



# **GENERACIÓN DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS POR CONJUGACIÓN A NANOBODIES PARA SU DIRECCIONAMIENTO A CÉLULAS DENDRÍTICAS**

**Carolina Padula Roca**

**Tesina de Grado de la Licenciatura en Bioquímica**

**Tutor: Gualberto González-Sapienza**

**Co-tutor: Gabriel Lassabe**

**Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República  
Montevideo, Uruguay**

**Diciembre 2020**

# AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Gualberto, gracias por recibirme con entusiasmo y confianza en el laboratorio, por tu amabilidad, tus enseñanzas y horas de dedicación. A mi co-tutor, Gabriel, gracias por tu buena onda, tus ideas y aportes al proyecto, y por hacerme sentir cómoda en el trabajo del día a día. A ambos, gracias por su buena disposición y atención aún cuando se encontraban ocupados con varias actividades.

Al Dr. Martín Fló, por aceptar corregir mi trabajo.

A todos mis compañeros de la casita del fondo, de quienes aprendí un montón y con quienes he disfrutado de un clima precioso de trabajo. Sin ustedes no sería lo mismo.

Al resto de los integrantes de la Cátedra de Inmunología, por su amabilidad y disposición a darme una mano cuando necesitaba aprender algo nuevo.

A mis padres, quienes son todo para mí y me brindaron las mejores herramientas para poder encarar esta carrera con entusiasmo y responsabilidad, gracias por siempre estar ahí para contenerme y aconsejarme.

A mis hermanas, Lu y Sofi, a quienes adoro y sé que siempre han deseado lo mejor para mí en este trayecto.

Al resto de mi familia, quienes siempre siguieron mis avances con orgullo y cariño.

A Esteban, por siempre confiar en que puedo encarar los desafíos que se me presentan y ayudarme a sentir mejor en los momentos difíciles.

A mis amigos de facultad, un hermoso grupo sin el cual no hubiera disfrutado la carrera de esta manera. Gracias por apoyarme, escucharme, compartir horas de estudio y materias juntos. Les deseo lo mejor.

A mis amigas de siempre, gracias por su apoyo incondicional y por todos los años compartidos.

# RESUMEN

En numerosos antecedentes se ha reportado que la conjugación de antígenos proteicos a anticuerpos contra receptores expresados en células dendríticas (CD) presentan una capacidad incrementada para activar respuestas de anticuerpos y de células T en ratones endocriados. En la mayoría de los casos se han utilizado anticuerpos monoclonales enteros o sus fragmentos derivados Fab o scFv. Los anticuerpos monodominio recombinantes o nanobodies, derivados de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos, presentan un gran potencial para aplicaciones terapéuticas por su facilidad de producción, su pequeño tamaño, su gran estabilidad y baja inmunogenicidad. Sin embargo, los reportes de utilización de nanobodies para direccionar antígenos a CD son aún escasos. El grupo de Inmunoquímica de la Cátedra de Inmunología viene desarrollando hace varios años la tecnología de generación de bibliotecas de nanobodies y su selección por *phage display*, y se han obtenido nanobodies contra los receptores CD11b y CD11c, potenciales blancos para la vacunación con antígenos dirigidos por anticuerpos. En particular CD11c es atractivo porque su expresión está principalmente restringida a las CD y existen antecedentes que lo destacan sobre otros receptores, y, a diferencia de CD11b, no ha sido explorado como blanco para el direccionamiento de antígenos con nanobodies.

En esta tesina se exploraron dos estrategias para la conjugación de nanobodies a ovoalbúmina (OVA) como antígeno modelo. Una estrategia consistió en la conjugación química amino-tiol a través de reactivos heterobifuncionales. Para ello se diseñó un vector para la expresión de nanobodies con un residuo de cisteína en el extremo C-terminal en el periplasma de *E. coli*, para su conjugación a OVA activada en grupos amino por los reactivos SPDP (formación de enlace disulfuro con el nanobody) o BMPS (formación de enlace tioéter). De este modo se consiguieron antígenos quiméricos multivalentes, es decir, con múltiples moléculas de nanobodies por molécula de OVA. Una segunda estrategia consistió en la fusión de las secuencias génicas de los nanobodies a la secuencia génica de OVA para su expresión recombinante en el citoplasma de *E. coli*, incluyendo a la proteína tiorredoxina como chaperona. Todos los productos obtenidos, tanto de conjugación química como de fusión recombinante, demostraron ser reactivos contra sus blancos en ELISA y en citometría de flujo con células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón. En forma paralela a los objetivos planteados, se realizó la selección de nanobodies anti-ovoalbúmina mediante la técnica de *phage display* y se seleccionó uno que fue aplicado como reactivo para la detección de los antígenos quiméricos en los experimentos de citometría de flujo

**Palabras clave:** nanobodies, ovoalbúmina, antígenos quiméricos, células dendríticas

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 La fusión de antígenos a anticuerpos dirigidos contra receptores en células dendríticas aumenta su inmunogenicidad	2
1.2 Las células de dendríticas capturan antígenos del medio extracelular y presentan péptidos en moléculas de MHC	3
1.3 La activación de linfocitos T por parte de las células dendríticas es un evento clave para el inicio de una respuesta antígeno-específica	4
1.4 Heterogeneidad de poblaciones de células dendríticas en ratones	6
1.5 Los receptores endocíticos con dominios de lectina tipo C emergieron como blancos prometedores para aumentar la inmunogenicidad de antígenos quiméricos	8
1.6 La integrina $\alpha$ x/CD11c como blanco para estimular respuestas inmunes potentes con bajas dosis de antígeno y sin adyuvante	11
1.7. Los nanobodies son los fragmentos de anticuerpo más pequeños que se conocen y tienen propiedades excepcionales	15
1.8 La tecnología de phage display es ampliamente utilizada para la selección de nanobodies a partir de bibliotecas inmunes	19
1.9 Es posible producir nanobodies funcionales en el periplasma y en el citoplasma de bacterias	20
1.10. Nanobodies contra receptores de células dendríticas	23
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo general	28
2.2 Objetivos específicos	28
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1 Buffers y soluciones	30
3.2 Medios de cultivo y suplementos	30
<b>3.3 Producción de nanobodies con un residuo de cisteína C-terminal</b>	<b>32</b>
3.3.1 Preparación de un vector para la expresión de nanobodies con cisteína C-terminal	32
3.3.2 Reacción de PCR	33
3.3.3 Electroforesis en gel de agarosa	33
3.3.4 Purificación de productos de PCR	33
3.3.5 Digestión con enzimas de restricción	33
3.3.6 Reacción de ligación	34
3.3.7 Transformación de células electrocompetentes	34

3.3.8 Extracción del ADN plasmídico por miniprep	35
3.3.9 Secuenciación de clones	35
<b>3.4 Expresión a pequeña escala de nanobodies con un residuo de cisteína C-terminal</b>	<b>36</b>
3.4.1 Fundamento del sistema de expresión	36
3.4.2 Pruebas de expresión en BL21	36
3.4.3 Lisis de cultivos y preparación de extractos solubles e insolubles	37
3.4.4 SDS-PAGE	37
<b>3.5 Expresión a gran escala, purificación y caracterización de nanobodies con cisteína C-terminal</b>	<b>37</b>
3.5.1 Expresión a gran escala y lisis de cultivos por shock osmótico	37
3.5.2 Purificación por cromatografía IMAC	38
3.5.3 Estimación de la concentración	38
3.5.4 Control de la reactividad del nanobody control T9-Cys por ELISA	39
<b>3.6 Activación de ovoalbúmina con reactivos heterobifuncionales</b>	<b>40</b>
3.6.1 Activación de OVA con SPDP	40
3.6.2 Titulación de grupos activados	41
3.6.3 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF	41
3.6.4 Activación de OVA con BMPS	42
<b>3.7 Conjugación química de OVA a nanobodies con una cisteína C-terminal</b>	<b>42</b>
3.7.1 Pruebas de reducción de dímeros de nanobodies	42
3.7.2 Optimización de la conjugación Nb-OVA vía SPDP	43
3.7.3 Optimización de la conjugación Nb-OVA vía BMPS	43
3.7.4 Caracterización de productos de conjugación por cromatografía de gel filtración o exclusión molecular (SEC)	44
3.7.5 Conjugación a gran escala de nanobodies con OVA activada por BMPS	45
3.7.6 Doble purificación de productos de conjugación por cromatografía de afinidad y SEC	45
<b>3.8 Expresión recombinante de proteínas quiméricas de nanobodies con ovoalbúmina</b>	<b>46</b>

3.8.1. Vector para expresión citoplasmática de VHHs fusionados a OVA y a tiorredoxina A	46
3.8.2 Clonado de T9 y V36 en vector pET-32a	47
3.8.3 PCR de colonias para la identificación de clones positivos	47
3.8.4 Expresión a pequeña escala de nanobodies fusionados a OVA y Trx	48
3.8.5 Expresión a gran escala de nanobodies fusionados a OVA y Trx	48
3.8.6 Purificación de quimeras recombinantes por IMAC	48
3.8.7 Estimación de la concentración	49
3.8.8 Evaluación de la digestión con enteroquinasa a pequeña escala	49
3.8.9 Digestión a gran escala y purificación de productos de digestión	49
3.8.10 Control de la reactividad por ELISA	50
<b>3.9 Producción de un nanobody anti-OVA como reactivo para citometría de flujo</b>	<b>51</b>
3.9.1 Selección de VHHs anti-OVA por phage display	51
3.9.2 Producción del nanobody OV9 en forma biotinilada	53
<b>3.10 Análisis de la reactividad de los antígenos quiméricos por citometría de flujo con BMDC</b>	<b>54</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Generación de antígenos quiméricos por conjugación direccionada de OVA a nanobodies con un residuo de cisteína C-terminal</b>	<b>57</b>
4.1.1 Clonado de nanobodies con un residuo de cisteína C-terminal	57
4.1.2 Expresión a pequeña escala de nanobodies con cisteína C-terminal	57
4.1.3 Expresión a gran escala y purificación por cromatografía de afinidad	61
4.1.4 El agregado de un residuo de cisteína C-terminal no impacta sobre la funcionalidad del nanobody	62
4.1.5 Control de la reducción de dímeros Nb-SS-Cys	63
4.1.6 Activación de ovoalbúmina con SPDP	65
4.1.7 Caracterización de productos de conjugación Nb-OVA	66
4.1.8 Activación de ovoalbúmina con el reactivo heterobifuncional BMPS y conjugación a Nb-Cys vía enlace tioéter	70
<b>4.2 Producción de antígenos quiméricos recombinantes: nanobodies de fusión a OVA y tiorredoxina</b>	<b>76</b>

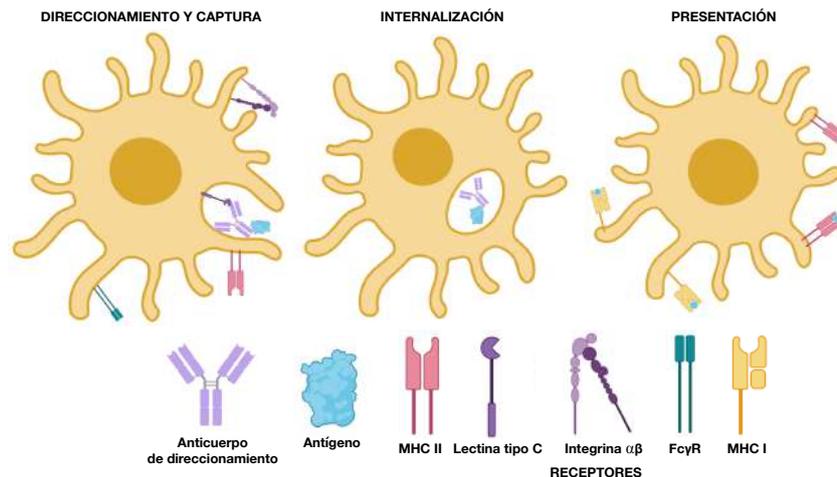
4.2.1 Clonado de T9 y V36 en vector pET-32a	76
4.2.3 Expresión de quimeras recombinantes Trx-VHH-OVA en el citoplasma de E. coli BL21	77
4.2.4 Evaluación de la digestión con enteroquinasa a pequeña escala	79
4.2.5 Digestión a gran escala y purificación de los antígenos recombinantes VHH-OVA	82
4.2.6 Evaluación de la reactividad de las quimeras recombinantes por ELISA	84
<b>4.3 Selección de VHHs anti-OVA por phage display</b>	<b>85</b>
<b>4.4 Análisis de la funcionalidad de los antígenos quiméricos por citometría de flujo con BMDC</b>	<b>87</b>
4.4.1 Las quimeras V36-OVA y MR33-OVA reconocen a sus blancos celulares	88
4.4.2 El nanobody MR33 comparte epítopes con el anticuerpo monoclonal N418	91
4.4.3 Los antígenos quiméricos son estables a la incubación a 37 y 50°C	92
<b>5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>94</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>98</b>

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 La fusión de antígenos a anticuerpos dirigidos contra receptores en células dendríticas aumenta su inmunogenicidad

La entrega direccionada de antígenos a receptores de las células dendríticas (CD) o *targeting*, ha demostrado potenciar la respuesta inmune. En el contexto de la vacunación, la búsqueda de estrategias para inducir una respuesta prolongada de linfocitos T, deseable para afecciones como HIV, tuberculosis, malaria o cáncer, para las cuales aún no se han desarrollado vacunas efectivas, ha posicionado al *targeting* de CD como una opción prometedora y la más ampliamente estudiada [1]. El formato de una vacuna de este tipo consiste en administrar dosis de quimeras proteicas en presencia o ausencia de adyuvante, construidas mediante la fusión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido a un marcador particular presente en la superficie de CD, y el antígeno de interés. El *targeting* de receptores específicos de las CD podría reducir la dosis requerida de vacunación, reducir la proporción de la dosis que termina en células no blanco y, por ende, los potenciales efectos adversos [1].

El fundamento de la estrategia radica en el rol clave que cumplen las CD como conectoras de la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa. Estas células constituyen una población heterogénea que reside en la mayoría de los tejidos periféricos donde capturan antígenos propios así como antígenos no propios que son internalizados, procesados en unidades peptídicas y cargados en moléculas del MHC de clase I y II en el proceso denominado presentación de antígeno [2] (**figura 1.1**). Los propósitos de esta función son la activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> vírgenes para convertirse en células efectoras, y para colaborar en el desencadenamiento de las funciones efectoras de linfocitos T en los sitios de infección [3]. Por lo tanto, la fusión de antígenos de vacunación a anticuerpos contra receptores en las CD optimiza la entrega de los antígenos a estas células para dar comienzo a la activación de una respuesta inmune más eficiente.



**Figura 1.1.** Entrega direccionada de antígenos a las células dendríticas mediante su fusión a anticuerpos. En este ejemplo el anticuerpo está dirigido a un receptor con dominio lectina tipo C, pero también se representan otros receptores que han sido utilizados para estos fines: integrinas  $\alpha\beta$ , receptores Fc $\gamma$ , MHC de clase II. Una vez en el interior de la CD, el antígeno es procesado a unidades peptídicas que son presentadas en moléculas de MHC de clase I o II.

## 1.2 Las células de dendríticas capturan antígenos del medio extracelular y presentan péptidos en moléculas de MHC

Las CD capturan antígenos propios y no propios continuamente del medio extracelular, a través de los procesos de endocitosis, fagocitosis y macropinocitosis [2]. La endocitosis permite la captación de macromoléculas a través de receptores especializados que incluyen receptores de la región Fc de inmunoglobulinas (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII, y Fc $\gamma$ RII en ratón), receptores del complemento (CR3, CR4), receptores Scavenger, y lectinas tipo C (DEC-205, CD-SIGN, langerina) [2]. La fagocitosis es el proceso de captación de antígenos particulados como patógenos enteros y generalmente involucra receptores especializados, mientras que la macropinocitosis es la captación inespecífica de antígenos solubles junto con grandes volúmenes de fluido [2]. Mediante estos procesos las CD realizan un muestreo de los antígenos de su ambiente y los procesan en unidades peptídicas que son cargadas en moléculas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de clase I o MHC de clase II [3]. Como se comentará en la próxima sección, el complejo péptido-MHC es reconocido por linfocitos T antígeno-específicos en lo que constituye el primer paso del desarrollo de una respuesta adaptativa. Existen básicamente tres vías descritas para la presentación de antígeno (**Tabla 1.1**). La vía de presentación determina con qué clase de linfocito T se realizará la comunicación, con el fin de desarrollar una respuesta adecuada al patógeno que desencadenó el evento. Por ejemplo, ante el caso de una infección viral, es deseable

activar respuestas de linfocitos T citotóxicos dirigidos a eliminar a las células infectadas, las cuales presentan en su superficie complejos de MHC de clase I con péptidos derivados del virus.

**Tabla 1.1.** Las tres vías de presentación de antígeno del sistema inmune. Fuente: Murphy, K., Weaver, C. [3].

	<b>Presentación vía MHC de clase II</b>	<b>Presentación convencional vía MHC de clase I</b>	<b>Presentación cruzada vía MHC de clase I</b>
<b>Origen de los péptidos</b>	Espacio extracelular: internalización por endocitosis, macropinocitos o fagocitosis	Citosol	Espacio extracelular
<b>Patógenos asociados</b>	Virus, bacterias y parásitos extracelulares	Virus y bacterias intracelulares	Patógenos intracelulares que no replican en el citosol de CD
<b>Activación de linfocitos T</b>	Colaboradores (CD4 <sup>+</sup> )	Citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> )	Citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> )
<b>Células que realizan el proceso</b>	Presentadoras profesionales: CD, linfocitos B, macrófagos	Todas las células somáticas	Poblaciones específicas de CD

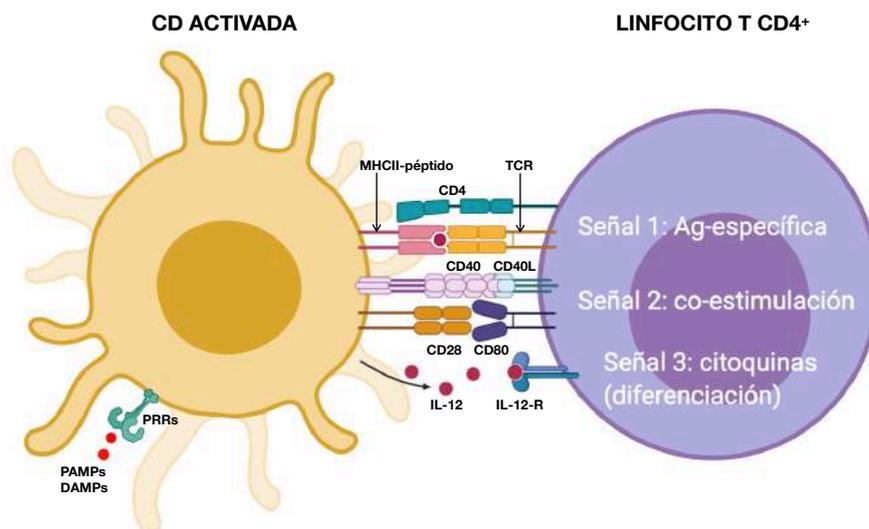
El monitoreo del medio extracelular y la captura y presentación de antígenos por parte de las CD es un proceso constante. Sin embargo, ante una situación de infección o de daño tisular, las CD sensan PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) o DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*), así como citoquinas pro-inflamatorias, desencadenando cascadas de señalización que activan un programa de maduración y activación que modifica el fenotipo de las CD [3]. Uno de los cambios inducidos es la expresión del receptor CCR7, sensible a la quimioquina CCL21 que se produce en el tejido linfoide, promoviendo la migración de las CD hacia los ganglios locales con una capacidad aumentada para presentar péptidos en moléculas de MHC de clase I y II, en conjunto con una alta expresión de moléculas co-estimuladoras —B7.1 (CD80), B7.2 (CD86)— que son esenciales para promover la activación de los linfocitos T [3].

