del patógeno. Las IgA se encuentran principalmente en superficies de mucosas. Las IgE están involucrados en la defensa contra parásitos y tienen un rol importante en enfermedades alérgicas. La IgD se co-expresa con la IgM sobre la superficie de la mayoría de las células B maduras antes de la estimulación antigénica (17, 18) pero su función como Ig secretada aún es desconocida (11). Por último está la IgG que constituye la clase de Ig más abundante constituyendo el 70-75% de las Ig totales (13). Hay cuatro subclases de IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) de las cuales las IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> son fuertes activadores del complemento, y por su interacción con distintos receptores para Fc presentes en células fagocíticas y citotóxicas, actúan como potentes opsoninas y constituyen los principales isotipos vinculados a la ADCC mediada por células NK. Por otro lado, la IgG<sub>2</sub> es comúnmente asociada a la respuesta contra antígenos glucídicos, mientras que el Fc de la IgG<sub>4</sub> carece de funciones efectoras y su actividad se asocia principalmente con la neutralización de alérgenos (19).

La variación en la capacidad de reconocimiento de antígenos de los anticuerpos se debe a la presencia de regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDRs). La región variable de cada cadena de Ig contiene tres de estas regiones, CDR1, CDR2 y CDR3, las cuales están flanqueadas por regiones menos variables denominadas *frameworks* (FR) (20). Estas últimas están altamente conservadas y tienen un rol importante en la preservación de la estructura, plegamiento y estabilidad del anticuerpo (21, 22). Cuando los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se aparean en la molécula de anticuerpo, se ponen en contacto los tres CDRs de las dos cadenas conformando el parátipe, en el cual los CDR3 de ambas cadenas ocupan la porción central. Los CDRs de la cadena liviana son aproximadamente de 6 a 10 aminoácidos de longitud cada uno, mientras que los de la cadena pesada son más largos, de 5 a 15 aminoácidos (15, 23). Entre las diferentes especies la longitud del CDR1 y CDR2 de la cadena pesada es muy similar pero muestran mucha variación a nivel del CDR3 (23). Por ejemplo el CDR3 de la cadena pesada de humanos y ratones es en promedio de 5-15, en camélidos y tiburones de 6-30, y en bovinos puede llegar hasta 60 aminoácidos (24). Esta particularidad en la longitud del CDR3 entre las especies se discutirá más adelante.

## 1.2 Estructura génica y generación de diversidad.

La diversidad pre-inmune de las inmunoglobulina se establece a través de un proceso de recombinación somática que involucra distintos segmentos génicos y que ocurre durante el desarrollo de los linfocitos B (7, 25, 26). Como se muestra en la **figura 2**, el locus humano de la cadena pesada (IgH) está compuesto de aproximadamente 45 segmentos V (variables), 27 segmentos D (diversidad) y 7 segmentos J (de unión). En el caso de la cadena liviana existen dos locus, IgL- $\kappa$  y IgL- $\lambda$ , formados por 40 segmentos  $V_\kappa$  y 5 segmentos  $J_\kappa$ , y 30 segmentos  $V_\lambda$  y 4 segmentos  $J_\lambda$ , respectivamente.

Durante el desarrollo de las células B en la médula ósea hay un proceso de rearreglo génico que combina segmentos individuales  $V_H$ - $D_H$ - $J_H$  o  $V_L$ - $J_L$  de cada cadena para generar los exones maduros codificantes de los dominios funcionales  $V_H$  y  $V_L$  (27). Este proceso de *diversificación combinatoria* se da en etapas diferentes (primero para la IgH y más tarde en el desarrollo para la IgL), y permite la generación de 7290 combinaciones de exón  $V_H D_H J_H$  ( $45 \times 27 \times 7$ ) y 320 exones para el  $V_L J_L$  (200 exones  $V_\kappa/J_\kappa$  y 120 exones  $V_\lambda/J_\lambda$ ) (26).



**Figura 2. Organización génica de la región variable de los anticuerpos.** En humanos y ratones el dominio variable maduro de la cadena pesada ( $V_H$ ) surge de la recombinación de un segmento génico V con un segmento DJ previamente empalmado. Cada gen V codifica los *frameworks* 1-3 y los CDR1-2. El CDR3 está codificado por el gen D y el último FR surge del gen J. Este proceso de recombinación genera diversidad (diversidad combinatoria), la cual se ve amplificada por la introducción de nucleótidos durante el proceso de empalme de los distintos segmentos génicos. Adaptado y modificado de Vaughn et al., 2013 (28).

Debido a que el reconocimiento del antígeno tiene lugar a través del paratope generado por la interacción  $V_H/V_L$ , cada una de las 7290  $V_H$  podría combinarse con cada una de las 320  $V_L$  para así generar  $\sim 2.3 \times 10^6$  especificidades diferentes. Este valor a su vez se ve amplificado por un mecanismo adicional conocido como *diversidad de unión* que surge por la adición o eliminación de nucleótidos al azar en torno a los segmentos génicos durante el proceso de empalme de los exones  $V_H-D_H-J_H$  y  $V_L-J_L$ . Este proceso es mediado por la enzima TdT (*terminal deoxynucleotide transferase*) que está particularmente activa durante el empalme de los segmentos génicos  $D_H-J_H$  de la región variable de la cadena pesada, por lo que afecta directamente la longitud del CDR3. Se estima que la combinación de estos mecanismos genera un repertorio primario de por lo menos  $10^{11}$  anticuerpos diferentes capaces de reconocer virtualmente cualquier molécula (29). Finalmente, el RNA mensajero codificante de la cadena inmunoglobulina completa, se genera cuando el exón  $(VDJ)_H$  o  $(VJ)_L$  se empalma con la secuencia codificante de la región constante correspondiente ( $C_\mu$ , para la IgH, o  $C_\kappa$ ,  $C_\lambda$  para la IgL) a través de un evento de *splicing* del RNA, para así generar la IgM de membrana que característica del linfocito inmaduro que sale de médula ósea (30).

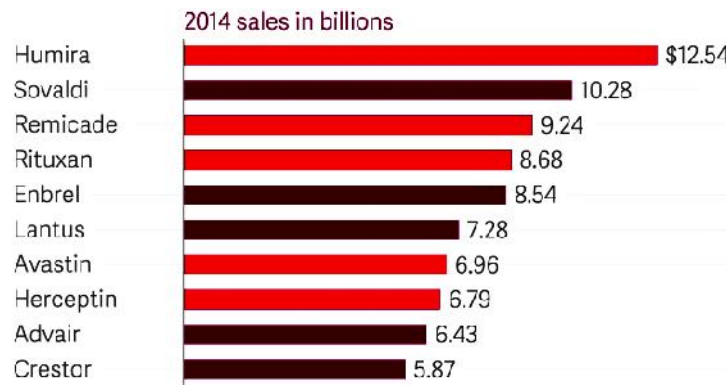
En el transcurso de la respuesta inmune, en la zona oscura de los centros germinales los linfocitos B que se activaron proliferan llevando adelante eventos de *hipermutación somática* que afectan los exones (VDJ)<sub>H</sub> y (VJ)<sub>L</sub>. El proceso está mediado por la enzima AID (desaminasa de citidina) y afecta las regiones variables con una frecuencia de mutaciones 10<sup>6</sup> veces más alta que la normal (31, 32). En la zona clara del centro germinal esta población diversificada compete por el antígeno inmovilizado sobre las células dendríticas foliculares y sólo los clones que expresan las Ig de mayor afinidad logran endocitar suficiente antígeno para lograr su supervivencia. El proceso es reiterativo y como resultado se obtienen aumentos de varios órdenes en la afinidad de los anticuerpos (33). En paralelo, ocurren además eventos de recombinación del ADN, denominado *cambio de clase*, en el cual los segmentos V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> hipermutados son empalmados con diferentes genes codificantes del dominio constante (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>) para dar lugar a los isotipos IgD, IgG, IgE o IgA (34).

### **1.3 Aplicaciones biotecnológicas de los anticuerpos.**

La extraordinaria especificidad de unión de los anticuerpos los convierte en una de las herramientas más valiosas en investigación, diagnóstico y terapia. Inicialmente, la única fuente de anticuerpos eran los sueros policlonales hiperinmunes, pero los mismos constituyen una población de anticuerpos con especificidad por distintos epítopes del antígeno blanco, y además son susceptibles a la variación entre diferentes preparaciones contra el mismo antígeno. El descubrimiento más importante para el uso masivo de los anticuerpos fue posible gracias al desarrollo de la tecnología de hibridomas por Georges Köhler y César Milstein en 1975 (35). El método se basa en lograr líneas celulares estables (hibridomas) capaces de producir una cantidad ilimitada de anticuerpos monoclonales (mAbs) con una única especificidad, a través de la fusión de células B productoras de anticuerpos con una línea celular de mieloma compatible. Las líneas de mieloma más exitosas son las de ratón, rata y conejo, pero no se han desarrollado las correspondientes líneas humanas, por lo que no es posible preparar anticuerpos monoclonales humanos con esta tecnología (35). El otro hito en la tecnología de anticuerpos se produjo con el desarrollo de los métodos de humanización de mAbs murinos y de selección de anticuerpos recombinantes mediante *phage display* (descrito en la **sección 3, página 26**) que abrió las puertas al uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales, con ejemplos emblemáticos en la aprobación en 1997 del anticuerpo quimérico *rituximab* (anti-CD20) para linfomas non-Hodgkin y el primer anticuerpo totalmente humanizado *adalimumab* (anti-TNF $\alpha$ ) en 2002.



En la investigación básica los anticuerpos son elementos claves de muchas técnicas como inmunodetección, inmunoblot (*western blot*), inmunoprecipitación, citometría de flujo, inmunohistoquímica, etc. (36). Su alta especificidad también los hace útiles en numerosas aplicaciones de diagnóstico clínico, monitoreo ambiental y seguridad alimentaria. Estimaciones recientes sitúan el mercado mundial de anticuerpos usados en investigación en USD 2000 millones anuales y en aplicaciones diagnósticas en los USD 8000 millones, pero en los últimos años las mayores cifras están asociadas a la comercialización de anticuerpos terapéuticos, que fueron de USD 40000 millones en 2012 (37) y en 2013 alcanzaron los USD 75000 millones representando el 50% de las ventas de todos los biofarmacéuticos (38), siendo el *adalimumab* (Humira) el medicamento de mayor venta en 2014, **figura 3**. Hasta la fecha hay más de 47 mAbs aprobados en EEUU y Europa para su uso en varias patologías humanas, desde enfermedades inflamatorias hasta cánceres, y hay más de 300 candidatos en desarrollo clínico (39-42).

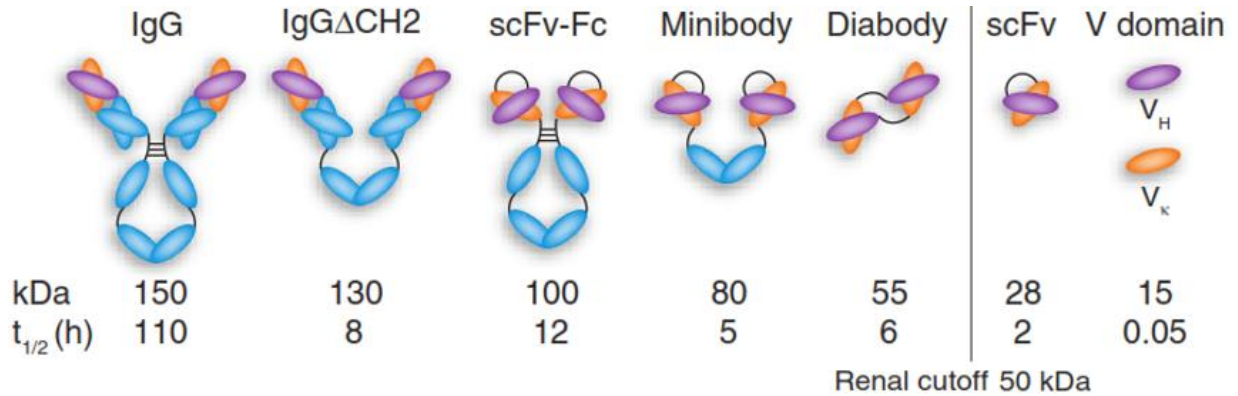


**Figura 3. Los medicamentos de prescripción de mayor venta global.** En rojo se señalan los anticuerpos terapéuticos. Fuente *Genetic Engineering News and Drug Prescribing Information*.

La efectividad del tratamiento con los mAbs se debe por un lado al efecto directo de la interacción con el antígeno, ya sea por neutralización (ej. *ifliximab* anti-TNF ), o por su acción biológica, como por ejemplo, al activar el receptor celular blanco sobre-expresado en células tumorales que da lugar a la inducción de apoptosis (ej. *rituximab*). En otros casos su actividad resulta de las funciones efectoras asociadas al dominio Fc, y se han puesto numerosos esfuerzos en la ingeniería del Fc de los anticuerpos terapéuticos para mejorar la interacción con los receptores para Fc, con el complemento o con las células involucradas en la ADCC (43). Recientemente en la terapia anti-tumoral se ha producido un avance impresionante redirigiendo la actividad de los anticuerpos, no contra blancos tumorales directos, sino contra “puntos de control” de la respuesta inmune que el tumor utiliza para reprimir la inmunidad. Sobre esta base la FDA aprobó en 2011 el *ipilimumab* (anti-CTLA-4) y en 2014 el *pembrolizumab* (anti-PD1) en modalidad de vía rápida (*fast track*) debido a sus evidentes beneficios en melanoma avanzado (44). Adicionalmente al uso de

mAbs completos se vienen explorando formatos alternativos que incluyen fragmentos de anticuerpos, alguno de los cuales se describen en la **figura 4** tomada de Nuñez et al., 2015 (40).

#### 1.4 Formatos de anticuerpos recombinantes.



**Figura 4. Diferentes formatos de fragmentos recombinantes de anticuerpos.** En la figura se menciona el peso molecular de los diferentes tipos de anticuerpos y el tiempo de vida media esperado en suero. *Fab*, fragmento de unión al antígeno; *Fv*, fragmentos variables; *scFv*, fragmentos variables de única cadena; y *V<sub>H</sub>*, fragmento variable derivado de la cadena pesada. Extraído de Holliger et al., 2005 (45).

##### 1.4.1 Fragmentos scFv.

El fragmento más pequeño derivado de un anticuerpo convencional lo constituye el dominio  $V_H$  o  $V_L$  individual. Sin embargo estos dominios individuales tienen una interfase muy hidrofóbica que estabiliza la interacción de ambos dominios (46), y en consecuencia, los dominios  $V_H$  o  $V_L$  tienden a agregarse y por tanto carecen de utilidad (47). El fragmento recombinante funcional más pequeño derivado de los anticuerpos convencionales es la unidad scFv (por *single chain Fv*) donde los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se encuentran unidos covalentemente a través de una secuencia espaciadora flexible (48, 49). Debido a su pequeño tamaño (~25 kDa) pueden ser producidos de forma recombinante en bacterias en altos rendimientos (50). Para el diagnóstico por imagenología *in vivo* los scFv representarían una herramienta ideal debido a que combinan la capacidad de alta penetración tisular y rápido *clearance* del organismo (45). Esto último es muy atractivo debido a que se limitaría la exposición a los radioisótopos. Además, debido a la ausencia de dominio Fc muestran muy bajo *background* en comparación a la IgG parentales, según se ha mostrado en modelos murinos (51, 52). A pesar de estas ventajas sobre los anticuerpos convencionales su uso se ha visto obstaculizado para aplicaciones terapéuticas debido a su corta vida media en circulación por su rápida absorción y excreción por los riñones (45, 53). Dependiendo del largo de la secuencia espaciadora se puede dar la asociación cruzada entre dos o más cadenas  $V_H$ - $V_L$  dando lugar a la formación de di- o tribodies, fenómeno que no siempre es fácil de controlar (54).

### 1.4.2 Fragmentos Fab.

Los Fabs pueden ser generados por digestión proteolítica de los anticuerpos enteros o de forma recombinante, y comprenden los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$  de la cadena pesada y los dominios  $V_L$  y  $C_L$  de la cadena liviana conectados por enlaces disulfuro entre los dominios constantes. Constituyen una alternativa ventajosa para los sistemas de expresión de fragmentos de anticuerpos en fagos (*phage display*) debido a la estabilidad de formato Fab (55). Estos también pueden expresarse en sistemas procariotas, pero con menor rendimiento que los scFvs debido a que son moléculas más complejas y presentan un mayor tamaño (48).

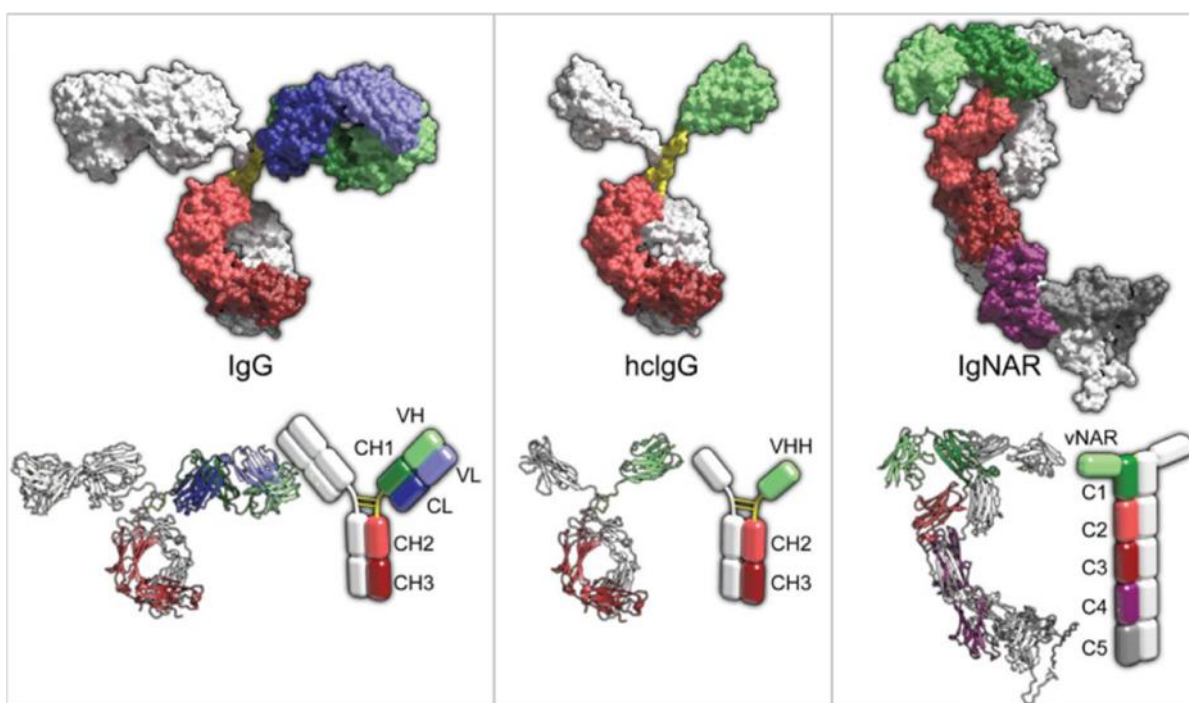
### 1.4.3 Anticuerpos Biespecíficos.

La estructura modular de las inmunoglobulinas ha sido explotada para crear más de 60 variantes diferentes de formatos de anticuerpos biespecíficos (BsAb), los cuales varían de muchas formas incluido su peso molecular, número de paratopos, separación espacial entre los distintos paratopos, valencia para cada antígeno, habilidad de suministrar funciones efectoras y propiedades de farmacocinética (56). Muchos de ellos están diseñados para redireccionar células T al sitio de tumores para su eliminación como por ejemplo *Catumaxomab* (Removab®, anti-EpCAM × anti-CD3, para el tratamiento de tumores sólidos) y *blinatumomab* (Blinicyto®, anti-CD19 × anti-CD3, precursores de células B). Estos dos son los primeros en ser aprobados por la FDA para su uso en terapia humana. La mayoría de los otros formatos de BsAb interaccionan con mediadores de patologías como por ejemplo con dos receptores celulares (*Duligotuzumab*, anti-EGFR × anti-HER3, cáncer colorectal), ligandos solubles (ABT-122, anti-IL6 × anti-IL17A, artritis reumatoidea) y otras proteínas (Revisado por Spiess et al., 2015). De estos últimos hay más 30 que están en desarrollo clínico, y 13 de ellos en etapas avanzadas de fase II (56).

Estas variables de anticuerpos recombinantes han suministrado una alternativa a los mAbs en distinto tipos de aplicaciones (57-59), pero el uso de anticuerpos para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico se ha expandido enormemente a partir del descubrimiento de un tipo de anticuerpos no convencionales, cuya manipulación genética y simple mecanismo de reconocimiento del antígeno permite la generación de mini-anticuerpos funcionales recombinantes (*nanobodies* o VHH), los cuales en determinadas aplicaciones presentan ventajas potenciales ante los anticuerpos convencionales y otros formatos de fragmentos de anticuerpos.

## 2. Anticuerpos de cadena pesada.

En los 90's, Hamers-Casterman y colegas encontraron que los camellos además de los anticuerpos tetraméricos convencionales también tenían un tipo de anticuerpos estructuralmente diferentes a los conocidos hasta el momento que carecían de cadena liviana (60). Estos anticuerpos homodiméricos compuestos únicamente por dos cadenas pesadas (hcAbs, por *heavy chain antibodies*, **figura 5**), son completamente funcionales y también contribuyen a la defensa humoral de los camellos (60, 61). Cada cadena pesada está formada por regiones variables y constantes referidas como V<sub>H</sub>H y C<sub>H</sub>H, respectivamente, que difieren de su contraparte convencional V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>, como se mostrara más adelante.



**Figura 5. Diferencias estructurales entre los anticuerpos convencionales y los de cadena pesada.** Los anticuerpos convencionales son estructuras tetraméricas formados por dos cadenas livianas y dos pesadas, y portan dos sitios de unión al antígeno determinado por la combinación de los dominios variables de cada cadena (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>). En cambio, los anticuerpos de cadena pesada de camélidos están formado únicamente por dos cadenas pesadas compuestas de un dominio de unión al antígeno (V<sub>H</sub>H) y dos dominios constantes (C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3). En los tiburones las IgNAR presentan un dominio variable (VNAR), y cinco dominios constantes (C<sub>H</sub>1-5), y a diferencia de los camélidos, contienen el dominio C<sub>H</sub>1. El dominio V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> reconoce preferencialmente superficies planas sobre el antígeno, mientras que los V<sub>H</sub>H y VNAR, como se mostrara más adelante, tienen preferencia para interactuar con cavidades o grietas sobre la superficie del antígeno. Extraída de Zielonka et al., 2015 (62).

Estos anticuerpos también se encontraron en otros camélidos como llamas y alpacas, pero no en otras familias del orden *Artiodactyla*, como los rumiantes y suiniformes (60). En 1995 Greenberg y colaboradores encontraron una forma similar de hcAbs en tiburones nodriza (61), y luego en otros peces cartilagosos que recibieron un nombre más complejo, NAR (por *new antigen receptor*). Los IgNAR están compuestas por dos cadenas idénticas formadas por cinco dominios constantes ( $C_H$ ) y un dominio variable (V-NAR) (61, 63). A pesar de similitudes con los VHH el análisis evolutivo mostro que los VNAR surgieron en la evolución por un camino diferentes independiente y mucho más temprano que en los camélidos (64).

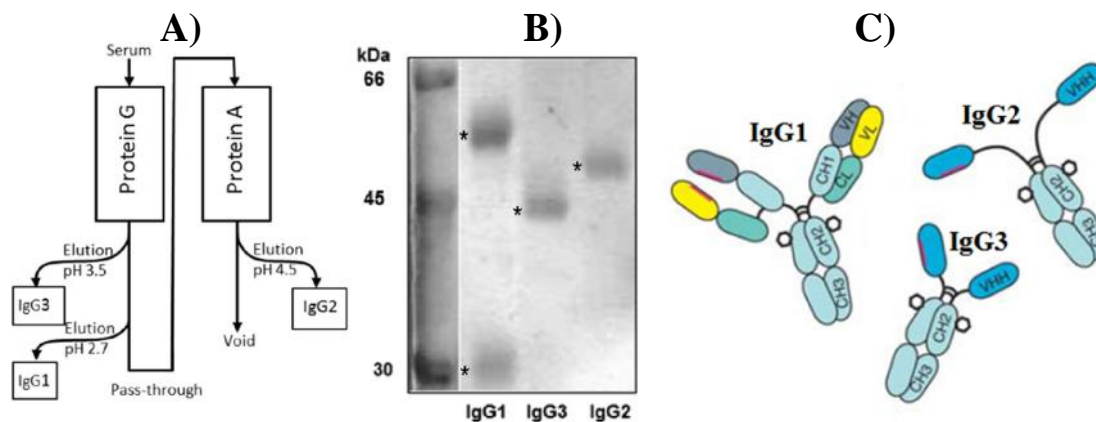
Tanto en camélidos como en tiburones, el dominio de unión al antígeno de los hcAb esta reducido a ~130 aminoácidos (~14 kDa) y representan los fragmentos de unión al antígeno más pequeños hasta hoy conocidos en la naturaleza derivados de Ig funcionales (65).

## 2.1 Respuesta humoral en camélidos.

Ya a comienzo de 1970 habían sido reportadas en el suero de camellos y llamas la presencia de IgM, IgG, IgA e incluso IgD sobre la base de reactividad cruzada con inmunoglobulinas humanas (66). Sin embargo, hasta la fecha todavía no hay reactivos confiables que permitan la identificación y la cuantificación de los isotipos de inmunoglobulinas presentes en camélidos. En base a estudios de cromatografía de afinidad se diferencian tres tipos de IgG en camélidos que se nombran de acuerdo a su cantidad relativa en el suero (**figura 6**). La fracción IgG1 es el más abundante, aproximadamente 3 mg por mL de suero en camellos, y corresponde a los anticuerpos tetraméricos convencionales. Esta inmunoglobulina interacciona tanto con la proteína A como la G (60). La fracción IgG2 e IgG3 corresponde a los hcAb que están presentes en 2 y 1 mg por mL en el suero de camellos, respectivamente. La interacción diferencial de los hcAb con la proteína A y proteína G permite su purificación individual. Por ejemplo la IgG2 no interacciona con la proteína G, pero si con la proteína A, mientras que la IgG3 interacciona con ambas, pero más débil a la que presenta la IgG1. Esto permite que a partir del mismo paso de purificación por cromatografía de afinidad sobre proteína G se eluya la IgG3 a un pH mayor al necesario para eluir la IgG1 (60).

La cantidad de los hcAb varía dentro de las especies de camélidos, por ejemplo en camellos la proporción IgG1:IgG2/3 es 50:50, mientras que en llamas es menor, 75:25 (65). La fracción IgG1 es muy heterogénea, y existirían dos isotipos, uno con una región bisagra de 19 aminoácidos y otro con una de 12 aminoácidos (60, 67). En los hcAb la región bisagra permite diferenciar la IgG2 de la IgG3. La primera presenta una región bisagra muy extensa, de 35 aminoácidos, mientras que la de la IgG3 es de 15 aminoácidos (65). Hasta ahora no hay evidencia de la existencia, como proteína, de

otros isotipos y también se desconoce si la ausencia de cadena liviana es específico de las IgGs o hay isotipos de IgM, IgA, IgE o IgD de cadena pesada (67).



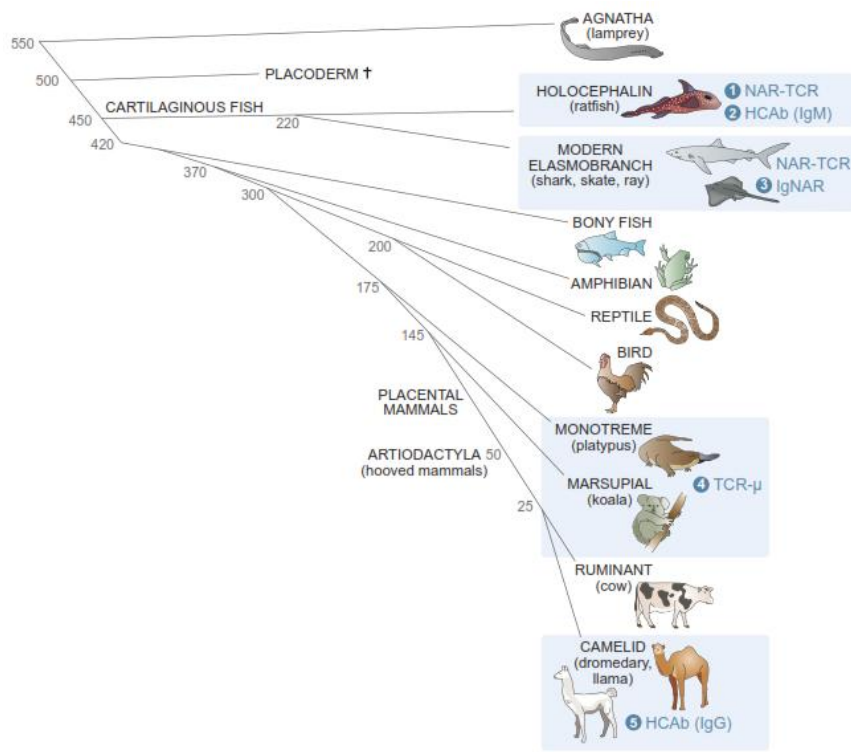
**Figura 6. Inmunoglobulinas del suero de camélidos.** En A se muestra el método para la separación de cada clase de acuerdo a la interacción con proteína A y proteína G. En B la separación pro SDS-PAGE permite evidenciar que la IgG1 está formada por cadena pesada (~50 kDa) y cadena liviana (~30 kDa), mientras que la fracción IgG2 e IgG3 son anticuerpos únicamente de cadena pesada. La diferencia en el tamaño de la IgG2 e IgG3 se debe a la presencia de una región bisagra más extensa. En C se muestra la representación de los tres tipos de Ig presentes en el suero de camélidos. Modificada de Tabares et al., 2011(68) y Muyldermans et al., 2013 (65).

## 2.2 Aparición de los hcAb.

Análisis filogenéticos han mostrado que los genes dedicados a los hcAb derivan de los genes que codifican a los anticuerpos convencionales, que emergieron y se diversificaron ~ 25 millones de años atrás (64, 69), después que *Tylopoda* se separara de otros mamíferos (60–80 millones de años atrás) y antes de la especialización de los camellos y llamas (11 millones de años atrás) (69) (figura 7). En el caso de los peces cartilaginosos se desconoce el origen de los genes codificantes de los V-NAR, pero se deduce que emergieron por lo menos hace 220 millones de años atrás. Estos animales también tienen la particularidad de generar receptores de células T (TCR) de naturaleza monodominio a partir del mismo set de genes V, conocidos como NAR- TCR (29, 70, 71).

La evolución molecular convergente de los hcAbs homodiméricos en especies tan diversas como camellos y tiburones sugiere que el sistema inmune de los ancestros de esas especies estuvo sujeto a un *estress* semejante, y en ese momento la aparición de esas moléculas confirmó alguna ventaja de sobrevivida debido a que fue propagado y fijado en la población. Aunque se han propuesto muchas hipótesis, la fuerza directora de su aparición aún es un misterio. La más realista de todas es que emergieron por la necesidad de estas especies de una respuesta humoral adaptativa capaz de desarrollar anticuerpos con dominios variables (I) más pequeños, (II) de forma alargada, y (III) de dominio único, que pudieran complementar a los anticuerpos convencionales a través del reconocimiento de regiones de antígenos que no son inmunogénicos para los anticuerpos

convencionales (29, 71). Como se mostrara más adelante los hcAb tanto de camélidos como tiburones tienen la particularidad de reconocer epítopes muy diferentes a los reconocidos por los anticuerpos convencionales.



**Figura 7. Árbol filogenético enfatizando aquellos *taxas* que poseen Ig o TCRs de cadena única.** Los camélidos y peces cartilagosos son los únicos que tienen anticuerpos de cadena pesada funcionales. Se ha descubierto que otras especies tendrían la capacidad de generar moléculas similares de dominio único, como por ejemplo receptores de células T (TCR) o IgM de dominio único (sombreado celeste). Los números a la izquierda indican el tiempo en la divergencia en millones de años atrás, para varias *taxas* de vertebrados. Adaptado de Flajnik et al., 2011 (29).

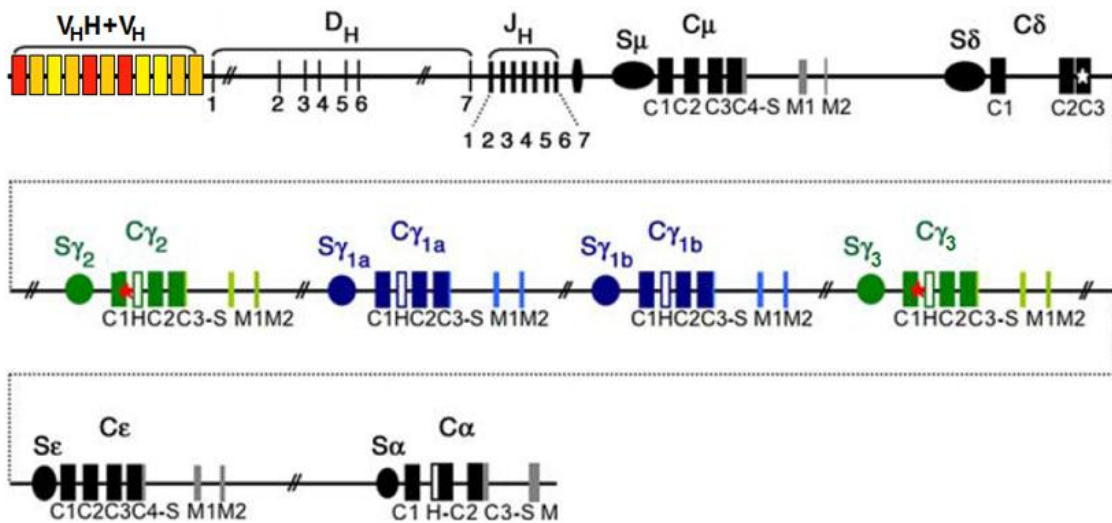
Más allá del origen filogenético, una pregunta interesante en relación a la convergencia molecular es: *Cuales son las modificaciones necesarias para la generación de hcAbs funcionales?*

### 2.3 Estructura y organización de genes.

La estructura general de los hcAbs se asemeja a la Ig clásica en el cual los dominios variables están formados por cuatro *frameworks* y tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs). No obstante, tienen características distintivas. Primero, los hcAbs carecen del dominio constante C<sub>H1</sub>, lo cual genera que el dominio variable V<sub>HH</sub> se conecta directamente a la región bisagra y de ahí al dominio Fc (60). Segundo, en los hcAbs, el Fab está reducido a un único dominio. Esto surge como consecuencia a la ausencia del dominio C<sub>H1</sub> el cual en los anticuerpos convencionales interacciona con el dominio constante de la cadena liviana (C<sub>L</sub>) estabilizando el fragmento de unión al antígeno (V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>).

### 2.3.1 Ausencia del dominio constante C<sub>H1</sub>.

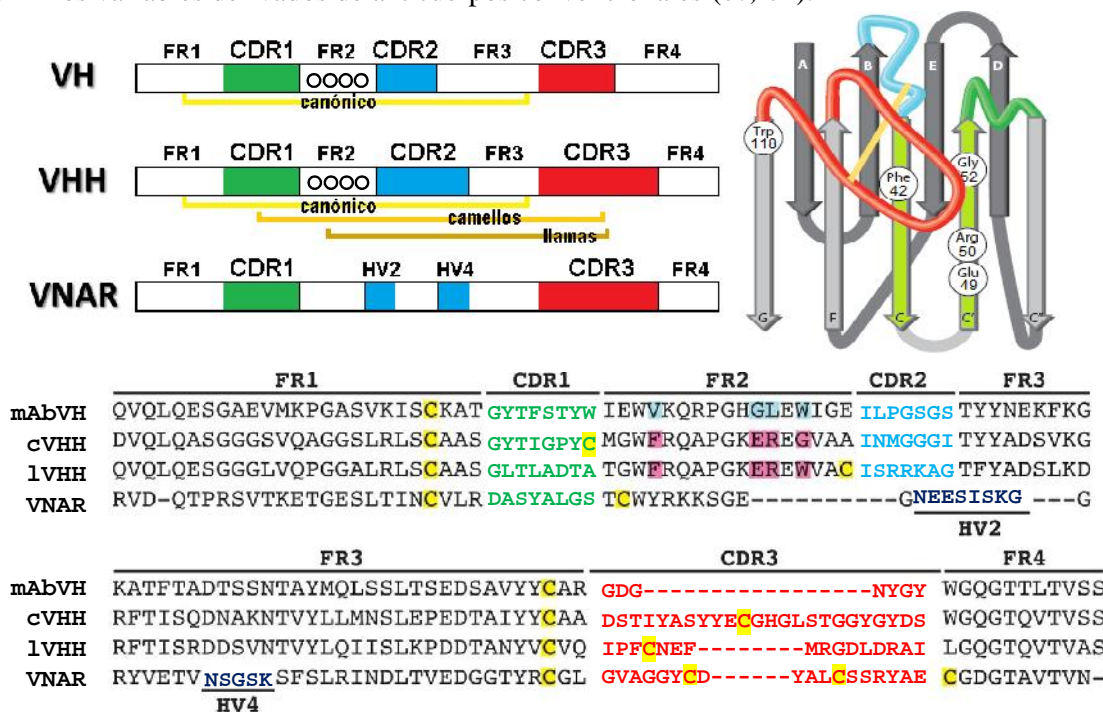
Análisis bioquímicos y de secuencia de ADN mostraron que la región constante de las IgG tetramérica es diferente a la homodimérica, y son referidas como regiones C<sub>H</sub> y C<sub>H1</sub>, respectivamente. La primera gran modificación fue la alteración del dominio C<sub>H1</sub> en los genes C<sub>γ</sub> dedicados para los hcAbs (C<sub>γ</sub>2b y C<sub>γ</sub>2c, IgG2 e IgG3 respectivamente). Este dominio no está presente en el mensajero maduro de ARN de los hcAb debido a mutaciones puntuales en el sitio de *splicing* donador inmediato al exón de C<sub>H1</sub> (72, 73) (**figura 8**). En consecuencia, este límite exón/intron truncado no es reconocido por el *spliceosoma* y el *splicing* del ARN mensajero ocurre entre el exón del V<sub>H</sub>H y el exón de la región bisagra (74). En los anticuerpos convencionales las cadenas pesadas, después de ser sintetizadas son retenidas en el retículo endoplásmico por la asociación con la chaperona BiP (proteína de unión a la cadena pesada) hasta que se asocia con la cadena liviana (75, 76). La asociación IgH/BiP ocurre a través del dominio C<sub>H1</sub>, y solo después de su desplazamiento por la cadena liviana, el anticuerpo completo es liberado para su secreción (77, 78). De esta forma, en ausencia del dominio C<sub>H1</sub>, la cadena pesada se ensambla como un homodímero que existe en el retículo endoplásmico y es secretado como hcAb, independientemente de la proteína BiP.