### **1.3 La activación de linfocitos T por parte de las células dendríticas es un evento clave para el inicio de una respuesta antígeno-específica**

Los linfocitos T reconocen a sus antígenos exclusivamente en forma de péptidos anclados a moléculas de MHCI/II en la superficie de una célula presentadora de antígeno, a través de sus TCRs (*T Cell Receptors*) [4]. Estos se generan por recombinación del ADN a nivel somático, proceso que determina el desarrollo de un repertorio ampliamente diverso de clones de linfocitos T en términos de especificidad por el antígeno, con la potencialidad de reconocer prácticamente cualquier péptido en

complejo con MHC [4]. Las células T vírgenes son aquellas que aún no han encontrado a su antígeno en el organismo y no son capaces de ejercer sus funciones efectoras, y la interacción de éstas con células presentadoras de antígeno es el punto de partida para el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa. Las CD son las únicas células presentadoras con la capacidad de activar linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes para convertirlos en células efectoras (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>, T<sub>reg</sub>) [5], evento que ocurre típicamente en ganglios linfáticos y bazo [3].

La interacción de las CD con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes es un evento altamente organizado donde participan distintos actores moleculares. Las uniones entre moléculas de adhesión como ICAM-1 e integrinas estabilizan la unión de la CD con la célula T, potenciando la transducción de señales activadoras [6]. Pueden distinguirse tres grupos de señales necesarias para promover la activación y proliferación de clones específicos [7] (**figura 1.2**).



**Figura 1.2.** Interacción entre una célula dendrítica y un linfocito T CD4<sup>+</sup>, destacando tres grupos de señales necesarias para la activación: la señal antígeno-específica proporcionada por la interacción MHC-péptido con el TCR, la señal de co-estimulación proporcionada por las interacciones CD40-CD40L y CD28-CD80/CD86, y la señal de diferenciación mediada por citoquinas, en este ejemplo interleuquina 12 (IL-12). PRRs: *Pattern Recognition Receptors*, receptores que reconocen PAMPs y DAMPs, desencadenando la activación de la CD.

El grupo 1 consiste en las interacciones TCR-antígeno, y comprende tanto la interacción del propio TCR con el péptido-MHC, como la interacción del co-receptor CD4 con MHCII. El TCR se presenta en forma de un gran complejo multiproteico asociado a otro receptor denominado CD3, que presenta cadenas polipeptídicas con dominios intracelulares ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) [4]. La

fosforilación de estos dominios por parte de tirosin quinasas LCK asociadas al co-receptor (CD4/CD8) inicia una cascada de señalización que incluye distintos grupos de proteínas (tirosin quinasas, proteínas adaptadoras y de andamiaje, GTPasas, etc.) y culmina en la activación de factores de transcripción, cambios en el citoesqueleto, y aumento en la adhesión celular y el metabolismo [8]. Sin embargo, las señales proporcionadas por TCR-CD3 no son suficientes para la activación, por lo que es necesario un segundo grupo de señales promovidas por moléculas co-estimuladoras, las cuales son miembros de la familia CD28 o de la superfamilia TNF [8]. CD28 es el receptor de la célula T que interacciona con B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) en la CD, dando lugar a la fosforilación de CD28 y al inicio de una cascada de señalización que contribuye a amplificar la respuesta inducida por el estimulación del TCR, promoviendo la expresión del ligando de CD40 (CD40L) [8]. Por otro lado, la interacción de la proteína CD40 en la CD con CD40L en el linfocito T, promueve el aumento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras B7.1 y B7.2 [9], actuando como factor de retroalimentación positiva, y proporciona señales activadoras al linfocito T [8]. Sólo las CD que han recibido estímulos para su maduración y activación serán capaces de proveer señales para la co-estimulación, y por ende activar a los linfocitos T vírgenes.

Finalmente, el tercer grupo comprende señales mediadas por citoquinas que determinan la diferenciación de la célula T a un determinado fenotipo efector, para adecuar la respuesta inmune al estímulo original que desencadenó la activación.

#### **1.4 Heterogeneidad de poblaciones de células dendríticas en ratones**

El conocimiento que se ha acumulado en relación a las características de las poblaciones de células dendríticas presenta distintas alternativas para investigación en estrategias de vacunación mediante la entrega direccionada de antígenos quiméricos y la oportunidad de optimizar estas estrategias.

En la **Tabla 1.2** se resumen las características de los grupos de células dendríticas clásicas (cCD) y no clásicas de ratones [10, 11]. Las cCD tienen una capacidad aumentada para muestrear y capturar antígenos y presentarlos a los linfocitos T, gracias a su localización crítica en tejidos no linfoides y en la zona marginal del bazo, a su maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos y a su capacidad de migrar cargadas de antígenos desde los tejidos hacia las zonas T de los ganglios [10]. Estas células expresan constitutivamente los marcadores CD11c, MHCII y CD45, y en particular el marcador Flt3 distingue a esta población de los macrófagos [10]. Las CD

plasmacitoides actúan como centinelas en la defensa temprana contra infecciones virales, y no están involucradas en gran medida en la activación de linfocitos T vírgenes [8]. Expresan TLRs (*Toll-Like Receptors*) que reconocen patrones moleculares virales, receptores intracelulares que sensan ácidos nucleicos (RIG-I-like), y producen grandes cantidades de interferones de tipo I [8].

**Tabla 1.2.** Características de poblaciones clásicas y no clásicas de células dendríticas murinas. Fuentes: Merad *et al.* [10] y Mildner *et al.* [11].

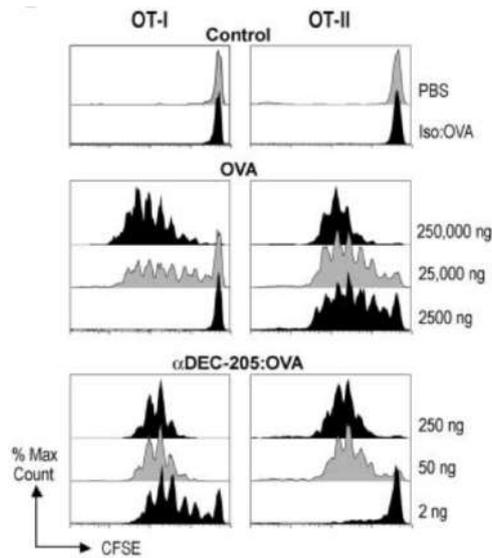
	<b>Localización</b>	<b>Funciones/características</b>
<b>Clásicas</b> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	Residen solo en tejidos linfoides	Presentación cruzada de antígenos a células T CD8 <sup>+</sup> Presentación de antígenos glicolipídicos en CD1d
<b>Clásicas</b> CD103 <sup>+</sup>	Tejidos no linfoides, abundantes en tejidos conjuntivos	Población equivalente a las CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>
<b>Clásicas</b> CD11b <sup>+</sup>	Tejidos no linfoides Las más abundantes en tejidos linfoides (excepto timo)	Gran heterogeneidad No realizan presentación cruzada Buenas inductoras de respuesta T CD4 <sup>+</sup>
<b>No clásicas</b> Plasmacitoides	Tejidos linfoides, circulantes	Elevada capacidad secretora Producción de IFN tipo I ante infecciones virales Expresan bajos niveles de MHCII y de CD11c
<b>No clásicas</b> Derivadas de monocitos o inflamatorias CD11b <sup>+</sup>	Tejidos no linfoides	Se diferencian a partir de infiltrados monocíticos debido a inflamación o infección Expresan el receptor de Fc gamma 1 (Fc $\gamma$ RI)
<b>No clásicas</b> Células de Langerhans	Restringidas a la epidermis de la piel	Más relacionadas a macrófagos residentes CD11b <sup>+</sup> , F4/80 <sup>+</sup> Alta expresión de CD207 (langerina)

Si se pretende potenciar una respuesta T de tipo citotóxica, es importante considerar que existe un grupo de CD especializadas en presentar antígenos exógenos en moléculas de MHC de clase I a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (presentación cruzada) [12], que se diferencia del proceso convencional por el cual los antígenos exógenos son cargados en moléculas de MHC de clase II y presentados a linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En ratones, esta tarea es realizada de forma más eficiente por CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> [12]. En humanos, el ortólogo de este subgrupo de CD carece del receptor CD8 $\alpha$ , pero expresa una lectina de tipo C denominada Clec9A, el receptor de quimioquinas XCR1, y BCDA3 [13, 14]. Por lo tanto, como no todos los grupos de CD expresan los mismos receptores, es pertinente conocer las características del grupo hacia el cual se dirige el antígeno.

Los primeros estudios de *targeting* de CD reportados en ratones se dirigieron a los receptores Fc $\gamma$ , CD40 y MHC de clase II, resultando en una mejora de la inmunidad tanto celular como humoral [15-17]. Posteriormente se investigaron nuevos blancos.

## 1.5 Los receptores endocíticos con dominios de lectina tipo C emergieron como blancos prometedores para aumentar la inmunogenicidad de antígenos quiméricos

En particular, la lectina de tipo C llamada DEC-205 (CD205 o LY75) se convirtió en el blanco más estudiado en modelos murinos, humanos, y primates no humanos [1]. Se trata de una proteína integral de membrana que reconoce carbohidratos en una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y funciona como receptor endocítico [18]. En las CD circulantes, incluyendo CD plasmacitoides, células de Langerhans y CD cultivadas *in vitro* a partir de precursores monocíticos, la expresión de DEC-205 es baja; sin embargo, los niveles de expresión aumentan significativamente tras su activación [18]. Ya en 1995, Jiang y colegas demostraron que al incubar CD derivadas de médula ósea de ratones BALB/c con anticuerpos IgG de conejo dirigidos contra DEC-205 y exponerlas a un hibridoma de linfocitos T, la presentación de antígeno era 100 veces más eficiente que en presencia de anticuerpos IgG no reactivos [19]. Más tarde, se demostró el potencial de la vacunación de ratones con un anticuerpo monoclonal monovalente anti-DEC-205 conjugado a ovoalbúmina (OVA) a través del reactivo heterobifuncional SMCC [20]. Ratones C57BL/6 fueron inyectados por vía intravenosa con células OT-I u OT-II marcadas con CFSE y posteriormente se inyectaron por vía subcutánea diferentes dosis del conjugado anti-DEC-205:OVA u OVA soluble [20]. La proliferación de las células T en los ganglios linfáticos se evaluó por citometría de flujo. Las células OT-I y OT-II derivan de modelos de ratones C57BL/6 transgénicos y son linfocitos T  $\text{CD8}^+$  y  $\text{CD4}^+$ , respectivamente, cuyos TCRs reconocen péptidos inmunodominantes de la OVA, SIINFEKL (257-264) y LSQAVHAAHAEINEAGR (323-339), en complejo con el MHC de clase I o II. En la **figura 1.3** extraída del artículo correspondiente, se muestran los datos de la citometría de flujo. La disminución en la señal de CFSE respecto al control indica proliferación de la población inicial de linfocitos T. Para los ratones inmunizados con anti-DEC-205:OVA, con una cantidad tan baja como 2 ng de OVA se observó proliferación de células OT-I pero no con 2500 ng de OVA soluble, una dosis 1000 veces mayor. A partir de los 50 ng también se detectó proliferación de células OT-II. La dependencia de este efecto con DEC-205 se demostró utilizando ratones *knockout* para el receptor, observando que no se reproducían los resultados anteriores.



**Figura 1.3.** Evaluación de la respuesta OT-I y OT-II en ratones inmunizados con anti-DEC-205-OVA, OVA, o control, con distintas dosis de OVA. Figura adaptada de Bonifaz *et al.* [20].

Para activar los linfocitos T endógenos específicos por el antígeno, que naturalmente se encuentran en baja frecuencia, se potenció la inmunización con una dosis de 25  $\mu$ g del anticuerpo monoclonal anti-CD40 como estímulo para la activación de las CD en el ganglio linfático. La proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y secreción de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por parte de éstos ante la reestimulación *in vitro* fue notoriamente superior en las células derivadas de ratones inmunizados con anti-DEC-205:OVA más anti-CD40 en comparación con una dosis mayor de OVA soluble más anti-CD40. Interesantemente, observaron que tras la inyección intradérmica del anticuerpo contra DEC-205 conjugado a OVA, éste alcanzó sus blancos rápidamente, en tan sólo 30 minutos se localizó en el ganglio drenante y en el bazo. Además, los ratones inmunizados con anti-DEC-205:OVA más anti-CD40 desarrollaron inmunidad protectora contra tumores de melanoma y virus vaccinia-OVA recombinante.

La potente inmunidad mediada por células T CD8<sup>+</sup> que se logró con la estrategia descrita anteriormente está de acuerdo con el hecho de que el receptor DEC-205 se encuentre preferentemente expresado en CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> del bazo, facilitando la presentación cruzada en MHC de clase I [21].

En otro trabajo se comparó la capacidad de conjugados recombinantes del péptido gag-p24 de HIV como antígeno con anticuerpos IgG con especificidades por distintos receptores con dominios externos de lectina tipo C, incluyendo DEC-205, langerina

(CD207) y Clec9A, todos expresados en CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> [22]. Se encontró que los tres receptores tienen un potencial similar para inducir respuestas T<sub>H</sub>1 y CD8<sup>+</sup> en ratones BALB/c x C57BL/6, cuando se inyectaron en conjunto con el adyuvante poli I:C (Ácido poliinosínico:policitidílico) y el anticuerpo anti-CD40. Sin embargo, al aplicar la misma estrategia con un anticuerpo anti-CD137, un receptor restringido a CD CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, no se logró la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> por presentación cruzada y la respuesta CD4<sup>+</sup> secretora de IFN- $\gamma$  fue más débil.

El conocimiento de que la expresión de DEC-205 no está restringida a CD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> sino que también se extiende a otras poblaciones de dendríticas, incluyendo células de Langerhans, y también a células epiteliales de timo, macrófagos, células B y T y granulocitos, motivó la búsqueda de blancos más selectivos [23]. La lectina Clec9A, o también conocida como DNGR-1 (*NK lectin group receptor-1*) se expresa selectivamente en cCD CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, y a menores niveles en pCD, pero no en otros tipos celulares [23, 24]. Este receptor reconoce patrones en células muertas, y promueve su captación y la presentación cruzada de péptidos derivados de éstas [25]. Sancho y colegas caracterizaron este receptor y su potencial en el contexto de la entrega dirigida de antígenos a CD [23]. Generaron conjugados de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-Clec9A al péptido SIINFEKL derivado de OVA o a antígenos de melanoma a los cuales se les agregó un residuo de cisteína y de biotina en el extremo C-terminal. La conjugación se realizó por medio del reactivo sulfo-SMCC que se une a grupos amino en el mAb y a los tioles de cisteína en los péptidos. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con los conjugados anti-Clec9A:SIINFEKL o con una IgG control unida al mismo péptido y se extrajeron los esplenocitos para evaluar su capacidad de realizar presentación cruzada a linfocitos OT-I marcados con CFSE. Solamente las células CD11c<sup>+</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, provenientes de ratones inmunizados con el conjugado al anticuerpo anti-Clec9A, estimularon la proliferación de los linfocitos y la producción de IFN- $\gamma$  por parte de éstos. Con el modelo de OVA, también se demostró que al administrar el conjugado se logró una potente activación de la respuesta T citotóxica, dependiente de la co-administración de un anticuerpo anti-CD40 como adyuvante. Finalmente, inmunizando ratones con una única dosis de las quimeras de anticuerpo anti-Clec9A y péptidos derivados de antígenos de diferenciación de melanocitos más adyuvantes (anti-CD40 y poli I:C), se logró erradicar casi completamente tumores preestablecidos de melanoma B16 que alcanzaron metástasis en pulmones, y la estrategia también fue efectiva en un formato profiláctico.

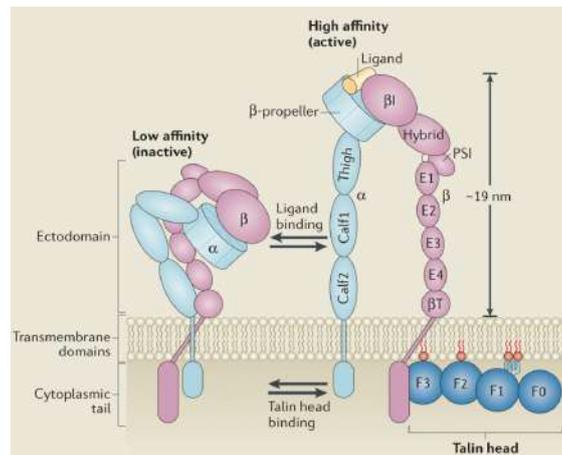
Una consideración importante a tener en cuenta al planear una estrategia de entrega dirigida de antígenos es si el receptor blanco tiene la capacidad de modular la función de las CD, y si los anticuerpos utilizados contra el receptor pueden desatar esta capacidad. De no ser así, es necesario administrar adyuvantes que activen a las CD, de lo contrario se induciría tolerancia al antígeno contra el cual se quiere generar inmunidad [1, 23]. Para el caso de Clec9A, se identificó un dominio intracelular similar al dominio hemITAM de la dectina-1, que tiene capacidad de acoplarse a la tirosin quinasa Syk promoviendo la activación de las CD cuando el receptor dectina-1 es estimulado por sus agonistas  $\beta$ -glucanos [26]. Sin embargo, en los experimentos realizados por Sancho y colaboradores ninguno de los anticuerpos contra Clec9A promovió la activación de CD *in vitro* o *in vivo*, sugiriendo que éstos no provocan la señalización a través del receptor y remarcando la necesidad del uso de adyuvantes [23]. En un trabajo realizado posteriormente por el mismo grupo de investigación, se evaluó la respuesta T CD4<sup>+</sup> inducida mediante el *targeting* con anticuerpos contra Clec9A y se observó que la misma puede polarizarse a respuestas tipo T<sub>H1</sub>, T<sub>H17</sub>, o T regulatoria si se aplica el adyuvante poli I:C, curdlano ( $\beta$ -glucano) o sin adyuvante, respectivamente [27]. Sin embargo, Caminschi y colaboradores demostraron que la inmunización de antígenos fusionados a un mAb anti-Clec9A produjo una gran potenciación de la respuesta de anticuerpos y de la inmunidad mediada por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, en ausencia de adyuvantes [24]. Puesto que tampoco lograron demostrar activación de CD *in vitro* por estimulación con los mAb, proponen que el efecto podría deberse a una captación y presentación de antígeno tan eficientes que aún a niveles basales de expresión de MHCII, CD40, CD80 y CD86 la CD lograría activar potentes respuestas inmunes.

## **1.6 La integrina $\alpha_x$ /CD11c como blanco para estimular respuestas inmunes potentes con bajas dosis de antígeno y sin adyuvante**

La molécula CD11c pertenece a la familia de las integrinas y junto con la integrina  $\beta_2$  (CD18) forma el receptor CR4 (*Complement Receptor 4*) [12]. Esta familia comprende 24 proteínas transmembrana de tipo I heterodiméricas, donde cada una está formada por la asociación no covalente de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  [6]. CD11c es la subunidad  $\alpha_x$  de CR4 y la integrina  $\beta_2$  (CD18) es compartida con otros miembros:  $\alpha_L$ -CD11a,  $\alpha_M$ -CD11b,  $\alpha_D$ -CD11d [6]. Los cuatro receptores heterodiméricos que presentan la integrina  $\beta_2$  se encuentran exclusivamente en leucocitos y median el reclutamiento de células a órganos linfoides y tejidos inflamados, facilitando su adhesión a las células endoteliales y su extravasación [6]. Además, participan de las interacciones celulares durante la formación de la sinapsis inmunológica, y activan cascadas de señalización

intracelular que influyen en el rearrreglo del citoesqueleto, la activación, proliferación y las respuestas a TLRs [6]. Los resultados pueden ser pro- o anti- inflamatorios [6].

El modelo de activación de las integrinas está representado en la **figura 1.4**, y consiste en dos vías de señalización. La señalización *inside-out* —de adentro hacia afuera— modifica la afinidad y avidéz del receptor para permitir que se una a sus ligandos extracelulares, y define cómo la célula interactúa con su ambiente [6]. Estímulos recibidos del exterior a través de receptores de quimioquinas, receptores T o B, podrían inducir la señalización *inside-out* [28]. La señalización *outside-in* —de afuera hacia adentro— responde a la ocupación del receptor, en su estado de alta afinidad por el ligando, desencadenando cascadas de señalización intracelular [6]. El cambio conformacional de las integrinas está controlado por las proteínas adaptadoras Talina 1 y 2 [29].



**Figura 1.4.** Modelo de activación de integrinas  $\alpha\beta$ . Dos estados conformacionales, uno de baja afinidad (inactivo) y uno de alta afinidad (activo). Figura extraída de Calderwood *et al.* [29].

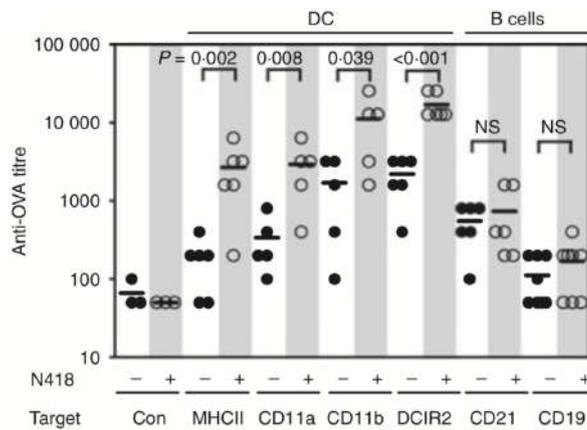
La secuencia de CD11c es muy similar a la de CD11b y tienen varios ligandos en común, incluyendo iC3b, ICAM-1 y fibrinógeno [6]. CD11b se encuentra abundantemente expresado en macrófagos, en monocitos, y en algunas poblaciones de CD [6]. CD11c es ampliamente empleado como marcador de CD murinas —se expresa tanto en CD clásicas como no clásicas— y su alto nivel de expresión la convierte en un buen blanco para la entrega direccionada de antígenos [12]. Más aún, se ha encontrado que las CD inmaduras, estado en el que su capacidad de capturar antígenos es más eficiente, presentan este alto nivel de expresión de CD11c [30]. Los macrófagos de los pulmones, del bazo, células NK y células T activadas también expresan este receptor [10].

Las funciones de CD11c en las CD aún se encuentran escasamente descritas. Se ha demostrado *in vitro* su capacidad para mediar la fagocitosis a través de la unión del fragmento del sistema del complemento iC3b, y más recientemente se describió la importancia de este receptor para mediar la captura de células deficientes en CD47 — señal “don’t eat me” en células de mamífero— y la consecuente activación de las CD *in vivo* [31]. Si bien la relación directa entre la estimulación de CD11c y la activación de las CD no está establecida, varios antecedentes indican que este receptor es muy efectivo para potenciar la respuesta inmune a antígenos proteicos dirigidos por anticuerpos, en algunos casos sobresaliendo entre otros blancos (**Tabla 1.3**). Los resultados destacados en cada uno de los trabajos [32-39] siempre se describen en relación a controles realizados con antígeno soluble o con antígeno conjugado a anticuerpos irrelevantes. Como se puede apreciar observando la **Tabla 1.3**, las estrategias han sido diversas en cuanto al tipo de anticuerpo o fragmento de anticuerpo utilizado (IgG, Fab, scFv), la forma de conjugación al antígeno o el formato de la vacuna (proteica, DNA, vehiculización con liposomas/nanopartículas), y los adyuvantes elegidos para inmunización.

**Tabla 1.3.** Trabajos que han explorado la conjugación de antígenos proteicos a anticuerpos dirigidos a la integrina CD11c como estrategia para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos.

Antígeno	Anticuerpo anti-CD11c	Conjugación/ Formato vacuna	Adyuvantes	Cepa/Modelo murino	Resultados destacados	Ref.
IgG anti-hámster	Hámster IgG N418	Unión no covalente (antígeno-anticuerpo)	S/A	CBA y BALB/c	Fuerte respuesta de anticuerpos tras 7 días de inmunización con 500 ng de ambos mAbs, sin adyuvante Predominó respuesta de IgG1	Wang <i>et al.</i> [32]
OVA y antígenos de melanoma B16	scFv recombinante (N418)	Liposomas cargados con OVA y cubiertos con scFv	LPS o IFN- $\gamma$	C57BL/6	Inducción de una potente inmunidad anti-tumoral en ratones desafiados con células tumorales de melanoma B16-OVA	van Broekhoven <i>et al.</i> [33]
OVA	Fab (N418)	Crosslinking con SMCC, 3 Fab / OVA	mAb anti-CD40	C57BL/6 y C57BL/6 OT-I/ OT-II TCR-Tg	La presentación de antígeno a células OT-I y OT-II y la acumulación de linfocitos T CD4+ y CD8+ endógenos <i>in vivo</i> , es superior con targeting a CD11c versus otros targets (CD11b, MHCII, DEC-205, CD40, TLR2, Fc $\gamma$ RII/III) Rápida acumulación del conjugado en la zona marginal y zona T del bazo	Castro <i>et al.</i> [34]
HER2	scFv (N418)	Quimera recombinante con dominio de dimerización	CpG	BALB/c	El scFv promueve la internalización del antígeno por células dendríticas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> Vacunación efectiva en la prevención y tratamiento de tumores inducidos por líneas celulares que expresan HER2	Wei <i>et al.</i> [35]
OVA	Fab (N418)	Crosslinking con SMCC, 3 Fab / OVA	S/A	BALB/c y C57BL/6	Respuesta de anticuerpos superior con 100 ng de OVA conjugada a Fab anti-CD11c vs. 10 $\mu$ g de OVA más ACF en el día 28 post-inmunización El efecto obtenido no depende de la vía de administración del conjugado ( <i>i.v.</i> , <i>i.p.</i> , <i>s.c.</i> , <i>i.d.</i> ) Efecto adyuvante del anticuerpo anti-CD11c: al inmunizar ratones con conjugados de OVA a anticuerpos contra otros receptores en CDs, la respuesta de anticuerpos mejora de 6 a 20 veces cuando se coadministra con N418	White <i>et al.</i> [36]
IDRgag de Friend Virus	scFv	Quimera recombinante	LPS	C57BL/6 Tg con TCR específicos para FV	La activación de células T CD8+ se mejoró significativamente, tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> , traduciéndose en efectivas respuestas contra tumores derivados de FV y contra infección contra este virus.	Ejaz <i>et al.</i> [37]
OVA	mAb	Nanopartículas de PLGA cargadas con OVA y recubiertas con anticuerpos	Poli I:C R848	C57BL/6	La capacidad de desatar respuestas citotóxicas mediadas por linfocitos T CD8+ fue similar con anticuerpos anti -CD11c, -DEC-205 y -CD40.	Cruz <i>et al.</i> [38]
HER2/neu	scFv (N418)	Vacuna a DNA plasmídico	S/A	BALB/c BALB/c-neuT	La inmunización intramuscular de 50 $\mu$ g de plásmido en PBS seguida de electroporación <i>in vivo</i> confirió protección contra el desarrollo de tumores de mama D2F2/E2, y en combinación con bajas dosis de ciclofosfamida —para depletar células Treg— se logró la completa erradicación de tumores preestablecidos.	Wang <i>et al.</i> [39]

El direccionamiento de antígenos a CD11c da lugar tanto al desarrollo de respuestas T CD8+ y CD4+ como a la potenciación de la respuesta de anticuerpos. Para este último objetivo, Wang y colaboradores [32] y White y colaboradores [36] demostraron la potencialidad de esta estrategia para obtener elevados títulos de IgG en poco tiempo, tras la inmunización con dosis únicas y bajas (nanogramos de antígeno), sin adyuvantes. Además, White y colaboradores realizaron una observación muy interesante: cuando el anticuerpo anti-CD11c (N418) se co-administra con Fab contra otros receptores de CD conjugados a OVA, el título de anticuerpos contra el antígeno se incrementa significativamente (**figura 1.5**). Este efecto no se presenta cuando los blancos del antígeno quimérico están en linfocitos B (CD21, CD19). Otros anticuerpos anti-CD11c distintos al clon N418 (HL3, 223H7) demostraron un efecto adyuvante similar.



**Figura 1.5.** Título de IgG anti-OVA medido en sueros de ratones 7 días después de su inmunización con anticuerpos contra los targets indicados conjugados a OVA, con o sin co-administración de N418. CD21 y CD19 son expresados por linfocitos B pero no por CD. Figura adaptada de White *et al.* [36].

Esta observación sugiere que la unión de un anticuerpo anti-CD11c a CD11c podría desencadenar cascadas de señalización para promover la activación de CD. Sin embargo, los autores no pudieron demostrar la expresión de marcadores de activación clásicos (CD80, CD86, I-CAM1, CD40), *in vitro* o *in vivo*, aunque no se excluye la posibilidad de que se promueva la expresión de otros receptores que puedan ser importantes en la activación de la respuesta B [36].

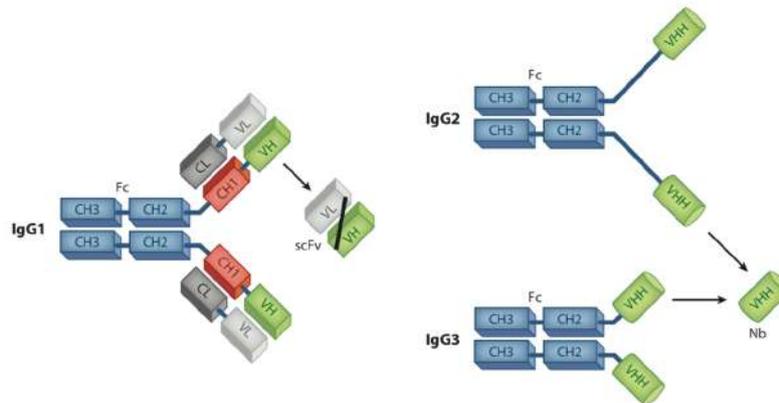
En todos los trabajos que se basan en el direccionamiento de antígenos al receptor CD11c de CD, a la fecha, se han usado anticuerpos convencionales o sus derivados, la mayoría empleando el clon N418. Una alternativa con gran potencial por su facilidad de producción y manipulación es el uso de anticuerpos monodominio derivados de anticuerpos no convencionales de camélidos o nanobodies (Nb). A continuación se describen algunas de las características más relevantes de estas proteínas.

### 1.7. Los nanobodies son los fragmentos de anticuerpo más pequeños que se conocen y tienen propiedades excepcionales

En 1993, el grupo de investigación de Hamers-Casterman en Bruselas, Bélgica, publicaba por primera vez el hallazgo de un tipo particular de anticuerpos que carecían de cadena liviana. Analizando suero de camello, los autores describieron la presencia de IgGs de aproximadamente 100 kDa —además de los anticuerpos convencionales de 150 kDa— que tras el tratamiento con un agente reductor daban lugar únicamente a dos cadenas pesada [40]. Desde entonces, estos anticuerpos se han identificado solamente en camellos (50-80% del total de anticuerpos circulantes) y en camélidos de Sudamérica

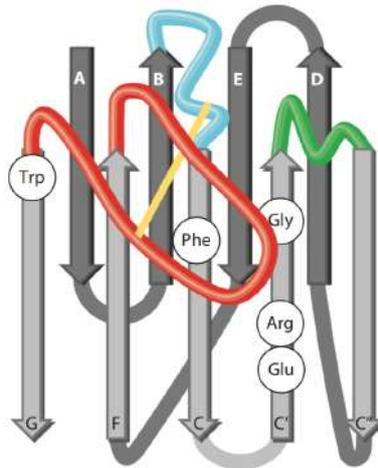
(11-25%) [41], así como en tiburones y otros peces cartilagosos, y reciben el nombre de anticuerpos de cadena pesada o HcAbs (heavy-chain-only antibodies).

Los HcAbs de camélidos presentan una región Fc típica de IgG con isotipos IgG2 e IgG3, pero carecen del dominio constante CH1 y tienen un dominio variable característico denominado VHH (**figura 1.6**) [42]. El mismo se genera por rearrreglos génicos aleatorios de los elementos V (*variable*), D (*diversity*) y J (*joining*) en la línea germinal, involucrando un set particular de genes V presente en el genoma de camélidos [43].



**Figura 1.6.** Representación esquemática de la estructura de un anticuerpo convencional IgG1, con sus cadenas pesada y liviana. El mínimo fragmento con actividad de unión a un antígeno es el scFv, conformado por el dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio variable de la cadena liviana (VL). A la derecha, se representan los isotipos IgG2 e IgG3 de los anticuerpos de cadena pesada HcAbs. La región bisagra de IgG2 es de mayor longitud que la de IgG3. En verde se representa el dominio VHH. Figura adaptada de Muyldermans, S. [44].

El dominio VHH aislado es un fragmento de 15 kDa que conserva enteramente su potencial de unión al antígeno y su afinidad, por lo que se considera el anticuerpo más pequeño encontrado naturalmente [44]. Su pequeño tamaño en el rango de unos pocos nanómetros inspiró el nombre de “nanobodies”, otorgado por la compañía biofarmacéutica Ablynx [45]. En este dominio, tres regiones hipervariables o CDRs (*Complementarity Determining Regions*) se organizan en tres bucles separados por cuatro FRs (*framework regions*) agrupados en el extremo N-terminal, conformando el sitio de unión del antígeno o paratope (**figura 1.7**) [46]. La estructura secundaria es característica del dominio de inmunoglobulinas presente en todos los anticuerpos, con dos hojas beta antiparalelas, y un enlace disulfuro conservado entre las cadenas beta B y F cuya importancia en el plegamiento y en la estabilidad intrínseca de estos dominios está bien establecida [47].



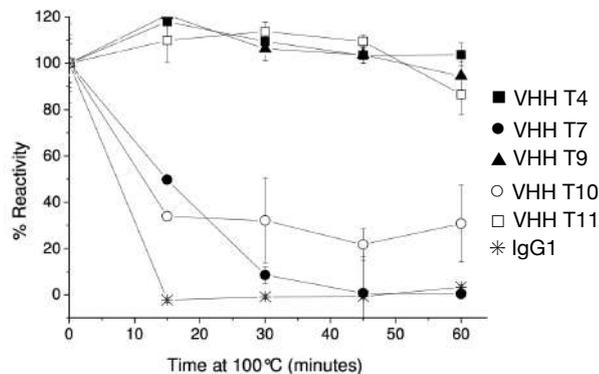
**Figura 1.7.** Representación del plegamiento del dominio VHH de camello. Dos hojas beta anti-paralelas, una con 4 y otra con 5 cadenas beta. En celeste, verde y rojo, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. En amarillo, el enlace disulfuro no canónico entre CDR1 y CDR3. Figura adaptada de Muyldermans, S. [44].

Si bien los tres CDRs contribuyen al reconocimiento del antígeno, y en algunos casos también residuos de FRs, el principal es el CDR3 [45]. En los VHHs el CDR3 se caracteriza por su mayor longitud en comparación al CDR3 de VHs de anticuerpos convencionales (10-13 aminoácidos), compensando la falta de superficie de unión al antígeno debido a la ausencia del dominio variable de la cadena liviana (VL) [48]. En VHHs de llamas y camélidos en general, el CDR3 tiene 14.9 aminoácidos en promedio, y en VHHs de camellos el promedio es similar pero la distribución de tamaños tiende a números mayores [48]. La mayor longitud de la mayoría de los CDR3 encontrados en VHHs sugiere flexibilidad estructural en la forma libre de antígeno, que se fijaría en una única conformación al unirse al mismo, creando una barrera entrópica para la unión. La eventual presencia de un enlace disulfuro extra entre CDR1 y CDR3 reduce esta barrera entrópica al mismo tiempo que incrementa la estabilidad conformacional de los nanobodies [47]. Este enlace disulfuro es más frecuente en VHHs de camellos, donde se ha descrito que aproximadamente un 65% de éstos presentan residuos de cisteína no-canónicos en CDR1 y CDR3 [49].

Dos propiedades destacables del dominio VHH son su elevada solubilidad y su capacidad de plegarse correctamente en forma aislada del anticuerpo. Éstas son producto, en gran medida, de la sustitución de cuatro residuos conservados en FR2, involucrados en la interacción de la cadena pesada (VH) con la cadena liviana (VL) en los anticuerpos convencionales, y del CDR3 largo y flexible que enmascara residuos hidrofóbicos claves para esa interacción [42]. En los VHHs, los residuos hidrofóbicos

Val42, Gly49, Leu50 y Trp52 de los VHs de anticuerpos convencionales, usualmente se sustituyen por residuos más pequeños y/o polares como Phe/Tyr42, Glu/Gln49, Arg50 y Phe/Gly/Leu52 que se encuentran expuestos al solvente [50]. Estos aminoácidos están codificados en genes V de la línea germinal, y no son el resultado de hipermutación somática [51].

Otra propiedad sobresaliente de estos anticuerpos monodominio es su estabilidad fisicoquímica. Los nanobodies pueden conservarse durante meses a 4°C, o durante más tiempo a -20°C, manteniendo completamente su capacidad de unión al antígeno [44]. También se ha visto que toleran incubaciones a 37°C durante varias semanas, reteniendo entre un 80-100% de la actividad de unión, superando ampliamente a los scFv [52]. Y aún más sorprendente, parecen resistir condiciones químicas y térmicas desnaturalizantes. Tabares da Rosa y colaboradores seleccionaron nanobodies contra el hapteno triclocarbán (TCC) y caracterizaron su termoestabilidad en estrictas condiciones [53]. Todos los VHHs ensayados demostraron ser más estables que los anticuerpos convencionales. Tras una incubación de 1 hora a 100°C, los VHHs T4, T9 y T11 conservaron el 100% de su reactividad evaluada por ELISA (**figura 1.8**). Se propone que la base de este comportamiento en los nanobodies es la reversibilidad del proceso de desnaturalización térmica [54], característica que los diferencia de sus pares convencionales (VHs) y que ha prosperado como concepto.



**Figura 1.8.** Porcentaje de reactividad o actividad de unión al antígeno remanente en función del tiempo de incubación a 100 °C. Figura adaptada de Tabares da Rosa *et al.* [53].