### 2.3.2 Sustituciones aminoacídica sobre el FR2 de los VHHs.

La ausencia de cadena liviana requirió otra modificación en la estructura de los hcAb para su adaptación y fijación en la especie. El dominio VHH en los camélidos, a nivel del FR2 presenta cuatro sustituciones de aminoácidos altamente conservados: Val<sup>42</sup>Phe/Tyr, Gly<sup>49</sup>Glu, Leu<sup>50</sup>Arg/Cys y Trp<sup>52</sup>Gly (**figura 9**). Estos aminoácidos V<sup>42</sup>G<sup>49</sup>L<sup>50</sup>W<sup>52</sup> en el V<sub>H</sub> interactúan directamente con el V<sub>L</sub> a través de interacciones hidrofóbicas (46) y frente a la ausencia de este dominio se produciría la agregación de los mismos. La sustitución por otros aminoácidos más hidrofílicos (F<sup>42</sup>E<sup>49</sup>R<sup>50</sup>G<sup>52</sup>) aumenta la solubilidad de los VHH y evita la tendencia a la agregación (79). Estos cambios no introdujeron ningún rearrreglo conformacional mayor en el esqueleto proteico (80) y constituyen una marca distintiva que permite determinar el origen de los dominios variables (81). Ya un año después del descubrimiento de los hcAb, en 1994 se demostró que la introducción de mutaciones puntuales a nivel de esos aminoácidos (para cambiar los aminoácidos hidrofóbicos a aminoácidos cargados o polares) permitía obtener VH solubles de otras especies, proceso que se denominó “*camelización*” de los dominios variables derivados de anticuerpos convencionales (80, 82).



**Figura 9. Organización de la región variable de las inmunoglobulinas convencionales y de cadena pesada.** La presencia del motivo V<sup>42</sup>G<sup>49</sup>L<sup>50</sup>W<sup>52</sup> sobre el FR2 es característico de los dominios variables derivados de los anticuerpos convencionales (VH). En los VHH, la evolución dirigió la sustitución de esos aminoácidos hidrofóbicos por otros más hidrofílicos, F<sup>42</sup>E<sup>49</sup>R<sup>50</sup>G<sup>52</sup>. En la parte inferior se muestra el alineamiento de la secuencia del dominio variable de cuatro tipos de anticuerpos específicos por la lisosima de huevo (mAb, anticuerpo convencional; cVHH, VHH de camello; lVHH, VHH de llama; y VNAR, dominio variable de hcAb de tiburón). Los residuos de cisteína se resaltan en amarillo, y todos tienen el enlace disulfuro canónico que conecta el FR1 con el FR3. Los círculos en blanco sobre el FR2 marcan la posición de los aminoácidos VGLW/FERG. En el caso del VNAR, estos aminoácidos no están presentes debido a que carecen del CDR2 completo y una fracción del FR2. Para compensar la pérdida de diversidad por la ausencia del CDR2, en los VNARs se generaron regiones HV (HV2 y HV4, por hipervariables) que son regiones que

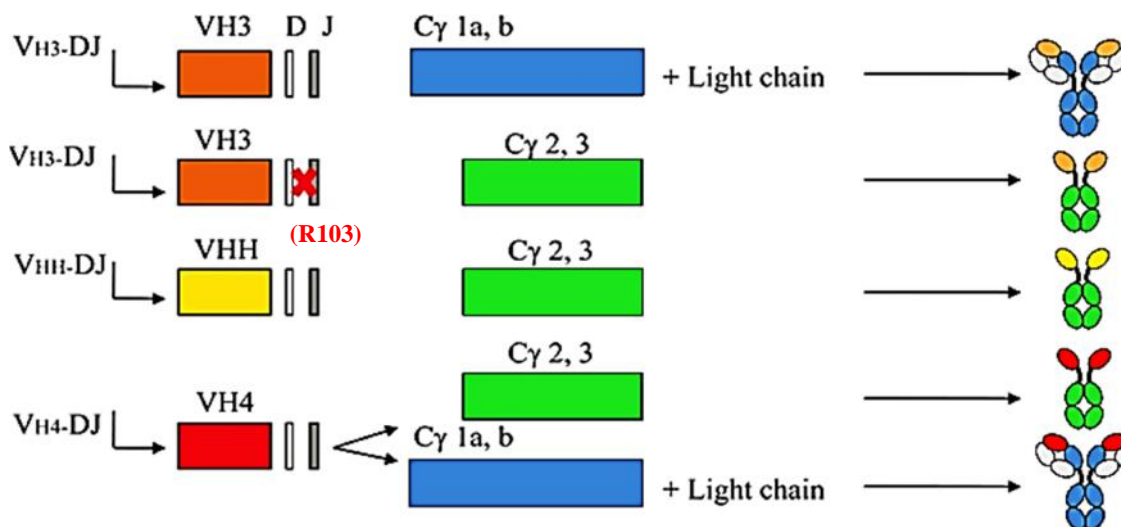
muestran una elevada frecuencia de mutación. Otra diferencia de los VNAR con respecto a los VHH es la presencia de mayor número de puentes disulfuro adicionales al enlace canónico que permite clasificarlos en cuatro familias y suministraría diversidad de reconocimiento de antígenos a partir de la adopción de diferentes estructuras secundarias del CDR3. En la parte superior se muestra la estructura conformacional del dominio variable donde se resaltan las sustituciones de los aminoácidos clásicos y se señala el residuo de triptófano que representa el primer aminoácido del FR4, el cual es esencial para el apareamiento con la cadena liviana en los anticuerpos clásicos (83). En la estructura puede verse que los aminoácidos E<sup>49</sup>R<sup>50</sup> están completamente expuestos al solvente, mientras que W<sup>42</sup> y G<sup>52</sup> están ocultos por el largo CDR3. Adaptado y modificado de Wesolowski et al., 2009 (84), Muyldermans et al., 2013 (65) y Zielonka et al., 2015 (62).

### 2.3.3 Eventos de recombinación que dan lugar a los hcAbs.

Como se mencionó anteriormente los camélidos pueden generar simultáneamente ambos tipos de respuesta humoral. En 2009 Achour y colaboradores mostraron que en camélidos existe un único locus codificante de las inmunoglobulinas de cadena pesada, ubicado en el cromosoma 4. Este locus de IgH contienen todos los elementos genéticos requeridos para la generación de los dos tipos de inmunoglobulinas que caracterizan al sistema inmune de los camélidos (30). El mismo está compuesto por una región V que contiene los segmentos génicos V<sub>H</sub>H y V<sub>H</sub> involucrados en la generación tanto de los exones VHH como los VH, seguidos por un único clúster de segmentos génicos D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub>, y una región que contiene tanto los genes para las cadenas constante de los anticuerpos convencionales (C<sub>H</sub>), como anticuerpos de cadena pesada (C<sub>H</sub>H), **figura 8**. Inicialmente, se observó que los V<sub>H</sub>H característicos de los hcAb y los segmentos génicos V<sub>H</sub> presentaban gran homología con el clan III de la familia V<sub>H</sub>(3) humana. En 2010, Deschacht et al. encontraron que además de segmentos V<sub>H</sub>H(3) y V<sub>H</sub>(3), el locus IgH contiene segmentos génicos V<sub>H</sub> pertenecientes al clan II de la familia V<sub>H</sub>(4) humana (85). El mecanismo genético para formar el exón VDJ del dominio variable de los hcAbs es muy similar al de los otros organismos (72, 86) pero resulta llamativo que los segmentos V<sub>H</sub>H como V<sub>H</sub> compartan el *set* de segmentos génicos D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> con los que se recombinan.

En los linfocitos que han sufrido un rearrreglo V<sub>H</sub>H-D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> para generar un exón VHH, el mismo se empalma específicamente con los exones C<sub>γ</sub>2 o C<sub>γ</sub>3 para dar lugar a los hcAb de clase IgG2 o IgG3. Se desconocen cuáles son las señales que dirigen la preferencia por estos dominios C<sub>H</sub>H en lugar del dominio C<sub>H</sub>, y que se empalmen con el dominio C<sub>γ</sub> en lugar del C<sub>μ</sub> (30). El panorama es aún más complejo porque se ha encontrado, aunque con moderada frecuencia, que segmentos génicos convencionales (V<sub>H</sub>) pueden dar lugar exones V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> que terminan expresándose como hcAbs, (**figura 10**) (85). Curiosamente en estos casos, aun cuando están presentes los residuos hidrofóbicos del FR2, los correspondientes hcAbs son funcionales. Se ha sugerido que la naturaleza del CDR3 tanto a nivel de longitud como de secuencia aminoacídica podría contribuir a la

estabilización y solubilidad de estos hcAb (87, 88) y ocasionalmente es posible aislar nanobodies derivados de segmentos génicos  $V_H$ , como se verá más adelante en este trabajo de tesis.



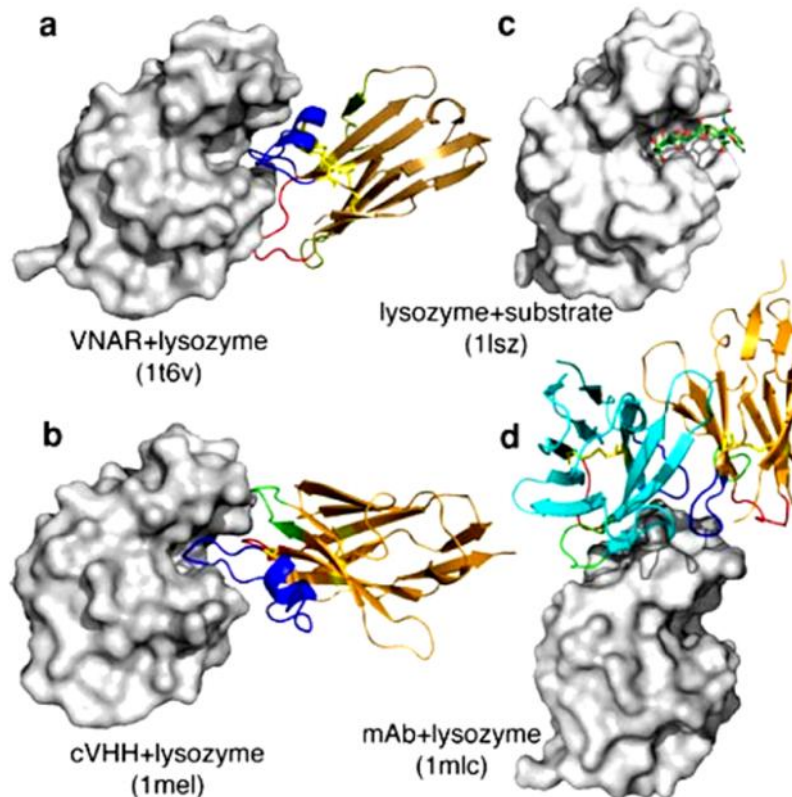
**Figura 10. Los exones derivados de los segmentos génicos  $V_{H3}$  y  $V_{H4}$  también pueden dar lugar a hcAb.** En ciertas condiciones los segmentos  $V_{H3}$  pueden combinan con un arreglo “especial”  $D_H-J_H$  y el dominio  $C_{\gamma 2}$  o  $C_{\gamma 3}$  que codifican el dominio constante característico de los hcAb. En los rearreglos  $D_H-J_H$  de este el hcAb hay una sustitución del residuo de triptófano (W) en la posición 103 por una arginina (R). Este triptófano es el primer aminoácido del FR4 y es esencial para el apareamiento con la cadena liviana en los anticuerpos clásicos (83). Existe otra excepción, por la cual en algunos casos los segmentos  $V_{H4}$  dan lugar a un rearreglo que puede indistintamente combinarse con cualquiera de los dos sets de dominios constantes para producir IgG convencionales o hcAb. A pesar de la alta homología de estos genes con los genes  $V_{H4}$  de humanos, este comportamiento dual es específico de los camélidos. La numeración del residuo de arginina o triptófano es variable porque depende de la longitud del CDR3. Extraído de Deschacht et al., 2010 (85).

## 2.4 Diversidad y forma de reconocimiento.

Debido a que la diversidad combinatoria generada por el apareamiento de las regiones  $V_H/V_L$  no está presente, se esperaría que los camélidos y tiburones tuvieran un repertorio de hcAb muy limitado, pero no es así (80, 89). Existen mecanismos compensatorios que ayudan a diversificar los VHHs, por ejemplo, existe un mayor número de *hotspots* vinculados a la hipermutación somática en los genes  $V_{HH}/V_{NAR}$  en comparación a la de los de los anticuerpos clásicos (69). Asimismo, en el 5' del CDR1 hay dos codones que codifican residuos claves para la conformación de este CDR cuya variación tiene gran impacto en la forma de reconocimiento del antígeno (80). Otra característica importante de los dominios variables de los hcAb es la longitud del CDR3, que en promedio es un 50% más largo que el de los anticuerpos convencionales (79, 90) pudiendo superar los 25 aminoácidos (91, 92).

El CDR3 tiene además una gran flexibilidad conformacional que le permite “ajustarse” a la interacción con el antígeno, particularmente cuando se trata de epítopes cóncavos que generalmente no son accesibles a los anticuerpos convencionales. Estos epítopes tienen muchas veces una alta

relevancia biológica al constituir el sitio activo de enzimas o del sitio de contacto en pares ligando-receptor (65, 93, 94). Esta es quizás una de las características más distintiva de los VHH y ha sido señalada como un elemento que podría justificar su existencia evolutiva. En la **figura 11**, correspondiente a la interacción de la lisozima de huevo con distintos anticuerpos, puede verse como un VHH, de la misma forma que un VNAR, acomodan su CDR3 en el sitio activo de la enzima mientras que un anticuerpo convencional reacciona con un epítipo más bien plano lejos del sitio activo (92, 95-97).



**Figura 11. Estructura tridimensional del complejo anticuerpo/lisozima o ligando/lisozima.** Los tres CDRs están coloreados según la **figura 7**. CDR1, rojo; CDR2, verde; y CDR3 en azul, y los puentes disulfuro en amarillo. En **a**, el complejo lisozima con un VNAR de tiburón con propiedades inhibitoras debido a que penetra en el sitio activo de la lisozima a través de las regiones CDR1 y CDR3 (96). En **b** la estructura del complejo entre la lisozima con un VHH de camello (cVHH) que introduce la región del CDR3 y ocupa el sitio activo de la enzima (92). Tanto el VHH como el VNAR mimetizan lo que hace el sustrato natural de la enzima (c) (98), mientras que el mAb (d) interacciona a través de los CDRs de ambas cadenas con la superficie plana del antígeno, por fuera del sitio activo de la enzima (99). Adaptado y modificado de Wesolowski et al., 2010 (84).

Es frecuente que el largo CDR3 esté estabilizado por la aparición de puentes disulfuro adicionales que conectan el CDR3 con el CDR1 en camélidos, o el CDR3 con el CDR2 en llamas (84). No solo a nivel del CDR3, sino que también a través de la aparición de cisteínas en las regiones constantes (29). El CDR3 típicamente contribuye con el 50 a 100% de la superficie de interacción con el antígeno (65). Esto ha sido usado para el diseño de péptidos miméticos de la estructura del

CDR3, denominados *pepti-bodies* los cuales retienen la especificidad y actividad del nanobody original, lo cual se demostró sintetizando un péptido de 26 aminoácidos derivado del VHH de camello (cVHH-1mel, **figura 11**) anti-lisozima (100). Esta posibilidad representa una atractiva biotecnológica muy grande debido a que este concepto podría expandirse para el diseño de agonistas/antagonistas peptídicos de receptores a partir de nanobodies.

## 2.5 Aplicaciones biotecnológicas de los nanobodies.

El potencial biotecnológico de los VHH ha sido reconocido desde el descubrimiento de los hcAb en 1993 y ha estado fuertemente protegido por la patente original de la *Vrije Universiteit Brussel*, transferida en 2001 a la compañía belga Ablynx, quien es también propietaria de la marca registrada “Nanobody™”. Ablynx ha monopolizado el desarrollo comercial de los nanobodies y tiene 6 nanobodies terapéuticos en fase clínica, pero la patente original caducó en Europa en 2013 y en EE.UU las patentes originales caducan entre 2013-2017, lo que ha incrementado el interés en este formato de anticuerpos (101, 102).

Algunas de las características de los nanobodies que los hacen atractivos para su aplicación en investigación, diagnóstico y medicina incluyen:

- 1) Conservación de la especificidad original durante la construcción de bibliotecas debido a que no se pierde el apareamiento con la cadena liviana (65).
- 2) Menor tamaño (15 kDa en lugar de 30 kDa para los scFv).
- 3) Comportamiento monomérico estricto (los scFv frecuentemente se dimerizan) (79).
- 4) Alto nivel de expresión en bacterias (10 mg/L) y levaduras (250 mg/L) en condiciones de laboratorio (103).
- 5) Fácil inclusión como dominio de unión en quimeras recombinantes (104).
- 6) Mayor estabilidad química y térmica que cualquier otro tipo de fragmento derivado de anticuerpos. Usualmente los nanobodies se desnaturalizan a 2.3-3.3 M de cloruro de guanidinio y a 60-80°C (105). Algunos son inusualmente estables y pueden soportar temperaturas superiores a 90°C sin afectar su capacidad de reconocer el antígeno (68, 106), y mantienen su funcionalidad a pH extremos y aún en condiciones desnaturizantes como urea 8M o cloruro de guanidinio 5M (107-109).
- 7) Su pequeño tamaño permite que penetrar en los tejidos y atravesar barreras tales como la hematoencefálica y logrando reconocer epítopes que no son alcanzados por los anticuerpos convencionales (110, 111).

- 8) Alta afinidad de reconocimiento el antígeno (nano a sub-nanomolar) (65).
- 9) “Baja” inmunogenicidad en humanos debido a su alta homología con los genes V (85).
- 10) Unión a epítipes crípticos de difícil acceso para anticuerpos conformacionales (93).

Algunas de las aplicaciones describen a continuación, las cuales están extensamente revisadas por (13, 65, 102, 112-114).

### **2.5.1 Nanobodies como herramientas de investigación.**

La facilidad para la identificación de nanobodies contra virtualmente casi cualquier antígeno ha convertido a estos anticuerpos en reactivos importantes y versátiles que pueden ser utilizados por ejemplo para cromatografía de afinidad, citometría de flujo, identificación de proteínas, marcado de proteínas intracelulares, e incluso como asistentes de cristalización (65, 114).

Por su estabilidad y robustez los nanobodies resultan ideales para cromatografía de afinidad, ya que la estabilidad asegura la capacidad de regeneración de la columna, y la naturaleza monomérica permite incrementar la densidad de paratopos en el soporte cromatográfico. En la actualidad ya hay nanobodies en el mercado disponibles para su uso en investigación, por ejemplo *Life Technology* (115) tiene disponibles matices con nanobodies anti-IgG y anti-albumina para eliminar estas proteínas de suero humano, que son usados como alternativa a la proteína A para la purificación de las IgG (116). Para cromatografía también hay disponible un VHH seleccionado contra la *-synuclein* (proteína asociada al síndrome de Parkinson) que reconoce el tetra péptido EPEA (Glu-Pro-Glu-Ala) con una  $K_D = 200$  nM (117). Esta secuencia, denominado *C-tag* (*The CaptureSelect™ C-tag*) es utilizada para la purificación de proteínas recombinantes que presenten dicho *tag*, y tiene la particularidad que tolera la purificación hasta 8M de urea y 2M de cloruro de guanidinio resaltando la estabilidad de los VHH. Otra ventaja de esta interacción es que la elusión se realiza con  $MgCl_2$  por lo que es muy útil para la elusión de proteínas que no toleran la elusión acida (108).

La fusión génica de nanobodies a proteínas fluorescentes como la GFP (*green fluorescent protein*) se conoce como *Chromobodies®* (118) o *fluorobodies* cuya expresión intracelular ha sido utilizado para evidenciar la presencia de antígenos particulares dentro de la célula viva (119, 120). La especificidad de los nanobodies por variantes conformacionales en su blanco y su capacidad de inducir y reportar cambios conformacionales ha sido explotado para el monitoreo de la expresión de proteínas en etapas puntuales del ciclo celular, o su translocación, y localización final dentro de la célula (114, 120).

Debido a la propiedad de algunos nanobodies de unirse al antígeno y estabilizarlo, estos han sido utilizados como chaperonas de cristalización (denominadas como *Xaperonas*) en donde asiste la cristalización de otra proteína (121). Por ejemplo, la estructura del receptor androgénico 2 en estado activo no se había logrado debido a su inestabilidad en este estado conformacional. Mediante el uso de un nanobody específico para el estado activo del receptor fue posible la formación de cristales para ambas proteínas (122). Esta asistencia o actividad de chaperona se supone que se logra a través de la estabilización de estados inestables y/o a través de proveer superficie de contacto adicional (123, 124). A partir de ese entonces se han utilizado para obtener la estructura de muchas otras proteínas (125, 126). En esta misma dirección la capacidad de estabilización de proteínas *in vivo*, los Nbs se utilizan para microscopia de súper resolución (nanoscopia) para estabilizar la GFP y así ganar resolución en las imágenes (127).

### **2.5.2 Nanobodies como herramientas diagnosticas.**

El crecimiento del área de desarrollo de Nbs para la detección de antígenos de valor diagnóstico ha sido relativamente lento, debido probablemente a lo consolidadas que están las tecnologías para la generación de anticuerpos convencionales en esta área (65). La gran mayoría de las aplicaciones que empiezan a aparecer son del 2014 en adelante, y aun no hay ningún formato disponible en el mercado. El mayor tamaño de los anticuerpos convencionales es una ventaja para la adsorción a superficies sólidas. Sin embargo, la facilidad de manipulación y modificación de los Nbs permite la introducción de *tags* peptídicos que permiten la inmovilización orientada, por ejemplo, sobre la superficie de sensores, asegurando una máxima capacidad de captura del antígeno. Esto ha permitido el uso de Nbs para generar biosensores para la detección del antígeno específico de próstata humana mediante SRP (*surface plasmon resonance*) (128), para la procalcitonina humana en el diagnóstico de infecciones bacterianas (129, 130), y para el marcador de cáncer de mamas HER-2 (131). También se han desarrollado inmunoensayos para el diagnóstico de cisticercosis por *Taenia solium* (132), la detección y cuantificación de la toxina Cry1Ac y Cry1Fa de *Bacillus thuringiensis* (133, 230), para la cuantificación de la prealbumina humana en suero como marcador de malnutrición e infecciones agudas (134), y la detección del virus de influenza H5N5 (135).

Por otro lado, su reducido tamaño, ausencia de la región Fc, y estabilidad estructural que les permite resistir distintas condiciones de conjugación a radionucleidos, los VHH han mostrado ser sumamente ventajosos en imagenología óptica, *positron emission tomography* (PET) y *single photon emission computed tomography* (SPECT), debido a la buena y rápida penetración en tejidos conjuntamente con una veloz eliminación renal que reduce enormemente el ruido de la técnica

(background) y permite realizar el estudio pocas horas luego de la administración (112, 136). Estas propiedades los hacen reactivos muy adecuados para su uso en combinación con radio-trazadores de corta vida media como  $^{68}\text{Ga}$  o  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 68$  y 110 min, respectivamente), lo cual tiene el beneficioso resultado de bajo tiempo de exposición del paciente a la radiación. Este principio ha sido demostrado y evaluado en varios modelos murinos, por ejemplo usando nanobodies anti-HER-2 (137), y anti-V-CAM1, un antígeno utilizado para el diagnóstico de lesiones ateroscleróticas (138).

### 2.5.3 Nanobodies terapéuticos.

Siguiendo el éxito de los anticuerpos terapéuticos convencionales ha habido un gran interés en el desarrollo de Nbs con potencial terapéutico. Como se ha mencionado, los desarrollos más avanzados están siendo llevados adelante por la compañía Ablynx, y algunos de estos se encuentran en etapas avanzadas de fase clínica, como por ejemplo los Nbs anti-IL6R, anti-TNF $\alpha$  y anti-IL17 utilizados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, un Nb contra el factor *von Willebrand* (anti-vWF) usado para el tratamiento de pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica, un Nb anti-RANKL usado para combatir desordenes óseos, y un Nb que inhibe la replicación del virus sincitial respiratorio (RSV) humano y se administra en forma de aerosol, **figura 12** (65, 139, 140).







Name	Format		MW (kDa)	Target(s)	Indication	Stage
ALX-0061	Bivalent bispecific nanobody		26	IL-6R $\times$ HSA	Rheumatoid arthritis	Phase II
ALX-0081/ALX-0681 (caplacizumab)	Bivalent monospecific nanobody		28	vWF	TTP	Phase II
ATN-103 (ozoralizumab)	Trivalent bispecific nanobody		38	TNF $\alpha$ $\times$ HSA	Rheumatoid arthritis	Phase II
ALX-0761	Trivalent trispecific nanobody		40	IL-17F $\times$ IL-17A/F $\times$ HSA	Rheumatoid arthritis	Phase I
ALX-0141	Trivalent bispecific nanobody		41	RANKL $\times$ HSA	Osteoporosis; bone metastasis	Phase I
ALX-0171	Trivalent monospecific nanobody		42	F protein of RSV	RSV infection	Phase I

Figura 12. Nanobodies terapéuticos en fase de desarrollo clínico. Extraído de Nuñez-Prado et al., 2015 (40).

Por su carácter modular, los Nbs representan una poderosa herramienta en terapia anti-tumoral como vehículos de entrega (sistemas de *delivery*) de drogas o compuestos tóxicos (directos o generados por la acción de enzimas fusionadas al nanobody) (141-144), o de nano-partículas de oro para producir una terapia foto-térmica para el control de células tumorales. Esto último ha sido demostrado usando Nbs específicos para HER-2, el cual dirige las partículas de oro a las células que sobre-expresan dicho marcador, y luego mediante luz láser se produce localmente calor suficiente para destruir el tumor (145). Otra variante a esta estrategia es el uso de Nbs para la entrega de



moléculas a tejidos que son de difícil acceso para los anticuerpos convencionales. Con este fin, se han generado Nbs que pueden atravesar la barrera hematoencefálica (110, 146). Uno de estos Nbs reconoce un marcador específico de astrocitos, GFAP (*human glial fibrillary acidic protein*), incluso cuando está fusionado a la proteína fluorescente GFP posibilitando su uso en aplicaciones de imagenología (146). En forma similar, se han desarrollado Nbs que transmigran a través del epitelio mediante el reconocimiento del receptor pIgR (*polymeric immunoglobulin receptor*) y podrían transportar compuestos a las mucosas (147).

Los anticuerpos monodominio presentan también interesantes propiedades para la rápida neutralización de microorganismos y toxinas. Distintos Nbs han mostrado ser eficaces como agentes anti-infecciosos. Así además del ALX-0171 contra el RSV, se han desarrollado distintos VHHs contra el virus del HIV. En estos casos, la existencia de un CDR3 largo y flexible es un componente crucial que facilita la unión “ajustada” a la cavidad que alberga el sitio de unión a CD4 en la proteína gp120 (148-150). Este nanobody posee un amplio poder neutralizante, llegando a neutralizar 96 de las 100 cepas de HIV-1 ensayadas (151). También se han aislado VHHs neutralizantes, que interfieren con la unión al receptor de quimioquinas (CXCR4) que el virus utiliza como co-receptor en el proceso de infección (152). Ablynx ha combinado ambas vías de neutralización en un nanobody biespecífico que es capaz de ligar en simultáneo los receptores CD4 y CXCR4 produciendo un sinergismo en el poder de neutralización que es 320 veces mayor que las versiones monoméricas combinadas (140).

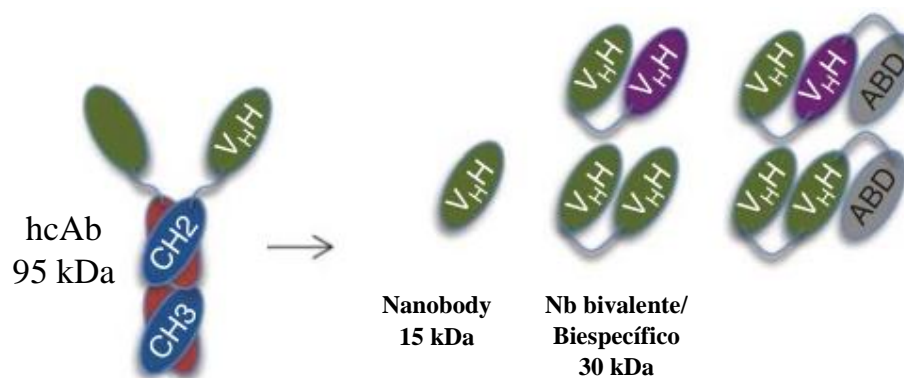
En cuanto a la neutralización de toxinas, el pequeño tamaño de los nanobodies vuelve a aparecer como un factor ventajoso en términos de una rápida biodistribución, pero por otro lado su rápida eliminación renal disminuye rápidamente su concentración efectiva y hay pocos casos de VHH monoméricos efectivos. Un ejemplo particular es el de un nanobody que neutraliza una toxina de escorpión, con una potencia de neutralización muy alta (153). La particularidad de este caso se debe a que esta toxina tiene un pequeño tamaño (~7 kDa) y al ser reconocida por el nanobody forma un complejo de 22 kDa que es rápidamente eliminado de circulación por vía renal. No obstante, este escenario es poco común, y la mayoría de los inmunocomplejos formados toxina/anticuerpo deben ser eliminados por la acción de células fagocíticas en un proceso que en caso de los anticuerpos neutralizantes convencionales es mediado por la región Fc. En el caso de los nanobodies esto no es posible y se han ideado distintas estrategias para superarlo. Este punto se discute en mayor detalle en la introducción del **artículo II** de esta tesis (154).

## 2.6 Nanobodies multivalentes:

En algunas aplicaciones es necesario combinar varios nanobodies en una única molécula utilizando secuencias peptídicas flexibles. Por ejemplo, su corta vida media en circulación ( $t_{1/2} = 20-68$  min) es, como se ha visto, un obstáculo para su aplicación como anti-toxinas pero también en terapéuticas (34), y la multimerización permite en algunos casos corregir este problema. En otros casos se combinan dos especificidades para mejorar su funcionalidad, como por ejemplo es el caso del nanobody biespecífico anti-CD4  $\times$  anti-CXCR4 comentado en la sección anterior, que está siendo desarrollado por Ablynx (140).

Los formatos más utilizados se describen a continuación y se representan en la **figura 13**:

- (I) **diméricos**, en el cual un nanobody mono-específico está en dos copias (155),
- (II) **biparatópicos o bivalentes**, cuando se fusionan dos nanobodies específicos para epítopes diferentes del mismo antígeno, lo cual resulta en el incremento de la afinidad (avidéz) por el antígeno (147),
- (III) **biespecíficos**, cuando se fusionan dos nanobodies con especificidad por antígenos diferentes (nanobodies biespecíficos) (156, 157).
- (IV) **Multiméricos**, cuando un nanobody se clona “en marco” a proteínas que naturalmente tienden dimerizarse o multimerizarse, como el motivo de cremallera de leucina, estreptavidina o verotoxina (158, 159); como fusión a la región bisagra, o a los dominios CH2 y CH3 de la IgG humana. Estos dos últimos son transfectados en líneas de células de mieloma para la producción de un hcAb de la especie deseada (155, 159).



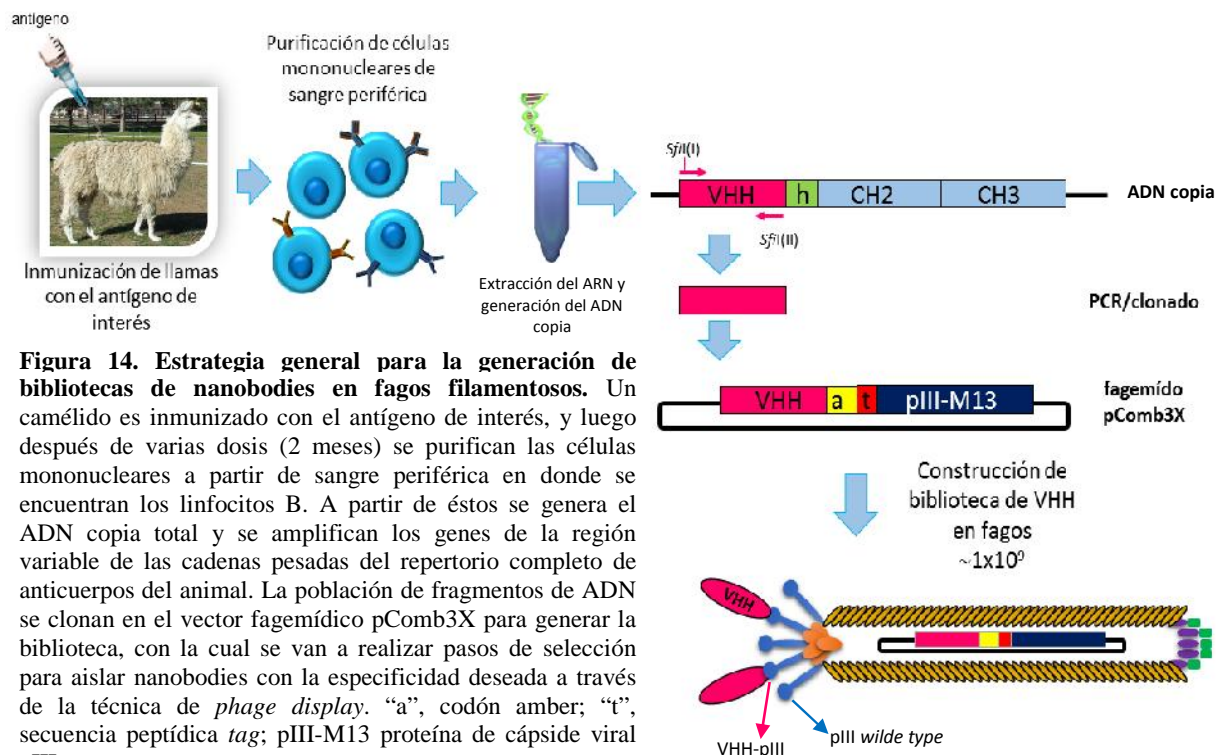
**Figura 13. Diferentes formatos de fragmentos recombinantes de anticuerpos derivados de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos.** Nb, nanobody; ABD, representa otro nanobody con especificidad por la albumina sérica humana. Extraída de D'Huyvetter et al., 2014 (113).

La utilización de formatos biespecíficos para aumentar la vida media de los nanobodies ha sido implementada exitosamente a través de distintas estrategias, como por ejemplo mediante la

generación de Nb biespecíficos que se unen al antígeno de interés y por el otro extremo a la albumina sérica humana (HSA) (139, 142), al receptor Fc neonatal (160), o a inmunoglobulinas del hospedero (161). La fusión ALX-0061 (anti-TNF- × anti-HSA) mejoró la vida media del primero y se incrementó 500 veces la potencia bloqueante de esta citoquina inflamatoria, en comparación a la versión monomérica del mismo nanobody (142, 144). En la actualidad hay varios formatos similares que están en etapas finales de pruebas clínicas (figura 12).

## 2.7 Métodos para la generación y selección de nanobodies.

Los nanobodies recombinantes derivados de hcAbs se obtienen típicamente a partir de bibliotecas de expresión en fagos (*phage display*) construidas a partir de camélidos inmunizados (45). Siguiendo un corto proceso de inmunización de 6-8 semanas es posible generar una respuesta de hcAbs de alta afinidad contra el antígeno de interés. Luego, a partir de la sangre periférica del animal inmunizado se purifica la fracción de células mononucleares, donde se encuentran los linfocitos B, para amplificar los genes de la región variable de la cadena pesada del **repertorio total** de anticuerpos del animal (tanto VH como VHH, y tanto previos como los generados por la inmunización con el antígeno). Los genes amplificados se clonan en un vector que permita su expresión fusionada a una proteína de la cápside del bacteriófago M13 (*display*) generando así la correspondiente biblioteca de nanobodies en fagos filamentosos (figura 14) (162-164).



**Figura 14. Estrategia general para la generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos.** Un camélido es inmunizado con el antígeno de interés, y luego después de varias dosis (2 meses) se purifican las células mononucleares a partir de sangre periférica en donde se encuentran los linfocitos B. A partir de éstos se genera el ADN copia total y se amplifican los genes de la región variable de las cadenas pesadas del repertorio completo de anticuerpos del animal. La población de fragmentos de ADN se clonan en el vector fagémico pComb3X para generar la biblioteca, con la cual se van a realizar pasos de selección para aislar nanobodies con la especificidad deseada a través de la técnica de *phage display*. “a”, codón amber; “t”, secuencia peptídica tag; pIII-M13 proteína de cápside viral pIII.

La posterior selección de los VHH de interés a partir de esta biblioteca se realiza mediante su interacción con el antígeno inmovilizado (*panning*) como se verá más adelante. Dado que es fácil alcanzar una alta representatividad de la diversidad original en las bibliotecas de VHHs como se discute a continuación, es común aislar nanobodies de alta afinidad con constantes de disociación ( $K_D$ ) nM o sub nM (nano molar). Alternativamente, se han utilizado otros soportes biológicos para construir bibliotecas de nanobodies y proceder a sus selección, incluyendo el *display* en bacterias, levaduras, y ribosomas (165-167).

Comparativamente, la generación de bibliotecas de VHH es mucho más eficiente que las bibliotecas equivalentes derivadas de anticuerpos tetraméricos IgG. Esto es así dado que en las primeras, la especificidad reposa en un único dominio y una vez clonado reproduce la especificidad original. Por el contrario en las segundas la especificidad depende del apareamiento de los dominios VH y VL, y el mismo se pierde durante el clonado individual y posterior ensamblado ambos genes, que resultan “barajados” y que por tanto se combinan en forma aleatoria, por lo que la especificidad original se recupera con muy baja frecuencia. En términos prácticos esto significa una biblioteca con una diversidad de  $10^6$  es suficientemente representativa del repertorio de VHH del animal, mientras que es necesario generar bibliotecas del orden de  $10^9$  clones de scFv o Fab para lograr una representatividad equivalente. La alta diversidad inherente a las bibliotecas de nanobodies, hace que en ocasiones sea posible aislar anticuerpos contra antígenos que no fueron utilizados en la inmunización (168). No obstante, la afinidad de los nanobodies que se seleccionan de esta forma es modesta, lo cual se explica por la ausencia de maduración de afinidad *in vivo*. Esta baja afinidad puede mejorarse *in vitro* a través de distintos métodos de diversificación y selección (169).