Pero tras varios estudios que arrojaron datos de agregación irreversible de nanobodies, Kunz y colaboradores se propusieron aclarar esta visión [55]. Analizando 68 nanobodies por fluorimetría diferencial de barrido (DFS) y por medidas de turbidez, revelaron que tras incubación a altas temperaturas ocurre, en cierto grado, desnaturalización irreversible de la mayoría de los nanobodies, principalmente por agregación. Los

resultados sugieren que los nanobodies que revierten el proceso de desnaturalización térmica serían la excepción, y no la regla. A pesar de esto, los autores aclaran que la termorresistencia de los nanobodies no deja de ser destacable en comparación a los anticuerpos convencionales.

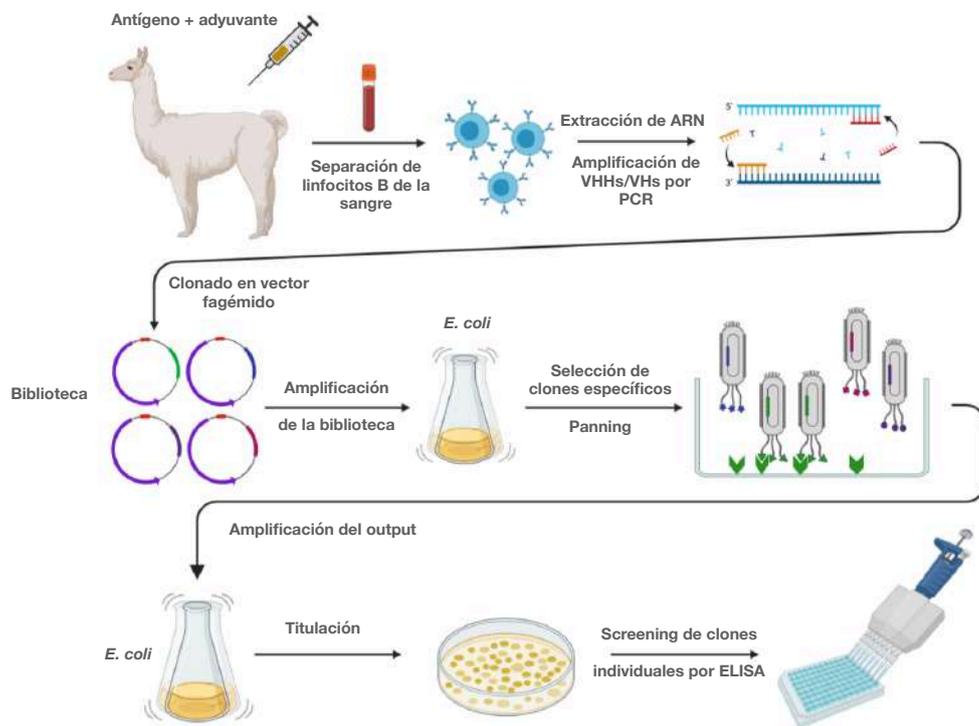
## **1.8 La tecnología de *phage display* es ampliamente utilizada para la selección de nanobodies a partir de bibliotecas inmunes**

Los VHHs o nanobodies se obtienen tras la inmunización de un camélido con el antígeno de interés, seguida de la extracción del ARN total de linfocitos B de la sangre, amplificación y clonado del repertorio de genes V (construcción de una biblioteca) y su selección mediante la técnica de *phage display* [44] (presentación en fagos).

La técnica de *phage display* data de 1985, desarrollada por George Smith como método para presentar proteínas/péptidos en la superficie de bacteriófagos filamentosos del género Inovirus [56]. La misma se basa en el hecho de que el fenotipo y el genotipo del fago están físicamente ligados: el gen de la proteína que va a ser presentada está empaquetado en el DNA del mismo virión que la expresa fusionada a una proteína de su cápside. Los bacteriófagos fl, fd y M13 son comúnmente usados con este propósito [57]. Todos infectan bacterias gram-negativas como *E. coli* y presentan un genoma circular de ADN de simple hebra que codifica para un total de 11 genes, dentro de los cuales se destacan las proteínas de la cápside. La proteína mayor de la cápside, pVIII, recubre la superficie del fago con alrededor de 3000 copias, mientras que la proteína menor de la cápside, pIII, se localiza en unas pocas copias (3-5) en un extremo del virión [57] y es esencial para iniciar la infección mediante su interacción con el pilus F de la bacteria [58]. El gen de las proteínas/péptidos a ser presentados se fusionan preferentemente al gen que codifica para pIII, generalmente entre la secuencia señal y el primer dominio (N1) de pIII [58].

Los vectores de ADN para generar la biblioteca de VHHs (o cualquier otro fragmento de anticuerpo) y obtener fagos con proteína pIII quimérica, pueden ser de tipo fagémido: contienen únicamente los genes necesarios para la expresión del VHH-pIII y por lo tanto requieren de un fago *helper* (colaborador) para empaquetar los viriones [59]. Tras la infección, la progenie de fagos resultante presenta los diferentes nanobodies codificados por los genes de la biblioteca y será sometida a un proceso de selección contra el antígeno de interés denominado *panning*. Ése consiste en varios ciclos de incubación, lavado y amplificación de los fagos unidos. El antígeno blanco

puede estar inmovilizado en un soporte sólido, en esferas magnéticas e incluso en células enteras [57]. Finalmente, un conjunto de clones seleccionado al azar se somete a un proceso de *screening* (cribado) en el cual los nanobodies expresados por bacterias, en forma libre y no en la superficie de fagos, se evalúa contra el antígeno mediante ensayos como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). El ADN de los VHHs positivos se aísla, se secuencian y se clona en vectores para la expresión recombinante de las proteínas fusionadas a secuencias que permiten su purificación por afinidad. Los pasos para obtención de nanobodies por *phage display* se resumen en la **figura 1.9**.



**Figura 1.9.** Obtención de nanobodies específicos mediante *phage display*. A partir de una muestra de sangre de una llama inmunizada con el antígeno de interés se aíslan los linfocitos B y se amplifican las secuencias de los genes V para construir una biblioteca en un vector fagémido. La biblioteca amplificada (por co-infección de bacterias con un fago helper) se somete a un proceso de panning para la selección de clones específicos contra el antígeno que generalmente involucra varias rondas. El output (conjunto de clones eluidos del panning) se amplifica y se titula en placa. A partir de las colonias aisladas se crecen cultivos individuales y los sobrenadantes se evalúan por ELISA.

## 1.9 Es posible producir nanobodies funcionales en el periplasma y en el citoplasma de bacterias

Una característica noble del trabajo con nanobodies es su facilidad de expresión recombinante en sistemas simples como procariontes (por excelencia *Escherichia coli*), si bien no se limita a estos microorganismos y también se han expresado en levaduras

(*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*), células de insecto, plantas y células de mamífero [60].

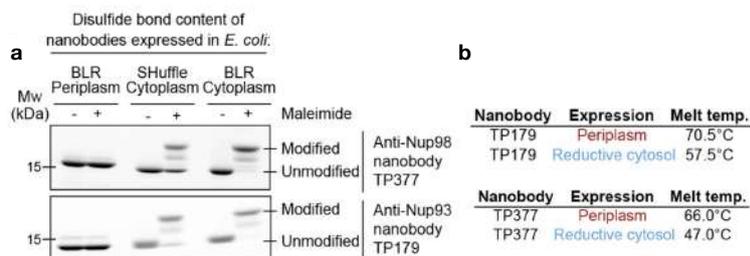
Para la expresión en bacterias se prefiere clonar los VHHs a continuación de una secuencia señal para su exportación al periplasma, debido a que las condiciones oxidantes de este compartimiento hacen posible la formación de enlaces disulfuro [44]. Sin embargo, esta estrategia a menudo resulta en rendimientos más bajos que en el citoplasma, pero en este compartimiento la limitante es la formación de los enlaces disulfuro [60]. La oxidación de tioles de cisteína en el citoplasma está fuertemente desfavorecida por razones termodinámicas y cinéticas [61]. En primer lugar, el potencial redox del citoplasma es demasiado bajo para proveer suficiente fuerza para la formación de disulfuros estables [61]. En segundo lugar, bajo condiciones fisiológicas, no hay enzimas que catalicen la oxidación de tioles. En el citoplasma de *E. coli* hay dos tiorredoxinas y tres glutarredoxinas, que en su forma oxidada pueden catalizar la formación de enlaces disulfuro, pero estas enzimas son mantenidas en un estado reducido debido a la acción de tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa [61]. A pesar de lo anterior, en varias ocasiones se ha reportado la obtención de nanobodies expresados en el citoplasma con funcionalidad intacta, empleando diferentes estrategias [62-65].

Olichon y Surrey generaron una biblioteca de fluobodies —nanobodies fusionados a la proteína verde fluorescente GFP— contra los microtúbulos del citoesqueleto eucariota fusionados a la enzima periplasmática disulfuro isomerasa DsbC, y lograron expresar satisfactoriamente en el citoplasma de *E. coli* varios clones positivos [62]. Uno de estos clones fue seleccionado para su caracterización y se demostró que tanto el nanobody como el fluoróforo de la GFP eran funcionales, y por difracción celular se reveló que la estructura secundaria del dominio VHH presentaba el plegamiento de hoja beta típico de los VHHs y que éste coincidía con el espectro del mismo VHH expresado en el periplasma.

Por otro lado, Zarschler y colaboradores expresaron VHHs en el citoplasma de la cepa de *E. coli* SHuffle® T7 Express, que expresa constitutivamente la enzima DsbC y además tiene deletados los genes para las enzimas tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*), asegurando el plegamiento correcto de proteínas con enlaces disulfuro [63]. En combinación con el uso de medios de cultivo que promueven una alta densidad celular, Terrific Broth y EnPresso, y condiciones tipo fed-batch obtuvieron rendimientos de hasta 200 mg de proteína soluble por litro. Mediante un protocolo de

desnaturalización y cuantificación de tioles con el reactivo de Ellman (DTNB) encuentran que el 97% de las moléculas de VHH expresadas en Shuffle se encuentran en su estado oxidado. Además, mediante ensayos de unión *in vitro* contra el target celular del VHH se demostró una alta afinidad y especificidad.

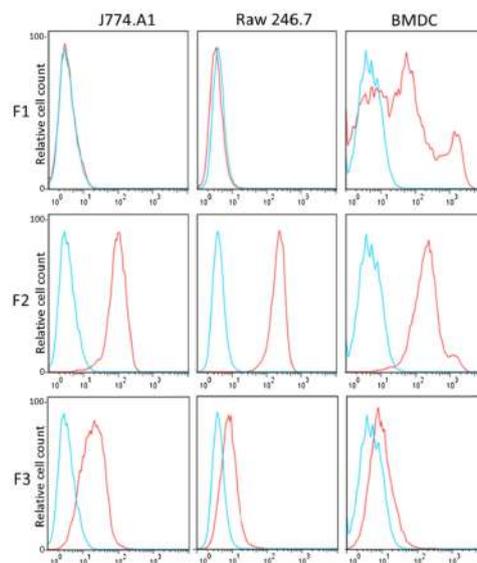
Un dato más interesante acerca del comportamiento de los nanobodies según su estado redox es proporcionado por el trabajo de Pleiner y colaboradores [65]. Los autores caracterizaron dos nanobodies contra un mismo antígeno que fueron expresados en el periplasma de *E. coli* BLR, en el citosol reductor de *E. coli* BLR o en el citosol oxidativo de *E. coli* SHuffle. Mediante el tratamiento de los nanobodies con el reactivo biotina-PEG<sub>23</sub>-maleimida en condiciones desnaturalizantes y posterior SDS-PAGE, evaluaron la fracción de moléculas con enlace disulfuro formado en los distintos compartimientos (**figura 1.10a**). Los nanobodies que presentan tioles reducidos se conjugan al reactivo a través del grupo maleimida, dando lugar a un producto de mayor peso molecular que se observa en gran proporción cuando la proteína se produce en el citoplasma reductor de BLR. Por el contrario, las cisteínas oxidadas no pueden reaccionar, por lo que es coherente observar una banda mayoritaria de 15 kDa para los nanobodies producidos en el periplasma. De los nanobodies expresados en el citoplasma de SHuffle se observan ambas bandas, sugiriendo que no todas las moléculas presentan sus cisteínas en forma de disulfuro. Un resultado predecible es el impacto en la termoestabilidad de los nanobodies: aquellos que fueron expresados en el citosol reductor y carecen, en su mayoría, del enlace disulfuro, registran una menor *T<sub>m</sub>* (*melting temperature*) que la de los nanobodies expresados en el periplasma, medida por fluorimetría diferencial de barrido (**figura 1.10b**). Finalmente, mediante un ensayo de competencia por el antígeno se demostró que la afinidad no se ve afectada por el estado redox del nanobody.



**Figura 1.10.** En **a**, se evalúa la fracción de los nanobodies TP377 y TP179 con enlace disulfuro de acuerdo a su expresión en tres distintos compartimientos. En **b**, se reportan las temperaturas de melting de los nanobodies TP377 y TP179 producidos en periplasma o en el citosol reductor de BLR. Figura adaptada de Pleiner *et al.* [65].

## 1.10. Nanobodies contra receptores de células dendríticas

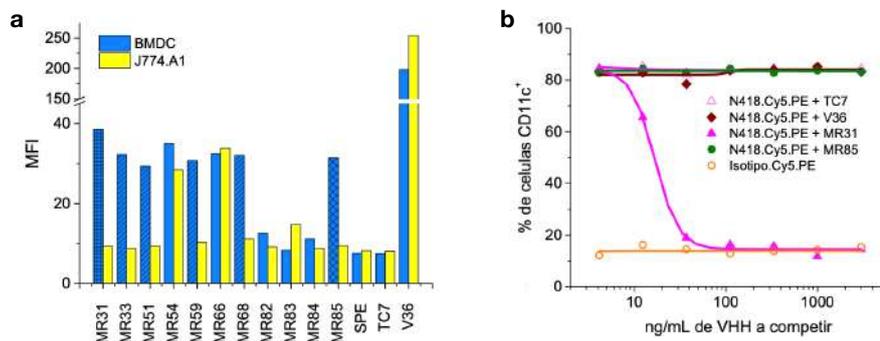
En el grupo de trabajo que integro en la cátedra de Inmunología se han seleccionado y caracterizado nanobodies dirigidos contra receptores de membrana de células inmunes. Se generó una biblioteca de *phage display* de VHs y VHHs a partir de una llama inmunizada con una población de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de ratones Balb/c que expresaban CD11b y CD11c [66]. Los genes de VHs y VHHs se amplificaron a partir del genoma de los leucocitos de sangre periférica de la llama y se clonaron en el vector fagémido pComb3X, obteniendo una biblioteca del orden de  $2 \times 10^9$  transformantes. Para la selección se realizó el panning con células. En primera instancia se hizo una selección negativa, preadsorbiendo la biblioteca en la línea celular de fibroblastos de ratón L-929, a modo de eliminar clones con especificidad por receptores ubicuos. La fracción no unida se seleccionó positivamente contra BMDC de ratón en tres rondas de panning. En un primer screening de clones individuales en formato ELISA con un lisado de membrana de BMDC como antígeno se obtuvo más de un 95% de clones positivos, los cuales se clonaron en un vector para expresión y biotilación en *E. coli*. Mediante citometría de flujo se identificaron tres familias de nanobodies (**figura 1.11**): nanobodies que reaccionan principalmente con BMDC (F1), y nanobodies que reaccionan con BMDC y con líneas celulares de macrófagos de ratón (J774.A1 y Raw 246.7) con valores medios altos (F2) o bajos (F3).



**Figura 1.11.** Análisis por citometría de flujo de nanobodies representativos de las familias F1, F2 y F3, en BMDC y en dos líneas celulares de macrófagos de ratón. En rojo, histogramas obtenidos por señal del conjugado estreptavidina-ficoeritrina. En azul, histograma correspondiente a un nanobody usado como control negativo. Figura adaptada de Rossotti *et al.* [66].

Por espectrometría de masas se determinó que seis nanobodies de la familia F2 reconocían al antígeno CR3 (CD11b/CD18). Uno de ellos, al nanobody V36, es uno de los utilizados en esta tesina por su potencial para el *targeting* de células dendríticas CD11b<sup>+</sup>.

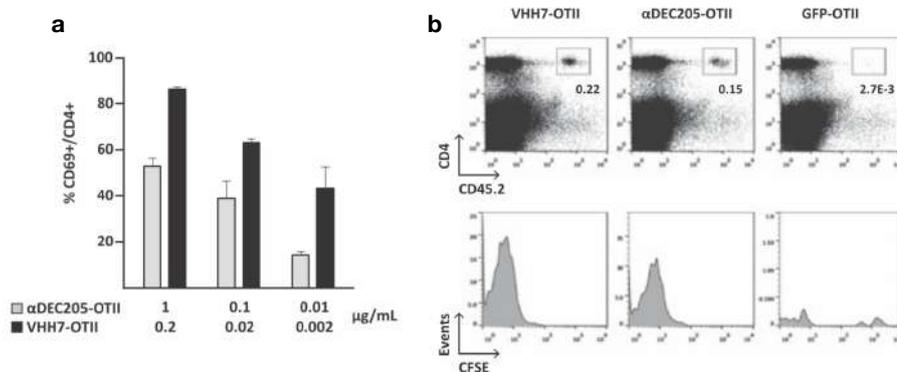
El nanobody anti-CD11c utilizado en esta tesina es producto de los trabajos del Dr. Rossotti en su tesis de doctorado [67]. Sin embargo, como en los experimentos descritos anteriormente se observó que la selección sobre BMDC resultó muy polarizada a receptores altamente expresados, se optó por una estrategia para lograr una selección dirigida, en la cual se realizó el panning con el antígeno CR4 (CD11c/CD18) recombinante en pocillos de ELISA. Mediante captura del antígeno con un nanobody anti-CD18 adsorbido al pocillo de ELISA por la interacción estreptavidina-biotina e incubación con la misma biblioteca de la cual se obtuvo el nanobody V36, se logró seleccionar clones positivos para CR4. Como se muestra en la **figura 1.12a**, seis clones reaccionaron exclusivamente con BMDC (MR31, MR33, MR51, MR59, MR68, MR85), entre los cuales se hallan tres secuencias diferentes (MR33 = MR51 = MR59 = MR68). Los nanobodies MR33 y MR31 demostraron ser superiores a MR85 en su capacidad de marcar células dendríticas en citometría de flujo, y en particular el nanobody MR31 demostró ser comparable al anticuerpo monoclonal comercial N418 — que se ha utilizado en varios de los trabajos citados como antecedentes de *targeting* de células dendríticas— y por un ensayo de competencia se reveló que ambos reconocen al mismo epítipo sobre CD11c (**figura 1.12b**). Además, se demostró que la señal de marcado de BMDC con V36 es de unas 5 veces superior al marcado con MR33/MR31, en concordancia con la mayor expresión de CD11b.



**Figura 1.12. a)** Análisis por citometría de flujo de clones seleccionados en el panning con CR4, SPE (estreptavidina-ficoeritrina) TC7 (control negativo anti-triclocarbán), V36 (anti-CD11b), sobre la línea celular de macrófagos J774.A1 y sobre BMDC. La detección de los nanobodies biotinilados se hizo con estreptavidina-ficoeritrina. **b)** Ensayo de competencia sobre BMDC de los nanobodies anti-CD11c MR31 y MR85 y controles (V36 y TC7) contra el anticuerpo monoclonal anti-CD11c N418. Figura adaptada de Rossotti, M [67].

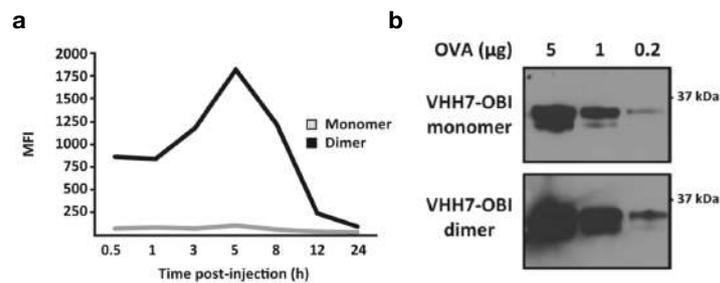
## 1.11 Los nanobodies se han empleado exitosamente contra distintos blancos para la entrega direccionada de antígenos a células dendríticas

Duarte y colaboradores generaron nanobodies contra receptores abundantemente expresados en células presentadoras de antígeno [68]. Los vectores de ADN se diseñaron para que los VHHs expresen en su C-terminal la secuencia LPETG que es reconocida por la enzima sortasa A de *S. aureus* para la transferencia de antígenos proteicos, a modo de lograr una conjugación sitio-específica. La incubación de conjugados de VHH a los péptidos inmunodominantes de OVA, OT-I y OT-II, con CD del bazo seguida de incubación con células T OT-I y OT-II marcadas con CFSE, permitió evaluar la capacidad de estimular la proliferación de los linfocitos por dilución de la señal de CFSE en citometría de flujo. El conjugado de un nanobody anti-MHCII (VHH7) con OTII fue el más potente para inducir la proliferación de linfocitos OT-II *in vitro*, y superando la capacidad del conjugado anti-DEC205-OTII también *in vivo* (figura 1.13). Para la activación de linfocitos T *in vivo* fue imprescindible la administración de adyuvantes (anti-CD40 y poli I:C) en la inmunización.



**Figura 1.13.** a) Cuantificación de células OT-II activadas (CD69+) tras la incubación con CDs previamente expuestas a diferentes concentraciones de VHH7-OTII o anti-DEC205-OTII. b) Ratones C57BL/6 recibieron células OT-II marcadas con CFSE por vía i.v. y más tarde se inmunizaron por vía i.p., o no, con cantidades equimolares de VHH7-OTII, anti-DEC205-OTII, o GFP-OTII con 25 µg de anti-CD40 y 50 µg de poli I:C. La expansión de células T CD4+ se midió por citometría de flujo por dilución de CFSE. Figura adaptada de Duarte *et al.* [68].

Al evaluar la respuesta mediada por células B, hallaron que la dimerización del nanobody VHH7 conjugado a antígeno incrementa el título de anticuerpos contra OVA al doble, promovida por una mayor avidéz y mayor vida media (figura 1.14).



**Figura 1.14.** a) Cuantificación de fluorescencia en esplenocitos en función del tiempo post-inyección i.v. de VHH7 dímero o monómero conjugado a Alexa Fluor 467. b) Inmunoblot con antígeno OVA y sueros provenientes de ratones inmunizados con VHH7 dímero o monómero conjugado al péptido OBI-17mer de OVA, más adyuvantes. Figura adaptada de Duarte *et al.* [68].

En trabajos posteriores del mismo grupo se empleó el targeting con VHH7 (anti-MHCII) para desatar respuestas inmunes robustas contra una glicofoma de la proteína mucina 1 (MUC1), sobreexpresada en varios tipos de cáncer [69], y más recientemente se utilizó el nanobody DC13 (anti-CD11b) conjugado a un pequeño péptido de la oncoproteína E7 de HPV para inducir respuestas inmunes específicas contra tumores HPV+ [70].

En suma, considerando que hay una gran cantidad de antecedentes que destacan al receptor CD11c como blanco para el direccionamiento de antígenos a CD, así como resultados recientes que utilizan nanobodies anti-CD11b para el mismo objetivo, y que ovoalbúmina es un antígeno modelo ampliamente utilizado para explorar estrategias de direccionamiento, para esta tesina se propuso poner a punto la producción de antígenos quiméricos de ovoalbúmina fusionada a nanobodies anti-CD11c y anti-CD11b murinos.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo general

Optimizar estrategias para la conjugación química y recombinante de nanobodies contra los receptores CD11c y CD11b de células dendríticas murinas, al antígeno modelo ovoalbúmina para su uso en inmunización

## 2.2 Objetivos específicos

- ▶ Clonar nanobodies anti-CD11b, anti-CD11c y T9 (control negativo anti-triclocarbán) con un residuo de cisteína C-terminal en un vector para expresión periplasmática en la cepa BL21 de *E. coli*
- ▶ Optimizar la expresión y purificación por afinidad de los nanobodies con cisteína C-terminal
- ▶ Generar formas activadas de ovoalbúmina con reactivos heterobifuncionales para su conjugación a tioles de cisteína en los nanobodies
- ▶ Optimizar la reacción de conjugación nanobody-OVA, caracterizar los productos obtenidos por SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF, y doble purificarlos por afinidad y exclusión molecular
- ▶ Clonar los nanobodies anti-CD11b, anti-CD11c y T9 en vectores para expresión citoplasmática en la cepa BL21 de *E. coli*, en forma fusionada a OVA y a la chaperona tiorredoxina
- ▶ Poner a punto la expresión de las quimeras recombinantes y su purificación por afinidad
- ▶ Optimizar las reacciones de digestión con la enzima enteroquinasa para la remoción de la proteína tiorredoxina de las quimeras purificadas
- ▶ Evaluar la funcionalidad de las quimeras mediante ensayos ELISA y citometría de flujo

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 Buffers y soluciones

- Buffer fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, en agua destilada, pH 7.5.
- Buffer Tris salino (TBS): Tris 50 mM, NaCl 150 mM, en agua MilliQ, pH 7.5.
- Sustrato para la enzima peroxidasa (PO) – revelado de ELISA: buffer acetato 0.1 M, TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina) 0.096 mg/mL en DMSO (dimetilsulfóxido), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.04%, pH = 5.5.
- Buffer Tris-acetato (TAE) 1X: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, en agua MiliQ, pH 8.0.
- Buffer de carga 6X para SDS-PAGE: Tris-HCl 0.35 M, SDS 10%, glicerol 30%, 2-mercaptoetanol 5%, azul bromofenol 0.024%, pH 6.8.
- Buffer de corrida 10X para SDS-PAGE: Tris base 10 mM, glicina 1.44%, SDS 0.1%, en agua destilada.
- Solución colorante para la tinción con azul de Coomassie: ácido acético glacial 10%, etanol 20%, Coomassie 0.1%, en agua destilada.
- Solución decolorante para la tinción con azul de Coomassie: ácido acético glacial 10%, etanol 20%, en agua destilada.
- Buffer Tris-EDTA-Sacarosa (TES): Tris-HCl 0.2 M, pH 8.0, EDTA 0.5 mM, sacarosa 0.5 M.
- Buffer de unión para cromatografía IMAC o buffer A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, en agua MilliQ, pH=8.
- Buffer de elución para cromatografía IMAC o buffer B: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM, en agua MilliQ, pH=8.
- Buffer enteroquinasa (EK): Tris 20 mM, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 8.0.
- Buffer FACS: BSA 0.1%, EDTA 2 mM, en PBS.

### 3.2 Medios de cultivo y suplementos

- Luria Bertani broth (LB; SigmaAldrich).
- Luria Bertani agar (LB agar; Sigma Aldrich).

- SuperOptimalbrothwithCataboliterepression (SOC): triptona 2%, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.05%, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glucosa 20 mM, en agua MilliQ, pH=7.0.
- Super Broth (SB): triptona 3.0%, extracto de levadura 2.0%, MOPS 1.0% (ácido 3-[N-morfolino]-propanosulfónico)
- Kanamicina stock: 40 mg/mL en agua MilliQ. Concentración de trabajo: 40 µg/mL.
- Ampicilina stock: 50 mg/mL en agua MilliQ. Concentración de trabajo: 100 µg/mL.
- Cloranfenicol stock: 34 mg/mL en etanol. Concentración de trabajo: 34 µg/mL.
- Arabinosa stock: 20% en agua MilliQ.
- D-biotina stock: 100 mM en agua MilliQ.
- Glucosa stock: 40% en agua MilliQ.



### 3.3.2 Reacción de PCR

Para amplificar los VHHs se emplearon los primers en una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$ , 1.25 U de la enzima Taq ADN polimerasa (ThermoScientific™), Buffer Taq 1X, 1.25 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de dNTPs y 1  $\mu\text{L}$  de molde (vector que contiene la secuencia del VHH) en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . La reacción se llevó a cabo en un termociclador LifeEco (BIOER) de acuerdo al siguiente programa: 1 minuto a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (annealing), 30 segundos a 72°C (elongación), por 25 ciclos, y al finalizar 10 minutos a 72°C. El resultado se verificó por electroforesis en gel de agarosa.

### 3.3.3 Electroforesis en gel de agarosa

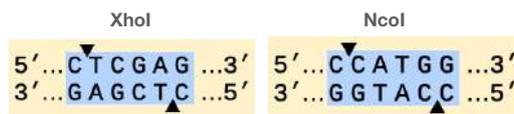
Las muestras se diluyeron en buffer de carga 6X (ThermoScientific™ #R0611) (concentración final 1X). Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific™). Se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X con bromuro de etidio como agente intercalante. Los productos se visualizaron bajo irradiación UV con un equipo Universal Hood II (BIORAD) acoplado a un scanner ChemiDoc XRS (BIORAD) para la captura de imágenes.

### 3.3.4 Purificación de productos de PCR

La totalidad del volumen de los productos de PCR se corrió por electroforesis en gel de agarosa hasta separar los amplicones (400 pb) de sus respectivos vectores molde (5000 pb). Se extrajeron las bandas del gel y se purificó el ADN de los amplicones utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Purification (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante.

### 3.3.5 Digestión con enzimas de restricción

Para la preparación del vector pINQ.H6.Cys, el amplicón correspondiente al VHH T9 así como el vector de expresión fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y NcoI (ThermoScientific™) que presentan sitios únicos en el vector. Los cortes con las enzimas dejan extremos cohesivos que no son complementarios (**figura 3.2**), y por lo tanto facilitan el clonado direccional de los insertos en el vector.



**Figura 3.2.** Sitios de corte de las enzimas de restricción XhoI y NcoI.

Las reacciones se llevaron a cabo con las dos enzimas en simultáneo a 37°C — temperatura óptima de ambas— y en buffer Tango 1X, en el cual NcoI presenta 100% de actividad y XhoI 20-50% de actividad. Se digirió 1 µg de amplicón y 2 µg de vector usando 20 U de cada enzima en las condiciones previamente descritas, durante 2 horas. El amplicón digerido se purificó por columna con un kit comercial GeneJET PCR Purification Kit (ThermoScientific™), y el vector digerido se purificó a partir de un gel de agarosa.

Para clonar los nanobodies anti-CD11b (V36) y anti-CD11c (MR31 y MR33), se realizaron digestiones de los amplicones y del vector con la enzima SfiI (ThermoScientific™) (**figura 3.3**). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 35 µL, en buffer G 1X y con 10 U de enzima, durante 1 hora a 50°C.



**Figura 3.3.** Sitio de corte de la enzima de restricción SfiI.

### 3.3.6 Reacción de ligación

Para ligar los VHHs al vector pINQ se trabajó con una relación molar inserto:vector de 3:1 y con 30 ng de vector. Se realizó la reacción con la enzima T4 DNA ligasa (ThermoScientific™) en buffer de reacción 1X (Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1mM, DTT 10 mM, pH 7.5) en un volumen de 20 µL, durante 30 minutos a 24°C, seguido de 5 minutos de inactivación a 70°C. Como controles, se realizaron reacciones de ligación sin inserto y sin inserto y sin enzima T4 ligasa.

### 3.3.7 Transformación de células electrocompetentes

Con los productos de ligación se transformaron células electrocompetentes de la cepa DH5α de *E. coli* que se define por tres mutaciones: recA1, inactivando la recombinación homóloga; endA1, inactivando endonucleasas intracelulares que podrían degradar el ADN plasmídico; y lacZM15 que permite el screening de colonias blanco/azul (que no se aplicó en este protocolo). La transformación se realizó con 1 µL de

producto de ligación (o controles) y 30  $\mu$ L de células por electroporación en un equipo MicroPulser (BIORAD) y cubetas de 1 mm. Las células se resuspendieron en 1 mL de medio de recuperación SOC y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación, tras lo cual se sembraron diluciones seriadas en placas de LB agar-kanamicina, las cuales permanecieron a 37°C ON (*overnight*, equivalente a 16-20 horas). Al día siguiente, se contaron las colonias y se compararon los números obtenidos para las placas correspondientes a la reacción de ligación con los números obtenidos para las placas de los dos controles realizados. Si la reacción de ligación fue eficiente, se espera una diferencia significativa en el número de colonias de la ligación respecto a los controles.

### **3.3.8 Extracción del ADN plasmídico por miniprep**

De la placa más concentrada de la transformación con reacción de ligación se seleccionaron cinco colonias y se incubaron en tubos separados en 2 mL de LB-kanamicina ON a 37°C. Al día siguiente se obtuvieron los pellets por centrifugación a 5000 x g, 10 min, a partir de los cuales se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo correspondiente.

### **3.3.9 Secuenciación de clones**

El ADN de cada uno de los cinco clones se envió al servicio de secuenciación CES (*Capillary Electrophoresis Sequencing*) de la empresa Macrogen, en Corea. La reacción se realizó con el primer universal T7 terminador (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'). Se seleccionaron los clones que presentaran la secuencia completa de los nanobodies seguida de la cola de polihistidina y del residuo de cisteína C-terminal.

## **3.4 Expresión a pequeña escala de nanobodies con un residuo de cisteína C-terminal**

### **3.4.1 Fundamento del sistema de expresión**

Para la expresión se transformaron células electrocompetentes *E. coli* de la cepa BL21 (DE3). La misma contiene el profago lambda DE3 que porta el gen para la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor lacUV5. Además, la cepa carece de las proteasas Ion y OmpT, reduciendo la degradación de proteínas heterólogas expresadas en la célula. El vector de expresión pINQ utilizado codifica para el represor Lac y presenta el operador Lac precedido por el promotor T7. De este modo, el sistema de expresión se basa en la síntesis de la T7 ARN polimerasa producida por la bacteria que actuará sobre el promotor T7 del plásmido, únicamente en ausencia de inhibición por el represor lac. Éste también es codificado en el genoma de la bacteria y actuará inhibiendo la transcripción tanto de la T7 ARN polimerasa como de la proteína heteróloga mediante la unión a su operador. Sólo en presencia de una molécula inductora, como lactosa, alolactosa o IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido), se impide la acción del represor, promoviendo de esta forma la expresión de la proteína de interés. La proteína expresada desde el vector pINQ es exportada al compartimiento periplasmático de la bacteria gracias al péptido señal OmpA (*Outer membrane protein A*), que es clivado en la proteína final.

### **3.4.2 Pruebas de expresión en BL21**

La transformación de los productos de ligación en BL21 y cultivo en placas de LB agar-kanamicina se realizó de igual manera que se describió en 1.5. Para las pruebas de expresión a pequeña escala, se tomó una colonia aislada en las placas, se resuspendió en LB-kanamicina y glucosa al 4% y se incubó ON a 37°C y 250 rpm. La glucosa en el medio cumple la función de reprimir la expresión de la proteína recombinante, porque asegura la acción del represor lac, con la finalidad de evitar que la presencia de una proteína ajena a la bacteria afecte su crecimiento. A partir del cultivo ON se inocularon tubos de 2 mL de LB-kanamicina a una dilución de 1/50 y se mantuvieron a 37°C y a 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de aproximadamente 0.6. En este punto se agregó el agente inductor IPTG a concentraciones variables en el rango de 0-1000  $\mu$ M. Las inducciones se dejaron proceder en condiciones de temperatura y tiempo también variables para los distintos nanobodies. Como control negativo se incluyó un cultivo de células BL21 no transformadas.

### **3.4.3 Lisis de cultivos y preparación de extractos solubles e insolubles**

De cada cultivo se tomó una alícuota de 1 mL y se centrifugó a 5000 x g por 10 minutos. El pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L del buffer de lisis B-PER™ (ThermoScientific), se mezcló usando un agitador de vórtice y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se centrifugó a máxima velocidad (17000 x g) por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble del extracto celular, mientras que el pellet correspondiente a la fracción insoluble se resuspendió en 20  $\mu$ L de urea 8 M, se mezcló usando un agitador de vórtice, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y luego se agregó 180  $\mu$ L de PBS 1X. Se centrifugó a velocidad máxima por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante.

### **3.4.4 SDS-PAGE**

Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12.5% y buffer de corrida 1X. Las muestras se diluyeron en buffer de carga 6X, con o sin agente reductor, y se incubaron a 100°C durante 5 minutos para promover la desnaturalización. Se utilizó un marcador de peso molecular no teñido (Pierce™ #26610). La corrida electroforética se realizó a 90 voltios durante los primeros 15 minutos y a 140 voltios el resto de la corrida. Las bandas se revelaron mediante tinción con Coomassie seguida de inmersión en solución decolorante.

## **3.5 Expresión a gran escala, purificación y caracterización de nanobodies con cisteína C-terminal**

### **3.5.1 Expresión a gran escala y lisis de cultivos por shock osmótico**

A partir de una placa fresca de colonias de BL21 transformadas con pINQ-VHH.H6.Cys se inoculó un matraz con 10 mL de LB-kanamicina-glucosa y se incubó ON a 37°C y 250 rpm. Al día siguiente se inoculó un matraz de 2 L con 500 mL de LB-kanamicina con los 10 mL del cultivo, diluyéndose 50 veces, y se incubó en las mismas condiciones. Una vez alcanzada  $DO_{600} = 0.6$  se procedió a inducir con IPTG de acuerdo a las concentraciones óptimas definidas en las pruebas de expresión a pequeña escala. Pasado el tiempo de inducción, los cultivos se centrifugaron a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C y el pellet se lisó por shock osmótico, adaptando un protocolo previamente descrito [71]. Se resuspendió el pellet en 3 mL de buffer TES y se congeló

a -80°C. Al día siguiente el pellet se descongeló en hielo, se agregaron 3 mL de buffer TES y se dejó incubar durante 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo se agregaron 9 mL de buffer TES diluido 1:4 y se dejó incubar otros 30 minutos. Finalmente se centrifugó a 20000 x g durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante.