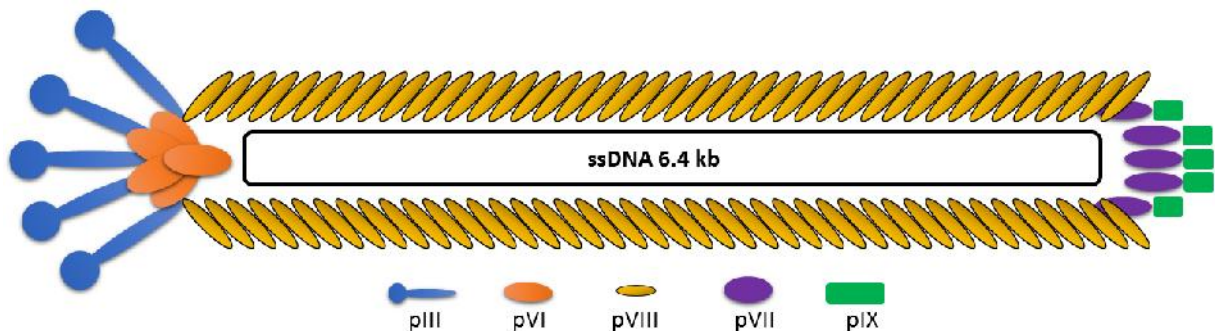
### **3. Principios y características de la técnica de *phage display*.**

Existen numerosas alternativas para generar bibliotecas de *display* o “muestreo” de anticuerpos sobre la superficie de distintos virus (170), bacterias (171) y levaduras (172) o en sistemas completamente *in vitro* utilizando *ribosome display* (173). Por ser la más ampliamente utilizada y la aplicada en esta tesis, solo se revisarán los principios de funcionamiento del método de expresión en fagos filamentosos referida como *phage display*.

Esta tecnología, desarrollada en 1985 por Smith (170) se basa en el uso de virus bacteriófagos que han sido modificados de forma tal que expresen proteínas o péptidos recombinantes fusionados a alguna de las proteínas de su cápside. Durante el proceso de ensamblaje en la

membrana bacteriana, estas proteínas de fusión son incorporadas en la partícula viral en formación. Dado a que al mismo tiempo el ADN que codifica para esas proteínas de fusión también es empaquetado dentro de la partícula viral, se establece un nexo directo entre el genotipo (ADN encapsulado en la partícula viral) y el fenotipo (proteína de fusión). Este vínculo, junto con la capacidad de infección retenida por el bacteriófago, constituyen la base de selección de clones individuales entre varios de millones de variantes presentes en una biblioteca.

El bacteriófago más utilizado para estos fines es el fago M13, miembro de la familia de fagos filamentosos que reciben su nombre por la larga estructura de filamento de ~880 nm de largo por ~6.5 nm de diámetro. Este virus infecta las cepas de *E. coli* que contengan el plásmido conjugativo F, a través de su unión al extremo del pilus de la bacteria, lo que da lugar a la translocación del ADN viral hacia el citoplasma de la célula. En la replicación de su genoma participan proteínas propias y de la célula huésped, y su empaquetamiento da lugar a una partícula en forma de bastón que se libera al medio exterior sin lisis de la célula infectada. La partícula viral tiene una masa mlecular de 16.3 MDa, de la cual aproximadamente el 87% esta atribuido a las proteínas de cápside que encierran el genoma de ADN de simple cadena de ~6.4 kb. El genoma del M13 codifica para 11 proteínas, cinco de las cuales componen la cápside del fago, y las otras seis están involucradas en la maduración del fago dentro de *E.coli*. La cápside está formada principalmente por el ensamblaje de aproximadamente 2700 copias de la proteína pVIII formada por 50 aminoácidos, y 5 copias de cada una de las otras cuatro proteínas (pIII, pVI, pVII, pIX) que se ubican en los extremos de la partícula viral como se muestra en la **figura 15**. pIII es la proteína que se une al *pilus* de *E. coli* e inicia el proceso de infección. Los dos dominios del extremo N-terminal de pIII participan en este proceso, mientras que el dominio C-terminal ancla la proteína a la partícula viral (164, 174).



**Figura 15. Estructura del bacteriófago M13.** Esquema de la partícula viral mostrando la localización de las diferentes proteínas de la cápside dentro de la cual se mantiene el genoma de simple hebra. Los fagos filamentosos tienen una morfología cilíndrica y la cápside está formada mayoritariamente por la proteína pVIII con alrededor de 2700 copias. En una de las extremidades se encuentran 5 copias de las proteínas pVII y pIX, y en el extremo opuesto se ubican 5 copias de las proteínas pVI y pIII. Las proteínas pIII y pVIII son las más utilizadas en la tecnología de *phage display*. Adaptado y modificado de Barbas III et al., 2001, *Phage display: A Laboratory Manual* (164).

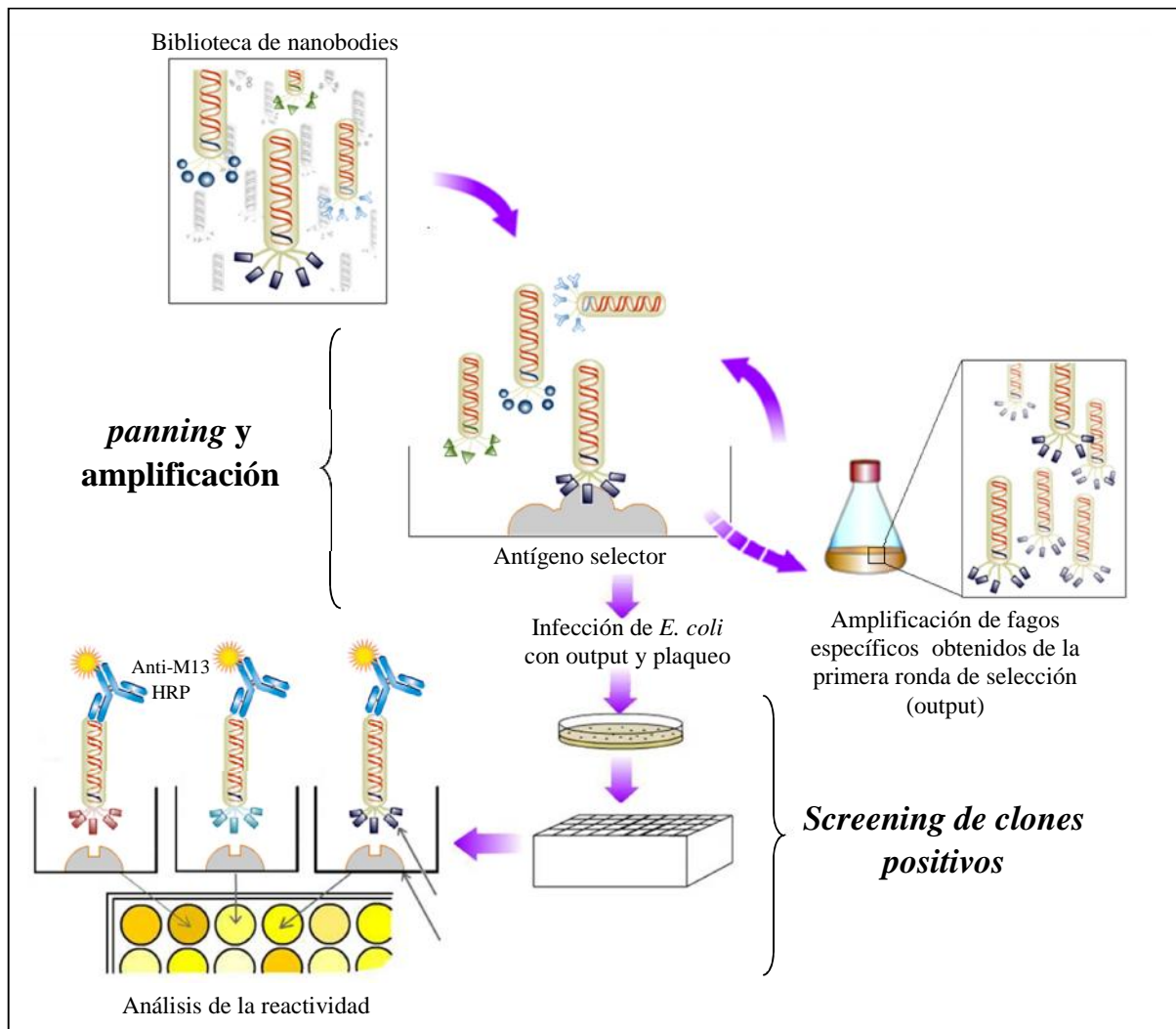
Cualquiera de las cinco proteínas de cápside viral puede ser utilizada para el *display*, pero las más utilizadas son pIII y pVIII (175). pIII es la proteína de elección para el muestreo de fragmentos de anticuerpos o proteínas recombinantes grandes debido a que es la última proteína incorporada durante el ensamblaje viral y por tanto tolera la fusión de proteínas de mayor tamaño sin distorsionar la estructura de la cápside viral. Esto no es posible cuando se utiliza el *display* sobre pVIII, en este caso solo es posible expresar péptidos cortos de 6-10 residuos sin comprometer la integridad de la partícula viral (176). De todas formas el sistema de expresión en pVIII es ampliamente utilizado en el caso de péptidos debido a que la multivalencia permite seleccionar ligandos peptídicos que si bien reacciona con baja afinidad, pueden seleccionarse en función de su aversez.

En las aplicaciones iniciales de la técnica la expresión se realizaba modificando el genoma del bacteriófago, con lo cual el *display* del péptido o proteína en cuestión se daba en cada una de las copias de la proteína capsular. Actualmente las técnicas de *phage display* se basan en el uso de vectores fagémidos. El vector fagémido, es básicamente un vector de expresión que contiene el gen de la proteína de la cápside utilizada para el *display* con un sitio de clonado en su extremo 5' para introducir el gen de interés a expresar en la superficie del fago. Este además contiene un origen de replicación "f1" que permite la replicación del ADN de simple hebra y su empacamiento en partículas de fagos (162). Sin embargo, dado que carece de los genes responsables del empaque, de la replicación y de las otras proteínas de la cápside del M13, una vez introducido en *E.coli* por transformación o electroporación, el fagémido puede ser empacado en partículas virales infectando la bacteria con un fago colaborador (fago *helper*) (177). Los fagos *helper* más utilizados son M13K07 (*New England Biolab*) y VCSM13 (*Stratagene*), y en ambos casos el genoma contiene mutaciones que hacen que su propia replicación y empaquetamiento sea poco eficiente, haciendo de esa forma que el fagémido sea preferencialmente empaquetado y garantiza que la mayoría de las partículas contengan el fagémido (178, 179). Por su menor tamaño los fagémidos tienen una eficiencia de transformación mayor, lo cual es muy importante para la obtención de bibliotecas de alta complejidad. Además, dado que la partícula viral es híbrida (la proteína recombinante y nativa se incorporan en la partícula viral) se asegura que no se afecta la capacidad infectiva del fago cuando se usa pIII (177).

En el caso de bibliotecas de fragmentos de anticuerpos la proteína elegida para la expresión es pIII, y se han desarrollado números vectores fagémidos para estos fines. En este trabajo se optó por utilizar el vector pComb3X desarrollado por el laboratorio del Dr. Barbas (174). El vector tiene una versión truncada de pIII que carece de los dominios N-terminales vinculados al proceso de infección. Esto es importante porque la expresión de pIII en el interior de la bacteria la hace inmune a la sobre

infección, y si esta se acumula debido a la presencia del vector fagémido se dificulta la sobreinfección con el fago *helper* y por tanto la generación de partículas virales (164). El vector tiene además una secuencia líder que dirige el VHH clonado en el extremo 5' de la pIII truncada hacia el periplasma de la bacteria, donde hay un ambiente favorable para el correcto plegamiento y formación de los puentes disulfuro que son esenciales para la actividad del fragmento de anticuerpo.

Una vez generada las bibliotecas de fragmentos de anticuerpos es necesario realizar pasos de selección que permitan aislar los clones de fagos que expresan anticuerpos con la especificidad buscada. Típicamente esto se logra incubando la biblioteca con el antígeno inmovilizado en placas, sobre partículas magnéticas, o sobre células, para que tenga lugar la interacción antígeno/anticuerpo, seguido de exigentes etapas de lavado para remover todo aquello que no haya interactuado. Este proceso se conoce como *panning* (**figura 16**). El proceso se puede adaptar en otras modalidades y así existen numerosos ejemplos de etapas de *panning* realizadas *in vivo*, en las cuales la biblioteca se inyecta en el animal y luego de un tiempo de circulación se extraen los tejidos enriquecidos con los clones con especificidad por los mismos (176). Por lo general, siguiendo este procedimiento, después de tres rondas de selección casi el 100% de los clones evaluados son específicos para el antígeno. Esto se verifica infectando *E. coli* con los fagos eluidos en la última etapa y ensayando la reactividad de clones individuales de la bacteria. En el caso del uso de pComb3X esto está facilitado por la existencia de un codón *amber* entre el VHH y la proteína viral pIII, que la cepa de *E. coli* (ER2738) utilizada suprime parcialmente, por lo que gran parte del VHH producido termina en el sobrenadante fusionado a colas peptídicas que permiten seleccionarlos. Este proceso se explica en más detalle en los primeros capítulos de resultados.



**Figura 16. Etapas del proceso de *panning* para la selección de nanobodies con la especificidad deseada.** Una alícuota de la biblioteca que contenga aproximadamente un número de fagos en el rango de 100 a 1000 veces la diversidad calculada de la misma se incubó con el antígeno selector. Luego de 1 hora de interacción, se descartan los fagos que no interaccionaron, mediante extensivos lavados, y los fagos unidos se eluyen por: (I) pH ácido (glicina pH 2.2), (II) por digestión moderada con tripsina que corta la unión del VHH a la proteína viral pIII, o (III) por competición (por ejemplo, con el ligando para el receptor). Los fagos así eluidos se amplifican mediante la infección de bacterias *E.coli*, seguido a la adición del fago *helper* para la producción de una progenie de partículas virales recombinantes que al día siguiente se utilizarán para realizar ciclos adicionales de *panning*. Este proceso se repite por dos o tres rondas con el fin de enriquecer el pool de fagos en secuencias de unión específica al antígeno en cuestión. Una vez finalizado el proceso se evalúa la especificidad de clones individuales mediante ELISA utilizando un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa (anti-M13:HRP), y los clones positivos son posteriormente caracterizados.





---

## OBJETIVOS DE LA TESIS

---



### **Objetivo general:**

Establecimiento de tecnología local para la generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos a partir de linfocitos B de llamas, para la selección y producción de anticuerpos monodominio monoclonales y demostración de su uso en el desarrollo de diferentes aplicaciones biotecnológicas de interés biomédico.

### **Objetivos específicos:**

- 1- Generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos a partir de linfocitos B de llama.
- 2- Generar nuevas herramientas para la expresión de nanobodies monoméricos con alto rendimiento.
- 3- Generar un sistema de biotinylation *in vivo* de los nanobodies.
- 4- Generar un método de alto rendimiento (*High-throughput*) para clasificar la reactividad de los nanobodies e identificar pares que permitan el desarrollo de inmunoensayos de alta sensibilidad.
- 5- Generar una metodología para facilitar la identificación de nanobodies contra receptores celulares utilizando células enteras en los procesos de *panning* y selección.
- 6- Generar una metodología para facilitar la identificación de nanobodies contra receptores celulares utilizando receptores recombinantes en los procesos de *panning* y selección.
- 7- Incorporar funciones efectoras en nanobodies mediante la generación de nanobodies biespecíficos.



# **Resultados y Discusión**

# CAPITULO I

## CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE NANOBODIES Y OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN

Una de las mayores ventajas de los anticuerpos de cadena pesada de llama (hcAbs) es su facilidad de manipulación genética. Mediante biología molecular el ADN codificante del dominio de unión al antígeno (VHH) es fácilmente amplificado por PCR y clonado en un vector fagémido que permite posteriormente aislar clones contra el antígeno de interés empleando la tecnología de *phage display*. Debido a que el ADN codificante de VHH es encapsulada dentro de la partícula viral, se establece así un vínculo físico entre el genotipo y el fenotipo (VHH expresado en la superficie viral). Esta asociación entre el fenotipo y genotipo es la base del sistema de selección de VHH individuales a partir de millones de variantes que están presentes en una biblioteca (180).

El *screening* de clones positivos para el antígeno de interés suele realizarse mediante ELISA con VHH aún unidos a fagos o con la fracción de VHH que son secretados al medio en baja concentración (164). Esto ocasiona que los nanobodies que son seleccionados mediante *phage display* deban ser sub-clonados individualmente en vectores de expresión procariota para su posterior producción y caracterización. La transferencia de VHH desde el vector fagémido a otro de expresión, es un proceso laborioso, especialmente si se tienen que sub-clonar varios VHH. Con estos antecedentes, uno de los objetivos del presente trabajo fue generar un vector de expresión de alto rendimiento, para acelerar y facilitar la caracterización de nanobodies, y posteriormente permitir su producción en gran escala.

### 1.1 Construcción de bibliotecas de nanobodies.

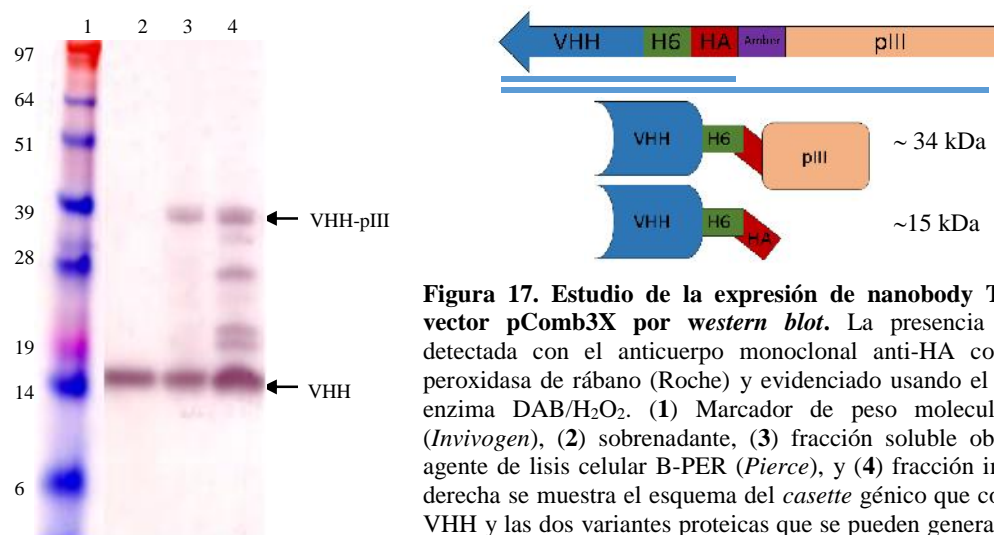
Una llama de dos años criada y mantenida en el parque Lecocq (IMM) fue inmunizada con un coctel de proteínas en adyuvante incompleto de Freud que incluía receptores recombinantes de células inmunes (Dectina-1 y MD2 murino), haptenos (conjugado a la proteína tiroglobulina del bactericida triclocarban (TCC)), enzimas (Tioredoxin glutatión reductasa de *E. granulosos* y la epoxi-hidrolasa humana), y fantasmas de glóbulos rojos humanos. Se realizaron *boosters* en las mismas condiciones cada tres semanas, y la evolución de la respuesta de anticuerpos contra los antígenos fue seguida mediante ELISA durante todo el proceso de inmunización.

Quince días después de la última dosis se extrajeron 150 ml de sangre periférica y se preparó una biblioteca de nanobodies en fagos como se describe en el [Artículo I](#) (68). Esto dio lugar a la biblioteca **NP001**, de  $2 \times 10^9$  transformantes independientes originada a partir de  $2 \times 10^7$  células mononucleares de llama. Considerando que la proporción de células B es de aproximadamente el 20%, la diversidad máxima de la biblioteca conseguida sería del orden de  $4 \times 10^6$  anticuerpos diferentes (VH/VHH). Errores aleatorios introducidos por las PCR podrían mínimamente incrementar este valor de diversidad (181). Se evaluó la calidad a través de la selección de nanobodies específicos para cada uno de los antígenos utilizados en la inmunización.

## 1.2 Estudio del sistema de expresión de Nbs desde el vector fagémido.

Con esta biblioteca se realizaron 2 rondas de *panning* contra el triclocarban (TCC, PM=316 Da) conjugado a una proteína diferente a la usada en la inmunización (TCC-BSA, triclocarban conjugado a la albumina sérica bovina) y se eligió el clon TC7 como modelo para las etapas de optimización (68). El vector pComb3X tiene la particularidad de que entre el nanobody y la proteína de cápside viral pIII hay un codón *amber*, lo cual permite generar el nanobody fusionado a pIII para su ensamblaje en la partícula viral, y también monomérico para su trabajo posterior (164).

Con este nanobody se estudió el nivel de expresión en la cepa de *E. coli* ER2738 desde el vector de selección pComb3X, utilizando condiciones estándares: inducción a  $Abs_{600nm} = 0.6$ , 1 mM de IPTG (isopropil-  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido, agente inductor), y expresión durante 24 h. Como se muestra en la [figura 17](#), en el sobrenadante se encuentra una banda de ~15 kDa.



**Figura 17. Estudio de la expresión de nanobody TC7 desde el vector pComb3X por western blot.** La presencia de TC7 fue detectada con el anticuerpo monoclonal anti-HA conjugado a la peroxidasa de rábano (Roche) y evidenciado usando el sustrato de la enzima DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (1) Marcador de peso molecular pre-teñido (*Invivogen*), (2) sobrenadante, (3) fracción soluble obtenida con el agente de lisis celular B-PER (*Pierce*), y (4) fracción insoluble. A la derecha se muestra el esquema del *cassette* génico que codifica para el VHH y las dos variantes proteicas que se pueden generar. H6, péptido *tag* de seis histidinas; HA, *tag* reconocido por mAb anti-HA.

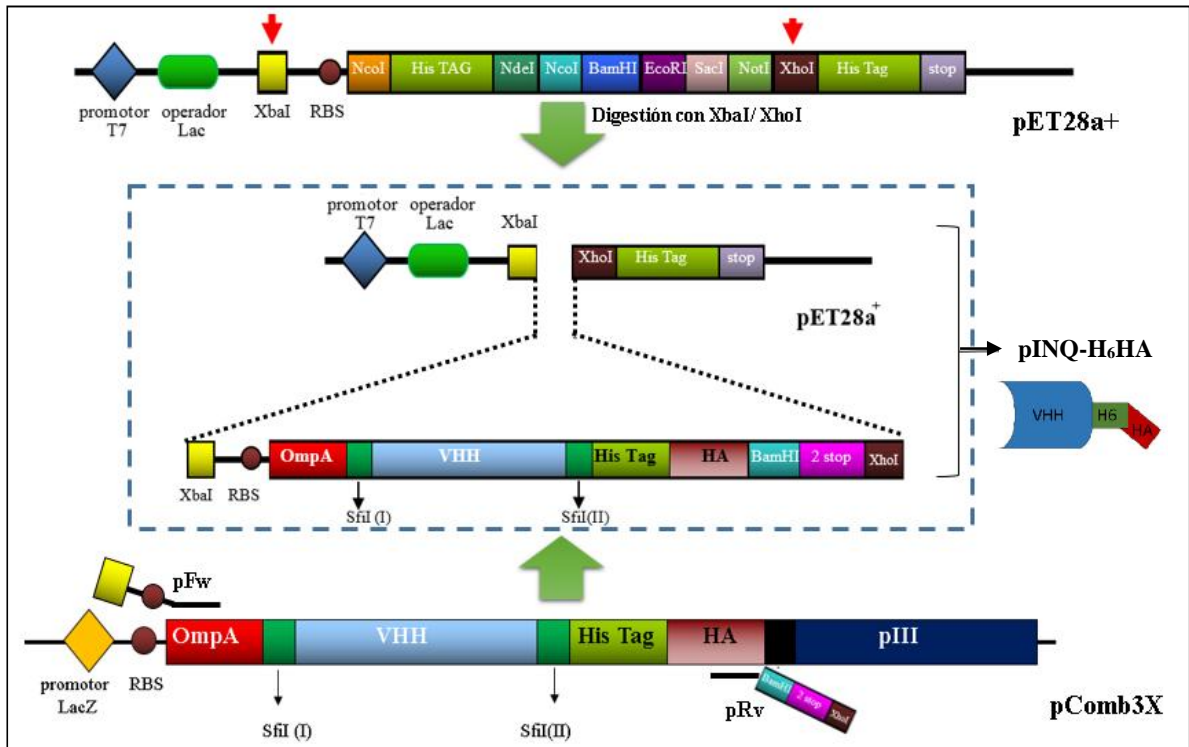
La cepa de *E.coli* ER2738 utilizada es supresora para el codón *amber*, pero aparentemente la supresión no es absoluta. Desde el punto de vista práctico, la aparición del VHH soluble que posee el tag HA (péptido YPYDVPDYA) facilita el *screening* porque pueden usarse directamente los sobrenadantes de los clones a ensayar. Por otro lado, en la fracción soluble e insoluble del extracto bacteriano, se observó una banda (~35 kDa) correspondiente al VHH fusionado a la proteína de cápside viral pIII, pero también se observó un gran porcentaje de la banda de VHH-TC7 como tal (~35 kDa, **figura 16**). En la fracción insoluble aparecían además formas truncadas que aún mantenían el epítipo HA.

Posteriormente se intentó purificar el nanobody TC7 “monomérico/libre de pIII” a partir del sobrenadante utilizando el tag de 6 histidinas. Esto no fue posible por la existencia de compuestos quelantes en el mismo (trazas en el medio de cultivo, o posiblemente ácido láctico, ascórbico o cítrico derivados del metabolismo bacteriano) que impedían la interacción entre la cola de histidina del nanobody y el Ni-NTA de la columna. Por esta razón, la purificación se realizó a partir de la fracción periplasmática obtenida mediante shock osmótico (182). Se obtuvo un rendimiento muy bajo (menor a 0.3 mg/L) con un alto contenido de contaminantes truncados, evidenciándose que el nanobody se encontraba mayoritariamente fusionado a pIII (**figura 19**, carril 4). No se encontró un incremento en el rendimiento modificando variables como la temperatura, tiempo de inducción, y/o la cantidad de agente inductor, e incluso con otros VHH (datos no mostrados).

### 1.3 Generación de un vector de expresión de alto rendimiento de los VHH.

Para superar el problema de la baja expresión encontrada con el uso de pComb3X se generó un nuevo vector, pINQ-H<sub>6</sub>HA (**figura 18**) mediante la modificación del vector de expresión fuerte pET-28a(+) (*Novagen*). Este vector asegura un alto nivel de expresión de la proteína recombinante cuando se usa en combinación con la cepa de *E.coli* BL21(DE3) la cual contiene en su genoma el gen de la T7 ARN polimerasa que va a dirigir la expresión del gen que se encuentra clonado en el vector pET28 gracias a la presencia de un promotor específico para la T7 ARN polimerasa (183). Para esto se usó el nanobody TC7 clonado en el vector pComb3X como molde y se diseñaron *primers* para amplificar por PCR un *cassette* que contuviera (I) la secuencia de secreción periplasmática OmpA, (II) el primer sitio de restricción para la enzima *sfI*, (III) el nanobody, (IV) el segundo sitio de restricción para la enzima *sfI*, (V) el tag de seis histidinas, y (VI) el epítipo HA. Dentro del *primer forward* se incluyó el sitio de unión a los ribosomas (RBS, *ribosome binding site*) y en el *primer reverse* dos codones *stop* flanqueados por un sitio *BamHI* y *XhoI*. Estos dos últimos sitios fueron

incluidos para la posterior generación de quimeras de nanobodies con diferentes proteínas de interés (verotoxina, estreptavidina, fosfatasa alcalina, péptidos OT-I y OT-II derivados de la ovalbúmina, entre otros). El nuevo vector permite fácilmente la transferencia de cualquier VHH, o población de VHHs (por ejemplo resultante de una ronda de *panning*) desde el vector pComb3X al pINQ-H<sub>6</sub>HA mediante una única digestión del ADN fagémido con la enzima *sfi*I.

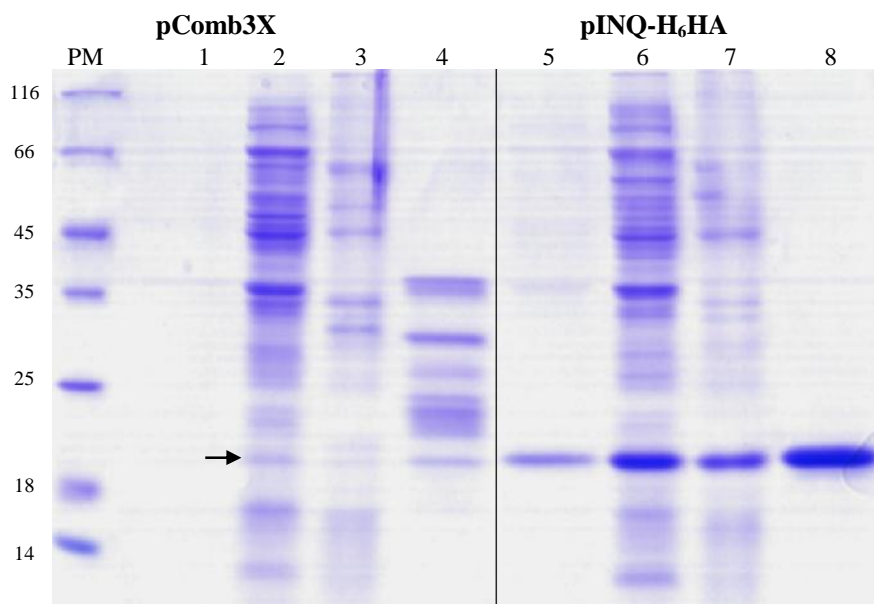


**Figura 18. Esquema de las modificaciones realizadas sobre el vector pET28a+ para generar el vector pINQ-H<sub>6</sub>HA.** A partir del vector pComb3X se amplificó por PCR el *cassette* OmpA-*sfi*(I)-TC7-*sfi*(II)-H<sub>6</sub>HA y clonó en el vector pET28a+ utilizando las enzimas *Xba*I y *Xho*I (flechas rojas). En este vector la expresión del VHH está regulado por el promotor de la RNA polimerasa T7, inducible por IPTG.

### 1.4 Comparación de la expresión de TC7 desde pComb3X y pINQ-H<sub>6</sub>HA.

La comparación de ambos sistemas se realizó electroporando bacterias *E.coli* ER2738 con el vector pComb3X-TC7 y células BL21(DE3) con pINQ-H<sub>6</sub>HA-TC7. Se cultivaron colonias individuales de ambas cepas en condiciones de crecimiento estándar (medio LB, 37°C, 250 rpm, 1 mM de IPTG por 24 horas). El pellet bacteriano se procesó por shock osmótico y se purificó el nanobody por cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA.

Como se muestra en la **figura 19** la expresión de TC7 utilizando el vector pINQ-H<sub>6</sub>HA fue notoriamente superior a la alcanzada con el pComb3X tanto en el sobrenadante como en el extracto celular. Afortunadamente la mayor parte del VHH obtenido con el pINQ-H<sub>6</sub>HA se produce en forma soluble. En estas condiciones, se obtuvieron aproximadamente 5 mg de TC7 purificado por litro.



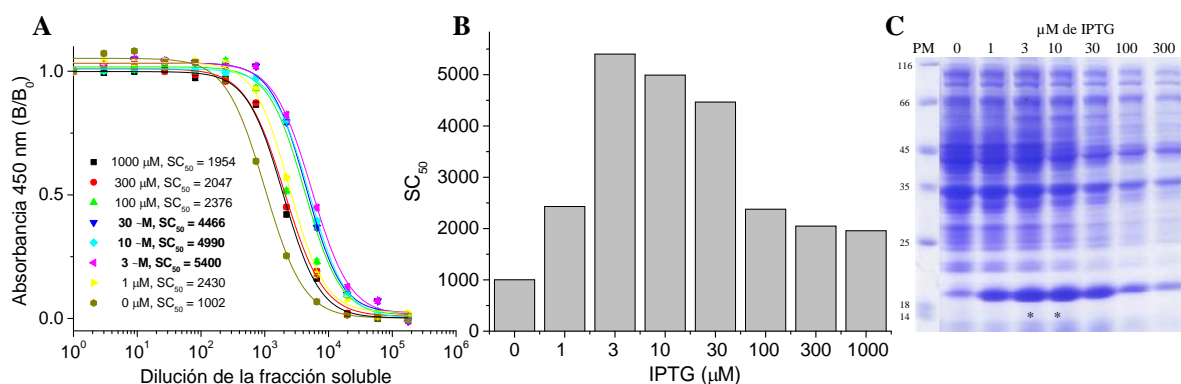
**Figura 19. Comparación de la expresión de TC7 en pComb3x y pINQ-H<sub>6</sub>HA.** Se analizaron por SDS-PAGE 15% cantidades equivalentes de cada fracción **1 y 5** sobrenadante, **2 y 6** fracción soluble; **3 y 7** fracción insoluble. Los carriles **4 y 8** corresponden a 5 µg de VHH purificado por columna de Ni-NTA para cada sistema. La flecha indica la posición del nanobody TC7.

### 1.5 Optimización de la expresión de TC7 desde el sistema pINQ-H<sub>6</sub>HA/BL21(DE3).

El rendimiento de expresión utilizando el vector pINQ-H<sub>6</sub>HA se estudió analizando la influencia de factores como la temperatura (16°C, 25°C y 37°C), el tiempo de inducción (4h y 24h), y la cantidad de agente inductor (IPTG). Experimentos preliminares indicaron un rol menor para la temperatura y una mayor producción de VHH soluble con inducciones de cuatro horas. En cuanto al IPTG, su influencia en el nivel de producción de TC7 se cuantificó mediante un ELISA, analizando la fracción soluble de los cultivos inducidos con distintas concentraciones en pocillos sensibilizados con TCC-BSA, utilizando como referencia el valor de dilución con el que se obtiene el 50 % de la señal de saturación (SC<sub>50</sub>), **figura 20**.

El rendimiento máximo se obtuvo al inducir con 3 µM de IPTG, llegando a obtenerse un rendimiento de 20 mg/L de cultivo. Esta optimización no es dependiente del nanobody TC7, ya que

se obtuvieron resultados similares con VHH específicos para otros antígenos, con rendimientos que varían desde 2 a 40 mg de VHH por litro de medio de cultivo.



**Figura 20. Optimización de la expresión de TC7 usando el vector pINQ-H<sub>6</sub>HA.** En A se muestra la reactividad de las fracciones solubles de las diferentes condiciones contra pocillos sensibilizados con TCC-BSA (titulación). En B se representa el valor de SC<sub>50</sub> obtenido en cada condición en función de la concentración de IPTG utilizada. En C el análisis por SDS-PAGE de las fracciones solubles usadas en el ELISA para demostrar que la mayor señal se debía a mayor cantidad de anticuerpo producido. Con asteriscos se resalta la condición de 3 y 10 μM que concuerda con el resultado obtenido en el ELISA para pINQ-H<sub>6</sub>HA. BSA, albumina sérica bovina; IPTG, Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.

El vector pINQ-H<sub>6</sub>HA resultó ser una valiosa herramienta para el desarrollo de esta tesis no solo en cuanto a etapa final de producción de nanobodies, sino también para algunos formatos de *screening* que requerían mayores concentraciones de VHH como se verá más adelante. Así mismo, resultó de utilidad para otros trabajos del grupo, así por ejemplo el desarrollo del método optimizado para la producción en gran escala de VHHs se aplicó en la caracterización y aplicaciones analíticas de VHHs contra el triclocarban que se describen en el [artículo suplementario S-I](#), Tabares S., Rossotti M., et al. (68).



## CAPITULO II

### DESARROLLO DE UN SISTEMA DE BIOTINILACIÓN *IN VIVO* DE NANOBODIES

**E**n el capítulo previo, se describió el desarrollo de un sistema de alta expresión de nanobodies. Para facilitar su utilización en distintas aplicaciones es conveniente fusionarlos con secuencias peptídicas (*tags*), generalmente epítopes de anticuerpos comerciales, que permiten su detección. Esto implica una dependencia en relación a los anticuerpos secundarios necesarios para reconocer estos *tags*, por ejemplo, contra el epítope HA o la cola de histidina, ya sea durante el proceso de selección de los nanobodies, como en su aplicación final ELISA, histoquímica, citometría de flujo, etc. Una alternativa interesante al uso de anticuerpos secundarios es el sistema biotina-avidinas (avidina, estreptavidina, neutravidina), por lo que resultó atractiva la posibilidad de que los nanobodies tuvieran una biotina como *tag*.

La excepcional afinidad de la interacción biotina-avidinas, ha convertido a la biotinilación en una de las formas de marcado *in vitro* de proteínas más utilizada, dado que permite la detección, inmovilización y purificación de la proteína de interés (184). No obstante, en la biotinilación química (con NHS-biotina) la reacción de conjugación tiene lugar sobre el grupo amino de cualquiera de los residuos de lisina expuestos, y en el caso de afectarse lisinas que formen parte del paratopo del anticuerpo, puede comprometerse el reconocimiento del antígeno (185-187).

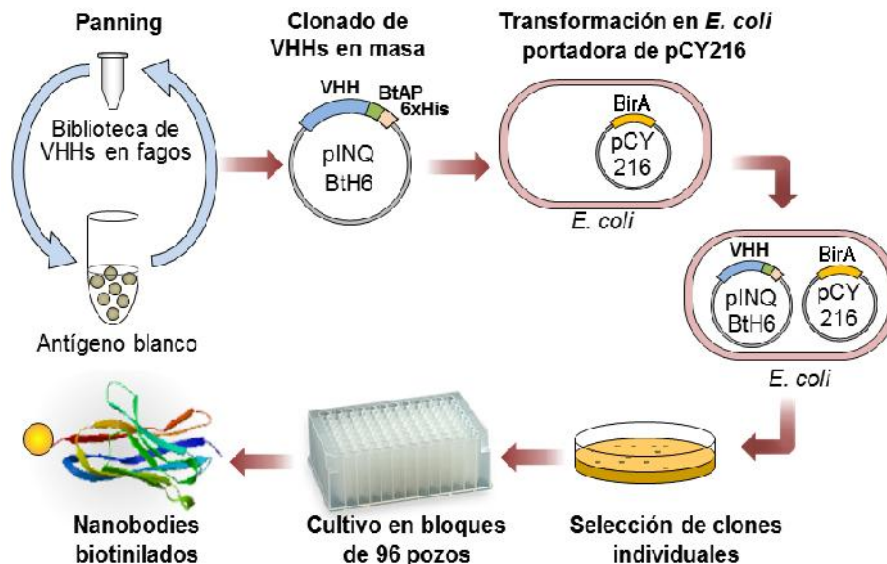
Para evitar afectar el reconocimiento y lograr una modificación sitio-específica una interesante alternativa es la biotinilación *in vivo* de los nanobodies durante su producción. Si bien la biotinilación post-traducciona de residuos de lisinas en proteínas es poco frecuente, la misma ocurre en distintos organismos con la participación de las llamadas *biotin holoenzyme synthetases* (BHS) (188). En *E. coli* hay una única proteína que se biotinila (la BCCP, *biotin carboxyl carrier protein*, subunidad de la acetyl-CoA carboxilasa), y la lisina blanco se encuentra en una región de alta homología con proteínas receptoras de biotina de otros organismos (188). Mediante estrategias combinatorias Beckett y colaboradores optimizaron una secuencia mínima de 15 aminoácidos receptora de biotina (pepBiot, GLNDIFEAQKIEWHE, AviTag™), que fusionada a la proteína de interés conduce a su biotinilación (189). Aunque esto puede observarse al añadir biotina al medio de cultivo, la biotinilación cuantitativa de la proteína requiere la sobre-expresión del gen BirA que codifica la BHS (BirA) de *E. coli* (190). Este sistema resulta sumamente útil debido a que la biotinilación es controlada y específica, preservando la funcionalidad de los anticuerpos.