### **3.5.2 Purificación por cromatografía IMAC**

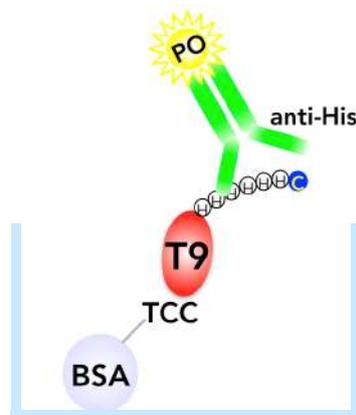
La cola de polihistidina (6xHis) presente en el extremo C-terminal de los nanobodies asegura su purificación por cromatografía de afinidad por níquel inmovilizado (IMAC: *Immobilized Metal Affinity Chromatography*). Para ello se emplearon columnas de Níquel-NTA HisTrap™ HP de 1 mL (GE Healthcare), en un equipo de FPLC ÄKTApurifier (GE Healthcare). Estas columnas se componen de una matriz de sefarosa (agarosa altamente polimerizada) con iones de Ni<sup>2+</sup> coordinados por moléculas de ácido nitrilotriacético (NTA) unidas covalentemente a la matriz. El níquel se une fuertemente a la cola de 6xHis de las proteínas recombinantes, pudiendo coordinar con hasta tres residuos. Para equilibrar la columna se utilizó un buffer de unión o buffer A. Los sobrenadantes obtenidos en la expresión a gran escala se llevaron a 300 mM con NaCl y a 20 mM de imidazol, y se filtraron a través de membranas de 0.22 µm. La alta concentración de cloruro de sodio cumple la función de evitar que se formen interacciones electrostáticas indeseadas entre las proteínas del sobrenadante y la matriz de la columna, y el imidazol a baja concentración inhibe interacciones inespecíficas de baja afinidad con el níquel. Toda la corrida se realizó a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La inyección de las muestras se hizo con un Superloop™ de 50 mL (GE Healthcare), tras lo cual se procedió a lavar la columna con 5 mL de buffer A, seguido de lavados de 5 mL con concentraciones crecientes de buffer de elución o buffer B, hasta eluir la proteína. A lo largo de toda la corrida se midió la absorbancia a 280 nm para identificar picos de elución. Se colectaron diferentes fracciones eluidas durante la purificación, y se analizaron por SDS-PAGE. Para remover el imidazol de las muestras, éstas se dializaron en PBS 1X usando membranas de celulosa de 10 mm de ancho y cut-off de 14 kDa (Sigma).

### **3.5.3 Estimación de la concentración**

Una vez dializadas las muestras, se midió su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific), usando buffer PBS como blanco. Se asumió que 1 unidad de absorbancia equivale a 1 mg/mL de proteína.

### 3.5.4 Control de la reactividad del nanobody control T9-Cys por ELISA

Se trabajó con T9-Cys y se incluyó el nanobody T9, sin cisteína. Se sensibilizaron 3 filas de 12 pocillos de una placa de 96 pocillos (Greiner, High binding) con 100  $\mu\text{L}$  de TCC (triclocarbán) conjugado a BSA en PBS 1X, a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y se incubó a 4°C ON. Al día siguiente se descartó el contenido de los pocillos y se bloqueó la placa con 200  $\mu\text{L}$  de BSA 1% en PBS 1X, y se incubó a 37°C por media hora. Se descartó el contenido y se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 0.05% para luego incubar con diluciones al medio del nanobody. Se incubó una hora a temperatura ambiente con agitación, se volvió a lavar y se incubó con 100  $\mu\text{L}$  de un anticuerpo anti-cola de polihistidina conjugado a peroxidasa (Anti-6xHis-PO) (abcam #ab1187) a una dilución de 1:10000. Tras una incubación de una hora a temperatura ambiente con agitación, se lavó nuevamente la placa para incubar con 100  $\mu\text{L}$  de la solución del sustrato de la enzima peroxidasa. Pasados unos 10 minutos, se detuvo la reacción mediante el agregado de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Se realizó la lectura de absorbancia a 450 nm en un equipo FLUOstar OPTIMA. El esquema de la reacción se representa en la figura 3.4.



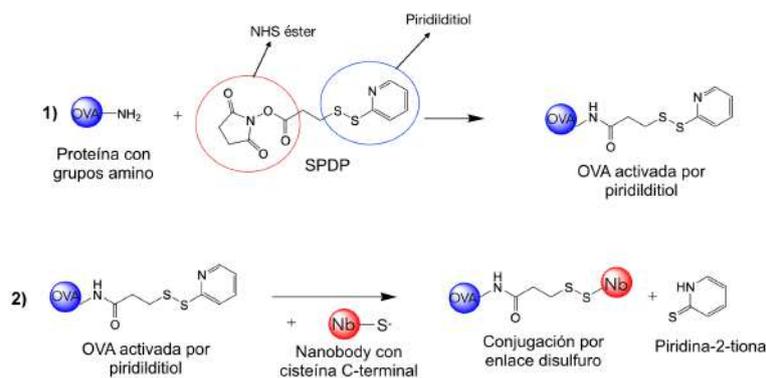
**Figura 3.4.** Esquema del formato del ensayo ELISA para evaluar la reactividad de T9-Cys contra su antígeno triclocarbán (TCC).

## 3.6 Activación de ovoalbúmina con reactivos heterobifuncionales

### 3.6.1 Activación de OVA con SPDP

Los reactivos heterobifuncionales se componen de dos grupos reactivos con diferente química. En este caso el objetivo era utilizar un reactivo que fuera capaz de, por un lado, unirse covalentemente a grupos presentes en abundancia en las proteínas (conjugación a OVA), y por otro lado, reaccionar específicamente con tioles (conjugación direccionada al nanobody). Inicialmente se trabajó con el reactivo SPDP (succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato) puesto que se encontraba disponible en el laboratorio. Éste se compone de un grupo éster de N-hidroxisuccinimida (NHS éster) que reacciona con aminas primarias para formar enlaces amida estables, y de un grupo piridilditio que reacciona con sulfhidrilos para formar enlaces disulfuro (**figura 3.5**). La OVA contiene 20 residuos de lisina, de los cuales la mayoría portan grupos amino reactivos, mientras que los nanobodies producidos no presentan cisteínas libres, únicamente la introducida en el extremo C-terminal, lo cual asegura la conjugación direccionada.

Para todos los experimentos de activación de ovoalbúmina y su conjugación a nanobodies, se trabajó con la proteína purificada a partir de clara de huevo (Sigma #A5503), la cual es glicosilada y fosforilada y tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa.



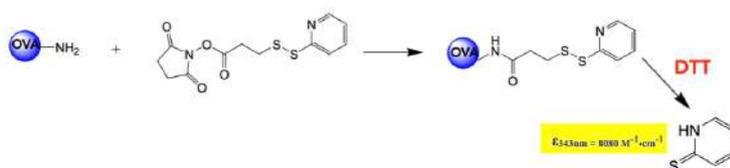
**Figura 3.5.** Química de la reacción de conjugación de OVA con un nanobody-Cys a través del reactivo SPDP.

Se efectuaron reacciones con relaciones molares SPDP:OVA de 5:1, 10:1, 20:1, 25:1, 30:1, 40:1 y 50:1. Las mismas se llevaron a cabo en 100  $\mu$ L de PBS-EDTA 1mM pH 7.4, con una concentración de proteína de 20 mg/mL, y se agregaron las cantidades

correspondientes de SPDP disuelto en DMSO (dimetilsulfóxido) en un volumen inferior al 50% del volumen de proteína en solución acuosa. Al cabo de una hora con agitación a temperatura ambiente se eliminó el exceso de SPDP empleando columnas de gel filtración NAP-5 (GE Healthcare), equilibradas en PBS 1X. Para cuantificar la proteína recuperada se aplicó el ensayo del ácido bicincoínico (BCA) siguiendo el protocolo de un kit comercial (ThermoScientific).

### 3.6.2 Titulación de grupos activados

A continuación se procedió a titular el número de grupos activados por molécula de OVA mediante medidas de absorbancia a 343 nm. Esta longitud de onda se corresponde con la absorbancia del grupo que se libera al reducir el enlace disulfuro del SPDP con DTT (**figura 3.6**), y es proporcional al número de grupos amino modificados por molécula de proteína.



**Figura 3.6.** Titulación de grupos amino activados por SPDP. La incubación con el agente reductor DTT libera un grupo que absorbe a 343 nm.

Las muestras de las distintas reacciones se diluyeron 1/100 en un volumen final de 1 mL, se midió su absorbancia basal a 343 nm en un espectrofotómetro Evolution 60 (ThermoScientific) y se incubaron con 10  $\mu\text{L}$  del agente reductor ditiotreitolo (DTT) en una concentración inicial de 15 mg/mL. Luego de 15 minutos de incubación con agitación a temperatura ambiente, se volvió a medir la absorbancia a 343 nm. Las medidas se realizaron por triplicado. Los moles de SPDP por mol de proteína se estimaron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta A_{343 \text{ nm}}}{8080} \times \frac{PM \text{ proteína}}{\text{mg/mL proteína}}$$

Donde PM es el peso molecular de la proteína, aproximadamente 45 kDa para OVA.

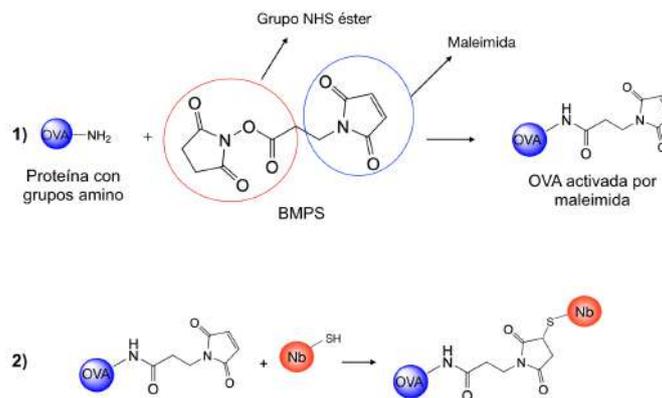
### 3.6.3 Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

Los productos de conjugación se verificaron por espectrometría de masas MALDI-TOF, en matriz de ácido sinapínico 10 mg/mL (en acetonitrilo:TFA 0.1%, 50:50), usando un

equipo microflex® (Bruker). Para la reacción de OVA con SPDP se consideró un cambio de masa de +198 por cada grupo amino activado.

### 3.6.4 Activación de OVA con BMPS

Alternativamente se realizó la activación de OVA con el reactivo BMPS (éster de N-β-maleimidopropil-oxisuccinimida), similar al SPDP excepto que el grupo que reacciona con tioles es un grupo maleimida (**figura 3.7**), lo cual da lugar a la formación de un enlace tioéter. Se probaron tres condiciones, con 100 μL de OVA 5 mg/mL (PBS-EDTA 1mM) y un exceso molar del reactivo de 10, 15 o 20 veces. La incubación se realizó a temperatura ambiente y con agitación durante 45 minutos. El exceso de reactivo fue removido usando columnas de gel filtración NAP-5. Los productos se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF como se describió previamente. Para ello se consideró un cambio de masa de +151 Da con respecto a la masa inicial de la proteína.



**Figura 3.7.** Química de la reacción de conjugación de OVA con un Nb-Cys a través del reactivo BMPS.

## 3.7 Conjugación química de OVA a nanobodies con una cisteína C-terminal

### 3.7.1 Pruebas de reducción de dímeros de nanobodies

Los nanobodies que se expresan con una cisteína C-terminal tienden a formar dímeros a través de enlaces disulfuro. Por lo tanto, el primer paso para la conjugación consiste en la reducción de estos dímeros para aumentar la disponibilidad de moléculas reactivas. Para ello se incubó el nanobody T9-Cys con el agente reductor DTT en diferentes relaciones molares con el fin de determinar la mínima relación molar que asegura la

totalidad de las moléculas de nanobody en estado monomérico. Se probaron seis relaciones molares DTT:Nb: 2.5:2, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 y 50:1. Cada reacción se realizó con 30 µg de proteína y la cantidad correspondiente de DTT, en una concentración final de 0.6-3 mM, incubando por 30 min a temperatura ambiente con agitación. Una vez finalizadas, se tomaron alícuotas y se analizaron por SDS-PAGE en buffer de carga sin agente reductor. La reactividad de T9-Cys reducido con 30:1 de DTT se evaluó por ELISA.

### **3.7.2 Optimización de la conjugación Nb-OVA vía SPDP**

Se llevaron a cabo reacciones a pequeña escala con el nanobody T9-Cys y OVA activada por SPDP en relación 5:1 (OVA-A), 10:1 (OVA-B) y 30:1 (OVA-C). Para ello, las soluciones de OVA se ajustaron a una concentración de 2 mg/mL en PBS-EDTA. Una solución 1.6 mg/mL de T9-Cys se incubó con DTT en una relación DTT:Nb de 20:1, durante 30 minutos a temperatura ambiente (concentración final DTT = 2.2 mM). Posteriormente se eliminó el exceso de agente reductor a través de una columna de gel filtración PD-10 (GE Healthcare) equilibrada en buffer acetato 10 mM, a un pH 5.5 para desfavorecer la re-oxidación de los tioles de cisteína y por ende la formación de dímeros. La fracción eluida se mantuvo en hielo. Para cada una de las tres reacciones se mezclaron 200 µg de OVA con la cantidad correspondiente de T9-Cys reducido de modo tal que la relación nanobody:grupos activados/OVA fuera de aproximadamente 2:1. El pH de la mezcla se ajustó a 7 con PBS 10X a una concentración final de aproximadamente 2X y se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente y con agitación durante 1 hora. Los productos resultantes se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, espectrometría de masas MALDI-TOF y cromatografía de gel filtración.

### **3.7.3 Optimización de la conjugación Nb-OVA vía BMPS**

Se realizaron pruebas con 50 µg de OVA 2 mg/mL en PBS-EDTA activada con BMPS en una relación molar 10:1. Con el nanobody T9-Cys reducido con DTT como se describió en 3.7.2, se llevaron a cabo reacciones con relaciones molares Nb:OVA de 6:1, 8:1 y 10:1, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Los productos resultantes se analizaron por SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF.

### 3.7.4 Caracterización de productos de conjugación por cromatografía de gel filtración o exclusión molecular (SEC)

En los experimentos realizados en este trabajo se utilizó una columna Superose® 12 HR 10/30 (Amersham Biosciences), empaquetada con una resina a base de agarosa, indicada para la separación de diversas biomoléculas incluyendo proteínas. Entre algunas de sus características de interés, la columna está diseñada para acoplarse a un sistema FPLC, en este caso un equipo ÄKTApurifier™ (GE Healthcare). Presenta un volumen total de 24 mL aproximadamente. Para obtener la mayor resolución, se recomienda inyectar volúmenes de muestra de 0.1-1% del volumen total (24-240 µL).

Para estimar los pesos moleculares de los productos de las reacciones de conjugación de OVA con nanobodies, inicialmente se construyó una curva de calibración con estándares proteicos: ribonucleasa A (13.7 kDa), quimiotropinógeno A (25.6 kDa), ovoalbúmina (44.3 kDa), seroalbúmina bovina (66.5 kDa), catalasa (232 kDa) y ferritina (440 kDa). Los mismos se combinaron en PBS 1X a una concentración final de 1 mg/mL aproximadamente, se inyectó en la columna un volumen total de 240 µL de la solución, y se realizó la corrida en PBS 1X a una velocidad de flujo de 0.75 mL/min. Se siguió la absorbancia a 280 nm y se registró el cromatograma correspondiente. Además, se corrió el polisacárido azul dextrano, que por su gran tamaño (2 MDa) es totalmente excluido de los poros de la columna y sirve para determinar el volumen muerto ( $V_o$ ) de la misma, que es el volumen total ocupado por la fase móvil. A partir de este valor y de los volúmenes de elución ( $V_e$ ) obtenidos para los estándares, se calculó el coeficiente de partición  $K_{av}$  para cada uno, que se define como  $(V_e - V_o)/(V_t - V_o)$ , donde  $V_t$  es el volumen total de la columna (24 mL). La relación entre  $K_{av}$  y el logaritmo del peso molecular de las proteínas es una función lineal que permite estimar el tamaño de proteínas a partir de su volumen de elución en una corrida realizada en las mismas condiciones.

Para la caracterización de productos de conjugación se inyectaron 100 µL de cada muestra, previamente filtrada por 0.22 µm. Además se corrieron los nanobodies sin conjugar. Todas las corridas se realizaron en PBS 1X a una velocidad de flujo de 0.75 mL/min.

### **3.7.5 Conjugación a gran escala de nanobodies con OVA activada por BMPS**

En primer lugar se realizaron reacciones de reducción de los nanobodies con DTT, empleando una relación molar DTT:Nb de 30:1. El exceso de DTT fue removido empleando columnas de gel filtración PD-10 equilibradas en buffer acetato 10 mM, pH 5.5. Las proteínas colectadas se mantuvieron en hielo. A continuación, los nanobodies reducidos fueron incubados con OVA activada por BMPS 10:1 en una relación molar Nb:OVA de 10:1, en concentraciones de entre 2 y 3 mg/mL aproximadamente para ambas proteínas. Se ajustó el pH de la mezcla a 7 con PBS 10X y se dejó proceder la reacción durante una hora a temperatura ambiente con agitación.

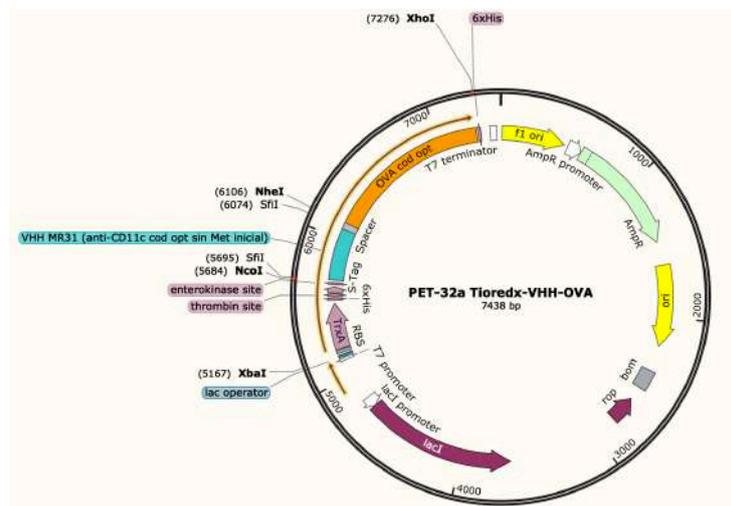
### **3.7.6 Doble purificación de productos de conjugación por cromatografía de afinidad y SEC**

Para purificar los productos de conjugación de moléculas libres (nanobody y OVA sin conjugar) se realizaron dos pasos. En primer lugar una cromatografía de afinidad con columnas de Ni-NTA, como se describió previamente. Los productos de conjugación presentan colas de polihistidina en los nanobodies, y también los nanobodies libres, pero no la OVA libre, la cual es removida en la fracción no unida. Los productos de interés y los nanobodies sin reaccionar quedan retenidos en la columna y se eluyen al aumentar la concentración de imidazol. Éstos pueden ser separados por SEC gracias a las grandes diferencias de tamaño, 15 kDa versus 60 kDa para los productos de conjugación más pequeños (1 nanobody/OVA). Previamente fue necesario un paso de concentración de las muestras a un volumen de 200  $\mu$ L, y para ello se utilizaron tubos concentradores Vivaspin® 6 (Sartorius), con un cut-off de 30 kDa. La cromatografía se realizó en PBS 1X a una velocidad de flujo de 0.75 mL/min. La cuantificación de los productos purificados se realizó utilizando un kit de BCA (ThermoScientific). La reactividad de la quimera V36-OVA se evaluó por citometría de flujo como se comenta en la sección 3.10.

## 3.8 Expresión recombinante de proteínas quiméricas de nanobodies con ovoalbúmina

### 3.8.1. Vector para expresión citoplasmática de VHHs fusionados a OVA y a tiorredoxina A

Se realizó la expresión recombinante de los nanobodies en el citoplasma de *E. coli* como proteínas de fusión a OVA. Para este fin se encargó la síntesis de un vector pET-32a (General Biosystems) representado en la **figura 3.8**. Éste incluye el gen del nanobody MR31 (anti-CD11c) en fase con el gen de la OVA. Los codones se optimizaron para su expresión en *E. coli*. A su vez, las secuencias de estos genes se encuentran en fase con la secuencia del gen de la proteína tiorredoxina A (Trx) y del péptido S-tag. Se ha demostrado que la fusión de Trx a proteínas heterólogas incrementa notoriamente la solubilidad de las mismas y su acumulación en altos niveles en el citoplasma [72]. Por otro lado, el péptido S es una secuencia de 15 aminoácidos derivada de la enzima RNasa A, que se utiliza en ensayos de detección de proteínas recombinantes o para su purificación, pero no fue utilizado en este trabajo. Además se incluye un sitio de clivaje por enteroquinasa para eliminar las secuencias de Trx y S-tag de la proteína de fusión.



**Figura 3.8.** Mapa del vector pET-32a para la expresión de VHHs fusionados a Trx y OVA.

### **3.8.2 Clonado de T9 y V36 en vector pET-32a**

Las secuencias codificantes de los nanobodies fueron amplificadas por PCR a partir de las construcciones realizadas en el vector pINQ.H6.Cys. Para cada VHH se realizaron tres reacciones en 50  $\mu$ L de volumen final, e iguales condiciones y concentraciones de reactivos que las descritas para el clonado en el vector pINQ.H6.Cys, utilizando los primers Fw-5 y Rv-6. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa y se purificaron con el kit GeneJET PCR Purification Kit (ThermoScientific). A continuación, los amplicones y el vector pET-32a se digirieron con la enzima SfiI como se describió en 3.3.5. Los productos de digestión se purificaron por electroforesis en gel de agarosa y usando el kit QIAquick Gel Extraction Purification (QIAGEN). Para las ligaciones y transformaciones en DH5 $\alpha$  se siguieron los protocolos descritos en 3.3.7., excepto que se utilizaron placas de LB-agar suplementadas con ampicilina para la selección de colonias transformadas.

### **3.8.3 PCR de colonias para la identificación de clones positivos**

A partir de las colonias crecidas en 3.8.2, se realizaron reacciones de PCR para evidenciar la presencia de clones positivos. Se tomaron cinco colonias de cada placa (reacciones de ligación y controles) y cada una se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua para biología molecular, y de ésta se tomó 1  $\mu$ L como molde para la reacción de PCR. Se siguió el mismo protocolo que para la PCR convencional usando los primers Fw-5 y Rv-6. Además se incluyó un control para la PCR de colonias, tomando una colonia de otra placa que se sabe contiene un plásmido con la secuencia de un nanobody, y otro control de la reacción con un vector como molde. El resultado se evidenció por electroforesis en gel de agarosa. Para interpretar el resultado se consideró que no se amplificará producto si el plásmido presente en las células contenía al vector pET-32a original dado que los primers no hibridan con la secuencia del nanobody MR31, puesto que éste carece del codón inicial ATG que aparece con el primer Fw-5 y tiene un codón TCT en lugar de TCC necesario para hibridar el primer Rv-6. Si, en cambio, el vector presentara la secuencia de T9 o de V36, habría amplificación. A partir de las réplicas de las colonias que resultaron positivas se crecieron cultivos ON en 5 mL de LB-ampicilina para extraer el ADN plasmídico por miniprep al día siguiente. Los plásmidos fueron enviados al servicio de secuenciación de Macrogen (Corea) y se verificaron las secuencias para proceder a las pruebas de expresión.

### **3.8.4 Expresión a pequeña escala de nanobodies fusionados a OVA y Trx**

Se transformaron células BL21 con los plásmidos correspondientes a cada nanobody y se plaquearon en LB-agar-ampicilina. Se tomó una colonia de cada placa y se resuspendió en 10 mL de LB-ampicilina, se incubó a 37°C y 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una  $DO_{600} = 0.6$ . En este punto se realizó la inducción en 2 mL con IPTG, y para cada clon se ensayaron distintas concentraciones: 0, 3, 5, 10, 15 y 30  $\mu\text{M}$ . Se incubó a 28°C y 250 rpm ON. Al día siguiente se extrajeron las fracciones solubles e insolubles como se describió en 3.4.3. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 12.5% en presencia de agente reductor.

### **3.8.5 Expresión a gran escala de nanobodies fusionados a OVA y Trx**

A partir de placas frescas de LB-agar-ampicilina de células BL21 transformadas con los vectores de los distintos nanobodies, se resuspendió una colonia de cada uno en 2 mL de LB-ampicilina-glucosa 4% y se incubó a 37°C y 250 rpm ON. Al día siguiente se inocularon matraces de 200 mL de LB-ampicilina con los 2 mL de starters y se dejaron crecer en las mismas condiciones hasta alcanzar una  $DO_{600\text{nm}} = 0.6$ , punto en el cual se inició la inducción con 5  $\mu\text{M}$  de IPTG, ON a 28°C y 250 rpm. Al día se centrifugaron los cultivos a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C, y los pellets se resuspendieron en 10 mL de PBS 1X. Los mismos se congelaron a -80°C durante media hora aproximadamente y se descongelaron en baño a 37 °C, repitiendo este proceso dos veces. A continuación, se sonicaron los pellets en un equipo Sonic Ruptor 4000 (Omni International) a una potencia de 80 watts, frecuencia 30 Hz, durante 15 minutos. Al finalizar se centrifugaron a 20000 x g durante 20 minutos, dos veces. A los sobrenadantes obtenidos se les agregó imidazol y NaCl a una concentración final de 20 mM y 300 mM, respectivamente, y se filtraron a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ .

### **3.8.6 Purificación de quimeras recombinantes por IMAC**

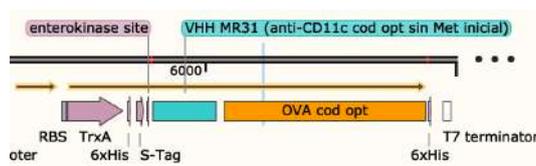
Se emplearon los mismos materiales y buffers descritos en 3.5.2. Se trabajó a una velocidad de flujo de 1 mL/min y se realizaron lavados con 5% de buffer B. Las proteínas se eluyeron con 20% o con 100% de buffer B. Las fracciones colectadas se dializaron en buffer de enzima enteroquinasa (buffer EK).

### 3.8.7 Estimación de la concentración

Para cada proteína dializada se midió la absorbancia a 280 nm en un nanodrop con buffer EK como blanco y como estimación de la concentración proteica se consideraron los coeficientes de extinción molar teóricos. Los mismos se obtuvieron en la plataforma bioinformática ExPASy (Expert Protein Analysis System) a partir de las secuencias aminoacídicas de las construcciones quiméricas, asumiendo todos los residuos de cisteína reducidos.

### 3.8.8 Evaluación de la digestión con enteroquinasa a pequeña escala

Se realizaron pruebas de digestión con la cadena liviana de enteroquinasa de NEB (P8070S) al incubar con 12.5  $\mu$ g de cada una de las proteínas (Trx-VHH-OVA), a una concentración final de 1.25 mg/mL, con distintas cantidades de enzima: 8 unidades (de acuerdo con el protocolo recomendado), 1.6 unidades, 0.8 unidades, 0.16 unidades, y 0.08 unidades. Las reacciones se realizaron en un termociclador BIORAD a 25°C y durante 16 horas. Se incluyeron controles sin enzima, que se expusieron a las mismas condiciones. Los productos se analizaron por SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF en matriz de ácido sinapínico. De acuerdo a la secuencia del vector de expresión, se predice que se obtienen al menos dos productos de digestión: Trx-6xHis-S-tag (17 kDa) y VHH-OVA (58 kDa) (**figura 3.9**).



**Figura 3.9.** Localización del sitio de corte de enteroquinasa en la construcción Trx-MR31-OVA.

### 3.8.9 Digestión a gran escala y purificación de productos de digestión

Para la digestión a gran escala se optó por una versión de enteroquinasa de GenScript (#Z03376), ya que, al igual que el fragmento de digestión Trx-6xHis-S-tag, presenta una cola de polihistidina. Esto simplifica la remoción de la enzima al mismo tiempo que se purifica el producto de digestión a través de una columna de Ni-NTA, en la cual quedan retenidas tanto la enzima como el fragmento con Trx, pero no el fragmento de interés VHH-OVA. Para la reacción de digestión se trabajó con una relación m/m EK:proteína de 1:800, incubando la mezcla en un termociclador a 25°C y durante 16 horas.

Para la purificación, debido a los volúmenes pequeños de proteína digerida, se utilizaron columnas microspin en las cuales se incubaron las muestras con resina de Ni-NTA (ThermoScientific #88221), durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. La elución de la fracción no unida que contiene al fragmento de interés se logró centrifugando a 750 x g, 2 minutos.

### **3.8.10 Control de la reactividad por ELISA**

Para evaluar la reactividad de las quimeras anti-CD11c y anti-CD11b contra sus antígenos recombinantes, se realizó un ensayo ELISA como se representa en la **figura 3.10**. Se siguió el formato propuesto por el Dr. Rossotti [67], en el cual se captura el antígeno (CR3 o CR4) por medio de un nanobody anti-CD18 biotinilado unido a estreptavidina en el pocillo, ya que la sensibilización directa del antígeno en el pocillo impide su reconocimiento en forma nativa. La sensibilización con 2 µg/mL de estreptavidina se realizó durante 1 hora a 37°C, luego se bloqueó la placa con BSA 1%, y después de cuatro lavados con PBS-Tween 0.05% se incubó con 2 µg/mL del nanobody IB7 (anti-CD18) ON a 4°C. Al día siguiente se lavó la placa y se incubó con los antígenos recombinantes CD11b/CD18 (CR3) o CD11c/CD18 (CR4) (R&D Systems #7959-AM y #7987-AX) a una concentración de 2 µg/mL, durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Para la incubación con las quimeras recombinantes se realizaron diluciones al medio en PBS 1X, por duplicado. Para la detección de las mismas, se utilizó un pool de sueros anti-OVA de conejo en una dilución 1/500, seguida de incubación con un anticuerpo anti-conejo-peroxidasa (Pierce) 1/4000, en PBS-Tween 0.01%. Se reveló con el sustrato de la enzima peroxidasa como se describió en 3.5.4.

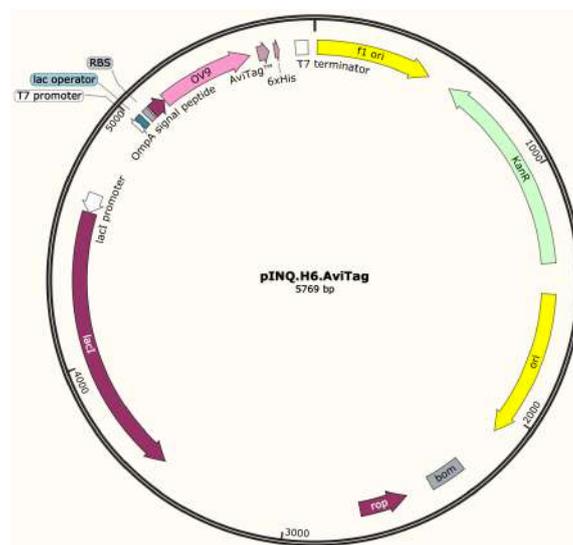


- b. Amplificación del primer output. Se creció un cultivo de 10 mL de SB con 10  $\mu$ L de células competentes de la cepa ER2738 de *E. coli*, en presencia de tetraciclina 10  $\mu$ g/mL, a 37°C y 250 rpm con agitación hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 1.0. A partir de éste se tomó una alícuota de 2 mL a la cual se le agregó 150  $\mu$ L del primer output y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se llevó a 20 mL con SB y 18  $\mu$ L de ampicilina (50 mg/mL), se incubó una hora a 37°C, se agregaron 22  $\mu$ L más de ampicilina y se incubó otra hora. Transcurrido este tiempo se agregó el fago helper M13KO7 a una multiplicidad de infección de 10:1, y se extendió la incubación durante 2 horas más. Finalmente se suplementó el cultivo con 35  $\mu$ L kanamicina (40 mg/mL) y se dejó ON a 37°C. En paralelo se realizó un cultivo control que consistió en células sin infectar crecidas en las mismas condiciones.
- c. Recuperación de fagos amplificados. El cultivo crecido ON se centrifugó a 12000 x g, 10 minutos, y se recuperó el sobrenadante al cual se le agregó 5 mL de una solución estéril de PEG<sub>8000</sub> al 20% m/v y NaCl 2.5 M para precipitar los fagos. Se incubó durante 1 hora en hielo y luego se centrifugó a 15000 x g, 15 minutos. El pellet se resuspendió en 1 mL PBS-BSA 3%, se centrifugó 1 minuto a 17000 x g, y se recuperó el sobrenadante con los fagos del primer output amplificado.
- d. Segunda ronda de panning. Se procedió de igual manera que para la primera ronda, excepto que se incubó con el primer output amplificado en lugar de la biblioteca.
- e. Titulación de fagos. Se realizó en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina en las cuales se sembraron 100  $\mu$ L de diluciones de la biblioteca, primer output, primer output amplificado o segundo output, en alícuotas de 100  $\mu$ L de un cultivo de células ER2738 en SB ( $DO_{600nm} = 1.0$ ). Como control se sembró una placa con solamente 100  $\mu$ L de cultivo. Las placas se incubaron a 37°C ON y al día siguiente se contaron las colonias para estimar los títulos en unidades formadoras de colonias por mL (ufc/mL).
- f. Screening desde pComb3X. Se seleccionaron 10 colonias al azar de una placa de la titulación del segundo output y cada una se resuspendió en 2 mL de SB suplementado con ampicilina. Los cultivos se incubaron a 37°C y 250 rpm con agitación hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0.5. En este punto se indujo la expresión de los VHHs mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 1 mM y los cultivos permanecieron ON en las mismas condiciones. Al día siguiente se centrifugaron los cultivos a 17000 x g, 10 minutos, y se utilizó el sobrenadante como fuente de VHHs. Éstos se analizaron en ensayos ELISA con placas sensibilizadas el día anterior con OVA o con cada una de las quimeras recombinantes Trx-VHH-OVA, y los nanobodies anti-OVA se detectaron con un anticuerpo anti-HA-peroxidasa (Roche) diluido 1/3000 en PBS-Tween 0.05%.

- g. Secuenciación de clones positivos. El ADN plasmídico de los clones que reaccionaron tanto con OVA como con las quimeras recombinantes se extrajo por miniprep, como se describió previamente, y se envió al servicio de secuenciación de la empresa Macrogen (Corea) con un primer Seq pCOMB de secuencia 5'-TGTTGTGTGGAATTGTGAGCG-3'.
- h. Alineamiento de secuencias proteicas. Se realizó utilizando la herramienta de alineamiento múltiple de la plataforma bioinformática Clustal Omega.

### 3.9.2 Producción del nanobody OV9 en forma biotinilada

La secuencia de uno de los clones positivos (nanobody OV9) se clonó en un vector pINQ.H6.AviTag™ (**figura 3.11**) por medio de digestión con la enzima SfiI y ligación con la enzima T4 DNA ligasa, como se describió previamente. La secuencia de aminoácidos AviTag™ (GLNDIFEAQKIEWHE) se incluye para la conjugación enzimática de una molécula de biotina catalizada por la biotina ligasa BirA de *E. coli*. Por eso se trabajó con la cepa de *E. coli* BL21(DE3)/pBir que porta el plásmido pCY216 para la expresión de BirA inducible por arabinosa y con marcador de selección por cloranfenicol. A continuación se describen los pasos seguidos para la obtención del nanobody purificado.



**Figura 3.11.** Mapa del vector pINQ.H6.AviTag con la secuencia del nanobody OV9.

- a. Transformación de BL21 pBir con plásmido pINQ.H6.AviTag codificante para el nanobody OV9 por electroporación como se describió previamente. Se sembraron las células en una placa de LB-agar suplementada con kanamicina y cloranfenicol.

- b. Se resuspendió una colonia aislada en 2 mL de LB suplementado con kanamicina y cloranfenicol y se incubó ON a 37°C y 250 rpm.
- c. Al día siguiente se diluyó el cultivo de 2 mL en un matraz con 200 mL de LB con kanamicina, cloranfenicol, arabinosa 0.04% y D-biotina 100 µM. Éste se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.6, tras lo cual se indujo la expresión del nanobody con IPTG a una concentración final de 3 µM y el cultivo permaneció ON a 28°C y 250 rpm.
- d. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo y se resuspendió el pellet en 20 mL de PBS 1X con 200 µL de D-biotina 100 mM y se lisaron las células mediante dos ciclos de congelado a -80°C y descongelado a 37°C más sonicado, como se describió en 3.8.5. El producto de lisis se incubó durante una hora y media a 37°C con agitación para promover la biotinilación in vitro.
- e. Se obtuvo el sobrenadante tras centrifugación a 30000 xg, 20 minutos, se llevó a 300 mM de NaCl y 20 mM de imidazol, y se filtró por 0.22 µm para proceder a su purificación por IMAC. Las fracciones eluidas se dializaron en PBS 1X y se analizaron por SDS-PAGE.
- f. Se verificó la biotinilación del nanobody sensibilizando una placa de ELISA con tres diluciones del mismo (1/1000, 1/500, 1/100), bloqueo con BSA 1% y detección con estreptavidina conjugada a peroxidasa (ThermoScientific) 1/10000.

### **3.10 Análisis de la reactividad de los antígenos quiméricos por citometría de flujo con BMDC**

Las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de ratones C57BL/6 fueron preparadas y proporcionadas amablemente por la Lic. Sofia Lagos, siguiendo un protocolo adaptado a partir del descrito previamente por Lutz *et al* [74]. Las células se cosecharon al décimo día de cultivo.

Para los experimentos de citometría se trabajó en placas fondo en V sembrando aproximadamente  $1.5 \times 10^5$  células por pocillo (contadas en cámara de Neubauer). Para el bloqueo de receptores Fc, se sembraron 25 µL por pocillo de una solución de suero normal de rata al 10% en buffer FACS, y se incubó la placa en un agitador a 4°C, durante 20 minutos.

Para la identificación de células CD11c<sup>+</sup> se utilizó el anticuerpo N418 (anti-CD11c) conjugado a Brilliant Violet 421 (BioLegend #117343) en una concentración de 2 µg/mL en buffer FACS, incubado durante 30 minutos a 4°C con agitación. Luego se realizó el lavado para eliminar exceso de moléculas no unidas: dos lavados con buffer FACS,

en un volumen final 120  $\mu\text{L}$ , centrifugando a 350 x g, 5 minutos, a 4°C. Este procedimiento se aplicó de igual manera para todas las incubaciones descritas en el experimento.

Para el marcado con los nanobodies anti-CD11c y anti-CD11b (monómeros biotinilados o quimeras Nb-OVA de conjugación química o recombinante) se prepararon diluciones en buffer FACS y se sembraron 25  $\mu\text{L}$  por pocillo, sin retirar la solución de bloqueo, y se incubó la placa durante 30-45 minutos en un agitador a 4°C. Para la detección de los nanobodies monoméricos biotinilados, se incubó con 50  $\mu\text{L}$  estreptavidina conjugada a ficoeritrina (STP-PE) (abcam #239759) a una dilución 1/200, y para la detección de las quimeras se agregó un paso intermedio de incubación con 50  $\mu\text{L}$  del nanobody OV9 biotinilado (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Para los ensayos de inhibición del anticuerpo N418 Brilliant Violet 421 por los nanobodies MR31 y MR33 (monómeros biotinilados), se incubó el anticuerpo en una concentración fuera del rango de saturación (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en conjunto con los nanobodies en exceso (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Para los ensayos de estabilidad de los antígenos quiméricos, se realizaron incubaciones de MR33-OVA, rV36-OVA (quimera recombinante) y qV36-OVA (quimera de conjugación química) a 37 y 50°C durante 1 hora en un termociclador BIORAD, seguidas de un ciclo de enfriamiento a 20°C (15 minutos). Posteriormente se realizó el marcado de BMDC como ya se describió.