En base a esto nos planteamos eliminar la dependencia de anticuerpos secundarios generando un sistema de biotilación *in vivo* de los nanobodies para aprovechar la versatilidad del sistema avidina-biotina, no solo para facilitar la detección de los nanobodies sino también para su uso en el desarrollo de metodologías que faciliten la selección y caracterización de los nanobodies. Los resultados principales de este desarrollo se resumen en la primera parte de la publicación “Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells”, BBA, 2015 (191), **Artículo I**, que se incluye al final de esta tesis y que se comentan a continuación.

## 2.1 Desarrollo de un sistema de biotilación *in vivo* de los nanobodies.

El método de biotilación enzimática de los nanobodies se esquematiza en la **figura 21** y consistió en la generación de:

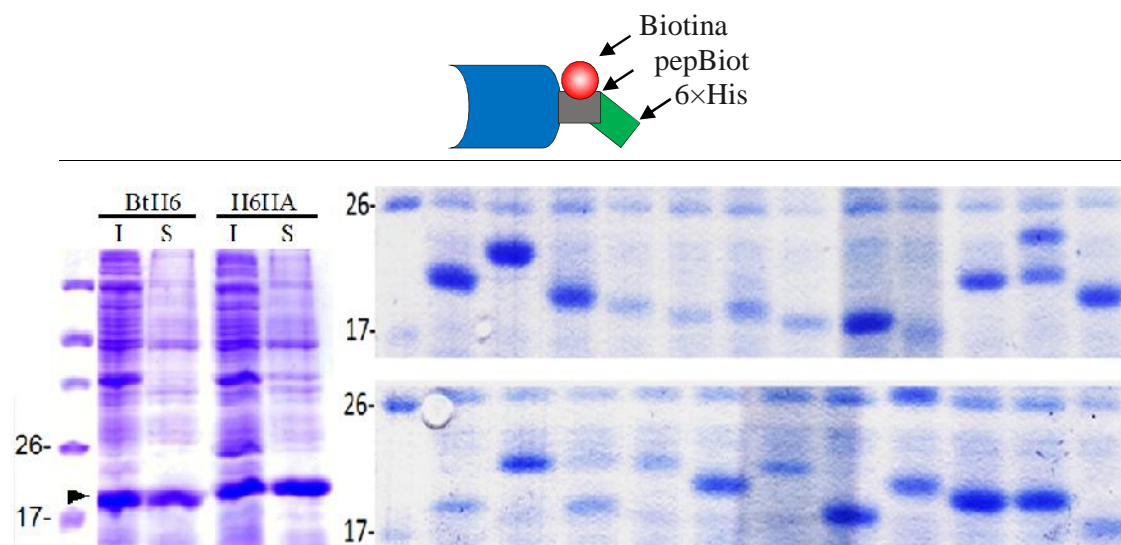
- (I) una cepa de *E. coli* “biotiladora”, mediante la electroporación de bacterias *E. coli* BL21(DE3) con el vector pCY216 (192), que dirige la expresión citoplasmática de la ligasa de biotina, BirA, bajo el control del promotor de arabinosa, y
- (II) una modificación del vector pINQ-H<sub>6</sub>HA, al que se le adicionó la secuencia pepBiot reconocida por la ligasa de biotina (**figura S-2 del Artículo I**).



**Figura 21. Esquema general del proceso de biotilación *in vivo*.** Luego de la selección por *panning* los genes de los VHHs son transferidos “en masa” al vector pINQ-BtH<sub>6</sub> (resistencia a kanamicina) donde resultan fusionados al extremo 5’ de la secuencia codificante del péptido aceptor de biotina pepBiot y de una cola de 6 histidinas. La sub-biblioteca de plásmidos resultante es electroporada en una cepa de *E. coli* (BL21/DE3) previamente transformada con el vector pCY216 (resistencia a cloranfenicol) que sobre expresa la ligasa de biotina BirA de *E. coli*. Los clones individuales son producidos en placas de cultivos de 96 pozos para facilitar el *screening* de un alto número de clones en paralelo. Adaptado y modificado de la **figura 1 del artículo I**.

## 2.2 Optimización del sistema de biotilación *in vivo* de los nanobodies.

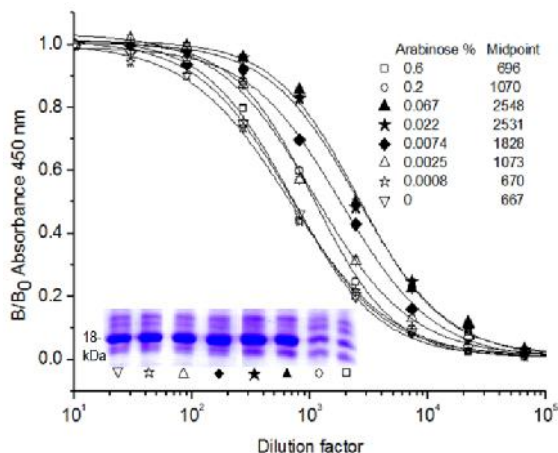
Con estos dos elementos se estudiaron las condiciones de expresión en este nuevo sistema y la influencia de la sustitución del péptido 6×His-HA por pepBiot-6×His utilizando como modelo el nanobody TC7 que reacciona contra el bactericida triclocarban (TCC). El análisis de rendimiento (cantidad final de nanobody purificado) mostró que no se modificó el nivel de expresión de TC7 (20 mg/L) al usar pINQ-BtH<sub>6</sub> en las bacterias sobre-expresando la ligasa de biotina BirA y crecidas en presencia de biotina, respecto al rendimiento obtenido con pINQ-H<sub>6</sub>HA, **figura 22** correspondiente a la **figura S-3, material suplementario del artículo I**. Asimismo, se observó que clones elegidos al azar en general presentaban buenos niveles de expresión soluble con pINQ-BtH<sub>6</sub>, lo cual es importante para utilizar este sistema como herramienta de *screening*.



**Figura 22.** Expresión de VHHs usando el vector pINQ-BtH<sub>6</sub>. En la derecha se muestra el análisis por SDS-PAGE de la expresión en pINQ-BtH<sub>6</sub> (BtH<sub>6</sub>) y pINQ-H<sub>6</sub>HA (H<sub>6</sub>HA) del nanobody TC7 (flecha) en la fracción insoluble (I) y soluble (S) del extracto celular. A la derecha se muestra el nivel de expresión de 23 clones de VHHs escogidos al azar utilizando el sistema pINQ-BtH<sub>6</sub>. Adaptado y modificado de la **figura S-3 del artículo I**.

A continuación se estudió la influencia de la L-arabinosa (que controla el nivel de sobre-expresión de la ligasa de biotina de *E. coli* desde el vector pCY216) sobre la biotilación de TC7. Como se muestra en el SDS-PAGE de la **figura 23**, correspondiente a la **figura 2 del Artículo I**, concentraciones elevadas de L-arabinosa comprometieron la producción del nanobody soluble. Al evaluar el nivel de biotilación mediante ELISA en pocillos sensibilizados con TCC-BSA y detectando la unión de TC7 biotilado con estreptavidina peroxidasa se observó que el mayor grado de biotilación se obtuvo en el rango entre 0.02 y 0.07% w/v de L-arabinosa (**figura 23**).

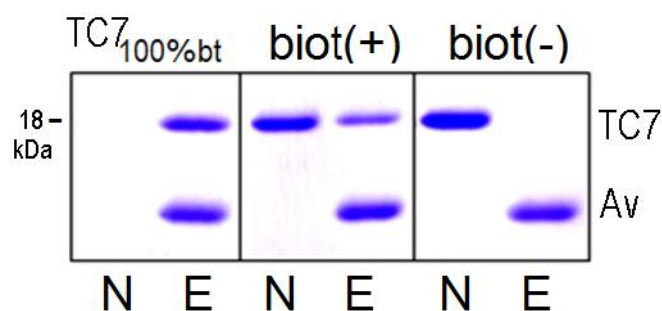
Una vez optimizadas las mejores condiciones de producción de TC7 biotinilado (TC7<sub>bt</sub>) se evaluó el porcentaje de biotinilación alcanzado mediante un ELISA similar al anterior, y a través de ensayos de captura con estreptavidina/agarosa (**figura 3 del artículo I**).



**Figura 23. Efecto de la arabinosa en la expresión y biotinilación de TC7.** Se muestra el análisis por SDS-PAGE de la expresión de TC7 a distintas concentraciones, y la reactividad por ELISA en pocillos cubiertos con TCC y detectando la presencia del TC7 biotinilado con estreptavidina conjugada a peroxidasa. Corresponde a la **figura 2 del artículo I**.

### 2.3 Determinación del porcentaje de biotinilación *in vivo* de los Nbs.

Con las condiciones utilizadas, se obtuvo una biotinilación de aproximadamente un 20 % (**figura 24**). El bajo porcentaje de VHH biotinilado podría deberse a que la ligasa de biotina BirA y los VHH se encuentran en compartimentos celulares diferentes. Estudios previos mostraban que cuando el VHH se expresaba en el citoplasma junto a BirA, la eficiencia de biotinilación era ~95% (187). Con estos antecedentes, el bajo rendimiento de biotinilación se abordó por dos caminos generando vectores que permitían (I) la co-expresión citoplasmática de BirA y TC7, y (II) la co-expresión periplasmática de BirA y el VHH. Se descartó la expresión citoplasmática del VHH debido al dramático descenso en la producción de TC7 soluble (**figura S-4 del artículo I**). En cambio, en el segundo sistema, la expresión del nanobody fue normal, pero la actividad de BirA en el periplasma se vio disminuida 10 veces (**figura S-5 del artículo I**).



**Figura 24. Análisis del grado de biotinilación de TC7 mediante SDS-PAGE.** El nanobody TC7 se expresó en las condiciones de inducción optimizadas en ausencia (biot(-)) o presencia (biot(+)) de biotina, se purificó por Ni-NTA. Cinco  $\mu\text{g}$  de la fracción purificada se pasó por una mini columna de estreptavidina inmovilizada en agarosa y se analizaron las fracciones no adsorbidas (N) y eluidas (E) por SDS-PAGE. En la prueba se incluyó como control positivo a TC7 100%bt que corresponde al nanobody biotinilado purificado por agarosa monomérica. Modificado de la **figura 3** del **artículo I**.

Finalmente, la obtención de un 100% de biotinilación se logró por un camino menos elegante pero más fácil, forzando el contacto del nanobody con la enzima BirA (después del periodo de expresión del VHH) mediante la lisis bacteriana por ultrasonido (sonicación), seguido de una breve incubación en presencia de D-biotina. En estas condiciones, donde ambas proteínas se encuentran en contacto, se obtuvo el 100% de TC7<sub>bt</sub> (**figura 4** del **artículo I**). Este paso adicional se denominó “post-biotinilación”, y consiste en lisar el pellet bacteriano mediante sonicación, o congelado y descongelado, e incubarlo por 1 hora a 37°C en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de D-biotina. Con esta metodología el sistema es sumamente eficiente. Asimismo, se comprobó que no es necesario incluir biotina durante la expresión del VHH, sino que es suficiente agregarla en el paso de post-biotinilación. Esto facilita el sistema de expresión y permite que, de una misma preparación, se pueda conseguir una fracción biotinilado y otra no. Más adelante, en el **capítulo IV** se detalla la utilidad de esto último en la obtención de estas dos fracciones para el mapeo de epítopes de los nanobodies seleccionados, sobre el antígeno de interés (sección **4.5.2**, pág. 63).

En resumen se logró desarrollar un sistema de alto rendimiento, simple y eficiente que permite introducir, de forma sitio específica, una molécula de biotina durante el proceso de producción de VHH, que como veremos más adelante, facilita tanto la selección de los nanobodies de interés como su posterior utilización en distintas aplicaciones. El vector base de este desarrollo, pINQ-BtH<sub>6</sub>, en principio puede utilizarse para obtener el producto biotinilado *in vivo* de cualquier gen que se clone en el mismo.

# CAPITULO III

## DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ELECCIÓN DE NANOBODIES POR SU AFINIDAD RELATIVA CONTRA EL ANTÍGENO MARCADO Y POR SU CAPACIDAD DE FORMAR PARES EN INMUNOENSAYOS DE DOS SITOS

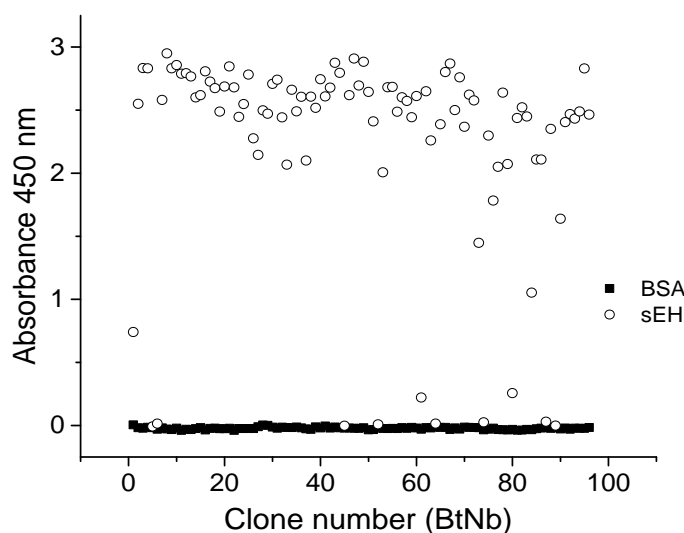
Generalmente los métodos de *screening* inicial de los clones aislados en la etapa de *panning* solamente arrojan información en cuanto a si el clon en cuestión reacciona o no con el antígeno, y el análisis de otras características queda librado al número de clones individuales que puedan analizarse, lo cual puede hacer perder clones valiosos si estos ocurren con baja frecuencia. La comparación directa de los sobrenadantes de cada clon no es posible dado que existen importantes diferencias en el nivel de expresión de los distintos clones. Por esta razón, en este trabajo se procuró utilizar el sistema de biotilación *in vivo* de los nanobodies para el desarrollo de metodologías que facilitaran el proceso de elección de los anticuerpos aislados durante el *panning*. En una primera instancia se utilizó la fuerte interacción biotina-avidina para estandarizar por saturación la cantidad de nanobody a ensayar y así identificar de una población de cientos de nanobodies positivos, aquellos más prometedores en términos de afinidad relativa por el conjugado del antígeno usado para generar la señal. Asimismo, se aprovechó la modificación de los nanobodies con biotina para generar una estrategia simple y rápida que permitiera la selección de pares de nanobodies para el montaje de un ELISA sándwich de alta sensibilidad. Estos desarrollos se hicieron utilizando la epoxi-hidrolasa humana soluble (sEH) como antígeno modelo, y los resultados principales se resumen en el **manuscrito I** “*A method for sorting and pairwise selection of nanobodies for the development of highly sensitive sandwich immunoassays*”, Rossotti et al., que dará lugar al **Artículo III**, que se incluye al final de esta tesis y se comenta a continuación.

### 3.1 Selección de nanobodies contra la sEH humana.

La sEH es un enzima de 62 kDa compuesta de dos dominios separados por una secuencia rica en prolina. En el dominio C-terminal se encuentra la actividad catalítica responsable de la hidrólisis de epóxidos de ácidos grasos dando los correspondiente dioles (193). Entre estos, la sEH hidroliza el ácido epoxi-eicosatrienoico que tiene importantes funciones anti-inflamatorias, vasodilatadoras y analgésicas. Su expresión se ha visto modificada en distintas dolencias y su inhibición se viene explorando como blanco farmacéutico (194). Utilizando la biblioteca **NP001** (derivada de una llama

inmunizada con sEH como se describe en el **capítulo I**), se realizaron dos rondas de selección sobre la epoxi-hidrolasa biotinilada químicamente y adsorbida a *beads* magnéticas a través de la interacción biotina-avidina (se describe en mayor detalle en el **artículo suplementario S-II (195)**). Se empleó una estrategia de selección diferente a la usual con la finalidad de mantener la estructura nativa de la enzima. Estudios preliminares nuestros mostraron que los VHHs seleccionados mediante *panning* sobre la proteína adsorbida directamente en la placa de ELISA no reconocían a la enzima en solución (“estructura nativa”), pero si en *western blots* (“estructura desnaturalizada”). Como se discutirá más adelante en el **capítulo V**, los nanobodies son altamente selectivos por la estructura contra la cual se está realizando el proceso de selección, y eso puede determinar la verdadera aplicabilidad de los nanobodies seleccionados.

Luego de dos rondas de selección el *pool* de los genes de VHH se clonaron “en masa” desde el vector fagemido pComb3X al vector de biotinilación pINQ-BtH6 (191), y se eligieron 96 clones para la evaluación de su reactividad mediante ELISA, **figura 25** (correspondiente a la **figura 1** del **manuscrito I**). La figura muestra un resultado típico del *screening* que se obtiene usando una biblioteca inmune después del *panning*.

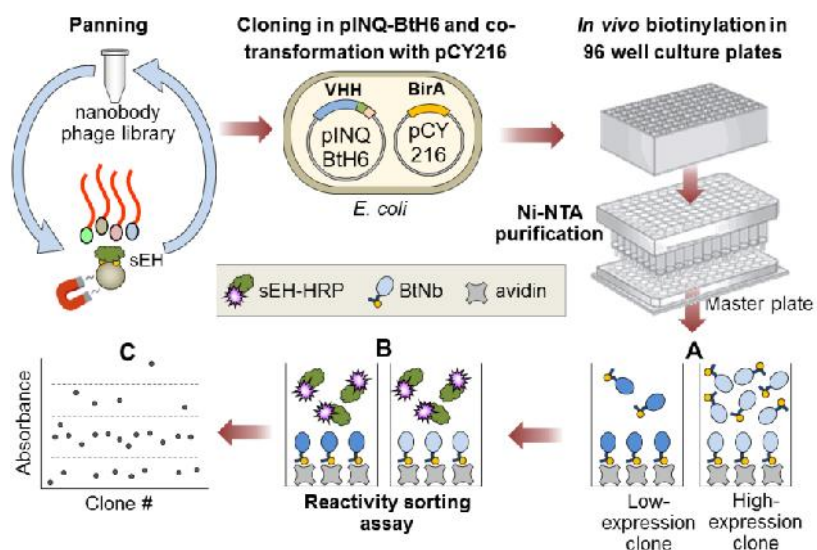


**Figura 25. Reactividad por ELISA de los nanobodies seleccionados contra la sEH humana.** El sobrenadante de 96 nanobodies biotinilados *in vivo* (diluido 200 veces) se enfrentó a pocillos sensibilizados con una alta concentración de sEH para minimizar la desnaturalización pasiva debido a la adsorción al plástico, y la unión se detectó con estreptavidina peroxidasa. En círculos se representa la reactividad contra la sEH, y en cuadrados la reactividad por la BSA. En el ensayo se incluyó en la posición 5 al BtNb TC9 (anti-TCC, (68)) como control negativo de unión. Corresponde a la **figura 1** del **manuscrito I**.

Este resultado no da más información que el parámetro “positivo o negativo” con respecto a la unión al antígeno, y esas diferencias en la señal del ELISA no se corresponden con la afinidad de reconocimiento, debido a las diferencias en la expresión, y por tanto de concentración de cada uno de los nanobodies evaluados. Esto hace difícil sacar una conclusión acerca de con cuál o cuáles de los 96 seguir adelante, y los clones que están poco representados podrían perderse durante esta etapa. Una posibilidad es proceder a secuenciarlos, pero además del costo y tiempo de preparación del ADN y secuenciación, no proporciona otro criterio de selección más que la eliminación de clones redundantes.

### 3.2 Aplicación I: Desarrollo de un método de comparación de afinidad relativa por el antígeno conjugado a la HRP.

Con el objetivo de incrementar la información obtenida del *screening* inicial, se desarrolló un método rápido que permite evaluar simultáneamente la afinidad relativa de cientos de nanobodies, aislados desde la biblioteca de VHH-fagos, contra el antígeno conjugado a una enzima reportera (en este caso, a la peroxidasa de rábano, sEH:HRP). La estrategia de la metodología se muestra en la **figura 26**, correspondiente a la **figura 2** del **manuscrito I**. El método se basa en la estandarización de la cantidad de nanobody biotinilado, lo cual se logra a través de la saturación de la capacidad de captura en el pocillo mediado por una cantidad optimizada de avidina. La alta afinidad de interacción del par biotina-avidina favorece la saturación cuantitativa, aún con cantidades limitantes del ligando, y minimiza las disociación en los siguientes pasos del ensayo.



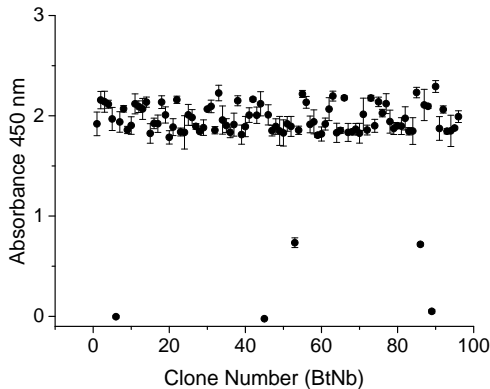


**Figura 26. Representación del método de comparación de la afinidad relativa por el antígeno marcado de un alto número de nanobodies en paralelo.** Luego de la etapa de *panning*, el ADN de la población de VHHs es clonado “en masa” al vector de biotilación pINQ-BtH6. Esta sub-biblioteca es co-transformada con el vector pCY216 que codifica para la ligasa de biotina BirA, y se producen 96 clones individuales utilizando un box de cultivo. Luego son purificados en paralelo utilizando placas de Ni-NTA con la finalidad de remover el exceso de biotina libre (“*master plate*” o placa madre). Los nanobodies purificados son utilizados para saturar la capacidad de captura de los pocillos sensibilizados con avidina (A), y así estandarizar la cantidad de nanobody capturado (B). Por último, se adiciona una cantidad del antígeno marcado (sEH:HRP), y bajo estas condiciones, la lectura a 450 nm se correlaciona con la afinidad del nanobody por el antígenoconjugado a la HRP (C). HRP, *horse radish peroxidase*. Corresponde a la **figura 2** del **manuscrito I**.

Utilizando un nanobody biotilado purificado como modelo (BtNb S22, específico por la sEH derivado del *screening* inicial) se optimizó la cantidad de avidina que permitiera minimizar la cantidad de nanobody requerida para saturar los pocillos de ELISA, lo cual se evidenció utilizando un anticuerpo monoclonal anti *tag* de seis histidinas conjugado a la peroxidasa de rábano (anti-6×His:HRP) para detectar la cantidad de anticuerpo biotilado retenida (**figura 3a** del **manuscrito I**). En la **figura 22** (sección 2.2, pág. 40) se muestra un esquema de los nanobodies y sus *tags*. Una vez fijada la cantidad de avidina utilizada en la captura, se determinó la cantidad de BtNb S22 necesario para saturar la capacidad de captura de los pozos, que resultó ser de 0.5 µg/mL (**figura 3b** del **manuscrito I**), un valor que típicamente está por debajo de la concentración de VHH biotilados que se obtienen en cultivos de 96 pozos.

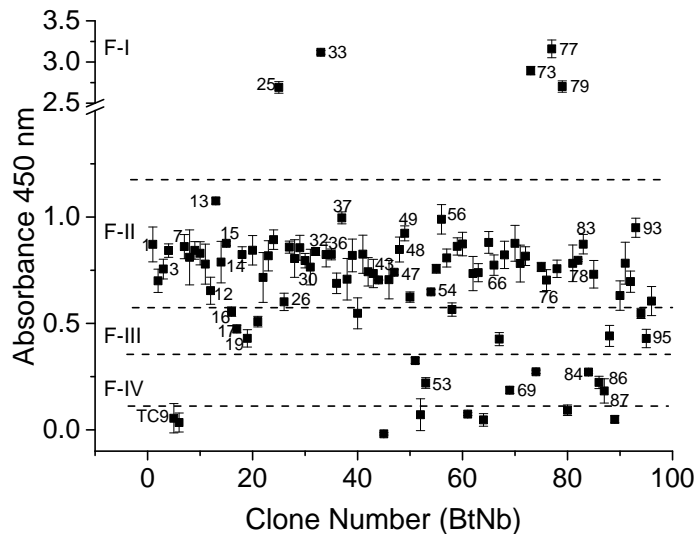
Luego de optimizar las condiciones de captura, 96 clones derivados del *screening* mostrado en la **figura 25** se crecieron en presencia de biotina en bloques de cultivo, 6 réplicas. La fracción soluble de los extractos bacterianos individuales se combinaron en el correspondiente sitio de un bloque de 96 mini-columns con agarosa:Ni-NTA y se eluyeron con 250 mM imidazol en un volumen final de 1 mL. Este paso tiene la finalidad de remover el exceso de biotina libre, y lograr una “placa madre” con 96 nanobodies para realizar tanto el ensayo de comparación de afinidad relativa, como la búsqueda de pares de nanobodies que se describe más adelante en la sección 3.3.

Los distintos nanobodies de la “placa madre” se incubaron en placas sensibilizadas con avidina, seis réplicas. Tres de estas se utilizaron para comprobar la saturación de los pocillos (**figura 26.A**) y las tres restantes para la evaluación de la afinidad relativa de los nanobodies contra la epoxi-hidrolasa humana conjugada a la peroxidasa de rábano (**figura 26.B**). Como se muestra en la **figura 27**, correspondiente a la **figura 4** del **manuscrito I**, a excepción de dos clones, la señal conseguida con el anti-6×His:HRP fue similar, lo cual indica que la cantidad de BtNb capturado en todos los pocillos es la misma.



**Figura 27. Saturación de pocillos sensibilizados con avidina con los 93 clones biotinilados derivados del panning contra la sEH.** La presencia de los nanobodies capturados se determinó con el anticuerpo monoclonal anti-6×His conjugado a la peroxidasa (anti-6×His:HRP). Cada valor representa el promedio de tres experimentos. El clon 5 corresponde al VHH-TC9 utilizado como control positivo de la saturación (5 µg/mL). Los clones 6, 45 y 89 se sustituyeron por PBS como controles negativos del ensayo de unión. Corresponde a la **figura 4** del **manuscrito I**.

Una vez verificado esto, las tres placas restantes con los 93 BtNb capturados se incubaron con una cantidad previamente optimizada del antígeno conjugado a la peroxidasa de rábano (sEH:HRP). Bajo estas condiciones, es de esperar que la señal para cada nanobody sea proporcional a su afinidad por la epoxi-hidrolasa conjugada a la HRP. Como se muestra en la **figura 28**, correspondiente a la **figura 5** del **manuscrito I**, la población de nanobodies se clasificó en cuatro familias de acuerdo a la señal obtenida a 450 nm (F-I a F-IV) que corresponderían a nanobodies con diferente “afinidad” por el antígeno conjugado a la HRP.



**Figura 28. ELISA de afinidad relativa.** Los nanobodies capturados en pocillos de avidina se incubaron con una cantidad fija de la epoxi-hidrolasa humana conjugada a peroxidasa (sEH:HRP). De acuerdo a la seña obtenida, los clones se agruparon en cuatro familias (F I-IV). Cada valor representa el promedio de tres ensayos. El clon 5, corresponde al VHH-TC9 (anti-TCC), y las posiciones 6, 45 y 89 corresponden a controles negativos (PBS). Los números indican nanobodies que fueron secuenciados. Corresponde a la **figura 2** del **manuscrito I**.

Del análisis de treinta y cuatro clones representativos de las cuatro familias se identificaron 13 secuencias únicas (figura 29, correspondiente a la figura S-2 del manuscrito I). Esto mostró que cada grupo corresponde a secuencias definidas, que no son compartidas con otras familias, apoyando la hipótesis de que el método desarrollado efectivamente separa nanobodies en función de su reactividad por el antígeno conjugado. A excepción del nanobody S33, todos los clones tienen en el FR2 los aminoácidos más polares característicos de los anticuerpos de cadena pesada (resaltados en rojo). S33 derivaría de un anticuerpo convencional del tipo IgG debido a la presencia del motivo G<sup>49</sup>L<sup>50</sup>W<sup>52</sup> sobre el FR2 (marcado en celeste y descrito en detalle en la Introducción, pág.15), y es así mismo un nanobody particular por el inusualmente largo CDR2 de 19 aminoácidos. Este clon apareció 4 veces (S25, S33, S77 y S79) en todos los casos con valores de reactividad característicos de la Familia I. El método permitió resaltar la existencia del clon S73 el cual apareció una única vez, por lo cual podría haber sido fácilmente perdido si los clones se hubieran escogido al azar.

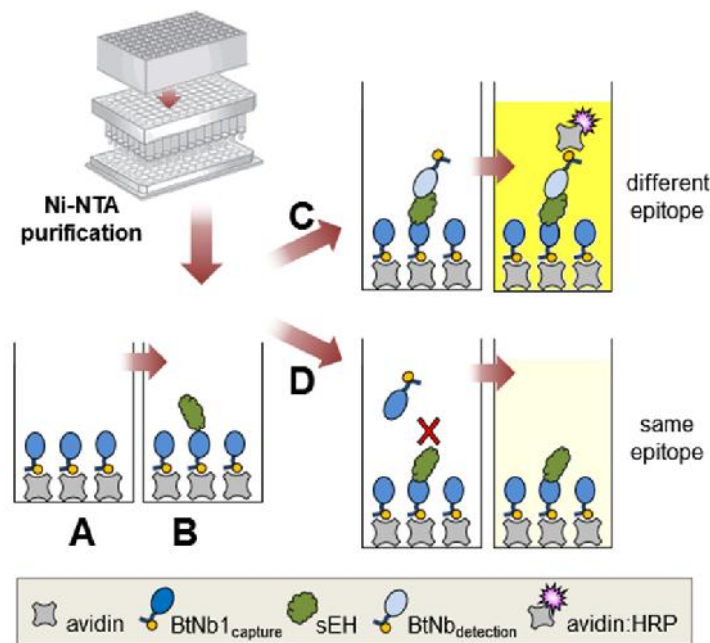
	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
<b>Familia I</b>						
S33 [4]	G FPFSSYWMY	WARQAPGKLEWVSG	I NSGGYPNSAIPNSGAYTTY	Y . . . . . C	ARARSISQAMGTTELWRETDY	WGQGTQVTVS (9,19,21)
S73 [1]	G INFSLTRMA	WYRQAPGNQRELVAAH	I GSMGSPG	Y . . . . . C	NGIGGHNLPV	WGQGTQVTVS (9,7,10)
<b>Familia II</b>						
S07 [6]	G SILSINTMA	WYRQAPGKERELVAV	I SAAGNTN	Y . . . . . C	NLELRGLRSY	WGQGTQVTVS (9,7,10)
S76 [1]	G SIFSIDSMA	WYRQAPGRQRELVAA	F TRGGSAY	Y . . . . . C	NLELRGLRSY	WGQGTQVTVY (9,7,10)
S03 [7]	G SIFSIDSMA	WYRQAPGRQRELVAA	F TRGGSAY	Y . . . . . C	KAGDRDSWRDY	WGQGTQVTVS (9,7,11)
S93 [1]	G NVLSINTMG	WYRQAPGKERELVAR	I SAYGVTN	Y . . . . . C	NLDLQF-RDY	WGQGTQVTVS (9,7,9)
S31 [2]	E RMLSINTMG	WYRQAPGKERELVAA	I TSGGVTN	Y . . . . . C	WINVLNGF	WGQGTQVTVS (9,7,8)
S26 [1]	E RMLSINTMG	WYRQAPGKERELVAA	I TSGGVTN	Y . . . . . C	RWGTDNFNS	WGQGTQVTVS (9,7,9)
S43 [4]	G RTNDLYTMG	WYRQAPGKERELVAVGQ	T ISEGGSPF	Y . . . . . C	AGDQGWGIRTLTQHYKY	WGQGTQVTVS (9,7,17)
<b>Familia III</b>						
S16 [3]	G LTLSNYRMG	WYRQAPGKERELVAVAS	V TWQGSSTH	Y . . . . . C	AASRWDSGYDY	WGQGTQVTVS (9,7,11)
S19 [1]	G SILSINTMA	WYRQAPGKERELVAV	I SAAGNTN	Y . . . . . C	KAGDRDSWRDY	WGQGTQVTVS (9,7,11)
<b>Familia IV</b>						
S69 [1]	E RMLSINTMA	WYRQAPGKERELVAV	I SAAGNTN	Y . . . . . C	KAGDRDSWRDY	WGQGTQVTVS (9,7,11)
S84 [2]	G SIFSIDSMA	WYRQAPGRQRELVAA	F TRGGSAY	Y . . . . . C	KGASVDSWDDY	WGQGTQVTVS (9,7,11)

**Figura 29. Secuencias de los nanobodies seleccionados contra la epoxi-hidrolasa humana.** En violeta se marcan los aminoácidos que delimitan los FR/CDRs. En celeste y rojo se marcan los aminoácidos característicos que definen el origen VH o VHH de los nanobodies seleccionados. En paréntesis rectos se señala la frecuencia con que apareció dicho clon y en paréntesis curvos se resalta la longitud en aminoácidos del CDR1, CDR2 y CDR3 respectivamente.

### 3.3 Aplicación II: Selección de pares de Nbs para la detección de la sEH.

Una aplicación muy atractiva desde el punto de vista biotecnológico es la posibilidad de utilizar esta plataforma para la selección de pares de nanobodies para el montaje de ELISAs en el formato tipo sándwich para el antígeno de interés. Este tipo de ensayos poseen mayor sensibilidad y rango de trabajo que los ensayos competitivos, y el reconocimiento “doble” del antígeno da lugar también a una mejora la especificidad (196). Son por tanto el tipo de inmunoensayo más utilizado para el análisis de biomarcadores en muestras biológicas complejas, pero hay pocos ejemplos en la literatura de ensayos de este tipo montados con nanobodies. A priori, la mayor sensibilidad del ensayo se obtiene con la mayor afinidad de los anticuerpos utilizados en la captura y la detección, pero además,

y el parámetro más importante, es que no debe haber solapamiento de los epítopes definidos por los dos anticuerpos. Como se comentó en la sección anterior, el método de ranqueo (**figura 26**) proporcionó una primera opción de elección de anticuerpos con alta reactividad contra la sEH conjugada a la HRP. En la siguiente etapa se procedió a la selección de pares de anticuerpos para la detección de la sEH en el formato de ELISA sándwich. La búsqueda de pares con epítopes no solapantes se realizó en forma empírica usando un formato de *high-throughput* (alto número de procesamiento de muestras en paralelo), para lo cual la modificación de los nanobodies con biotina volvió a ser de utilidad ya que se utilizó para inmovilizar en forma orientada al nanobody de captura así como para generar la señal tras la unión del nanobody de detección, **figura 30**.



**Figura 30. Diagrama de la estrategia para la búsqueda de pares de nanobodies.** El BtNb a utilizar en la captura se produce en cantidad suficiente purificándolo por Ni-NTA agarosa y es entonces utilizado para saturar los pocillos sensibilizados con avidina de una placa de 96 pozos (A), luego se adiciona una cantidad cercana al límite de detección esperado del antígeno, y el complejo así formado es posteriormente incubado con los 96 nanobodies biotinilados disponibles en la “placa madre” preparada para el *ranking* de afinidad contra la sEH:HRP (B). Esto puede dar lugar a la situación C, en la cual el segundo nanobody (de detección) reconoce un epítopo diferente al nanobody de captura y por lo tanto es posible el sándwich; o la situación D, en la cual los epítopes se solapan y por lo tanto no es posible el reconocimiento doble. Existirán además situaciones intermedias en las que se dé un solapamiento parcial de epítopes y por tanto señales más débiles.

Como se muestra en la **figura 6** del **manuscrito I**, la búsqueda de pares se realizó con los nanobodies S33, S73, S7, S43 y S76 como nanobodies de captura. Los dos primeros se eligieron debido a su mayor reactividad por la sEH:HRP, y los tres últimos (con reactividad intermedia) se incluyeron con el propósito de incrementar la posibilidad de encontrar pares. Para cada clon usado en la captura se evaluaron 96 combinaciones con nanobodies de la “placa madre” usando 20, 4 y 0

ng/mL de sEH, con la finalidad no solo de determinar la habilidad de formar pares, sino de observar cuál de ellos tenía mayor sensibilidad en la detección del antígeno. En este caso la búsqueda de pares se realiza con el antígeno nativo sin marcar, ya que es el que vamos a encontrar en las muestras biológicas. Algo llamativo del análisis de combinaciones (**figura 6 del manuscrito I**) fue que el clon S73 no formó buenos pares con ninguno de los 96 clones evaluados, en comparación por ejemplo a S43 el cual parece definir un epítipo muy diferente que no se solapa con la mayoría de los clones evaluados. Es interesante notar que este análisis permite además el mapeo relativo de epítopes, incluso dado el alto número de clones podría decirse que epítopes como los definidos por S7 son altamente inmunogénicos en la llama, dado que la gran mayoría de los epítopes definidos por el conjunto de nanobodies solapan con los mismos.

De este *screening* de alto número de combinaciones en paralelo, se eligieron para cada nanobody de captura las seis combinaciones de nanobodies que daban mayor señal al usar 4 ng/mL de sEH, y se realizaron curvas de titulación para comparar el rango de detección y el valor de SC<sub>50</sub> obtenido con cada uno de ellos. Este valor corresponde a la concentración de sEH con la cual se obtiene el 50% de la señal máxima, y se eligió como parámetro para comparar la sensibilidad lograda con cada combinación de nanobodies (**tabla 1, correspondiente a la tabla 1 del manuscrito I**).

**Tabla 1. Valores de SC<sub>50</sub> (ng/mL) obtenidos con los distintos pares de nanobodies**

<b>S7</b>	SC <sub>50</sub>	<b>S76</b>	SC <sub>50</sub>	<b>S33</b>	SC <sub>50</sub>	<b>S43</b>	SC <sub>50</sub>	<b>S73</b>	SC <sub>50</sub>
<b>S16</b>	88.4	<b>S16</b>	83.2	<b>S7</b>	<u><b>21.5</b></u>	<b>S7</b>	23.6	<b>S7</b>	269
<b>S33</b>	41.1	<b>S33</b>	37.6	<b>S12</b>	41.7	<b>S14</b>	26.6	<b>S12</b>	<u><b>147</b></u>
<b>S36</b>	13.0	<b>S36</b>	13.2	<b>S16</b>	4096	<b>S31</b>	44.2	<b>S16</b>	220
<b>S43</b>	<u><b>12.2</b></u>	<b>S43</b>	<u><b>12.0</b></u>	<b>S26</b>	22.7	<b>S33</b>	422	<b>S17</b>	243
<b>S49</b>	106	<b>S49</b>	78.1	<b>S43</b>	25.4	<b>S48</b>	<u><b>18.6</b></u>	<b>S49</b>	246
<b>S54</b>	44.9	<b>S54</b>	40.7	<b>S49</b>	248.8	<b>S94</b>	31.6	<b>S50</b>	221

El anticuerpo de captura se muestra en negrita al tope de cada columna donde se listan los correspondientes nanobodies de detección (negrita e itálica) con lo que se combinó. Los valores más bajo de SC<sub>50</sub> para cada anticuerpo de captura se muestran en negrita y subrayado. El par S76/S43 es la combinación con la que se logra mayor sensibilidad en el ensayo sándwich.

Todos los anticuerpos de captura tienen alta afinidad por el antígeno nativo (**tabla 2**), sin embargo los mejores valores de SC<sub>50</sub> son dependientes de la combinación de pares de nanobodies utilizado. Parecería que dentro de cierto rango de afinidad, los aspectos más críticos para un ensayo

de alta sensibilidad serían: 1) la ausencia absoluta de impedimento estérico para la unión en simultáneo de los dos nanobodies al antígeno, y 2) cambios conformacionales en el antígeno inducidos tras la unión del nanobody de captura, lo cual podría explicar la pobre capacidad de formación de pares del nanobody S73. Ambas hipótesis apoyan la importancia de la necesidad del análisis masivo de pares para maximizar la sensibilidad lograda en el ensayo sándwich.

**Tabla 2. Afinidad de nanobodies medido por interferometría de bio-capa.**

Nb	K <sub>D</sub> (nM)	k <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )
S33	0.35	1.97 x 10 <sup>5</sup>	6.85 x 10 <sup>-5</sup>
S43	0.21	7.35 x 10 <sup>4</sup>	1.56 x 10 <sup>-5</sup>
S73	0.71	1.40 x 10 <sup>5</sup>	1.00 x 10 <sup>-4</sup>
S76	0.42	2.55 x 10 <sup>5</sup>	1.07 x 10 <sup>-4</sup>

Nb, nanobody, K<sub>D</sub> constante de disociación en equilibrio (K<sub>D</sub>= k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>). M, molar; s, segundos; k<sub>on</sub>, constante de la velocidad de asociación y k<sub>off</sub>, constante de la velocidad de disociación del complejo.

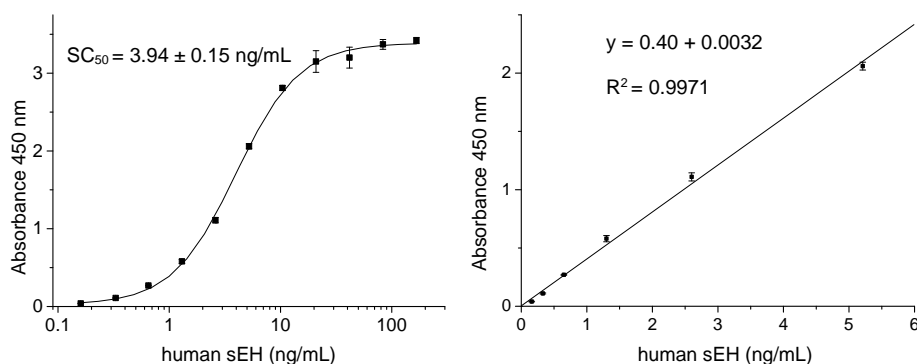
Los VHH son sumamente dependientes de la conformación del antígeno, por lo que la posibilidad de realizar la inmovilización orientada de los VHHs posibilita determinar la afinidad por el antígeno nativo, lo cual es el valor más confiable de su afinidad real. Esto se evaluó mediante ensayos de unión por interferometría de bio-capa en sensores sensibilizados con estreptavidina (*BioLayer Interferometry, Octet System, Fortebio*). Los valores de afinidad obtenidos con el antígeno nativo mostraron que el método de clasificación de reactividades desarrollado en la primera parte de este capítulo está influenciado por la modificación del antígeno con la peroxidasa. Por ejemplo, el nanobody de mayor afinidad es S43, el cual debería estar por encima del resto o muy similar a la reactividad obtenida con S33 o S73 en el método de “afinidad relativa”. Es posible que esta discrepancia se deba a que algunos epítopes resultan modificados por la conjugación a la peroxidasa y por tanto el resultado no es representativo de la afinidad real por el antígeno nativo (**figura S-2 del manuscrito I**).

Esta limitación no debería ser un problema en el caso, por cierto muy común, de que se trate de un antígeno con un *tag* peptídico (ej. HA, *c-myc* u otro diferente a la cola de seis histidinas presentes en los VHHs) que pueda ser detectada con un anticuerpo anti-*tag*. A pesar de esto, el método permitió encontrar nanobodies que se ven afectados por la peroxidación y otros que no, lo cual en

nuestro caso fue muy valioso para descubrir nanobodies que reconocen regiones diferentes de la epixi-hidrolasa, un parámetro muy valioso para el montaje de ELISA sándwiches.

### 3.3.1 Desarrollo de un ELISA sándwich para la cuantificación de la sEH.

En base a estos resultados se eligió desarrollar un ELISA sándwich con la combinación S76/S43. Dentro de los parámetros que se optimizaron se encontró que la detección del segundo nanobody a través del epítipo HA con un anticuerpo IgG anti-HA conjugado a peroxidasa (Roche) incrementó la sensibilidad del ensayo final, el cual como se muestra en la **figura 31** tiene un rango lineal de trabajo desde 0.16 a 5.2 ng/mL, y un límite de detección y cuantificación (LD y LQ) de 0.063 y 0.094 ng/mL, respectivamente. El ensayo logrado es muy sensible, lo cual resalta los beneficios del *screening* a gran escala para la búsqueda de los mejores pares de nanobodies a partir de una población de nanobodies específicos para el antígeno.



**Figura 31. ELISA sándwich montado con los nanobodies S76/S43 para la cuantificación de la epoxy-hidrolasa humana.** Curva de titulación obtenida en el rango de 0.16-160 ng/mL (izquierda) o en el rango de 0-5.2 ng/mL (derecha). Este resultado es el promedio de medidas realizadas por triplicado y las barras de error corresponden a la desviación estándar. El límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ) fue de 0.063 y 0.094 ng/mL, respectivamente. Estos parámetros fueron definidos como el valor del blanco más 3, o 10 desviaciones estándares, respectivamente. Corresponde a la **figura 7** del **manuscrito I**.

### 3.3.2 Performance analítica del ELISA sándwich basado en nanobodies.

Inicialmente se estudió la recuperación de cantidades adicionadas de sEH en la fracción citosólica de glóbulos rojos (RBC) en donde se expresa la sEH, y esta regula la epoxidación del ácido araquidónico catalizado por la hemoglobina (197, 198). La **tabla 3** (correspondiente a la **tabla 3** del **manuscrito I**) resume los valores determinados cuando al extracto de RBC se le adicionaron (“spiked”) cantidades de sEH en el rango 0.25-4.0 ng/mL, consiguiéndose excelentes valores de recuperación.

**Tabla 3. Recuperación de sEH en muestras adicionadas (n=3)**

<i>spiked (ng/mL)</i>	<i>Measured (ng/mL)</i>	<i>Mean recovery (%)</i>
<b>4.0</b>	4.14 ± 0.02	93
<b>2.0</b>	2.44 ± 0.01	101
<b>1.0</b>	1.44 ± 0.01	103
<b>0.5</b>	0.94 ± 0.01	103
<b>0.25</b>	0.67 ± 0.02	99
<b>0</b>	0.42 ± 0.03	-

La fracción citoplasmática de los RBC fue diluido 1/80 en PBS y fue adicionada (“*spiked*”) con diferentes concentraciones conocidas de sEH. Los resultados representan y la desviación estándar de tres medidas.

Posteriormente, utilizando fracciones comerciales de tejidos humanos (Xenotech LLC, Lenexa, KS, USA) se evaluó la utilidad del ensayo desarrollado para la cuantificación de la proteína en estas muestras biológicas. Era interesante analizar estas muestras debido a que las mismas habían sido analizadas por nuestros colaboradores de la Universidad de Davis (UCDavis, CA, USA) cuantificando la sEH a través de la actividad enzimática y por *western blot* (199), y recientemente utilizando un ELISA sándwich montado con anticuerpos policlonales de captura y un nanobody seleccionado de la biblioteca **NP001** para la detección (**artículo suplementario S-II**) (195). Como se muestra en la **tabla 4** (correspondiente a la **tabla 4** del **manuscrito I**), los valores obtenidos con el sándwich basado en nanobodies fue muy similar a los valores previamente reportados.

**Tabla 4. Comparación del ELISA nanobodies con otros métodos**

<b>Tejido humano</b>	<b>sEH (nM) estimado por:</b>			
	<b>Actividad enzimática (199)</b>	<b>Western-blot (199)</b>	<b>ELISA poli-Nb (195)</b>	<b>ELISA Nb76/Nb43</b>
	<b>promedio ± SD</b>	<b>promedio ± SD</b>	<b>promedio ± SD</b>	<b>promedio ± SD</b>
Hígado	420 ± 89	500 ± 150	386 ± 48	468 ± 22
Riñones	44 ± 3	80 ± 15	44.4 ± 1.6	37 ± 3
Pulmones (NF)	3.0 ± 0.3	22 ± 6	6.1 ± 0.3	2.9 ± 0.1
Pulmones (F)	2.8 ± 0.3	21 ± 4	5.9 ± 0.1	2.1 ± 0.2
Intestino	80 ± 9	110 ± 10	----	121 ± 6

NF, no fumadores; F, fumadores. SD, desviación estándar.

El ensayo resulto tan sensible que las muestras comerciales que contienen la menor cantidad de sEH esperada hubo que diluirlas por lo menos 1/200 (intestino) y en el caso del hígado 1/20.000. Esto evita la interferencia de la matriz, y augura que el método podría ser útil para el seguimiento de la enzima en muestras en las cuales pudiese aparecer en cantidades a nivel de trazas, por ejemplo en suero.



## CAPITULO IV

### SELECCIÓN DE NANOBODIES CONTRA RECEPTORES DE CÉLULAS INMUNES

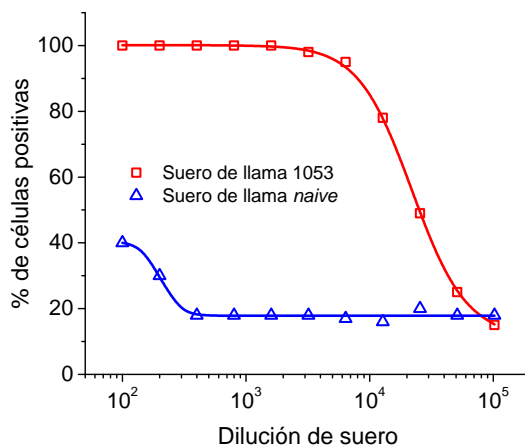
Como se comentó en la introducción uno de los objetivos principales de este trabajo fue la selección de anticuerpos contra receptores de las células inmunes. Así, las primeras bibliotecas preparadas en este trabajo de tesis fueron a partir de llamas inmunizadas con los receptores recombinantes MD2 y Dectina-1 producidos en baculovirus, tal como se mencionó en el **capítulo I**. Realizando la selección sobre estos antígenos inmovilizados en placas de ELISA, se obtuvieron nanobodies que reaccionaban fuertemente en ELISA y *Western blot*, con MD2 y Dectina-1, pero no reaccionaban con el receptor nativo expresado sobre la célula. Esta etapa fue un importante cuello de botella en el avance y desarrollo de esta tesis, e hizo replantear el esquema completo de la forma de inmunización y selección de nanobodies para receptores. La nueva estrategia apuntó a utilizar el “receptor en las células” tanto en la etapa de inmunización como en la selección, y así se procedió a inmunizar llamas con células dendríticas (DCs) “enteras” como sistema modelo, con la finalidad de generar anticuerpos contra proteínas de membrana en su conformación nativa. El interés sobre este tipo celular se basó en su importante rol en el sistema inmune que hace que se encuentren equipadas con receptores críticos para el inicio y desarrollo de la respuesta inmune.

La estrategia de inmunización con células enteras implica un gran desafío, ya que es un antígeno muy complejo, y por tanto el mayor reto es poder identificar fácilmente los antígenos reconocidos por los nanobodies seleccionados. Esta fue una de las razones por la cual se generó el sistema de biotinilación detallado en el **capítulo II**, y que es la base de la metodología de identificación que se resume en la segunda parte de la publicación “*Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells*”, BBA, 2015 (191), **Artículo I**, que se incluye al final de esta tesis y que se comenta a continuación.

## 4.1 Inmunización y evaluación de la respuesta humoral de la llama 1053 inmunizada con células dendríticas murinas.

Una llama de dos años (1053) fue inmunizada con células dendríticas generadas a partir de precursores de médula ósea (BMDCs) de ratones Balb/c diferenciados con el factor GM-CSF recombinante (factor estimulador de colonias de monocitos/macrófagos, producido de forma recombinante en el marco de esta tesis), en PBS por seis dosis (200). El fenotipo y calidad de las BMDCs se determinó por citometría de flujo utilizando una combinación de anticuerpos contra marcadores celulares (**figura S-1 del artículo I**) previo a cada administración, y en todos los casos 80% eran células dendríticas (considerado como células CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>).

Para tener una medida directa de la generación de anticuerpos contra proteínas de superficie de la célula dendrítica se evaluó el título de anticuerpos de la llama mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **figura 32** el título que alcanzó la llama 1053 contra la DC fue alto (1/20.000), y muy superior al obtenido con el suero de un animal *naive* (1/200). Esto era un buen indicador para proceder a la construcción de la biblioteca, ya que por primera vez, a diferencia de los intentos iniciales, teníamos evidencia del reconocimiento de receptores nativos por parte de anticuerpos de llama.

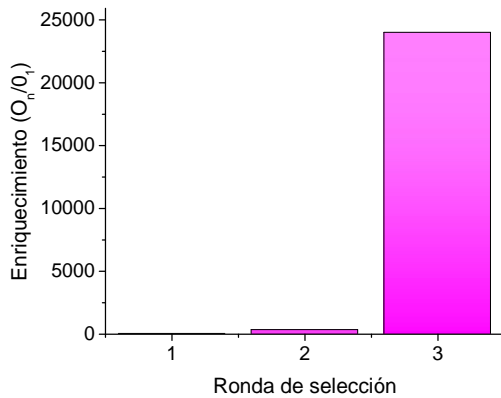


**Figura 32. Respuesta de anticuerpos de la llama 1053 inmunizada con BMDC.** Las células dendríticas se incubaron con diluciones decrecientes del suero de la llama inmunizada correspondiente al sexto sangrado (—), o suero de una llama *naive* (U). La unión de los anticuerpos a la célula se detectó con un suero murino policlonal anti-llama generado en esta tesis, seguido de un anti-IgG de ratón conjugado a FITC.

## 4.2 Selección de nanobodies contra proteínas de superficie de BMDCs.

A partir de la sangre de la llama 1053 se construyó una biblioteca de nanobodies de  $2 \times 10^9$  transformantes independientes, siguiendo el protocolo descrito en el **artículo I**. La selección se realizó sobre BMDCs intactas, pero para evitar la selección contra receptores celulares ubicuos la biblioteca se pre-adsorbió previamente con fibroblastos murinos (línea L-929, ATCC). Este proceso se repitió por tres rondas de selección, y ya en la segunda ronda se observó un enriquecimiento de 300 veces en términos de unidades formadoras de colonias (**figura 33**). A diferencia del *panning* en

placa, las células son lavadas por centrifugación con PBS-BSA y los VHH-fagos que interaccionaron con la BMDC se eluyen (recuperan) por elusión ácida a pH 2.2, y son posteriormente utilizados para su amplificación en *E.coli* para utilizarlos en una nueva ronda de selección.

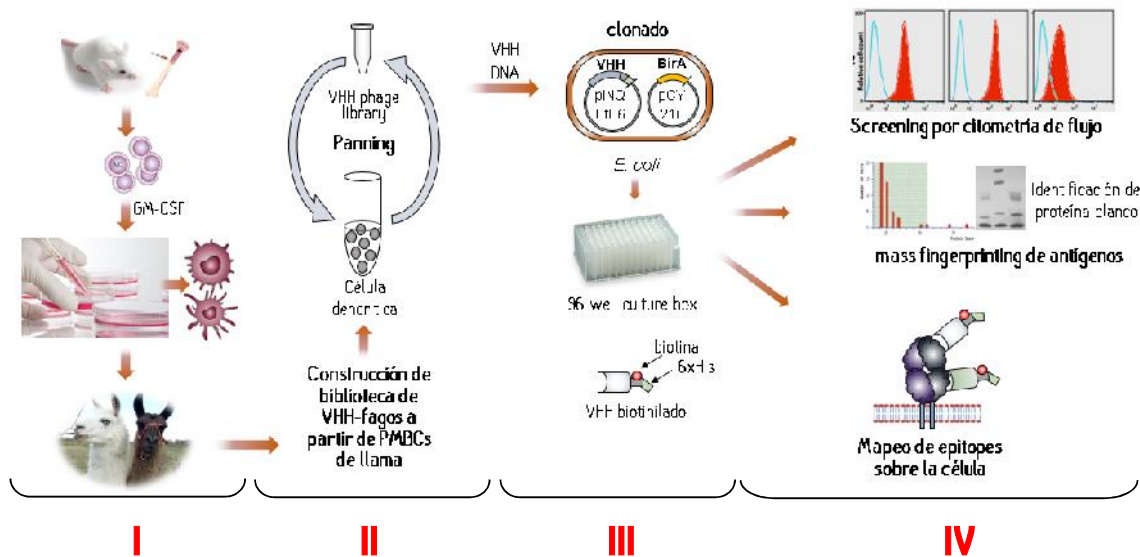


**Figura 33. Enriquecimiento de clones anti-células dendríticas.** En la gráfica se expresa el incremento de fagos con las sucesivas rondas ( $O_n$ , output de la ronda  $n$ ) en referencia a la cantidad de fagos obtenidas en la primera ronda del proceso de selección ( $O_1$ ). En cada ronda, el input de fagos fue de  $1 \times 10^{11}$ .

	Título (u.f.c)	Enriquecimiento
Ronda 1	$1.0 \times 10^5$	1
Ronda 2	$3.0 \times 10^7$	300
Ronda 3	$2.4 \times 10^9$	24000

u.f.c: unidades formadoras de colonias (*E.coli*)

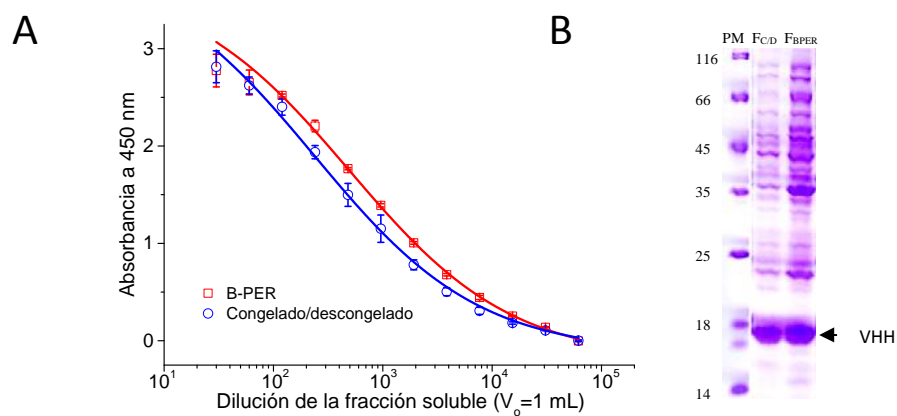
La población de genes de los VHH correspondientes a la tercera ronda se transfirió en masa desde el vector fagemídico pComb3X al vector pINQ-BtH<sub>6</sub> para producir los VHH biotinilados *in vivo* y facilitar el proceso de *screening* para evidenciar su reactividad por la BMDC mediante citometría de flujo (figura 34). La alta expresión alcanzada con este vector permitió que aún al cultivar los clones individuales en placas de cultivo de 96 pozos (0.5 mL/pozo) se obtuviera suficiente producción de VHH biotinilados como para proceder a su selección.



**Figura 34. Esquema de la metodología seguida para la selección de nanobodies contra receptores de células dendríticas y su posterior caracterización.** I) Producción de BMDCs e inmunización de llama 1053. II) Construcción de biblioteca a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la llama inmunizada y selección de nanobodies específicos para células dendríticas mediante *panning* sobre células vivas, III) transferencia “en masa” del ADN de la población de VHH de la tercer ronda de selección, y producción de los nanobodies biotinilados *in vivo*. IV) Evaluación de la reactividad de los nanobodies y su posterior caracterización facilitada por el *tag* de biotina. Adaptada y modificada de la figura 1 del artículo I.

### 4.3 Análisis en paralelo de alto número de Nbs mediante citometría de flujo.

Inicialmente se evaluaron diferentes métodos que permitieran la preparación de extractos de los VHH compatibles con citometría de flujo. Generalmente la lisis de un alto número de clones en placas de 96 pozos se obtiene utilizando el reactivo B-PER (*Bacterial Protein Extraction Reagent*, Pierce) que es una mezcla de detergentes. No obstante, la presencia de estos, aún en bajas concentraciones, hace incompatible su uso en citometría de flujo debido a que ocasionan la lisis de las células. Esta limitación se superó a través de ciclos de congelado/descongelado del pellet bacteriano. Como se muestra en la **figura 35**, la eficiencia de extracción del nanobody modelo TC7 con ambos métodos fue similar, y el congelado/descongelado se adoptó como método de extracción de los VHH a partir de los pellets bacterianos obtenidos en los cultivos de 96 pozos. Dichos extractos se utilizaron en citometría de flujo con distintos tipos celulares y se evidenció la unión con la célula utilizando conjugados de estreptavidina con fluoróforos (fluoresceína o ficoeritrina).

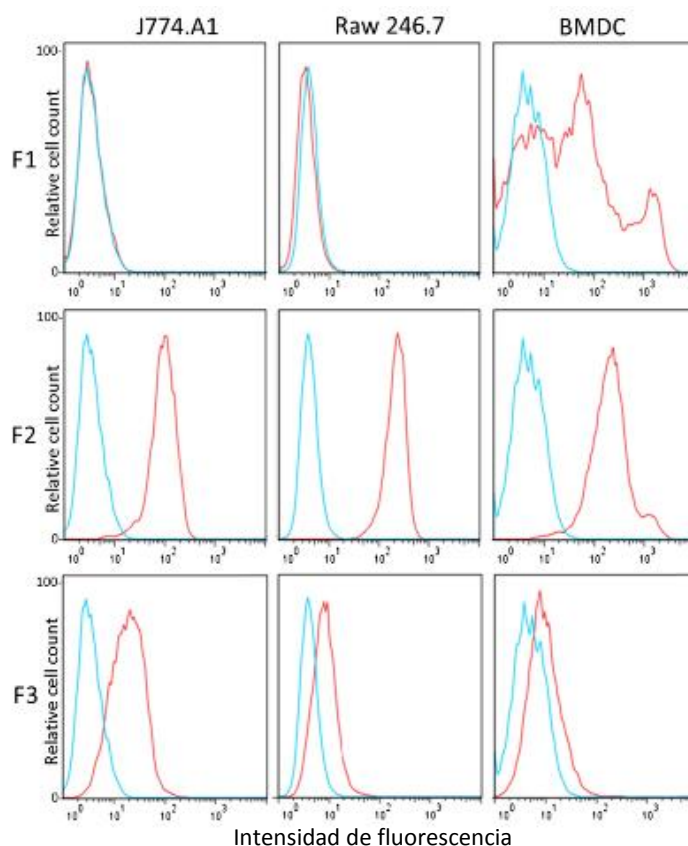


**Figura 35. Comparación de la eficiencia del método de congelado/descongelado en la liberación del BtNbTC7. A)** El pellet correspondiente a 1 mL de cultivo bacteriano se resuspendió en el mismo volumen de PBS o B-PER. La fracción soluble de cada condición se sometió a un ELISA cuantitativo utilizando estreptavidina-peroxidasa sonda, en pocillos sensibilizados con TCC-BSA. **B)** Las dos fracciones solubles se separaron por SDS-PAGE. F<sub>CD</sub>, lisis por ciclos de congelado/descongelado; F<sub>BPER</sub>, lisis con B-PER.

Se aplicaron dos criterios para la clasificación de los nanobodies seleccionados:

#### **A- Según el comportamiento sobre (I) macrófagos (J774.1 y Raw246.7), y (II) BMDCs:**

Como se muestra en la **figura 36**, correspondiente a la **figura 5** del **artículo I**, se obtuvieron 3 familias. La primera familia (**F1**) está formada por VHH que reaccionan principalmente con células dendríticas. La segunda familia (**F2**) reconoce antígenos altamente expresados en ambas células testeadas, y la tercer familia (**F3**) tiene un comportamiento similar a la familia F2, pero reconoce antígenos presentes en bajo nivel de expresión.



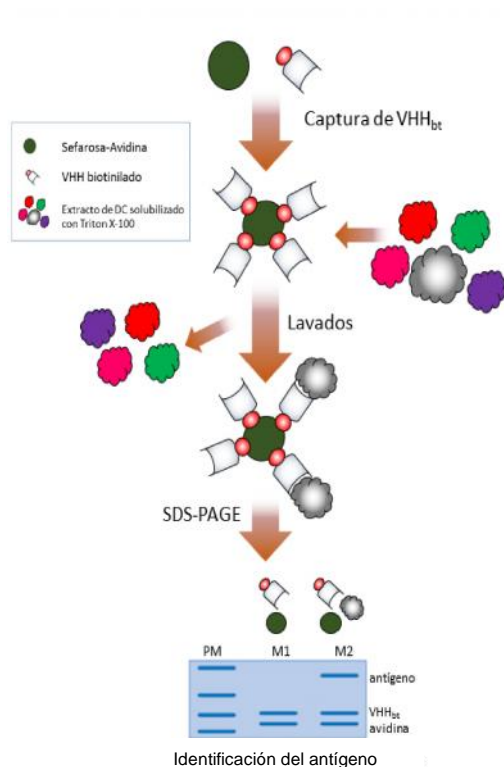
**Figura 36. Análisis por citometría de flujo de tres nanobodies representativos seleccionados sobre las BMDC.** Cada nanobody biotinilado se evaluó sobre BMDCs y dos líneas de macrófagos murinos (J774.A1 y Raw 246.7) usando estreptavidina conjugada a ficoeritrina. La línea roja de los histogramas corresponde a la reactividad de los clones p01, V36 y X6 para las familias F1, F2 y F3 respectivamente. El nanobody TC7 (anti-TCC) fue utilizado como control negativo (línea azul). Corresponde a la **figura 5 del artículo I**.

### **B- Según la secuencia aminoacídica:**

Como se muestra en la **figura S-6 del artículo I**, se secuenciaron 20 clones al azar y se obtuvieron 12 secuencias diferentes. Todas ellas derivan de IgGs carentes de cadena liviana y tienen los residuos característicos de los dominios VHH en *el framework 2* (recuadrados en la figura).

### **4.4 Identificación de los antígenos reconocidos por los Nbs seleccionados.**

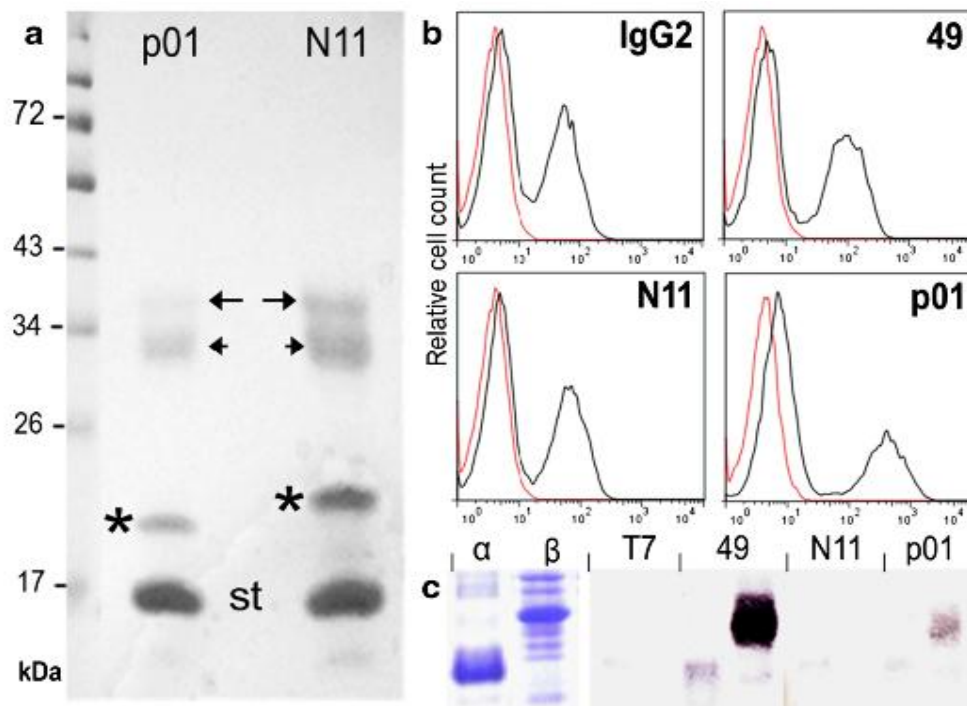
Al aplicar esta clasificación, se generó un panel de 12 nanobodies, algunos de los cuales presentan similitudes a nivel del CDR3, como por ejemplo el VHH-42 y B10, o VHH-32 y G7, lo cual potencialmente indicaría que reconocen la misma región sobre la proteína blanco. Esta hipótesis fue confirmada, aprovechando la presencia de biotina en los nanobodies para hacer ensayos de inmunoprecipitación cargando directamente la fracción soluble de cada BtNb en agarosa con estreptavidina inmovilizada (**figura 37**).



**Figura 37. Estrategia para la inmunoprecipitación de los antígenos celulares reconocidos por los BtNb.**  $10^8$  BMDCs se solubilizaron en PBS:Tritón X-100 y se incubaron con cada complejo agarosa-estreptavidina/BtNb. La resina se lavó con el mismo *buffer*, y las bandas fueron separadas por SDS-PAGE 10%, se digirieron *in situ* con tripsina y se caracterizaron por MALDI-TOF *mass fingerprinting*. PM, marcador de peso molecular, M1 complejo agarosa-estreptavidina-BtNb y M2 el complejo M1 usado para inmunoprecipitar el antígeno desde el extracto de BMDCs.

Cada uno de los complejos BtNb/streptavidina:agarosa obtenidos se incubó con un extracto de BMDCs solubilizados con Tritón X-100 para capturar y aislar el antígeno reconocido en la célula. En esta etapa, el disponer de los VHH biotinilados vuelve a ser una gran ventaja dado que la alta afinidad de interacción biotina-streptavidina permite usar condiciones de lavado rigurosas para reducir la presencia de contaminantes, un punto crítico cuando el antígeno reconocido es minoritario en la compleja muestra del extracto celular.

Siguiendo este procedimiento se demostró que los tres nanobodies de la primer familia (F1) (p01, VHH-49 y N11) inmunoprecipitaron dos componentes de  $\sim 30$  y  $\sim 36$  kDa (**figura 38**, correspondiente a la **figura 6.a** del **artículo I**). Se identificaron por MALDI-TOF y búsqueda en la base de datos Mascot como la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) (**figura S-8.A** del **artículo I**). Este resultado se condice con la expresión diferencial sobre las células dendríticas, y no sobre las líneas de macrófagos evaluadas (**figura 36**). También se demostró que los tres nanobodies reconocen un epítipo no polimórfico sobre el MHC-II debido a que también reaccionaron con esplenocitos de ratones C5bl/6 (**figura 7.b**, correspondiente a la **figura 6.b** del **artículo I**).

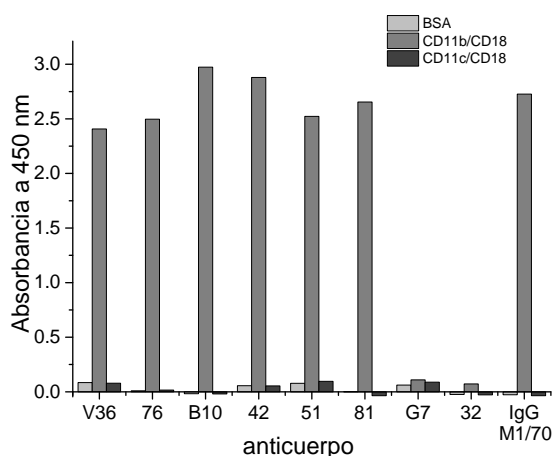


**Figura 38. Caracterización de los nanobodies de la familia F1.** a) Las bandas eluidas de cada complejo estreptavidina-agarosa/VHH<sub>bt</sub> utilizado en cada inmunoprecipitación fue separado por SDS-PAGE 12.5% y el gel fue teñido *coomassie blue*. En la figura se indican las bandas inmunoprecipitadas (flechas), los nanobodies biotinilados (\*), y el monómero de estreptavidina (st). b) Análisis de citometría de flujo sobre esplenocitos de ratones C57bl/6 teñidos con los VHH<sub>bt</sub> 49, N11 y p01 o con un anticuerpo comercial biotinilado (IgG<sub>2</sub>) anti-MHCde clase II (I-A/I-E) murino. c) Análisis por SDS-PAGE de la expresión insoluble de cada cadena, y *western blot* para determinar la reactividad de los VHH<sub>bt</sub> sobre extractos de *E. coli* sobre-expresando las cadenas individuales del complejo MHC II A-D. Corresponde a la **figura 6 del artículo I**.

Las condiciones “suaves o nativas” de inmunoprecipitación permitieron bajar además de la proteína reconocida por el nanobody, proteínas asociadas a la misma. Debido a esto, resultaba interesante determinar la especificidad de estos nanobodies contra las cadenas del complejo de MHC-II. Para esto, a partir del ADN copia de BMDCs se amplificaron los mensajeros de cada cadena con *primers* específicos, y se clonaron en el vector pET28a+ para su producción recombinante. Mediante *western blot* se confirmó la especificidad del VHH-49 por la cadena del MHC-II (**figura 38.c**, correspondiente a la **figura 6.c del artículo I**).

Seis de los ocho nanobodies de la segunda familia (42, B10, 51, 76, 81 y V36) inmunoprecipitaron dos bandas (**figura 7 del artículo I**) que fueron identificadas como CD11b y CD18 (**figura S-8.B del artículo I**). Estas dos proteínas en conjunto conforman el receptor Mac-1 que se expresa en varios tipos de células inmunes, lo cual está de acuerdo a la reactividad contra DC y las líneas de macrófagos mostrado en la **figura 36**. Nuevamente, debido a la inmunoprecipitación e identificación de dos proteínas, fue necesario determinar contra cuál de las dos bandas estos VHH

eran específicos. Esto se logró mediante ELISA enfrentando cada uno de los VHHs a pocillos sensibilizados con la proteína recombinante comercial CD11b/CD18 (Mac-1) y CD11c/CD18 (CR4). Como se muestra en la **figura 39**, correspondiente a la **figura S-7** del **artículo I**, los nanobodies V36, 76, B10, 42, 51 y 81 de la F2 son específicos por la proteína CD11b del complejo Mac-1, o de un epítoto que comparte residuos de ambas cadenas, pero no reacciona con CD18 cuando este forma parte de CR4.



**Figura 39. Determinación de la especificidad por CD11b de los nanobodies 42, B10, 51, 76, 81 y V36 de la F2 mediante ELISA.** Se muestra la señal obtenida con cada uno de los nanobodies evaluados. En el ensayo también se incluyeron la IgG comercial M1/70 biotinilada anti-CD11b, y los VHH 32 y G7, que como se mostrará más adelante, son específicos por CD45. Adaptada y modificada de la **figura S-7** del **artículo I**.

Los otros dos nanobodies de esta familia (VHH-32 y G7) inmunoprecipitaron una única banda de ~195 kDa (**figura 7** del **artículo I**), que fue identificada por MALDI TOF/TOF como CD45 (**figura S-8.C** del **artículo I**).

Finalmente la tercer familia (**F3**) formada por un único VHH (X6) inmunoprecipitó una banda de ~92 kDa identificada por MALDI-TOF como la ATPasa citoplasmática VCP (*valosin containing protein*) (**figura 7** y **figura S-8.C** del **artículo I**). Este resultado fue inesperado debido a que la estrategia de *panning* fue diseñada para seleccionar nanobodies contra proteínas de superficie. Debido a esta incoherencia se podría suponer que la señal obtenida en la citometría de flujo (**figura 36**) se debe a un artefacto de reactividad cruzada contra alguna otra proteína de membrana. Debido a esto, el nanobody X6 no se utilizó en el posterior desarrollo de esta tesis.

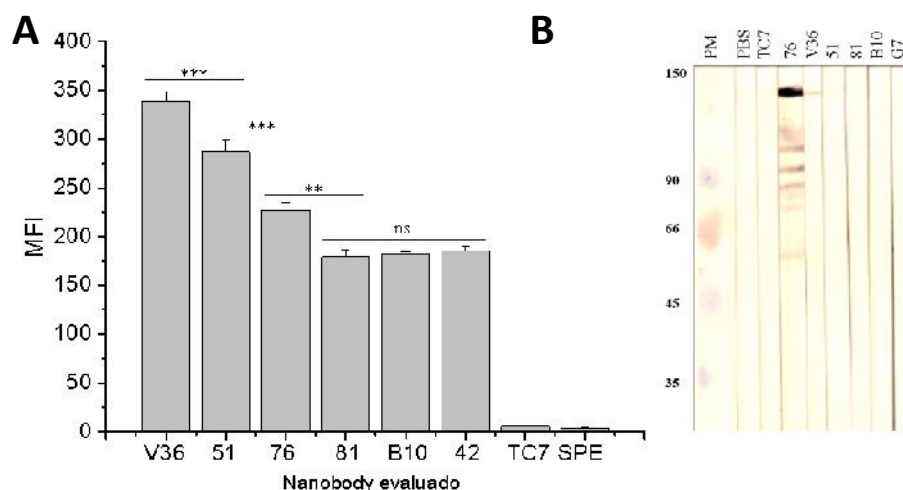


## 4.5 Caracterización de los nanobodies anti-CD11b.

Debido a que Mac-1 está involucrado en diferentes procesos inmunes, como la adhesión y migración celular, la fagocitosis y la activación celular (201, 202), los nanobodies contra CD11b se caracterizaron en mayor detalle. En particular, resulta interesante el hecho de que sea un receptor con capacidad endocítica que permitiría usar los nanobodies seleccionados para el *targeting* y *delivery* de antígenos a células CD11b<sup>+</sup>.

### 4.5.1 Afinidad relativa y comportamiento en *Western Blot*.

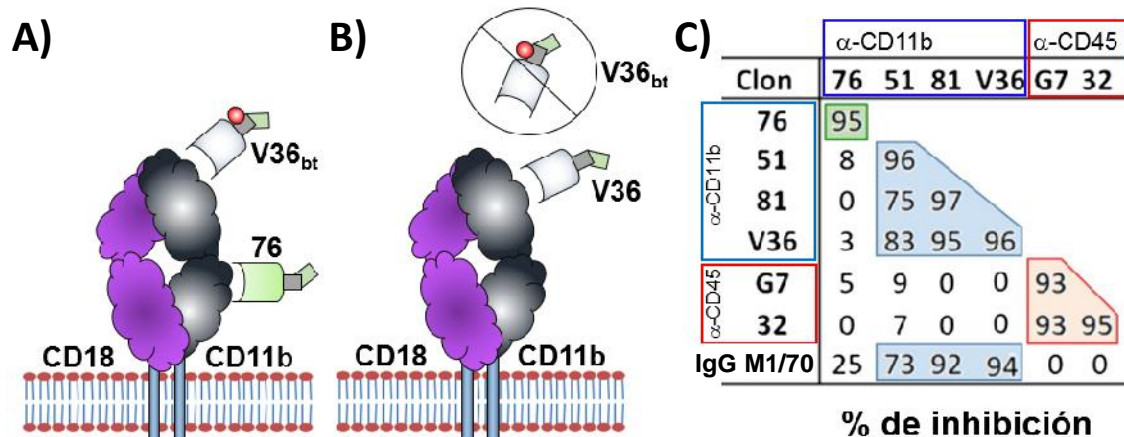
Si bien el costo del Mac-1 comercial resultó limitante para la determinación directa de la afinidad de los seis VHH anti-CD11b mediante interferometría de bio-capa (*biolayer interferometry*, BLItz) o *surface plasmon resonance* (SRP, BIAcore), estos parecen reconocer el receptor con diferentes afinidades según se determinó por citometría de flujo comparando la reactividad de cantidades iguales de los mismos (figura 36.A). Por otro lado, también se evaluó la reactividad de los nanobodies por *western blot* donde únicamente VHH-76 reconoció un epítipo lineal (figura 36.B), una propiedad poco común en los nanobodies, ya que como se mencionó en la introducción de la tesis, por lo general los nanobodies tienen una fuerte tendencia a reaccionar con el epítipo en la conformación original utilizada en la inmunización, que en este caso sería la conformación nativa (203, 204).



**Figura 40. Los nanobodies anti-CD11b de la familia 1 tienen diferentes afinidades relativas y formas de reconocimiento de CD11b.** En **A**, BMDCs se incubaron con 10 ng/mL de VHH<sub>bt</sub> por 1 hora a 4°C y la unión se detectó con estreptavidina conjugada a ficoeritrina (SPE). En **B**, el complejo CD11b/CD18 se separó por SDS-PAGE, se transfirió a nitrocelulosa, se incubó con los diferentes VHH<sub>bt</sub>, y la unión se detectó con estreptavidina conjugada a peroxidasa. Se incluyeron como controles negativos del experimento el VHH-TC7 (anti-TCC) y G7 (anti-CD45). Análisis estadístico *One way ANOVA* con test de comparación múltiple de Bonferroni,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ ; \*\*,  $p < 0.001$ .

## 4.5.2 Mapeo de epítopes sobre CD11b.

Otra interesante aplicación derivada del uso del sistema de biotinylation *in vivo* es la posibilidad de conseguir a partir de un mismo cultivo, una fracción del VHH biotinilado y otra no, sin la necesidad de sub-clonado en otro vector. Esto permitió realizar de forma simple el mapeo de epítopes sobre el receptor CD11b de los nanobodies mediante un ensayo de competencia en citometría de flujo (**Figura 41.A-B**). Esta metodología también se conoce como *epitope binning*.



**Figura 41. Ensayo de competencia con los VHH/VHH<sub>bt</sub> por la unión a CD11b mediante citometría de flujo.** En A, se muestra la situación en donde dos VHHs (V36<sub>bt</sub> y VHH-76) reconocen epítopes diferentes por lo que se detecta señal por citometría, en cambio como se muestra B, un exceso de V36 no biotinilado impide que V36<sub>bt</sub> interaccione con el receptor y por tanto se consigue la mayor inhibición de la señal. En C, se muestra la matriz de inhibición obtenida con los VHH anti-CD11b, anti-CD45 y la IgG M1/70 comercial biotinilada anti-CD11b. Adaptada y modificada de la **figura 7.B** del **artículo I**.

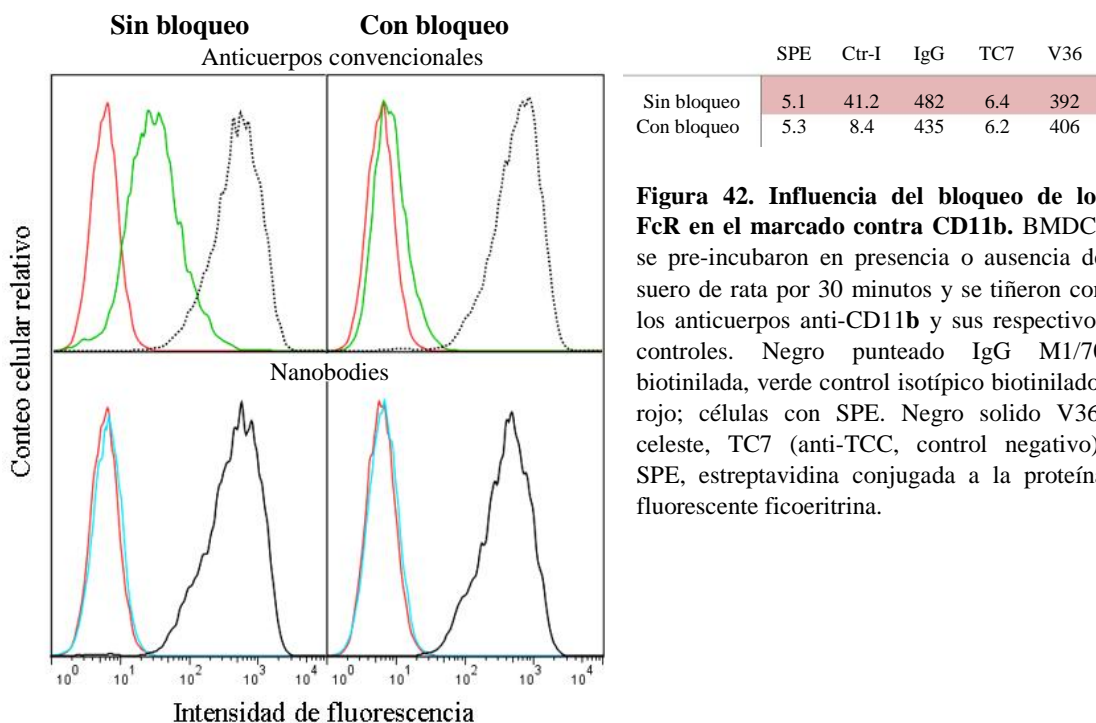
De esta forma se determinó que los nanobodies V36, 51, 81, y la IgG M1/70 comercial tienen epítopes solapantes sobre el receptor, al competir entre ellos por la unión al CD11b, mientras que el VHH-76 reconoce una región diferente a los anteriores (**figura 41.C**, correspondiente a la **figura 7.B** del **artículo II**). Esto permitió determinar con cuáles hacer los ensayos de evaluación funcional como se describirá más adelante.

## 4.1 Los Nbs biotinilados presentan importantes ventajas en aplicaciones de citometría de flujo respecto a los anticuerpos convencionales.

Los anticuerpos resultan fundamentales para el marcado de las distintas poblaciones celulares en citometría de flujo, pero el uso de anticuerpos convencionales para estos fines requiere cuidados especiales, en particular la necesidad de un control isotópico y el bloqueo de los receptores para Fc (FcR) para evitar la interacción “inespecífica” del anticuerpo primario o secundario con la célula. En

este sentido, los nanobodies biotinilados son muy atractivos ya que carecen de la región Fc y no se detectan con un anticuerpo secundario sino con conjugados de estreptavidina. Por otro lado, un único nanobody biotinilado no relacionado puede officiar como control “isotópico” universal.

Como se muestra en la **figura 42**, el reconocimiento de CD11b por el nanobody V36 es similar al obtenido con la IgG comercial M1/70 anti-CD11b. Sin embargo, a diferencia de este último, el *background* (ruido de fondo de la técnica) con los nanobodies es muy bajo, y hace innecesario el uso de un control “isotópico” (mas adecuadamente llamado control negativo de unión). En efecto, en el histograma puede observarse (línea verde) que si la célula está sin bloquear (con péptidos bloqueantes del FcR o con suero de la misma especie del anticuerpo a evaluar), la señal del control isotópico es muy elevada. Esto resulta crítico cuando se quiere marcar antígenos que se expresan en bajo nivel en la célula y por lo tanto la intensidad de fluorescencia es débil.



**Figura 42. Influencia del bloqueo de los FcR en el marcado contra CD11b.** BMDCs se pre-incubaron en presencia o ausencia de suero de rata por 30 minutos y se tiñeron con los anticuerpos anti-CD11b y sus respectivos controles. Negro punteado IgG M1/70 biotinilada, verde control isotópico biotinilado, rojo; células con SPE. Negro solido V36, celeste, TC7 (anti-TCC, control negativo). SPE, estreptavidina conjugada a la proteína fluorescente ficoeritrina.

Con estos experimentos se demostró que el nanobody V36, que tiene un epítipo solapante a la IgG M1/70, ampliamente utilizada para el marcado de células CD11b<sup>+</sup>, podría ser una buena alternativa al uso del anticuerpo comercial dada su facilidad de producción y “*performance/ desempeño*” en citometría de flujo.

## CAPITULO V

### SELECCIÓN DE NANOBODIES CONTRA EPÍTOPES NATIVOS DE CD11c

Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígeno más potentes del sistema inmune y tienen un rol central en la inducción de la respuesta adaptativa (205, 206). La expresión de un grupo de receptores de superficie como lectinas del tipo C (Receptor de manosa, DC-SIGN, DEC-205, etc), receptores del tipo Toll (TLR), receptores para la región fc de los anticuerpos (FcR) y receptores del complemento (CR3 y CR4) permiten a las DC reconocer y ligar antígenos (207-210), que luego son procesados y presentados eficientemente a otros componentes del sistema inmune. Por este motivo el *targeting* y *delivery* de antígenos proteicos a través de los receptores de esta célula ha emergido como una posible herramienta de vacunación para inducir una captación dirigida de los mismos.

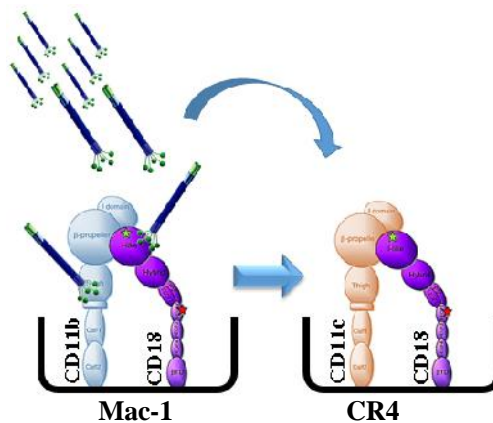
Esto se ha logrado conjugando covalentemente estos antígenos a ligandos de receptores para motivos conservados en patógenos (PRRs) como carbohidratos (reconocidos por lectinas de tipo-C), péptidos de flagelina (TLR5), CpG (TLR9), Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR2) (211, 212), o conjugándolos o fusionándolos a anticuerpos o fragmentos de los mismos, como mostraron en su trabajo pionero M. Nussenzweig y R. Steinman utilizando ovalbumina conjugada a un anticuerpo anti-DEC-205 (213). En términos de un direccionado específico del antígeno a células dendríticas, varios trabajos han demostrado el potencial de usar CD11c como blanco para favorecer la captación de proteínas tumorales y virales por estas células (214-216). Esto conduce a la presentación de los antígenos por ambas vías de MHC y se traduce en la generación de una potente respuesta T citotóxica específica contra el virus o el tumor, tanto *in vitro* como en modelos animales (215-218).

Como se mostró en el capítulo anterior, el primer intento de selección sobre BMDCs resultó muy polarizado a la selección de nanobodies contra receptores altamente expresados en células dendríticas. Debido a que la biblioteca 1053 preparada tiene una alta diversidad, existe el potencial para la selección de nanobodies adicionales, y en particular nos interesó la posibilidad de seleccionar VHHs contra el receptor CD11c. Esto abriría nuevas puertas para las líneas de investigación en inmunomodulación y estrategias de selección que se vienen desarrollando desde el comienzo de trabajo de esta tesis, pero presentaba el desafío de diseñar una estrategia para logara una selección no

por abundancia, sino dirigida. Para llevarla adelante se optó por utilizar en las etapas de *panning* el receptor comercial recombinante CD11c/CD18 (CR4, R&D Systems) en placas de ELISA, en lugar de hacerlo sobre las BMDCs en solución. De esta manera se enriquecería exclusivamente en nanobodies específicos para CD11c.

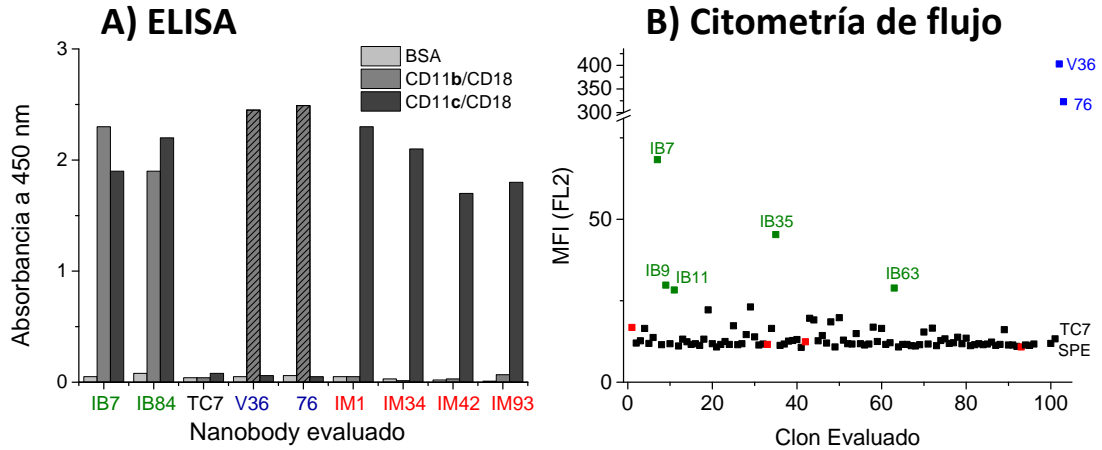
### 5.1 Primera estrategia de selección de nanobodies anti-CD11c.

CD11c, al igual que las integrinas CD11a y CD11b, existe asociado a la proteína CD18 sobre la superficie celular formando el receptor CR4. Esta co-dependencia con CD18 introduce un factor de complejidad adicional para realizar la selección de los nanobodies. Por eso, en la primera estrategia de *panning* se incluyeron etapas de selección negativa exponiendo la biblioteca de VHH en fagos a pocillos sensibilizados con el complejo CD11b/CD18 (Mac-1) para eliminar aquellos que reconocieran a CD18. Posteriormente, los fagos que no se unieron, se enfrentaron a pocillos sensibilizados con CD11c/CD18 (figura 43).



**Figura 43. Primera estrategia de *panning* para la selección de nanobodies contra CD11c.** La biblioteca 1053 fue incubada en pocillos sensibilizados con CD11b/CD18 (Mac-1) como paso de pre-adsorción (selección negativa), y luego, los fagos que no interaccionaron se pasaron a pocillos sensibilizados con CD11c/CD18 (CR4).

Luego de tres rondas de selección, la búsqueda de clones positivos se evaluó mediante ELISA contra 1) BSA, 2) CD11b/CD18 (Mac-1), y 3) CD11c/CD18 (CR4), siendo de interés los nanobodies que solo reaccionaran en la condición 3. El *screening* de 96 clones individuales dio lugar a cuatro nanobodies específicos para CR4 y a un gran número de clones que reaccionaban con ambos receptores (Mac-1 y CR4), y por tanto con especificidad por la subunidad CD18 (ochenta clones de un total de 96). En la figura 44.A, se muestra la señal por ELISA obtenida con algunos clones representativos derivados de la primer estrategia de selección.

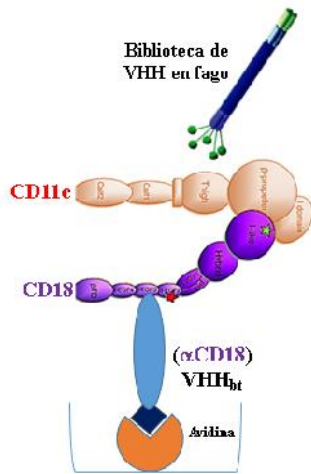


**Figura 44. Análisis de clones contra Mac-1 y CR4.** En A, la reactividad de 96 VHH<sub>bt</sub> se evaluó mediante ELISA contra los receptores recombinantes. Se muestran clones representativos (**IM#** anti-CD11c; **IB#** anti-CD18; **V36/76** anti-CD11b (controles positivos), **TC7** anti-TCC (control negativo, de unión inespecífica). En B, los mismos 96 nanobodies se evaluaron por citometría de flujo sobre  $2 \times 10^5$  BMDCs. En la gráfica de puntos se representa la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MFI) obtenida con cada nanobody biotinilado y estreptavidina conjugada a ficoeritrina (SPE). En rojo se representan los nanobodies **IM1**, **IM34**, **IM42** e **IM93** que por ELISA fueron reactivos por CD11c recombinante; en verde lo nanobodies anti-CD18 que fueron positivos por ELISA y citometría de flujo, y en azul los controles positivos anti-CD11b descritos en el capítulo IV.

Desafortunadamente, ninguno de los anti-CR4 marcó las BMDCs por citometría de flujo (clones **IM#**, puntos rojos), y de los ochenta nanobodies anti-CD18 solo cinco sí lo hicieron (clones **IB#**, puntos verdes) (figura 44.B). Este es un resultado muy importante, y vuelve a mostrar la dificultad de usar receptores recombinantes adsorbidos en placas de ELISA para el proceso de selección, dado que la mayoría de los nanobodies así seleccionados no reaccionan con la proteína nativa expresada en las células. La ausencia de reactividad probablemente se deba a que durante la adsorción en la placa de ELISA una alta proporción de la proteína recombinante se desnaturaliza (204, 219, 220), y por tanto, se fuerza la selección de nanobodies contra epítopes que pueden estar escondidos o ausentes en la proteína nativa.

## 5.2 Segunda estrategia de selección de nanobodies anti-CD11c.

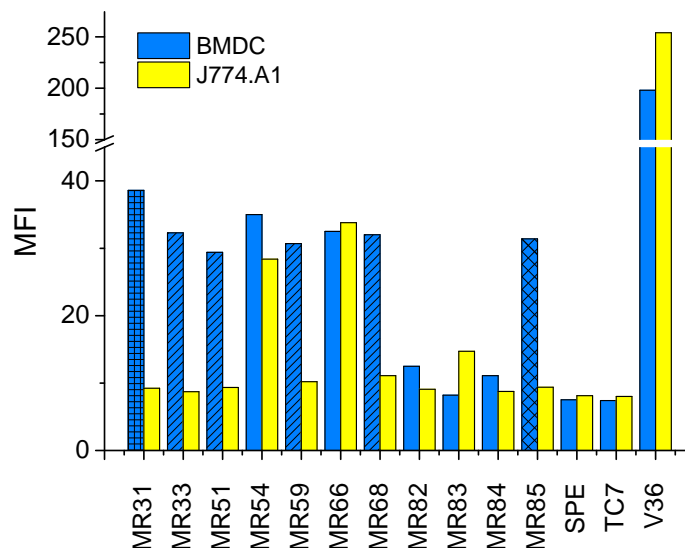
Para superar el problema de ausencia de reactividad contra los receptores nativos se diseñó una segunda estrategia de *panning* procurando mantener la “integridad” de CR4 para así forzar la selección de nanobodies contra epítopes nativos del mismo. Esto se logró utilizando uno de los nanobodies seleccionados contra CD18 para capturar a CR4 y así realizar lograr la inmovilización dirigida del receptor (figura 45).



**Figura 45. Estrategia para la selección de nanobodies contra epítomos nativos en CR4.** La integridad del receptor se mantiene a través de la inmovilización direccional mediada por un nanobody biotinilado *in vivo* anti-CD18 capturado en pocillos sensibilizados con avidina. Este complejo se usó en la selección de nanobodies anti-CR4 (potencialmente anti-CD11c) a partir de la biblioteca 1053.

Previo a la realización del *panning* con esta nueva estrategia se evaluó la eficiencia de los nanobodies anti-CD18 (con señal positiva en citometría) como anticuerpos de captura, usando como modelo el complejo el Mac-1 y el nanobody V36 anti-CD11b con un *tag* HA para la detección. El nanobody IB7 (anti-CD18) dio lugar a la señal más fuerte y por tanto se usó para capturar CR4 durante el *panning*. Para minimizar la selección de nanobodies contra la cadena CD18, la biblioteca y los amplificadores se pre-adsorbieron en solución con  $5 \times 10^7$  macrófagos J774.A (CD18+/CD11c-). Luego de tres rondas de selección, el ADN de la población de VHH se clonó “en masa” en el vector pINQ-BtH<sub>6</sub> y se electroporó en células BL21(DE3)/pCY216. Noventa y seis clones fueron producidos en presencia de D-biotina e IPTG, y los extractos de congelado/descongelado se evaluaron directamente por citometría de flujo usando BMDC (células CD11c+) y la línea de macrófagos J774.A1 (células CD11c-).

Como se muestra en la **figura 46**, se encontraron seis nanobodies (MR31, MR33, MR54, MR59, MR68 y MR85) que reconocieron exclusivamente células dendríticas, confirmando la especificidad contra epítomos nativos de CR4. A diferencia del marcado con V36 que reconoce CD11b (MFI ~200), la señal del marcado con los nanobodies anti-CR4 no supera una MFI de 40. Esto se debe a que la señal es directamente proporcional al nivel de expresión del receptor celular, y el de CD11c es más bajo que el de CD11b. Esto fue comprobado usando los anticuerpos comerciales N418 (IgG anti-CD11c) y M1/70 (IgG anti-CD11b) (datos no mostrados). Los cinco clones corresponden a tres secuencias diferentes MR31, MR33 (=MR51=MR59=MR68) y MR85, y todos poseen los residuos característicos de VHH en el *framework* 2.



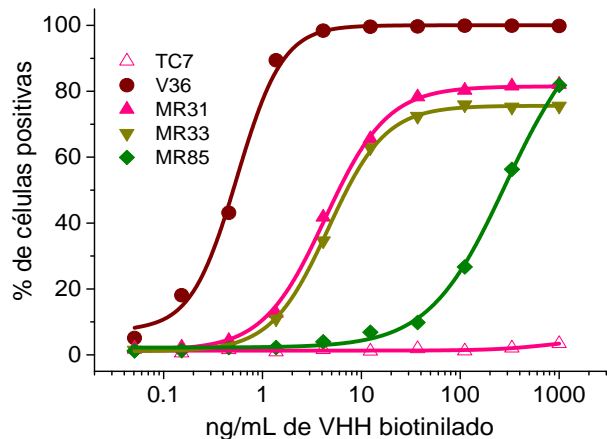
**Figura 46. Reactividad por citometría de flujo sobre BMDCs y macrófagos de los nanobodies seleccionados contra CR4 nativo.** La fracción soluble de 96 VHH<sub>bt</sub> individuales se incubó con  $2 \times 10^5$  BMDCs (células CD11c+) o macrófagos J774.A1 (células CD11c-) y la unión del nanobody biotinilado se evidenció con estreptavidina-ficoeritrina. Se muestra el resultado de clones representativos. El patrón en el relleno de las barras de MR31, MR33, MR51, MR59 y MR85 hace referencia a la identidad de secuencia aminoacídica. TC7 (anti-TCC); V36 (anti-CD11b); SPE (células con estreptavidina conjugada a ficoeritrina).

Corroborando una vez más la alta dependencia conformacional del reconocimiento de los nanobodies, los anticuerpos anti-CR4 que fueron seleccionados con la primera estrategia (receptor absorbido directamente en placa) y que no reconocían el receptor en la célula, tampoco reaccionaron contra el CR4 capturado (datos no mostrados).

### 5.3 Evaluación de los Nbs anti-CD11c para su uso en la determinación del porcentaje de células dendríticas de preparaciones de BMDCs.

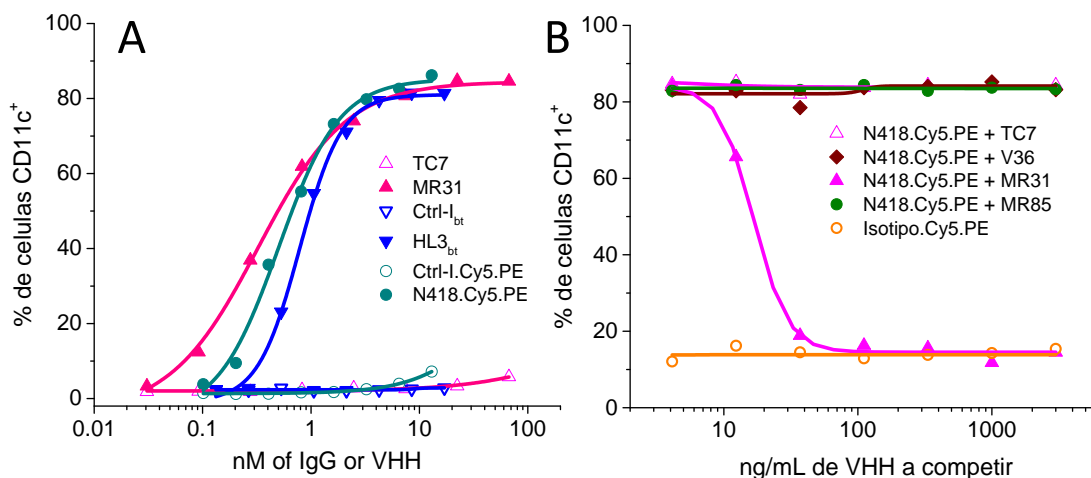
La utilidad de los nanobodies anti-CR4 se evaluó utilizando BMDCs en citometría de flujo. Se incluyó el V36<sub>bt</sub> como control positivo de células mieloides. Se encontró que los nanobodies MR31 y MR33 tienen un comportamiento similar (figura 47), mientras que MR85 requiere de una concentración mayor para alcanzar porcentajes equivalentes de marcado. Ambos nanobodies marcan un porcentaje de células dendríticas similar a la IgG comercial N418 (~80%).





**Figura 47. Porcentaje de células dendríticas obtenido con los nanobodies anti-CR4.** BMDCs se marcaron con concentraciones decrecientes de los nanobodies biotinilados y la unión se evidenció con estreptavidina-ficoeritrina. TC7 nanobody anti-TCC, V36 nanobody anti-CD11b, y MR31/33/85 nanobodies anti-CR4.

Por su facilidad de producción se continuó trabajando con MR31, el cual se comparó con las IgG comerciales anti-CD11c murinas producidas por los hibridomas N418 (221) y HL3 (222) mediante citometría de flujo a través de su titulación sobre BMDCs (**figura 48.A**). Al comparar la “afinidad relativa” de los tres anticuerpos se encontró que se requieren cantidades molares similares para alcanzar el porcentaje máximo de marcado. Teniendo en cuenta que la unión del nanobody es monovalente y por tanto no conlleva un efecto de avididad, su afinidad probablemente sería superior a la de los anticuerpos comerciales. Esta hipótesis será evaluada mediante interferometría de bio-capas.



**Figura 48. Comparación de la reactividad de los distintos anti-CR4 sobre BMDCs (A) y mapeo de epítopes (B) mediante citometría de flujo.** A) Porcentaje de células CD11b<sup>+</sup> positivas en función de la concentración molar de VHHs o IgGs utilizados. En B) las BMDC se incubaron con 800 ng/ml de N418.Cy5.PE en presencia de cantidades decrecientes de los nanobodies a estudiar y los respectivos controles, se incluye el valor del control isotópico como referencia. En ambos casos las BMDC se bloquearon previamente con suero de rata. HL3<sub>bt</sub>, IgG de hámster biotinilada anti-CD11c murino; N418.Cy5.PE IgG de hámster anti-CD11c murino conjugada a Cy5-ficoeritrina. Ctrl-I control isotópico.

Cuando se analizó la capacidad de los nanobodies MR31 y MR85 de inhibir la unión del anticuerpo comercial N418, se evidenció un claro solapamiento de epítopes entre esta IgG y el nanobody MR31 que definiría por tanto un epítoto común en la cadena CD11c, **figura 48B**.

En suma estos resultados muestran la utilidad en aplicaciones de citometría de flujo de los nanobodies seleccionados, particularmente de MR31, para la determinación del porcentaje de células dendríticas obtenidas a partir de cultivo de BMDC diferenciadas *in vitro*.

## CAPITULO VI

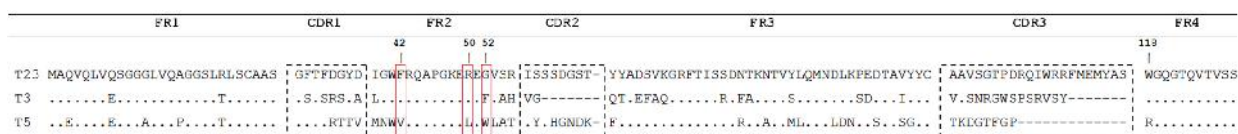
### GENERACIÓN DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS PARA CONFERIR FUNCIONES EFECTORAS A LOS NANOBODIES

Los anticuerpos biespecíficos (BiAb), que resultan de combinar dos especificidades en una misma molécula, han irrumpido como una poderosa herramienta con múltiples aplicaciones diagnósticas, biotecnológicas y médicas. El éxito más notorio es la aprobación del anticuerpo terapéutico *Catuxomab* (anti-EpCam × anti-CD3) por la EMA (*European Medicine Agency*) en 2009. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a la molécula de adhesión de células epiteliales EpCam sobre células tumorales y simultáneamente reclutar linfocitos T a través de la interacción con el receptor CD3, y otras células efectoras mediante la región Fc, lo cual en conjunto conduce a la eliminación específica de células tumorales (223). Existen numerosos formatos y métodos para la preparación de BiAb, pero los más simples de producir y más versátiles son los formados por tándems de VHHs (153, 224).

El objetivo del trabajo descrito en este capítulo fue explorar la posibilidad que los nanobodies anti-receptores de células dendríticas, previamente aislados, pudieran utilizarse en formatos de anticuerpos biespecíficos para incorporar funciones efectoras en los mismos. Más específicamente, utilizando como modelo nanobodies contra la toxina tetánica, los combinamos con los nanobodies anti- CD11b, CD45 y MHC-II a los efectos de mejorar el poder neutralizante de los primeros. La base para esta hipótesis es que los nanobodies neutralizantes monoméricos, si bien tienen una excelente biodisponibilidad (rápido acceso a la toxina), carecen de funciones efectoras y son eliminados rápidamente por vía renal, lo que afecta su capacidad neutralizante. Su combinación con un dominio con afinidad por receptores de células inmunes aumentaría su poder neutralizante al disminuir su eliminación renal y dirigirlos a células fagocíticas, particularmente al utilizar el VHH anti-CD11b, dado que el receptor Mac-1 es uno de los receptores principales vinculados a la fagocitosis de inmunocomplejos (225). Los resultados principales de este desarrollo se resumen en el artículo “*Increasing the potency of neutralizing single-domain antibodies by functionalization with a CD11b/CD18 binding domain*”, *mAbs* 2015 (154), que corresponde al **artículo II** que se incluye al final de la tesis y se comenta a continuación.

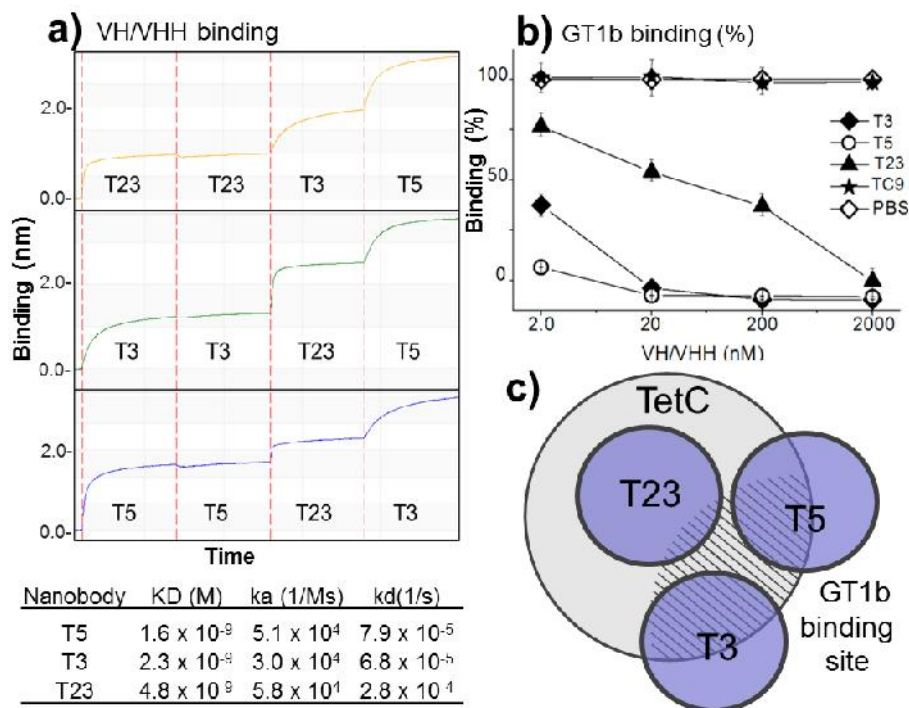
## 6.1 Selección y caracterización de nanobodies contra la toxina tetánica.

Para la selección de VHHs contra la toxina tetánica (TT), se utilizó una biblioteca de VHHs existente en el laboratorio preparada a partir de la sangre de una llama de tres años que había sido vacunada con una vacuna clostridial que incluye a *C. tetani*. El *panning* se realizó sobre el fragmento C recombinante de la TT (TetC) en placas de ELISA. Esta región representa en la toxina el dominio de unión a gangliósidos sobre las células neuronales, y es esa interacción la que permite que la toxina ingrese a las terminales nerviosas. Como se observa en la **figura 49**, correspondiente a la **figura 1** del **artículo II**, después de tres rondas de selección se aislaron tres secuencias diferentes. Curiosamente el clon T5 carece de los residuos característicos en el *framework 2* de los VHH derivados de hcAb, sino que deriva del dominio de unión al antígeno de los anticuerpos convencionales (VH). Cabe notar que los segmentos génicos V<sub>H</sub> y V<sub>H</sub>H se encuentran en el mismo locus y comparten los segmentos D y J, por lo que es relativamente común (~10% de las veces) que un V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> recombine con las regiones constantes de las IgG de cadena simple (30, 67).



**Figura 49. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de los nanobodies anti-TetC seleccionados.** Los aminoácidos se numeraron de acuerdo al sistema de numeración IMGT (226). En el alineamiento se tomó la secuencia de T23 como referencia, los puntos representan aminoácidos iguales en las tres secuencias, y los guiones marcan una región ausente en T3. Los rectángulos rojos señalan los aminoácidos característicos que permiten identificar de qué familia deriva cada nanobody (VH o VHH). Corresponde a la **figura 1** del **artículo II**.

Mediante ensayos de unión por interferometría de bio-capa (*BioLayer Interferometry*, BLItz *system*, Fortebio) se determinó que los tres nanobodies tienen afinidades en el rango nM, y que definen tres epítopes no solapantes sobre TetC (**figura 50.a** y **50.c**, correspondiente a la **figura 2** del **artículo II**). También resultaba interesante determinar si los nanobodies seleccionados eran neutralizantes y esto se logró por ensayos de competencia *in vitro* utilizando el gangliósido GT1b que constituye gran parte del ligando neuronal a través del cual se une la toxina. Como se muestra en la **figura 50.b** la presencia de cualquiera de los tres nanobodies interfirió con la interacción TetC a GT1b, aunque el efecto de inhibición fue mayor para el T5 y T3, probablemente debido a que su epítipo presenta mayor solapamiento con el sitio de unión a GT1b.

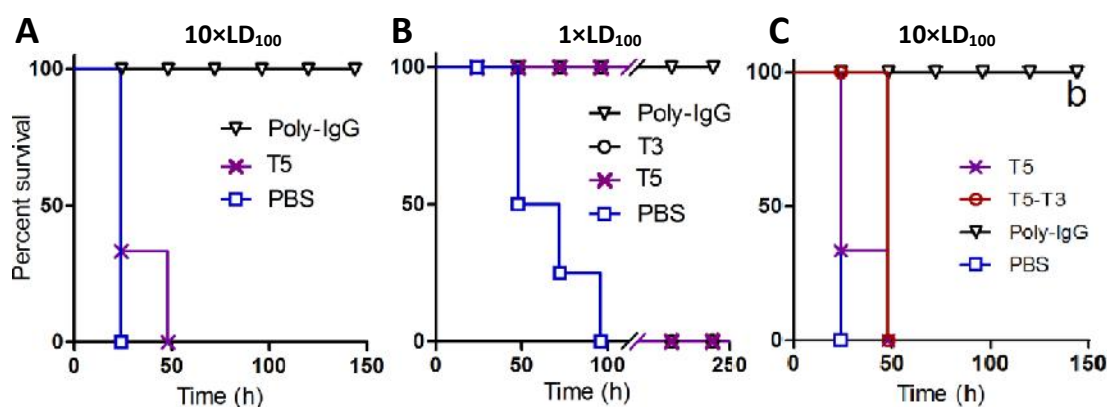


**Figura 50. Mapeo de epítopes y ensayo de inhibición de la unión de TetC al gangliósido GT1b.** a) Epítipo *binning* y medición de la afinidad de interacción de los nanobodies T3, T5 y T23 por TetC mediante interferometría de bio-capas (BLItz). b) Inhibición de la unión de TetC al gangliósido GT1b en presencia de cada nanobody anti-TetC o TC7 (anti-TCC) utilizado como control negativo. c) Esquema de las posibles regiones reconocidas por cada nanobody sobre TetC de acuerdo al ensayo de inhibición. Corresponde a la **figura 2 del artículo II**.

## 6.2 Evaluación de los Nb anti-TT para la neutralización de la toxina *in vivo*.

En base a la alta afinidad de reconocimiento de la toxina y la capacidad de bloquear la interacción con su “receptor celular” se eligió el nanobody T5 para evaluar su capacidad neutralizante *in vivo* en un modelo murino de letalidad inducido por la toxina tetánica (TT). Cuando se administró una dosis de nanobody de 100  $\mu\text{g}$  por vía subcutánea como complejo preformado con la toxina (T5/TT) no se observó protección frente a altas dosis de TT ( $10 \times \text{LD}_{100}$ ) (**Figura 51.A**, correspondiente **figura 3.A del artículo II**). En cambio, al disminuir la dosis letal de toxina 10 veces ( $1 \times \text{LD}_{100}$ ) todos los animales estaban vivos a las 96 h que es el tiempo comúnmente usado para los ensayos de neutralización de la toxina (227). No obstante, con el transcurso del tiempo el grupo de animales tratado con T5 mostró sintomatología característica de intoxicación por TT y culminaron muriendo (**Figura 51.B**, correspondiente a la **figura 3.B del artículo III**). Esto no fue observado en los ratones protegidos con IgGs policlonales convencionales obtenidas de una oveja vacunada con la TT (Poly- IgG).

Esta regresión en los síntomas que ocurría con T5, pero no con el anticuerpo convencional, llevo a pensar que este efecto podría explicarse por una rápida eliminación renal de los nanobodies debido a su pequeño tamaño, que a lo largo del tiempo disminuiría la concentración efectiva del nanobody neutralizante. La siguiente etapa consistió en generar una proteína bivalente para la toxina (T5-T3) lo cual duplicaría el tamaño (~30 kDa) y en caso de suficiente flexibilidad de la secuencia usada para fusionarlas, podría permitir la unión simultánea de los dos nanobodies. Mediante PCR de *overlap* se fusionaron ambos genes de tal forma que ambos nanobodies quedaban conectados por la secuencia peptídica (G<sub>3</sub>S)<sub>2</sub>. El nivel de expresión del nanobody bivalente resultó poco afectado, y al medir su afinidad (avidez) por la TetC se observó un aumento significativo, T5-T3 K<sub>D</sub>= 0.76 nM (T5 K<sub>D</sub>= 1.6 nM o T3 K<sub>D</sub>= 2.3 nM) que sugiere que ambos dominios se unen simultáneamente. Sin embargo, como se muestra en la **figura 51.C**, correspondiente a la **figura 4.B** del **artículo II**, la co-administración de esta nueva proteína no mostró mejoras significativas en la sobrevida de los animales.



**Figura 51. Neutralización *in vivo* con los nanobodies anti-TetC.** Análisis de la sobrevida de grupos de cinco ratones que fueron co-administrados con **A**) 10×LD<sub>100</sub> de toxina y 6.3 nmoles de T5 (100 µg), o 3.3 nmoles de Poly-IgG (500 µg), o PBS; **B**) 1×LD<sub>100</sub> de toxina con 0.63 nmoles de T5 (10 µg), 0.63 nmoles of T3 (10 µg), 0.33 nmoles of Poly-IgG (50 µg), o PBS; o **C**) 10×LD<sub>100</sub> de toxina con PBS o PBS conteniendo 6.3 nmoles de T5, 6.3 nmoles de T5-T3, o 3.3 nmoles de Poly-IgG. Adaptación de las **figura 3** y **4** del **artículo II**.

### 6.3 Nanobodies como dominios de funcionalización.

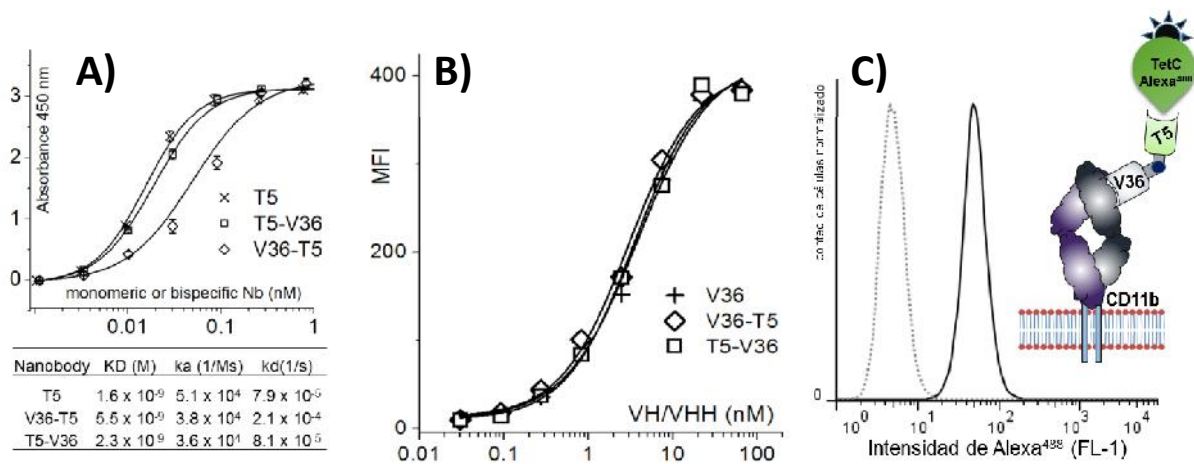
La eficiente neutralización de toxinas o drogas no sólo requiere alta afinidad, sino que es importante que los inmunocomplejos formados sean captados por las células fagocíticas para promover su eliminación. En el caso de anticuerpos convencionales, esto se ve favorecido por la respuesta policlonal que asegura el acúmulo de regiones Fc en la superficie de la toxina, lo que a su vez, a través de los receptores para Fc, activa la fagocitosis del inmunocomplejo. Recientemente, este proceso ha sido mimetizado como estrategia para mejorar el poder neutralizante de nanobodies

contra la toxina botulínica (228). Esto se logró adicionando copias de un epítipo peptídico (*tag*) a los nanobodies, y co-suministrando un anticuerpo monoclonal IgG<sub>1</sub> contra estos péptidos, de modo de acumular fragmentos Fc sobre la toxina. El efecto era potente sólo si se usaba un nanobody bivalente contra dos epítopes distintos y se acumulaban al menos 4 copias del *tag* peptídico por molécula de toxina. En estas condiciones la potencia de neutralización aumentaba dramáticamente en experimentos de co-administración, pero además de la complejidad del sistema, en la situación real de terapia anti-toxina, la IgG anti-*tag* peptídico inyectada debería difundir al sitio de neutralización, perdiéndose así la ventaja resultante de la rápida difusión de los nanobodies.

En base a estos antecedentes, nuestra siguiente estrategia fue tratar de sustituir la función mediada por el fragmento Fc de los anticuerpos convencionales, dotando a los nanobodies neutralizantes de la capacidad de unirse directamente a los receptores celulares vinculados al proceso de fagocitosis, mediante su fusión a un dominio anti-receptor en un formato de nanobodies biespecíficos. De esta forma podrían incorporarse funciones efectoras al dominio neutralizante, a la vez que se mantendría un tamaño reducido que favoreciese una rápida difusión a los tejidos. En nuestro caso el nanobody anti-CD11b (V36) podría actuar como dominio efector específico de un receptor directamente involucrado en la fagocitosis de inmunocomplejos, y los nanobodies contra los receptores MHC-II (VHH-49) y CD45 (G7) que no constituyen receptores fagocíticos podrían oficiar de dominios de fusión de control.

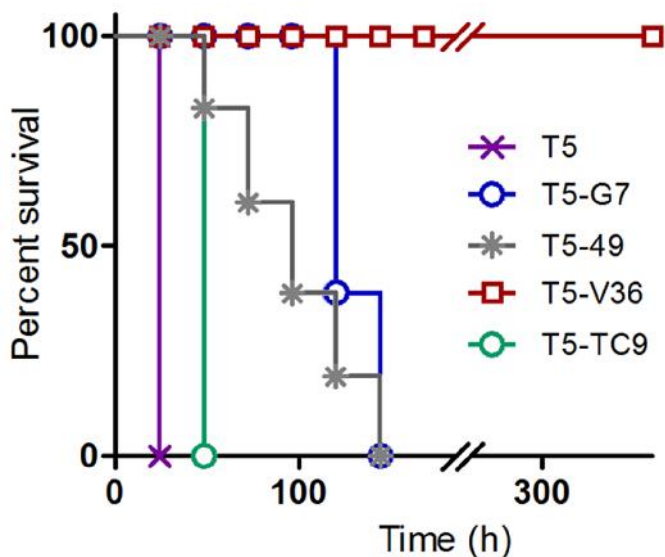
En forma similar a lo descrito para la generación de nanobodies bivalentes T5-T3, se generaron nanobodies biespecíficos por PCR de *overlap*, lo cual puede hacerse utilizando *primers* genéricos aprovechando la similitud de secuencia de las distintas familias de los VHH. En este caso también se encontró que la mayoría de los nanobodies biespecíficos pueden producirse en *E. coli* con alto rendimiento, consiguiéndose de 5-10 mg de proteína soluble activa por litro de cultivo (**figura 4.A** del **artículo II**).

Usando como modelo a la fusión de T5 con V36 se estudió *in vitro* la capacidad de la proteína biespecífica de reconocer a cada antígeno individual. Como se muestra en la **figura 52**, correspondiente a la **figura 5** del **artículo II**, la proteína en la orientación T5-V36 fue capaz de reconocer a TetC con afinidad semejante a la del nanobody original, mientras que en la orientación V36-T5 la afinidad por TetC disminuyó 2-3 veces. En el caso del reconocimiento de CD11b no hubo una influencia tan drástica en la orientación (T5-V36 vs. V36-T5). Finalmente se demostró que la proteína biespecífica también es capaz de unir simultáneamente los dos antígenos, al incubar macrófagos de la línea J774.A1 con TetC marcada con el fluoróforo Alexa<sup>488</sup>, en presencia o ausencia de T5-V36 (**figura 52.C**).



**Figura 52. Comparación de la reactividad de los nanobodies monomérico o biespecíficos.** A) Análisis de la reactividad de los nanobodies contra TetC mediante ELISA e interferometría de bio-capa. B) Titulación de los nanobodies biotinilados contra CD11b mediante citometría de flujo sobre macrófagos J774.A1. C) Unión de TetC marcada con el fluoróforo Alexa<sup>488</sup> a través de la interacción con T5-V36 al receptor CD11b (línea sólida). En línea punteada se muestra la señal correspondiente a macrófagos incubados con la misma cantidad de TetC-Alexa<sup>488</sup> en ausencia de T5-V36. **MFI** Intensidad de fluorescencia media. Corresponde a la **figura 5 del artículo II**.

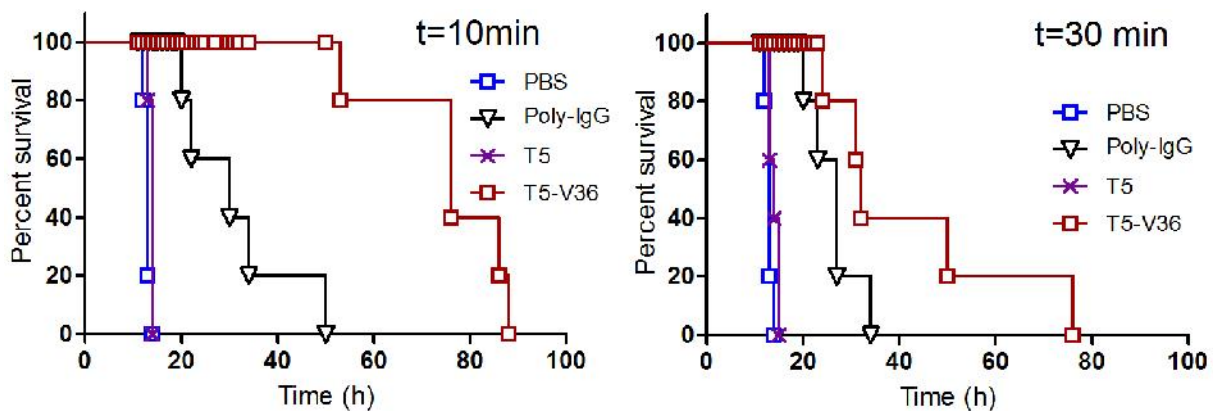
Las diferentes construcciones se evaluaron *in vitro* en el modelo de letalidad co-administrándolas con  $10 \times LD_{100}$ . Como se muestra en la **figura 53**, correspondiente a la **figura 6 del artículo II**, la combinación de T5 con cualquiera de los nanobodies anti-receptor incremento la sobrevivida de los animales por más de 96 horas, posiblemente al aumentar la retención de T5 a través de su asociación a células que expresaran dicho receptores. Sin embargo, sólo se consiguió 100% de sobrevivida con la combinación con V36 (anti-CD11b). Este efecto persistió hasta el fin del período de observación (15 días) cuando los animales no mostraban ningún síntoma de intoxicación. Con este ensayo se demostró que direccionar una toxina a un receptor endocítico de células mieloides es una eficiente y novedosa estrategia para su eliminación.



**Figure 53. Ensayo de neutralización *in vivo* con los anticuerpos biespecíficos.** Sobrevivida de los grupos de animales (n=5) que fueron co-administrados con  $10 \times LD_{100}$  de toxina y 6.3 nmoles de los anticuerpo monomérico (100  $\mu$ g) o biespecíficos (200  $\mu$ g) en PBS. El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prisma 5 (*Test log-rank* Mantel-Cox,  $p < 0.05$ ) e indica diferencias significativas en la actividad neutralizante de los nanobodies T5 < T5-TC9 ( $p < 0.0002$ ), T5-TC9 < T5-49 ( $p < 0.0002$ ), T5-49 < T5-G7 ( $p < 0.02$ ), T5-G7 < T5-V36 ( $p < 0.0001$ ). TC9 nanobody anti-TCC usado como control negativo de unión a la célula y de tamaño. Corresponde a la **figura 6 del artículo II**.



En los experimentos anteriores, siguiendo el procedimiento convencional del ensayo de neutralización *in vivo* para la TT, la toxina se co-administró con los anticuerpos neutralizantes, como inmunocomplejo preformado. Si bien este método es válido para comparar el poder neutralizante de los anticuerpos convencionales entre sí, no es adecuado para comparar distintos formatos de anticuerpos, dado que estas diferencias pueden afectar su biodisponibilidad, y por tanto la eficiencia del anticuerpo para acceder a la toxina en los tejidos y neutralizarla. Por esta razón, se evaluó el poder protector del anticuerpo biespecífico T5-V36 en condiciones que asemejan las encontradas durante un episodio de intoxicación natural, en donde la toxina es producida localmente en un foco infeccioso y los anticuerpos son administrados por vía intravenosa (**figura 54**).



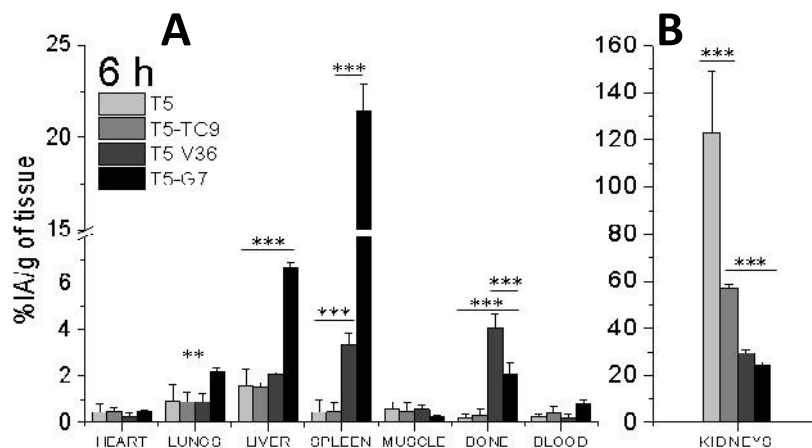
**Figura 54. Ensayo *in vivo* de neutralización retrasada.** Se evaluó la sobrevida de grupos de ratones enfrentados con  $5 \times LD_{100}$  de toxina (subcutánea), y que después de 10 o 30 minutos recibieron por vía intravenosa PBS, o PBS conteniendo 6.3 nmoles de T5, T5-V36, o 3.3 nmoles de Poly-IgG. El *test* de *log-rank* Mantel-Cox ( $p = 0.05$ ) indica diferencias significativas en la actividad neutralizante de diferentes preparaciones administradas según PBS < Poly-IgG ( $p < 0.0001$ ), Poly-IgG < T5-V36 ( $p < 0.0001$ ). Corresponde a la **figura 7** del **artículo II**.

En este modelo de neutralización “retrasada” si bien no se logró la completa sobrevida de los animales ante el desafío con  $5 \times LD_{100}$  de la toxina, nuevamente el anticuerpo T5-V36 mostró el mayor poder neutralizante en comparación a T5, **figura 54**, correspondiente a la **figura 7** del **artículo II**. Un resultado muy interesante de estos experimentos de post-administración es la superioridad del tratamiento con el nanobody biespecífico T5-V36 en comparación a los anticuerpos convencionales Poly-IgG, lo cual es más evidente cuando los anticuerpos son administrados a los 10 minutos posteriores al desafío con la toxina. Probablemente la más rápida biodistribución de los nanobodies y mayor penetración de tejidos por su menor tamaño (30 vs 150 kDa de la IgG) (229) permite un rápido encuentro con la toxina para facilitar su eliminación antes de que sea internalizada por las neuronas. En este sentido, a los 30 min una importante cantidad de la TT ya ingresó a las neuronas y su neutralización ya no es posible, por lo que el efecto protector observado es menor. Es

notable que en las mismas condiciones la administración de T5 monomérico casi no tuvo efecto protector, lo cual remarca la importancia de (I) incrementar la permanencia de los nanobodies en el cuerpo a través de la unión a células inmunes en distintos órganos, y (II) adicionar funciones efectoras de los nanobodies neutralizantes para que la toxina sea eliminada.

#### 6.4 Biodistribución de los nanobodies anti-CD11b y anti-CD45

Finalmente se estudió el patrón de biodistribución de los anticuerpos a través de la administración de los nanobodies marcados radiactivamente con tecnecio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) y el análisis *ex vivo* de los órganos a las 1, 3, 6, y 24 h. Como se muestra en la **figura 55**, correspondiente al análisis *ex vivo* realizado a las 6 h de la **figura S-3** del **artículo II**, T5-V36 y T5-G7 se acumulan rápidamente en órganos linfoides y órganos ricos en células inmunes (lo cual es ya evidente luego de 1 h de administración) sustentando la hipótesis de que la interacción con células inmunes (CD45<sup>+</sup> o CD11b<sup>+</sup>) disminuye su eliminación. Asimismo, esto también se vio reflejado en la menor filtración renal ( $p < 0.001$ ) de estas proteínas con respecto al anticuerpo monomérico o al nanobody biespecífico (T5-TC9) usado como control negativo.



**Figura 55. Análisis *ex vivo* de biodistribución de los nanobodies marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ .** Los nanobodies marcados radioactivamente se administraron por vía intravenosa a ratones CD1 (n=3) y después del tiempo indicado, se extrajeron los órganos individuales y determino la actividad en cada uno de ellos. Las columnas representan el promedio del porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (%IA/g). Se aplicó el análisis estadístico *two-way* ANOVA seguido por el *test* de Bonferroni.  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Correspondiente al tiempo  $t = 6$  h de la **figura S-3** del **artículo II**.

En la mayoría de los órganos estudiados la acumulación fue mayor para T5-G7 (bazo, hígado y pulmones) a excepción del hueso, donde curiosamente a pesar de la mayor abundancia relativa de células CD45<sup>+</sup> (**figura S-4 del artículo II**), fue T5-V36 el que más se acumuló, comportamiento que se mantuvo en todos los tiempos estudiados ( $p < 0.001$ ).

En suma, estos resultados mostraron que no sólo es importante lograr una mayor retención de los nanobodies neutralizantes en el organismo, como sucedió con T5-G7, sino que es necesario dotarlos de funciones efectoras que promuevan su eficiente remoción por el sistema fagocítico mononuclear (T5-V36). El anticuerpo monodominio V36 parece cumplir eficientemente este rol y su fusión a un nanobody “neutralizante” resulta en un anticuerpo biespecífico de mínimo tamaño, lo que también contribuye facilitando el rápido acceso a la toxina antes de que esta ejerza su función.



# **Discusión Final**



---

## DISCUSION FINAL

---



Este trabajo de tesis tuvo como principal objetivo el establecimiento de una plataforma local para la generación de bibliotecas de VHH de llamas, y para la posterior selección y producción de nanobodies. En este proceso se ha hecho especial énfasis en el desarrollo de herramientas que faciliten la selección e identificación de nanobodies para su uso en el desarrollo de diferentes aplicaciones biotecnológicas con potencial interés biomédico.

Una de las primeras contribuciones generadas en esta tesis, descrita en el **primer capítulo**, fue la modificación del vector comercial pET28 para generar el vector pINQ-H6HA que permite: (I) la fácil transferencia “en masa” del ADN de la población de nanobodies desde el vector de selección fagémido a sistema de expresión fuerte, y (II) el direccionamiento de los nanobodies al periplasma lo que resulta fundamental para su correcto plegamiento. En conjunto, esta estrategia permite que el *screening* de clones positivos para el antígeno se realice a partir de un sistema que asegura un alto rendimiento de proteína y abrió el camino para llevar adelante estrategias de análisis de un alto número de clones en paralelo. Esto se ve facilitado por la incorporación en el extremo carboxilo terminal de un *tag* HA para la detección y de un *tag* de seis histidinas. Este último posibilita la purificación por afinidad de los nanobodies ya sea en sistemas cromatográficos como en placas de 96 columnas. Instrumentando esta metodología se logró optimizar el rendimiento de producción de VHH tras el escalado en más de 60 veces (5-40 mg/L), y además se redujo 250 veces la cantidad de IPTG necesaria para lograr la máxima producción de nanobodies.

Si bien esta metodología sorteaba el bajo nivel de expresión, es necesario el uso de anticuerpos secundarios comerciales específicos de *tags* para la detección de los nanobodies, los cuales aumentan los costos para el desarrollo de distintos ensayos. En este sentido, con el interés de mejorar las técnicas usadas comúnmente para la caracterización de los nanobodies seleccionados, en el **segundo capítulo** se desarrolló una metodología que posibilita la biotilación *in vivo* de los nanobodies. De

esta manera se aprovechó la versatilidad del sistema avidina-biotina, no solo para facilitar la detección de los nanobodies sino también para el desarrollo de metodologías que faciliten la selección y caracterización de los nanobodies. Esto se logró a través de la generación del vector pINQ-BtH<sub>6</sub>, que tiene las mismas características de expresión de pINQ-H<sub>6</sub>HA pero además permite la biotinylación *in vivo* sitio específica a través de la inclusión de una secuencia peptídica que es reconocida por una biotiny ligasa natural de *E. coli*. Para lograr una biotinylación cuantitativa fue necesario la sobre-expresión de la enzima que se consiguió mediante la electroporación de las bacterias BL21(DE3) con el vector pYC216 codificante de la biotiny ligasa citoplasmática BirA. No obstante, la biotinylación no resultó completa, probablemente debido a la localización de la BirA y los VHH en compartimentos celulares diferentes. Con el objetivo de demostrar esta hipótesis se co-expresaron ambos componentes en el citoplasma o periplasma, pero en ningún caso se logró una mejora, pues de una u otra forma la expresión del nanobody o la actividad de la enzima se veían comprometidas. Finalmente, se encontró un camino alternativo, simple y fácil para la obtención del 100% de biotinylación, mediante la disrupción mecánica de las bacterias por sonicación y un paso de post-biotinylación *in vitro*. Esto permitió generar un sistema sumamente eficiente que permite obtener de 5-40 mg de nanobody biotinylado listo para su uso en futuras aplicaciones.

La segunda parte de la tesis se focalizó en la generación de herramientas derivadas del sistema de biotinylación *in vivo* de los nanobodies con la finalidad de facilitar el proceso de elección de los mejores candidatos para su posterior caracterización y uso en aplicaciones analíticas. Como se comenta en el **tercer capítulo** los métodos iniciales de *screening* generan poca información, por lo que en esta etapa se procuró el desarrollo de una metodología simple que permitiera la selección de nanobodies en términos de afinidad relativa por el antígeno conjugado a una enzima reportera, y por su capacidad de formar pares para el antígeno de selección. Tal desarrollo se realizó utilizando como antígeno modelo a la epoxi-hidrolasa humana, la cual debido a sus funciones anti-inflamatorias, vasodilatadoras y analgésicas ha adquirido gran importancia como blanco de interés biomédico (194). Como primer paso, del proceso se optimizó un método para clasificar los nanobodies de acuerdo a su reactividad contra un conjugado del antígeno. Esto permitió clasificarlos en 4 familias que correspondían a 13 secuencias diferentes. De estos, seis clones representativos se utilizaron para realizar la inmovilización orientada de los VHH biotinylados como anticuerpos de captura, y así realizar la búsqueda de pares de nanobodies que permitieran la detección del antígeno en formato de ELISA sándwich. En base a la evaluación de un alto número de combinaciones en paralelo se desarrolló un ELISA sándwich de muy alta sensibilidad (LD = 63 pg/mL), el cual presenta excelentes resultados de recuperación en muestras adicionadas y permitió la cuantificación de la sEH

humana en matrices muy complejas, coincidiendo con los valores reportados por otros métodos (199). Hasta ahora hay pocos ejemplos del uso de nanobodies en inmunoensayos tipo sándwich, de hecho, hasta el momento el ensayo de mayor sensibilidad reportado corresponde a la detección la toxina Cry1Fa de *Bacillus thuringiensis* con un LD de 880 pg/mL (133, 230). Esta estrategia también constituye una poderosa herramienta para el mapeo de epítopes, y además la disponibilidad de un método que estandarice la cantidad de anticuerpo a ensayar puede tener otras aplicaciones, por ejemplo para comparar en paralelo el poder inhibitorio de los VHHs inmovilizados contra una cantidad fija de la enzima de interés.

En la siguiente etapa se abordó la selección de VHH contra receptores celulares. La importancia del desarrollo de capacidad local para generar anticuerpos recombinantes contra dichos blancos es evidente teniendo en cuenta la importancia biomédica de los mismos. Sin embargo, como se ha comentado, debido a la gran dependencia conformacional del reconocimiento de los nanobodies, la estrategia inicial de inmunizar animales con los receptores recombinantes conducía al aislamiento de anticuerpos con reactividad contra la recombinante pero no contra el receptor en las células, coincidiendo con lo reportado en la literatura reciente (204). Para evitar este problema se recurrió a la inmunización y selección utilizando células enteras. Dado que esto significaba trabajar con “un antígeno” sumamente complejo, se hizo uso de la gran versatilidad del sistema de biotilación *in vivo* de los nanobodies para generar una nueva herramienta que permitiera la rápida identificación y caracterización de la reactividad de un panel de nanobodies generados contra células enteras, en este caso células dendríticas.

Esta metodología se describe en el **cuarto capítulo** donde se muestra su aplicación al análisis de un gran número de VHHs de forma sistematizada mediante citometría de flujo, lo cual asegura que los nanobodies escogidos reconozcan el antígeno nativo sobre la célula. Otro gran reto de la nueva estrategia de inmunización y selección fue el poder identificar el antígeno sobre la célula reconocidos por los nanobodies seleccionados. Nuevamente, haciendo uso de la presencia de biotina en los nanobodies se realizaron de forma rápida y simple ensayos de inmunoprecipitación con extractos de células dendríticas que permitieron la identificación de nanobodies contra CD11b, CD45 y MHC-II. Otra importante derivación de este trabajo fue la demostración de las ventajas competitivas que tienen los nanobodies biotilados anti-receptores seleccionados para aplicaciones posteriores en citometría de flujo como alternativa a los anticuerpos convencionales.

Debido a que la atención inicial se centró en los nanobodies que mostraban el mayor corrimiento de la señal en citometría de flujo, la selección se sesgó hacia anticuerpos que reaccionaban contra receptores altamente expresados en células dendríticas. Pero el método cobra mayor interés, en tanto sea posible orientar la selección hacia el receptor de interés, aun cuando este sea poco expresado. Una alternativa para lograr este fin sería realizar la inmunización y el *panning* sobre células transfectadas con un receptor particular de interés y usando la línea celular original sin transfectar para la pre-adsorción durante el *panning*. Alternativamente, como se mostró en el **quinto capítulo**, si se dispone del receptor recombinante en forma nativa, puede promoverse la selección contra el mismo: a) si la inmunización se realizó con células enteras y b) siempre y cuando se encuentre una forma de inmovilización que evite la desnaturalización resultante de la interacción con la superficie de adsorción pasiva. Esto se exploró con el receptor recombinante CR4 (CD11c/CD18), con el cual se logró aislar entre otros el anticuerpo MR31 anti-CD11c. Los anticuerpos contra este receptor son probablemente de los más utilizados en el estudio vinculado a la biología de las células dendríticas, y considerando las ventajas ya señaladas para el uso de los nanobodies biotinilados en citometría de flujo, el MR31 podría ser un reactivo incluso con valor comercial inmediato. Por otro lado, este nanobody tiene un alto potencial para funcionalizar antígenos o partículas adyuvantes y mejorar su captación por las células dendríticas en modelos preclínicos de vacunación. Aunque no se ha probado aún su reactividad contra el CR4 de células dendríticas humanas o de especies de interés veterinario, la estrategia desarrollada podría utilizarse para aislar un nanobody equivalente para el CD11c de otras especies.

Varias de las propiedades de los nanobodies, como su fácil producción, estabilidad, y rápida biodistribución los hacen muy atractivos para aplicarlos como antídotos, ya sea en casos de sobredosis de drogas, envenenamiento o intoxicación. Sin embargo, sistemáticamente el uso de nanobodies monoméricos neutralizante resulta ineficiente, como también ocurrió en este trabajo. Así, a pesar de la alta afinidad de los nanobodies neutralizantes seleccionados contra la toxina tetánica, estos no confirieron una protección significativa. Con estos antecedentes, la tercera y última parte de la tesis descrita en el **sexto capítulo** se focalizó en superar esta limitación a través de la generación de nanobodies biespecíficos para conferir funciones efectoras a los nanobodies neutralizantes, fusionándolos a un dominio “efector” representado por los nanobodies con especificidad por los receptores celulares CD11b, CD45 y MHC-II. Esta prueba de concepto resultó efectiva para la eliminación de la toxina modelo elegida cuando la proteína biespecífica dirigía la toxina al receptor endocítico CD11b<sup>+</sup>. Esta novedosa estrategia podría dar lugar a aplicaciones terapéuticas que excedan el campo de los antídotos, tales como el desarrollo de nanobodies biespecíficos, donde un



nanobody contra un receptor endocítico se combina con otro contra citoquinas desreguladas en procesos inflamatorios o un contra un factor de crecimiento tumoral. Esto podría resultar en alternativas de menor costo respecto a los anticuerpos convencionales, por ejemplo, los anticuerpos anti-TNF , que en este momento son los anticuerpos terapéuticos de mayor uso, se producen en cultivos de células de mamífero a un ritmo anual de decenas de toneladas de producto final ultrapuro.



---

## ARTICULOS GENERADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS

---



### PUBLICACIONES DIRECTAS

**I – Rossotti M**, Tabares S, Alfaya L, Leizagoyen L, Moron G, and González-Sapienza G. *Efficient isolation of single domain antibodies to cell receptors by site-specific labelling with biotin*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2015**;1850, (7):1397-1404.

**II – Rossotti M**, González-Techera A, Guarnaschelli A, Yim L, Camacho X, Fernández M, Cabral P, Leizagoyen C, Chabalgoity JA, and González-Sapienza G. *Increasing the potency of neutralizing single-domain antibodies by functionalization with a CD11b/CD18 binding domain*. *mAb.*, **2015**; 3, 7 (5):820-828.

**III – Manuscrito I a someter – Rossotti M**, Pirez M, Spier C, Cui Y, Morisseau C, Leizagoyen C, Gee S, Hammock BD, and Gonzalez-Sapienza G. *A method for sorting and pairwise selection of nanobodies for the development of highly sensitive sandwich immunoassays*.

### PUBLICACIONES SUPLEMENTARIAS

**S-I –** Tabares-da Rosa S, **Rossotti M**, Carleiza C, Carrión F, Pritsch O, Ahn KC, Last JA, Hammock BD, and González-Sapienza G. *Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response*. *Anal. Chem.*, **2011**; 83: 7213-7220.

En este artículo mi contribución fue la colaboración en el entrenamiento y en la construcción de la biblioteca de nanobodies utilizada en este trabajo, y en la generación del vector de expresión de alto rendimiento de los nanobodies pINQ.H<sub>6</sub>HA.

**S-II** – Cui Y, Li D, Morisseau C, Yang J, Wan D, **Rossotti M**, Gee S, González-Sapienza G, and Hammock BD. *Heavy Chain Single Domain Antibodies to Detect Native Human Soluble Epoxide Hydrolase*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2015**; Jul 31. [Epub ahead of print]. PMID: 6229025.

Mi contribución en el artículo **S-II** fue llevar adelante el proceso de inmunización de llamas con la sEH y la construcción de la biblioteca de nanobodies NP001 que se utilizó en este estudio para aislar el nanobody que permitió el montaje del ELISA híbrido.

## **ARTICULOS SUPLEMENTARIOS DERIVADOS DEL TRABAJO CON BIBLIOTECAS DE PEPTIDOS**

Estos dos artículos se generaron durante el periodo de entrenamiento en las técnicas para la construcción de bibliotecas y la metodología de *phage display*. Los mismos fueron realizados como parte de las actividades exploratorias llevadas adelante para la búsqueda de péptidos contra receptores de células inmunes recombinantes (TLR/MD2/Dectina-1) producidos en baculovirus en el marco del desarrollo de esta tesis.

**S-III** – **Rossotti M**, Carlomagno M, González-Techera A, Hammock BD, Last J, and González-Sapienza G. *Phage Anti-Immuno-complex Assay (PHAIA) for clomazone: Two-site recognition increases assay specificity and facilitates adaptation into a rapid on-site format*. *Anal. Chem.*, **2010**; 82: 8838-8843.

**S-IV** – Kim H, **Rossotti M**, Ahn KC, González-Sapienza G, Gee SJ, Musker R, Hammock BD. *Development of a noncompetitive phage anti-immunocomplex assay for brominated diphenyl ether 47 (PBDE)*. *Anal Biochem.*, **2010**; 401: 38-46.

En el artículo S-IV mi contribución fue la construcción de la biblioteca de octapeptidos cíclicos expresados sobre la superficie del bacteriófago M13, en el diseño de la estrategia para la selección de los fagos anti-inmunocomplejo específicos por PBDE-47 y colaboración durante el proceso de selección y producción de fagos anti-inmunocomplejo.

**S-V** – Lassabe G, **Rossotti M**, González-Techera A, González-Sapienza G. *Shiga-like toxin B subunit of Escherichia coli as scaffold for high-avidity display of anti-immunocomplex peptides*. Anal. Chem., **2014**; 86: 5541-5546.

**S-VI** – Carlomagno M, Lassabe G, **Rossotti M**, González-Techera A, Vanrell L, González-Sapienza G. *Recombinant streptavidin nanopeptamer anti-immunocomplex assay for noncompetitive detection of small analytes*. Anal. Chem., **2014**; 86: 10467-10473.

En los artículos S-V y S-VI mi contribución fue la colaboración en el diseño del vector para la expresión de los péptidos expresados como elementos de fusión a la proteína verotoxina y estreptavidina en el vector pINQ.H<sub>6</sub>HA. Asimismo, en ambos artículos se utilizó el péptido anti-inmunocomplejo (ICX-11) para el clomazone, el cual fue reportado en el artículo S-III.



# Referencias



---

## REFERENCIAS

---



1. D. M. Grant, [Lady Mary Wortley Montagu and the campaign against smallpox]. *L' Infirmiere canadienne* **11**, 29-31 (1969).
2. S. Riedel, Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proceedings* **18**, 21-25 (2005).
3. E. von Behring, S. Kitasato, [The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890]. *Molecular immunology* **28**, 1317, 1319-1320 (1991).
4. A. Antibody. (2015).
5. R. Medzhitov, Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826 (2007).
6. B. Beutler, Innate immunity: an overview. *Molecular immunology* **40**, 845-859 (2004).
7. P. J. Delves, I. M. Roitt, The immune system. Second of two parts. *The New England journal of medicine* **343**, 108-117 (2000).
8. A. V. Collis, A. P. Brouwer, A. C. Martin, Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *Journal of molecular biology* **325**, 337-354 (2003).
9. D. C. Parker, T cell-dependent B cell activation. *Annual review of immunology* **11**, 331-360 (1993).
10. R. Noelle, E. C. Snow, T helper cells. *Current opinion in immunology* **4**, 333-337 (1992).
11. M. Reth, Antigen receptors on B lymphocytes. *Annual review of immunology* **10**, 97-121 (1992).
12. R. R. Porter, Chemical Structure of Gamma-Globulin and Antibodies. *British medical bulletin* **19**, 197-201 (1963).
13. S. Cohen, C. Milstein, Structure and biological properties of immunoglobulins. *Advances in immunology* **7**, 1-89 (1967).
14. N. Hilschmann, L. C. Craig, Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **53**, 1403-1409 (1965).
15. G. Johnson, T. T. Wu, Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic acids research* **28**, 214-218 (2000).
16. D. E. Steinmeyer, E. L. McCormick, The art of antibody process development. *Drug discovery today* **13**, 613-618 (2008).
17. F. D. Finkelman, J. A. van Boxel, R. Asofsky, W. E. Paul, Cell membrane IgD: demonstration of IgD on human lymphocytes by enzyme-catalyzed iodination and comparison with cell surface Ig of mouse, guinea pig, and rabbit. *Journal of immunology* **116**, 1173-1181 (1976).
18. J. H. Ruddick, G. A. Leslie, Structure and biologic functions of human IgD. XI. Identification and ontogeny of a rat lymphocyte immunoglobulin having antigenic cross-reactivity with human IgD. *Journal of immunology* **118**, 1025-1031 (1977).
19. J. G. Salfeld, Isotype selection in antibody engineering. *Nature biotechnology* **25**, 1369-1372 (2007).
20. E. A. Kabat, T. T. Wu, Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *Journal of immunology* **147**, 1709-1719 (1991).

21. M. P. David, J. J. Asprer, J. S. Ibane, G. P. Concepcion, E. A. Padlan, A study of the structural correlates of affinity maturation: antibody affinity as a function of chemical interactions, structural plasticity and stability. *Molecular immunology* **44**, 1342-1351 (2007).
22. E. A. Padlan, Anatomy of the antibody molecule. *Molecular immunology* **31**, 169-217 (1994).
23. W. T. Kabat Elvin A., Perry Harold M., Gottesman Kay S., and Carl Foeller., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. (DIANE Publishing, 1991).
24. F. Wang *et al.*, Reshaping antibody diversity. *Cell* **153**, 1379-1393 (2013).
25. N. Hozumi, S. Tonegawa, Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 3628-3632 (1976).
26. S. Tonegawa, Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-581 (1983).
27. J. Schilling, B. Clevinger, J. M. Davie, L. Hood, Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments. *Nature* **283**, 35-40 (1980).
28. S. Vaughn, in *World ADC*. (San Francisco, USA, 2013).
29. M. F. Flajnik, N. Deschacht, S. Muyldermans, A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? *PLoS biology* **9**, e1001120 (2011).
30. I. Achour *et al.*, Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. *Journal of immunology* **181**, 2001-2009 (2008).
31. T. T. Wu, E. A. Kabat, H. Bilofsky, Some sequence similarities among cloned mouse DNA segments that code for lambda and kappa light chains of immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4617-4621 (1979).
32. K. Rajewsky, I. Forster, A. Cumano, Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* **238**, 1088-1094 (1987).
33. T. Honjo, K. Kinoshita, M. Muramatsu, Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annual review of immunology* **20**, 165-196 (2002).
34. D. Chowdhury, R. Sen, Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements. *Immunological reviews* **200**, 182-196 (2004).
35. G. Kohler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
36. C. A. Borrebaeck, Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunology today* **21**, 379-382 (2000).
37. BioAstrum. (2012).
38. D. M. Ecker, S. D. Jones, H. L. Levine, The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* **7**, 9-14 (2015).
39. S. Jinesh, Pharmaceutical aspects of anti-inflammatory TNF-blocking drugs. *Inflammopharmacology* **23**, 71-77 (2015).
40. N. Nunez-Prado *et al.*, The coming of age of engineered multivalent antibodies. *Drug discovery today* **20**, 588-594 (2015).
41. C. Spiess, Q. Zhai, P. J. Carter, Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Molecular immunology*, (2015).
42. J. M. Reichert, Antibodies to watch in 2014. *mAbs* **6**, 5-14 (2014).
43. A. M. Scott, J. D. Wolchok, L. J. Old, Antibody therapy of cancer. *Nature reviews. Cancer* **12**, 278-287 (2012).
44. J. M. Reichert, Antibodies to watch in 2015. *MAbs* **7**, 1-8 (2015).
45. P. Holliger, P. J. Hudson, Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology* **23**, 1126-1136 (2005).
46. C. Chothia, J. Novotny, R. Brucoleri, M. Karplus, Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *Journal of molecular biology* **186**, 651-663 (1985).
47. G. Winter, C. Milstein, Man-made antibodies. *Nature* **349**, 293-299 (1991).
48. P. J. Hudson, Recombinant antibody fragments. *Current opinion in biotechnology* **9**, 395-402 (1998).
49. J. S. Huston *et al.*, Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5879-5883 (1988).
50. A. Skerra, A. Pluckthun, Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science* **240**, 1038-1041 (1988).

51. V. R. Monnier P, and Tassew N. , In Vivo Applications of Single Chain Fv (Variable Domain) (scFv) Fragments *Antibodies* 193-208 (2013).
52. J. He *et al.*, Targeting prostate cancer cells in vivo using a rapidly internalizing novel human single-chain antibody fragment. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **51**, 427-432 (2010).
53. L. Sanz, A. M. Cuesta, M. Compte, L. Alvarez-Vallina, Antibody engineering: facing new challenges in cancer therapy. *Acta pharmacologica Sinica* **26**, 641-648 (2005).
54. A. Cattaneo, S. Biocca, The selection of intracellular antibodies. *Trends in biotechnology* **17**, 115-121 (1999).
55. A. S. Kang, C. F. Barbas, K. D. Janda, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4363-4366 (1991).
56. Z. Q. Spiess C, and Carter P, Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies *Molecular Immunology* **in press**, in press (2015).
57. T. Behr, W. Becker, E. Hannappel, D. M. Goldenberg, F. Wolf, Targeting of liver metastases of colorectal cancer with IgG, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab' anti-carcinoembryonic antigen antibodies labeled with <sup>99m</sup>Tc: the role of metabolism and kinetics. *Cancer research* **55**, 5777s-5785s (1995).
58. U. Elsasser-Beile, P. Buhler, P. Wolf, Targeted therapies for prostate cancer against the prostate specific membrane antigen. *Current drug targets* **10**, 118-125 (2009).
59. U. Elsasser-Beile *et al.*, PET imaging of prostate cancer xenografts with a highly specific antibody against the prostate-specific membrane antigen. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **50**, 606-611 (2009).
60. C. Hamers-Casterman *et al.*, Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-448 (1993).
61. A. S. Greenberg *et al.*, A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* **374**, 168-173 (1995).
62. S. Zielonka *et al.*, Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *mAbs* **7**, 15-25 (2015).
63. V. A. Streltsov *et al.*, Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12444-12449 (2004).
64. V. K. Nguyen, C. Su, S. Muyldermans, W. van der Loo, Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics* **54**, 39-47 (2002).
65. S. Muyldermans, Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual review of biochemistry* **82**, 775-797 (2013).
66. S. H. Neoh, D. M. Jahoda, D. S. Rowe, A. Voller, Immunoglobulin classes in mammalian species identified by cross-reactivity with antisera to human immunoglobulin. *Immunochemistry* **10**, 805-813 (1973).
67. E. De Genst, D. Saerens, S. Muyldermans, K. Conrath, Antibody repertoire development in camelids. *Developmental and comparative immunology* **30**, 187-198 (2006).
68. S. Tabares-da Rosa *et al.*, Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response. *Analytical chemistry* **83**, 7213-7220 (2011).
69. K. E. Conrath, U. Wernery, S. Muyldermans, V. K. Nguyen, Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Developmental and comparative immunology* **27**, 87-103 (2003).
70. M. F. Criscitiello, M. Saltis, M. F. Flajnik, An evolutionarily mobile antigen receptor variable region gene: doubly rearranging NAR-TcR genes in sharks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5036-5041 (2006).
71. M. F. Flajnik, M. Kasahara, Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature reviews. Genetics* **11**, 47-59 (2010).
72. V. K. Nguyen, R. Hamers, L. Wyns, S. Muyldermans, Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Molecular immunology* **36**, 515-524 (1999).



73. B. P. Woolven, L. G. Frenken, P. van der Logt, P. J. Nicholls, The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics* **50**, 98-101 (1999).
74. V. K. Nguyen *et al.*, Heavy-chain only antibodies derived from dromedary are secreted and displayed by mouse B cells. *Immunology* **109**, 93-101 (2003).
75. L. Hendershot, D. Bole, J. F. Kearney, The role of immunoglobulin heavy chain binding protein in immunoglobulin transport. *Immunology today* **8**, 111-114 (1987).
76. L. Hendershot, D. Bole, G. Kohler, J. F. Kearney, Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *The Journal of cell biology* **104**, 761-767 (1987).
77. M. J. Feige *et al.*, An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Molecular cell* **34**, 569-579 (2009).
78. I. G. Haas, M. Wabl, Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* **306**, 387-389 (1983).
79. S. Muyldermans, Single domain camel antibodies: current status. *Journal of biotechnology* **74**, 277-302 (2001).
80. S. Muyldermans, C. Cambillau, L. Wyns, Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends in biochemical sciences* **26**, 230-235 (2001).
81. S. Muyldermans, T. Atarhouch, J. Saldanha, J. A. Barbosa, R. Hamers, Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein engineering* **7**, 1129-1135 (1994).
82. J. Davies, L. Riechmann, 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains. *FEBS letters* **339**, 285-290 (1994).
83. M. M. Harmsen *et al.*, Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Molecular immunology* **37**, 579-590 (2000).
84. J. Wesolowski *et al.*, Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical microbiology and immunology* **198**, 157-174 (2009).
85. N. Deschacht *et al.*, A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *Journal of immunology* **184**, 5696-5704 (2010).
86. V. K. Nguyen, R. Hamers, L. Wyns, S. Muyldermans, Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *The EMBO journal* **19**, 921-930 (2000).
87. P. A. Barthelemy *et al.*, Comprehensive analysis of the factors contributing to the stability and solubility of autonomous human VH domains. *The Journal of biological chemistry* **283**, 3639-3654 (2008).
88. C. J. Bond, J. C. Marsters, S. S. Sidhu, Contributions of CDR3 to V H H domain stability and the design of monobody scaffolds for naive antibody libraries. *Journal of molecular biology* **332**, 643-655 (2003).
89. H. Dooley, M. F. Flajnik, Antibody repertoire development in cartilaginous fish. *Developmental and comparative immunology* **30**, 43-56 (2006).
90. T. T. Wu, G. Johnson, E. A. Kabat, Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* **16**, 1-7 (1993).
91. P. H. Chan *et al.*, Engineering a camelid antibody fragment that binds to the active site of human lysozyme and inhibits its conversion into amyloid fibrils. *Biochemistry* **47**, 11041-11054 (2008).
92. A. Desmyter *et al.*, Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nature structural biology* **3**, 803-811 (1996).
93. M. Lauwereys *et al.*, Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *The EMBO journal* **17**, 3512-3520 (1998).
94. K. E. Conrath *et al.*, Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 2807-2812 (2001).
95. E. De Genst *et al.*, Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4586-4591 (2006).
96. R. L. Stanfield, H. Dooley, M. F. Flajnik, I. A. Wilson, Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science* **305**, 1770-1773 (2004).

97. R. L. Stanfield, H. Dooley, P. Verdino, M. F. Flajnik, I. A. Wilson, Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *Journal of molecular biology* **367**, 358-372 (2007).
98. A. T. Hadfield *et al.*, Crystal structure of the mutant D52S hen egg white lysozyme with an oligosaccharide product. *Journal of molecular biology* **243**, 856-872 (1994).
99. B. C. Braden *et al.*, Three-dimensional structures of the free and the antigen-complexed Fab from monoclonal anti-lysozyme antibody D44.1. *Journal of molecular biology* **243**, 767-781 (1994).
100. A. Marquardt, S. Muyldermans, M. Przybylski, A synthetic camel anti-lysozyme peptide antibody (peptibody) with flexible loop structure identified by high-resolution affinity mass spectrometry. *Chemistry* **12**, 1915-1923 (2006).
101. Abcore. (2011).
102. T. De Meyer, S. Muyldermans, A. Depicker, Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in biotechnology* **32**, 263-270 (2014).
103. Y. E. Thomassen, A. J. Verkleij, J. Boonstra, C. T. Verrips, Specific production rate of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae* is correlated with growth rate, independent of nutrient limitation. *Journal of biotechnology* **118**, 270-277 (2005).
104. M. M. Harmsen, H. J. De Haard, Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied microbiology and biotechnology* **77**, 13-22 (2007).
105. M. Dumoulin *et al.*, Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein science : a publication of the Protein Society* **11**, 500-515 (2002).
106. R. C. Ladenson, D. L. Crimmins, Y. Landt, J. H. Ladenson, Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment. *Analytical chemistry* **78**, 4501-4508 (2006).
107. R. H. van der Linden *et al.*, Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochimica et biophysica acta* **1431**, 37-46 (1999).
108. S. B. Djender, A.; Schneider, A.; de Marco, A. , The Biotechnological Applications of Recombinant Single-Domain Antibodies are Optimized by the C-Terminal Fusion to the EPEA Sequence (C Tag). . *Antibodies* 182-191 (2014).
109. M. Dumoulin *et al.*, A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature* **424**, 783-788 (2003).
110. A. Abulrob, H. Sprong, P. Van Bergen en Henegouwen, D. Stanimirovic, The blood-brain barrier transigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *Journal of neurochemistry* **95**, 1201-1214 (2005).
111. P. Lafaye, I. Achour, P. England, C. Duyckaerts, F. Rougeon, Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Molecular immunology* **46**, 695-704 (2009).
112. R. Chakravarty, S. Goel, W. Cai, Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging? *Theranostics* **4**, 386-398 (2014).
113. M. D'Huyvetter *et al.*, Radiolabeled nanobodies as theranostic tools in targeted radionuclide therapy of cancer. *Expert opinion on drug delivery* **11**, 1939-1954 (2014).
114. J. Helma, M. C. Cardoso, S. Muyldermans, H. Leonhardt, Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *The Journal of cell biology* **209**, 633-644 (2015).
115. L. Technology. (2015).
116. R. Klooster *et al.*, Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology. *Journal of immunological methods* **324**, 1-12 (2007).
117. E. J. De Genst *et al.*, Structure and properties of a complex of alpha-synuclein and a single-domain camelid antibody. *Journal of molecular biology* **402**, 326-343 (2010).
118. Chromotek. (2015).
119. U. Rothbauer *et al.*, Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature methods* **3**, 887-889 (2006).
120. T. Romer, H. Leonhardt, U. Rothbauer, Engineering antibodies and proteins for molecular in vivo imaging. *Current opinion in biotechnology* **22**, 882-887 (2011).
121. S. Koide, Engineering of recombinant crystallization chaperones. *Current opinion in structural biology* **19**, 449-457 (2009).

122. S. G. Rasmussen *et al.*, Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* **469**, 175-180 (2011).
123. A. Y. Lam, E. Pardon, K. V. Korotkov, W. G. Hol, J. Steyaert, Nanobody-aided structure determination of the EpsI:EpsJ pseudopilin heterodimer from *Vibrio vulnificus*. *Journal of structural biology* **166**, 8-15 (2009).
124. K. V. Korotkov, E. Pardon, J. Steyaert, W. G. Hol, Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure* **17**, 255-265 (2009).
125. K. Domanska *et al.*, Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic beta2-microglobulin variant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 1314-1319 (2011).
126. R. N. Abskharon *et al.*, Probing the N-terminal beta-sheet conversion in the crystal structure of the human prion protein bound to a nanobody. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 937-944 (2014).
127. J. Ries, C. Kaplan, E. Platonova, H. Eghlidi, H. Ewers, A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nature methods* **9**, 582-584 (2012).
128. D. Saerens *et al.*, Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. *Analytical chemistry* **77**, 7547-7555 (2005).
129. H. Li *et al.*, A nanobody-based electrochemiluminescent immunosensor for sensitive detection of human procalcitonin. *The Analyst* **139**, 3718-3721 (2014).
130. J. Yan *et al.*, Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naive Nanobody phage display library. *Journal of nanobiotechnology* **13**, 33 (2015).
131. S. Patris *et al.*, Nanoimmunoassay onto a screen printed electrode for HER2 breast cancer biomarker determination. *Talanta* **130**, 164-170 (2014).
132. N. Deckers *et al.*, Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *International journal for parasitology* **39**, 625-633 (2009).
133. M. Li, M. Zhu, C. Zhang, X. Liu, Y. Wan, Uniform orientation of biotinylated nanobody as an affinity binder for detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac toxin. *Toxins (Basel)* **6**, 3208-3222 (2014).
134. M. Zhu, X. Gong, Y. Hu, W. Ou, Y. Wan, Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. *Journal of translational medicine* **12**, 352 (2014).
135. L. Ma, Y. Sun, X. Kang, Y. Wan, Development of nanobody-based flow injection chemiluminescence immunoassay for sensitive detection of human prealbumin. *Biosensors & bioelectronics* **61**, 165-171 (2014).
136. H. Revets, P. De Baetselier, S. Muyldermans, Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert opinion on biological therapy* **5**, 111-124 (2005).
137. I. Vaneycken *et al.*, Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 2433-2446 (2011).
138. A. Broisat *et al.*, Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circulation research* **110**, 927-937 (2012).
139. M. Van Roy *et al.*, The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* **17**, 135 (2015).
140. C. Stortelers, Ablynx Corp, paper presented at the PEG 2015, Boston, USA, 2015.
141. V. Cortez-Retamozo *et al.*, Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer research* **64**, 2853-2857 (2004).
142. K. Coppieters *et al.*, Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* **54**, 1856-1866 (2006).
143. R. C. Roovers, G. A. van Dongen, P. M. van Bergen en Henegouwen, Nanobodies in therapeutic applications. *Current opinion in molecular therapeutics* **9**, 327-335 (2007).
144. Ablynx. (2015).
145. B. Van de Broek *et al.*, Specific cell targeting with nanobody conjugated branched gold nanoparticles for photothermal therapy. *ACS nano* **5**, 4319-4328 (2011).

146. T. Li *et al.*, Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 3969-3979 (2012).
147. C. D. Emmerson *et al.*, Enhancement of polymeric immunoglobulin receptor transcytosis by biparatopic VHH. *PloS one* **6**, e26299 (2011).
148. A. Hinz *et al.*, Crystal structure of the neutralizing Llama V(HH) D7 and its mode of HIV-1 gp120 interaction. *PloS one* **5**, e10482 (2010).
149. W. W. Koh *et al.*, Generation of a family-specific phage library of llama single chain antibody fragments that neutralize HIV-1. *The Journal of biological chemistry* **285**, 19116-19124 (2010).
150. A. Forsman *et al.*, Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120. *Journal of virology* **82**, 12069-12081 (2008).
151. L. E. McCoy *et al.*, Neutralisation of HIV-1 cell-cell spread by human and llama antibodies. *Retrovirology* **11**, 83 (2014).
152. S. Jahnichen *et al.*, CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 20565-20570 (2010).
153. I. Hmila *et al.*, A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J* **24**, 3479-3489 (2010).
154. G.-T. G. Rossotti M, Guarnaschelli J , Yim L, Camacho X , Fernández M, Cabral P , Leizagoyen C , Chabalgoity JA, and González-Sapienza G., Increasing the potency of neutralizing single-domain antibodies by functionalization with a CD11b/CD18 binding domain. *mAbs*, (2015).
155. I. Hmila *et al.*, VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI'. *Molecular immunology* **45**, 3847-3856 (2008).
156. K. Els Conrath, M. Lauwereys, L. Wyns, S. Muyldermans, Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *The Journal of biological chemistry* **276**, 7346-7350 (2001).
157. P. Chames, D. Baty, Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *mAbs* **1**, 539-547 (2009).
158. J. Zhang *et al.*, Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *Journal of molecular biology* **335**, 49-56 (2004).
159. A. Bell *et al.*, Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. *Cancer letters* **289**, 81-90 (2010).
160. G. Richard *et al.*, In vivo neutralization of alpha-cobratoxin with high-affinity llama single-domain antibodies (VHHs) and a VHH-Fc antibody. *PLoS One* **8**, e69495 (2013).
161. M. M. Harmsen, C. B. Van Solt, H. P. Fijten, M. C. Van Setten, Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine* **23**, 4926-4934 (2005).
162. M. Arbabi Ghahroudi, A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers, S. Muyldermans, Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS letters* **414**, 521-526 (1997).
163. R. van der Linden *et al.*, Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *Journal of immunological methods* **240**, 185-195 (2000).
164. B. D. Barbas III, Scott JK, Silverman GJ *Phage display*. C. S. H. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA Ed., (2001).
165. M. Pellis *et al.*, A bacterial-two-hybrid selection system for one-step isolation of intracellularly functional Nanobodies. *Arch Biochem Biophys* **526**, 114-123 (2012).
166. V. Tereshko *et al.*, Toward chaperone-assisted crystallography: protein engineering enhancement of crystal packing and X-ray phasing capabilities of a camelid single-domain antibody (VHH) scaffold. *Protein Sci* **17**, 1175-1187 (2008).
167. K. Y. Yau *et al.*, Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library. *Journal of immunological methods* **281**, 161-175 (2003).

168. J. Tanha *et al.*, Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. *The Journal of biological chemistry* **276**, 24774-24780 (2001).
169. K. Y. Yau *et al.*, Affinity maturation of a V(H)H by mutational hotspot randomization. *Journal of immunological methods* **297**, 213-224 (2005).
170. G. P. Smith, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317 (1985).
171. S. Becker *et al.*, A generic system for the Escherichia coli cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS letters* **579**, 1177-1182 (2005).
172. S. Fields, O. Song, A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246 (1989).
173. J. Hanes, A. Pluckthun, In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4937-4942 (1997).
174. C. F. Barbas, 3rd, A. S. Kang, R. A. Lerner, S. J. Benkovic, Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 7978-7982 (1991).
175. C. E. Chan, A. P. Lim, P. A. MacAry, B. J. Hanson, The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *International immunology* **26**, 649-657 (2014).
176. C. M. Hammers, J. R. Stanley, Antibody phage display: technique and applications. *The Journal of investigative dermatology* **134**, e17 (2014).
177. A. Gupta *et al.*, A novel helper phage enabling construction of genome-scale ORF-enriched phage display libraries. *PloS one* **8**, e75212 (2013).
178. N. E. Biolab. (2015).
179. J. Vieira, J. Messing, Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in enzymology* **153**, 3-11 (1987).
180. I. Benhar, Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv* **19**, 1-33 (2001).
181. A. Monegal *et al.*, Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library. *Protein Eng Des Sel* **22**, 273-280 (2009).
182. I. A. Lorimer *et al.*, Recombinant immunotoxins specific for a mutant epidermal growth factor receptor: targeting with a single chain antibody variable domain isolated by phage display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14815-14820 (1996).
183. N. P. S. manual. (2011).
184. E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* **37**, 625-636 (1991).
185. V. R. Muzykantov *et al.*, The functional effects of biotinylation of anti-angiotensin-converting enzyme monoclonal antibody in terms of targeting in vivo. *Analytical biochemistry* **226**, 279-287 (1995).
186. A. V. Panyutich, E. A. Baturevich, T. S. Kolesnikova, T. Ganz, The effect of biotinylation on the antigenic specificity of anti-defensin monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods* **158**, 237-242 (1993).
187. K. Even-Desrumeaux, D. Baty, P. Chames, Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation. *Molecular bioSystems* **6**, 2241-2248 (2010).
188. M. D. Lane, K. L. Rominger, D. L. Young, F. Lynen, The Enzymatic Synthesis of Holotranscarboxylase from Apotranscarboxylase and (+)-Biotin. II. Investigation of the Reaction Mechanism. *J Biol Chem* **239**, 2865-2871 (1964).
189. D. Beckett, E. Kovaleva, P. J. Schatz, A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci* **8**, 921-929 (1999).
190. K. L. Tsao, B. DeBarbieri, H. Michel, D. S. Waugh, A versatile plasmid expression vector for the production of biotinylated proteins by site-specific, enzymatic modification in Escherichia coli. *Gene* **169**, 59-64 (1996).
191. M. Rossotti *et al.*, Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochimica et biophysica acta*, (2015).

192. A. Chapman-Smith, D. L. Turner, J. E. Cronan, Jr., T. W. Morris, J. C. Wallace, Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *The Biochemical journal* **302** ( Pt 3), 881-887 (1994).
193. T. R. Harris, B. D. Hammock, Soluble epoxide hydrolase: gene structure, expression and deletion. *Gene* **526**, 61-74 (2013).
194. H. C. Shen, B. D. Hammock, Discovery of inhibitors of soluble epoxide hydrolase: a target with multiple potential therapeutic indications. *J Med Chem* **55**, 1789-1808 (2012).
195. Y. Cui *et al.*, Heavy chain single domain antibodies to detect native human soluble epoxide hydrolase. *Anal Bioanal Chem*, (2015 (in press)).
196. T. M. Jackson, R. P. Ekins, Theoretical limitations on immunoassay sensitivity. Current practice and potential advantages of fluorescent Eu<sup>3+</sup> chelates as non-radioisotopic tracers. *Journal of immunological methods* **87**, 13-20 (1986).
197. H. Jiang *et al.*, Hydrolysis of cis- and trans-epoxyeicosatrienoic acids by rat red blood cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **326**, 330-337 (2008).
198. H. Jiang, G. D. Anderson, J. C. McGiff, Red blood cells (RBCs), epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and adenosine triphosphate (ATP). *Pharmacological reports : PR* **62**, 468-474 (2010).
199. C. Morisseau *et al.*, Effect of soluble epoxide hydrolase polymorphism on substrate and inhibitor selectivity and dimer formation. *Journal of lipid research* **55**, 1131-1138 (2014).
200. K. Inaba, W. J. Swiggard, R. M. Steinman, N. Romani, G. Schuler, Isolation of dendritic cells. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* **Chapter 3**, Unit 3 7 (2001).
201. R. O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687 (2002).
202. D. A. Solovjov, E. Pluskota, E. F. Plow, Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *The Journal of biological chemistry* **280**, 1336-1345 (2005).
203. S. Nunes-Silva *et al.*, Llama immunization with full-length VAR2CSA generates cross-reactive and inhibitory single-domain antibodies against the DBL1X domain. *Scientific reports* **4**, 7373 (2014).
204. E. Pardon *et al.*, A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature protocols* **9**, 674-693 (2014).
205. J. Banchereau, R. M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
206. E. Segura, J. A. Villadangos, Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Current opinion in immunology* **21**, 105-110 (2009).
207. A. Lanzavecchia, Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Current opinion in immunology* **8**, 348-354 (1996).
208. N. Kanazawa, Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *Journal of dermatological science* **45**, 77-86 (2007).
209. I. Zanoni, F. Granucci, Regulation of antigen uptake, migration, and lifespan of dendritic cell by Toll-like receptors. *Journal of molecular medicine* **88**, 873-880 (2010).
210. Z. Bajtay, E. Csomor, N. Sandor, A. Erdei, Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunology letters* **104**, 46-52 (2006).
211. W. Kastenmuller, K. Kastenmuller, C. Kurts, R. A. Seder, Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype? *Nat Rev Immunol* **14**, 705-711 (2014).
212. P. J. Tacken, I. J. de Vries, R. Torensma, C. G. Figdor, Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* **7**, 790-802 (2007).
213. L. Bonifaz *et al.*, Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *J Exp Med* **196**, 1627-1638 (2002).
214. F. V. Castro *et al.*, CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *European journal of immunology* **38**, 2263-2273 (2008).
215. H. Wei *et al.*, Targeted delivery of tumor antigens to activated dendritic cells via CD11c molecules induces potent antitumor immunity in mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 4612-4621 (2009).
216. A. Faham, J. G. Altin, Ag-bearing liposomes engrafted with peptides that interact with CD11c/CD18 induce potent Ag-specific and antitumor immunity. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **129**, 1391-1403 (2011).

217. A. Ejaz *et al.*, Targeting viral antigens to CD11c on dendritic cells induces retrovirus-specific T cell responses. *PloS one* **7**, e45102 (2012).
218. G. Kou *et al.*, Preparation and characterization of recombinant protein ScFv(CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* **52**, 131-138 (2007).
219. J. E. Butler *et al.*, The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *Journal of immunological methods* **150**, 77-90 (1992).
220. J. E. Butler *et al.*, The immunochemistry of sandwich ELISAs--VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescyl capture antibodies (CAbs) are denatured by passive adsorption. *Molecular immunology* **30**, 1165-1175 (1993).
221. J. P. Metlay *et al.*, The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *The Journal of experimental medicine* **171**, 1753-1771 (1990).
222. J. W. Huleatt, L. Lefrancois, Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo. *Journal of immunology* **154**, 5684-5693 (1995).
223. M. Sebastian *et al.*, Treatment of malignant pleural effusion with the trifunctional antibody catumaxomab (Removab) (anti-EpCAM x Anti-CD3): results of a phase 1/2 study. *Journal of immunotherapy* **32**, 195-202 (2009).
224. C. Rozan *et al.*, Single-domain antibody-based and linker-free bispecific antibodies targeting FcγRIII induce potent antitumor activity without recruiting regulatory T cells. *Molecular cancer therapeutics* **12**, 1481-1491 (2013).
225. M. van Lookeren Campagne, C. Wiesmann, E. J. Brown, Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol* **9**, 2095-2102 (2007).
226. E. Alamyar, V. Giudicelli, P. Duroux, M. P. Lefranc, Antibody V and C domain sequence, structure, and interaction analysis with special reference to IMGT(R). *Methods in molecular biology* **1131**, 337-381 (2014).
227. M. M. Peel, Measurement of tetanus antitoxin. II. Toxin neutralization. *J Biol Stand* **8**, 191-207 (1980).
228. J. Mukherjee *et al.*, A novel strategy for development of recombinant antitoxin therapeutics tested in a mouse botulism model. *PloS one* **7**, e29941 (2012).
229. P. Bannas *et al.*, Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection. *Contrast media & molecular imaging*, (2015).
230. P. Wang *et al.*, Bactrian camel nanobody-based immunoassay for specific and sensitive detection of Cry1Fa toxin. *Toxicon* **92**, 186-192 (2014).



# **Agradecimientos**





---

## AGRADECIMIENTOS

---



El agradecimiento y admiración que le tengo a Gualberto Gonzales-Sapienza es infinito, una persona a la que le debo mucho de lo que soy como científico, a su visión en mí, a su exigencia, a su entusiasmo y animo en todo momento, principalmente en aquellos cuando las cosas, a pesar de mi devoción al trabajo, no daban los resultados que queríamos y buscábamos. Un mentor excepcional, una persona accesible y generosa al compartir sus ideas geniales conmigo, muchas de las cuales permitieron que tenga la tesis que tengo y están plasmadas en este trabajo. Alguien que aprecio y valoro mucho porque me enseñó a RAZONAR. Por haberme enseñado todo lo que sé de *phage display*, por la lucha codo a codo en el establecimiento de los nanobodies, camino que quiero continuar el resto de mi carrera. Aprendimos de todos los resultados negativos, las fallas, los obstáculos y los problemas, y los superamos airoosamente. Ésta tesis me formó, a los golpes, manera en la que considero se aprende mucho más, también me enseñó a divertirme y a no perder el entusiasmo en el camino. Otra cosa que le agradezco a Gualberto es el haberme transmitido su visión de la ciencia aplicada, y de pensar a lo grande o en “*high-throughput*” como él dice. Por su generosidad a la hora de escribir cartas de recomendación, y por la libertad que siempre me dio para trabajar y moverme en el laboratorio.

A toda la *Inmunopeople*, todos pero absolutamente todos los integrantes de la cátedra, desde Sandra hasta Gualberto que es el Jefe. Desde mi ingreso allá en el 2007, me sentí muy cómodo, es lindo levantarse, ir a trabajar, y estar feliz de hacerlo, por las condiciones de trabajo y por sobre todo, por el afecto humano. Desde ese momento la cátedra de Inmunología fue mi casa y lo va a seguir siendo por siempre.

A todos los integrantes de la “casita de adelante” por la generosidad para conmigo en todo momento, a Verónica Fernández, Ana Hernández y Sylvia Dematteis. A Gustavo Mourglia y Paula Arbildi que me ayudaron desinteresadamente con experimentos, y me daban una mano en técnicas que yo no manejaba. Gustavo, una persona que admiro por su capacidad de pensar, que me explicó las teorías “conspiratorias” de la inmunología y siempre estuvo ahí cuando necesité una mano con el

citómetro de flujo. A Cecilia Soñora a la cual acudía para obtener sangre. A Claudio Rodríguez por su generosidad y por seguir todas las locuras que se me ocurrían.

También a todos los integrantes de la “casita de adelante”, a los más grandes por sus sugerencias y consejos que me ayudaron a mejorar. A Cecilia Casaravilla que fue quien me enseñó los principios de técnicas de cultivo, y citometría de flujo. A Alvaro Pittini que me dio BMDCs a lo último de la tesis, cuando no quería ver más las dendríticas y necesitaba algunas para hacer pruebas. A Cecilia Fernández, un amor de persona, no tengo más que palabras de agradecimiento, un ser sabio y generoso que me dio una mano siempre que la necesité.

Por último y no menos importante a mi sección, tanto los que no están como los que quedan, con los que pasé tiempo en familia. A Mariana Umpiérrez, Mariana Carlomagno, Noelia Morel, Sofía Tabares, Gabriel Lassabe, Lucia Vanrell.

A los más nuevos, Cecilia, Diego, Lucia A, Lully Port, Noelia, y Triana.

A Andrés González-Techera por su gran ayuda al comienzo de mi estancia en la cátedra, por su enorme generosidad siempre, y por permitirme trabajar con el nanobody T5 que me permitió demostrar la espectacular capacidad del nanobody V36 y conseguir el artículo que tenemos en colaboración.

A Macarena Pérez, mi compañera de andanzas estos 8 años y amiga incondicional. La quiero mucho, porque me aportó y aporta consejos tanto para el trabajo como para mi vida. Ella fue y es un eje que comprende mi cabeza.

A la gente del laboratorio de Alejandro Chabalgoity, que siempre que necesite algo siempre estaban ahí. Natalia Muñoz, María, Analía, Julio, Amy, Thais, Lucia, y José María.

A Geraldine Rimsky, una amiga genial, que siempre estuvo cuando la necesitaba y me ayudó en el pulido de la redacción de la tesis.

A Gerardo Lin que diseñó la caratula delantera e interpreto exactamente lo que quería.

A Sergio y Roberto, amigos que los quiero como familia, y son muy importantes para mí.

No me quiero olvidar del centro de esta tesis....de las llamas!. Gracias al director del Zoológico Parque Lecoq Dr. Eduardo Tavares por su disposición e interés en dejarnos utilizar las llamas con fines de investigación. Especialmente a Carmen Leizagoyen, la veterinaria y directora técnica del Parque, y a todos los muchachos y las pasantes que colaboraron e hicieron posible que, incluso bajo lluvia, las llamas recibieran los antígenos o colectáramos sangre.

Muchas más son las personas a las que les tengo que agradecer, que me ayudaron y enseñaron, al laboratorio de Gabriel Morón de Argentina donde aprendí a generar BMDCs, y pasé un mes espectacular. Al laboratorio del Dr. Bruce Hammock de la Universidad de Davis, California, en el cual hice dos pasantías muy productivas. A Siuzo George Kamita que me entreno el sistema de expresión en baculovirus, al Dr. Kit Lamb con quien utilicé bibliotecas de péptidos sintéticos, a Jerold Last por su apoyo en UC Davis. A Madelón del IPasteur que un día la llame por un problema en la identificación de una proteína, y en 5 minutos me la identificó, genia!. A Federico Carrión por los intentos de medición de afinidades por BIAcore. A Ximena Camacho y Marcelo Fernández del CIN por el trabajo intensivo con el tecnecio en el último mes de la tesis.

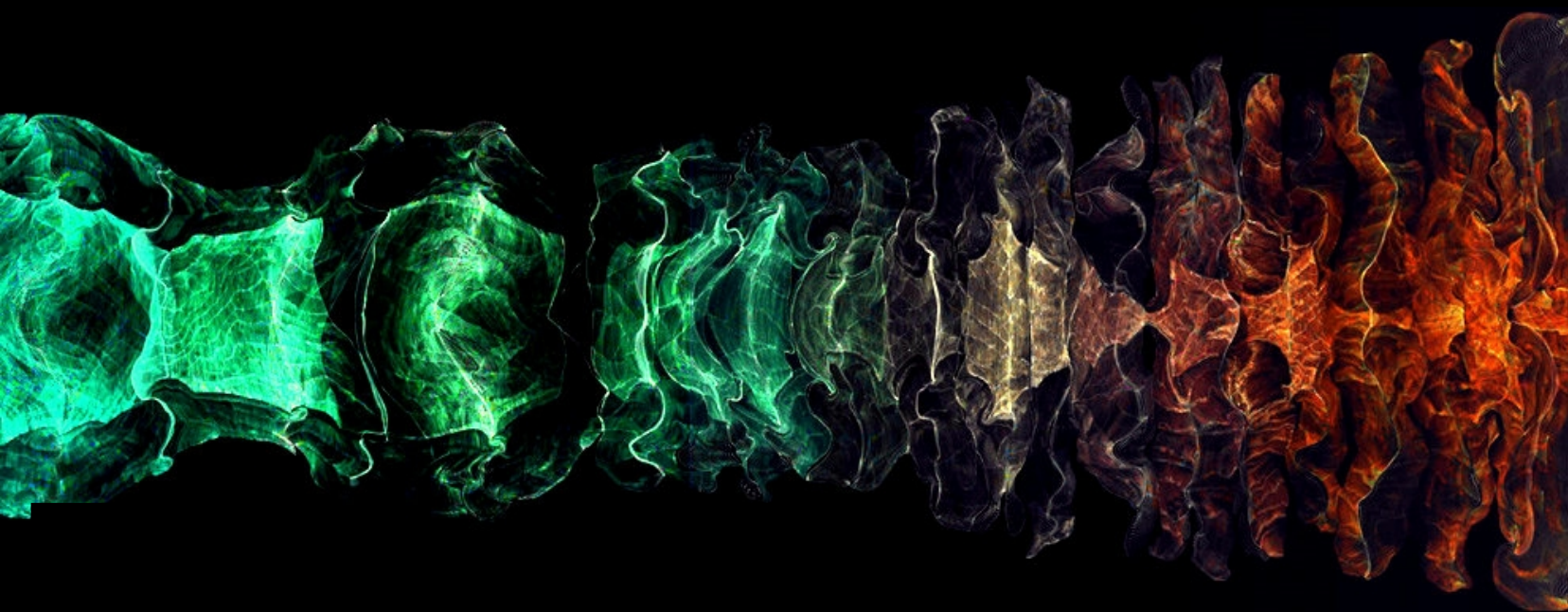
La lista es interminable y es lindo que así sea, porque es mucha la gente a la que le tengo que agradecer, que en algún momento me regalaron su tiempo para sugerirme cosas, ayudarme y de alguna manera también forman parte de este trabajo. A muchos de ellos me hubiese gustado agradecerles con publicaciones y espero en algún momento poder retribuirles de alguna forma.

A las agencias financiadoras por el apoyo económico ANII, CSIC, CAP y Fogarty Center.

Ésta tesis es el cierre de un ciclo, y es la oportunidad de agradecer a los amigos y familia, ya que muchas veces los he dejado de lado por mis ganas de superación e inversión en mi carrera.

Por último, esta tesis se la quiero dedicar a mis padres que son un ejemplo y me enseñaron con sus acciones el valor del esfuerzo para conseguir lo que uno quiere, no solo en el trabajo sino en la vida misma. De ellos aprendí a jamás bajar los brazos frente a los obstáculos que se nos presentan a diario, a aprender de los errores que uno comete para no volver a repetirlos y sacar el mayor provecho de ellos. Inconscientemente me enseñaron a manejar la frustración, una situación muy común en esto de hacer ciencia. A mis hermanos, que a pesar de ser más jóvenes, son un ejemplo muy grande y a quienes siento una admiración profunda. A todos ellos que desde un principio cuando dije de estudiar, creyeron en mí e hicieron posible que estudiara libremente, y gracias a sus acciones pude convertirme en lo que siempre quise ser.

Plataforma para acelerar el descubrimiento  
de nanobodies contra blancos de interés  
biomédico y sus aplicaciones



**Martin Rossotti**

Tesis de Doctorado  
Octubre 2015



Facultad de Química  
Universidad de la República  
Uruguay