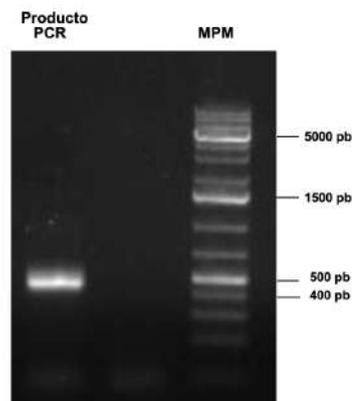
Al finalizar las incubaciones, se lavaron las células, se fijaron con 100  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído 1%, se lavaron nuevamente y se guardaron en 80  $\mu\text{L}$  de FACS a 4°C hasta el día siguiente. Las muestras se transfirieron a tubos de citometría y se analizaron en un equipo BD FACSCanto II (BD Biosciences).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1 Generación de antígenos quiméricos por conjugación direccional de OVA a nanobodies con un residuo de cisteína C-terminal

### 4.1.1 Clonado de nanobodies con un residuo de cisteína C-terminal

El nanobody T9-Cys (control negativo anti-triclocarbán) se amplificó con éxito utilizando los primers Fw-5 y Rv-Cys, como se evidencia en la **figura 4.1** por la aparición de una banda de aproximadamente 400 pb en la corrida electroforética en gel de agarosa.



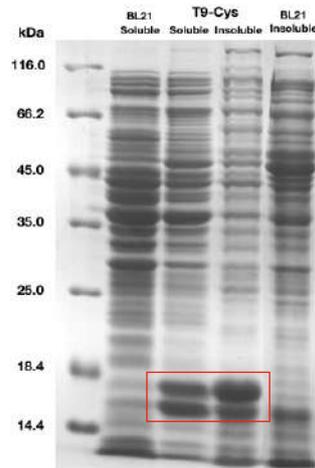
**Figura 4.1.** Amplificación de T9 con primers Fw-5 y Rv-Cys. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa 1%, revelado con bromuro de etidio.

Se logró construir el vector de expresión pINQ.H6.Cys con la secuencia de T9, y en este vector se clonaron los nanobodies V36 (anti-CD11b), MR31 y MR33 (anti-CD11c).

### 4.1.2 Expresión a pequeña escala de nanobodies con cisteína C-terminal

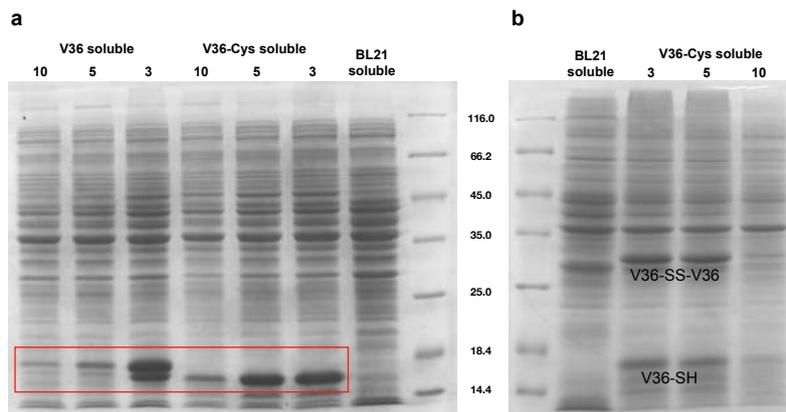
Se logró expresar el nanobody T9-Cys en el periplasma de la cepa BL21 de *E. coli*, mediante inducción con 10  $\mu$ M de IPTG a 37°C durante 4 horas. Observando el gel de SDS-PAGE (**figura 4.2**), entre las bandas de 14.4 y 18.4 kDa se puede apreciar una doble banda correspondiente a la expresión de T9-Cys, tanto en la fracción soluble como en la insoluble. Esta proteína tiene un peso molecular teórico de 14.8 kDa, excluyendo el péptido OmpA de secuencia MKKTAIAIAVALAGFATVAQAA. Éste es un péptido señal que se ubica en el extremo N-terminal y dirige el transporte de la proteína al compartimiento periplasmático. En *E. coli*, durante el proceso de

translocación al periplasma, los péptidos señal son clivados proteolíticamente para dar lugar a la forma madura de la proteína [75]. Podría sugerirse que la segunda banda constituye una forma inmadura de la proteína que conserve el péptido señal, con un peso molecular total de 16.9 kDa.



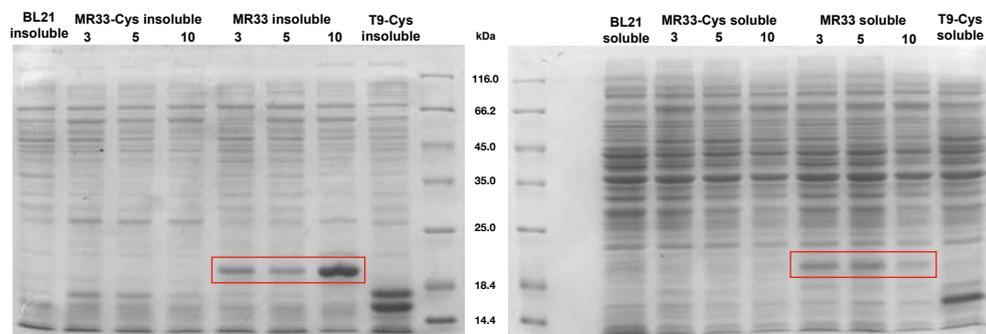
**Figura 4.2.** SDS-PAGE reductora de expresión del nanobody T9-Cys en el periplasma de BL21, a 37°C, 4 horas, con 10  $\mu$ M IPTG.

Con respecto al nanobody V36-Cys (anti-CD11b), éste se logró expresar en forma soluble induciendo a 28°C ON, obteniendo mayores rendimientos con 3 y 5  $\mu$ M de IPTG (**figura 4.3a**). Podría decirse que la expresión de V36 sin cisteína es algo superior a la de V36-Cys en la condición de 3  $\mu$ M IPTG. Si se observa el gel de SDS-PAGE donde las muestras se corrieron sin agente reductor (**figura 4.3b**), se aprecian bandas de menor y mayor tamaño correspondientes a las formas monomérica y dimérica del nanobody (V36-SS-V36), respectivamente, comportamiento que también se observó con T9-Cys (no se muestra en la figura 4.3). La presencia de la forma monomérica en ausencia de reductor fue inesperada, dadas las condiciones de corrida de la SDS-PAGE y particularmente considerando la expresión periplasmática de la proteína donde está promovida la formación de enlaces disulfuro.



**Figura 4.3.** SDS-PAGE de pruebas de expresión de los nanobodies V36-Cys y V36, a 28°C y distintas concentraciones micromolares de IPTG (3, 5 y 10). **a)** Buffer de carga con agente reductor 2-mercaptoetanol y **b)** sin agente reductor.

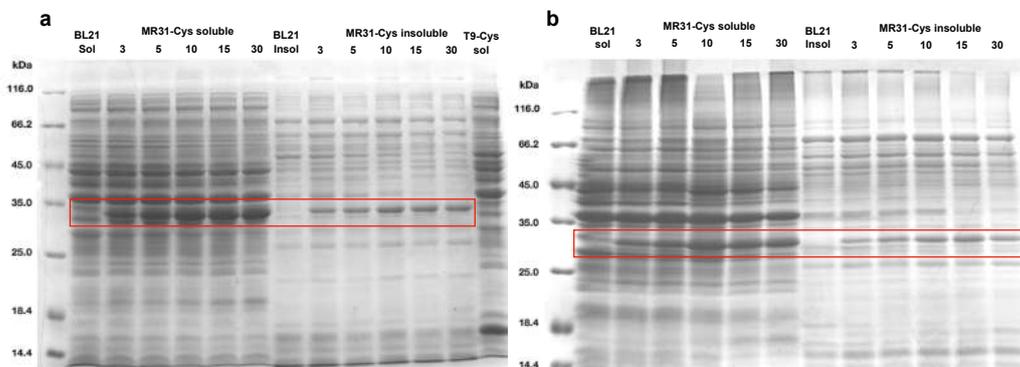
Con respecto al nanobody MR33-Cys (anti-CD11c), no se observa la proteína en ninguna de las condiciones experimentales y en ninguna de las fracciones, soluble o insoluble (**figura 4.4**). Tampoco se evidenció expresión a 37°C o a concentraciones de IPTG superiores a 10 μM (no se muestra en la figura). Esta dificultad de expresión no es sorprendente si se considera que el MR33, carente del residuo de cisteína, se expresa pobremente, apareciendo en general como una débil banda mayor a los 18.4 kDa en las fracciones solubles e insolubles, que no está presente en el control de células sin transformar.



**Figura 4.4.** SDS-PAGE de las fracciones insolubles y solubles de pruebas de expresión de los nanobodies MR33-Cys y MR33, a 28°C ON y distintas concentraciones micromolares de IPTG (3, 5 y 10). En ambos geles las muestras se corrieron en buffer de carga con el agente reductor 2-mercaptoetanol.

También se clonó el nanobody MR31 (anti-CD11c) en el vector pINQ con cisteína en C-terminal. Su expresión se evaluó en las mismas condiciones que las ensayadas para MR33-Cys, sin éxito. Sin embargo, al intentar expresarlo a 20°C ON, se observa la aparición de una banda inferior a los 35 kDa que podría tratarse de la forma dimérica MR31-SS-MR31 (**figura 4.5**). Lo desconcertante es que al realizar la corrida electroforética en condiciones reductoras no se observa una banda correspondiente a la

forma monomérica MR31-SH. Este resultado no se explica por errores en la secuencia, la cual fue confirmada por secuenciación. De todas formas, a pesar de la natural curiosidad que surgió sobre las posibles causas que podrían dar lugar a este resultado, no se continuó trabajando con esta construcción.

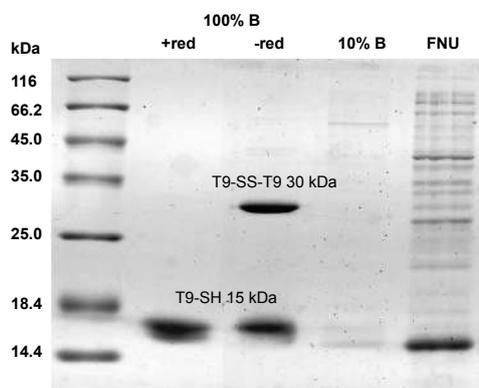


**Figura 4.5.** Fracciones solubles e insolubles de pruebas de expresión del nanobody MR31-Cys a 20 °C ON, a distintas concentraciones de IPTG (3, 5, 10, 15 y 30 μM). SDS-PAGE **a)** con agente reductor o **b)** sin agente reductor.

Llegado a este punto, en general los resultados sugieren que el agregado de una cisteína en C-terminal puede afectar la expresión de nanobodies en forma caso específica, ya sea porque la proteína se expresa con mayor dificultad, o porque es degradada por algún motivo. Este fenómeno encuentra precedentes en los trabajos de Massa y colegas, quienes implementaron la estrategia de la producción de nanobodies con una cisteína C-terminal con el objetivo de generar sondas para imagenología molecular, y observaron que el rendimiento de la producción recombinante de los nanobodies que utilizaron disminuía hasta un 2% cuando la cisteína se agregaba inmediatamente a continuación de la cola de polihistidina [76]. Los autores especulan que la cisteína desapareada interfiere con el correcto plegamiento del disulfuro interno de la proteína, traduciéndose en un efecto de toxicidad hacia la célula hospedera que se caracteriza por una diferencia en la turbidez del cultivo ON, viscosidad del extracto periplasmático y presencia del nanobody en el sobrenadante. Para resolver el problema, los autores agregaron una secuencia espaciadora de 14 aminoácidos entre la cola de polihistidina y la cisteína, derivada de la región bisagra de una IgA1 humana, que mejoró significativamente la expresión de los nanobodies. En nuestro caso, el uso de una construcción alternativa para el nanobody MR31 con una secuencia espaciadora GGGGSG entre la cola de polihistidina y la cisteína, permitió obtener una moderada expresión de MR31-Cys, pero demasiado baja para justificar su producción a mayor escala (figura no mostrada). Curiosamente en esta construcción no se observó la formación del dímero resistente a la reducción. Por todos los motivos expuestos es que no se continuó trabajando con las construcciones de MR33-Cys y MR31-Cys.

### 4.1.3 Expresión a gran escala y purificación por cromatografía de afinidad

En la **figura 4.6** se muestra un gel de SDS-PAGE evaluando el resultado de la purificación del nanobody T9-Cys por columna de Ni-NTA. De derecha a izquierda, los carriles corresponden a la fracción no unida a la columna, fracción eluida con 10% de buffer B (lavado), y fracción eluida con 100% de buffer B. En esta última fracción se obtuvo la proteína de interés con una pureza considerable. Si se analiza el nanobody en ausencia de agente reductor, se aprecia que solo una fracción de las moléculas, y no todas, se encuentran en forma de dímeros de disulfuro, como también se observó para el nanobody V36. Este fenómeno se observó sistemáticamente a lo largo de este estudio y se volverá a comentar más adelante.



**Figura 4.6.** SDS-PAGE evaluando la purificación del nanobody T9-Cys por cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular, fracción eluida con 100% de buffer B con y sin reductor, fracción eluida con 10% de buffer B, fracción no unida.

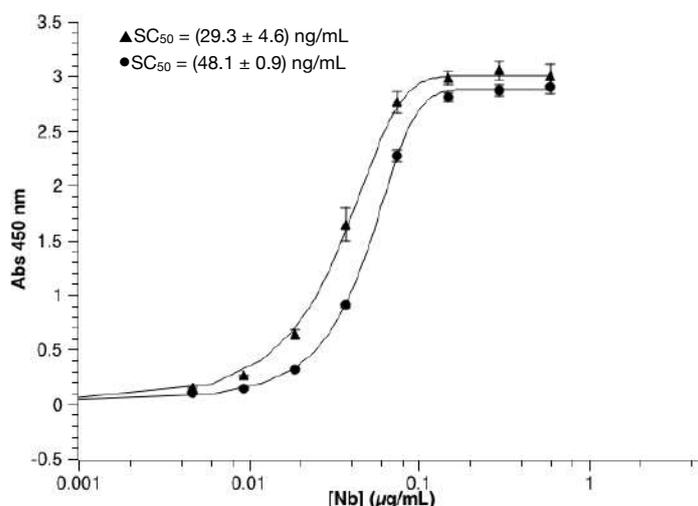
La fracción eluida con 100% de B se dializó en PBS y se midió una absorbancia a 280 nm de 2.89. Considerando que el volumen total fue de aproximadamente 2.5 mL y estimando una concentración de 2.9 mg/mL, se calcula que se produjeron aproximadamente 7.2 mg de T9-Cys de 500 mL de cultivo.

El nanobody V36-Cys también se produjo a gran escala. La inducción se realizó con 3  $\mu$ M, a 28°C ON. Los rendimientos obtenidos fueron muy similares a los de T9-Cys, recuperando aproximadamente 7 mg por cada 500 mL de cultivo.

Por su facilidad de producción y disponibilidad de antígeno para ELISA, las etapas de caracterización y pruebas de conjugación a pequeña escala se centraron en el nanobody T9-Cys.

#### 4.1.4 El agregado de un residuo de cisteína C-terminal no impacta sobre la funcionalidad del nanobody

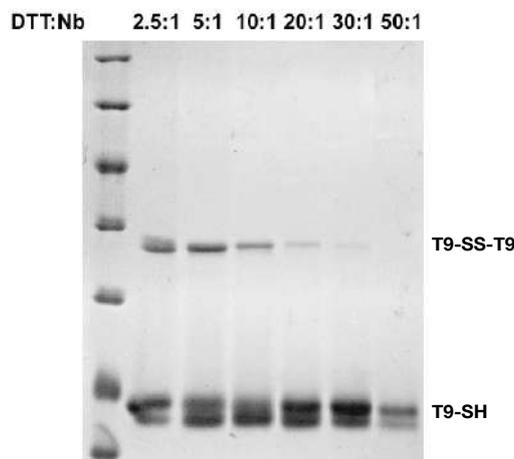
Un punto importante en la caracterización es verificar la capacidad de los nanobodies de reconocer a su antígeno tras haber sufrido una modificación en su secuencia. En la **figura 4.7** se reporta la curva de un ensayo ELISA, comparando la reactividad del nanobody T9 con T9-Cys contra su antígeno triclocarbán (TCC) conjugado a BSA. De acuerdo a este resultado se puede afirmar que la afinidad del nanobody por su antígeno no se ve afectada por el agregado de un residuo de cisteína en el extremo C-terminal. Debido a que una proporción de las moléculas de T9-Cys se encuentran en forma de dímeros T9-SS-T9, no se descarta la posibilidad de que la ligeramente menor  $SC_{50}$  de la curva correspondiente a T9-Cys refleje la bivalencia de la forma dimérica.



**Figura 4.7.** Curva de ELISA evaluando la reactividad de T9-Cys (▲) y T9 (●). La placa se sensibilizó con TCC-BSA 2 µg/mL y se reveló con un anticuerpo anti-6xHis conjugado a peroxidasa (abcam #ab1187).  $SC_{50}$ : concentración correspondiente al 50% de la señal máxima de absorbancia a 450 nm.

#### 4.1.5 Control de la reducción de dímeros Nb-SS-Cys

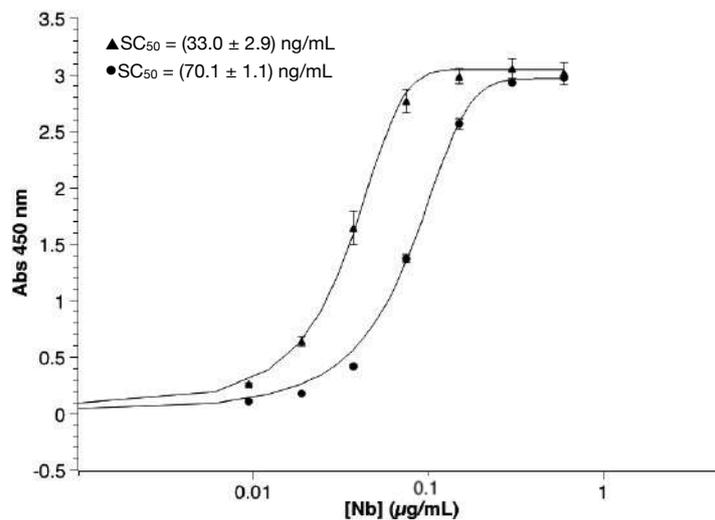
Como se observó en la **figura 4.6**, el nanobody T9-Cys forma dímeros a través de enlace disulfuro, por lo que se vuelve necesario tratar a la proteína con algún agente reductor antes de conjugarla a OVA. Con este fin se realizaron reacciones de reducción a pequeña escala con ditioneitol (DTT), en distintas relaciones molares DTT:Nb. En la **figura 4.8** se muestra el resultado de la SDS-PAGE en condiciones no reductoras en la cual se corrieron alícuotas de las reacciones mencionadas. Si bien faltó incluir en la figura el T9-Cys sin tratamiento con reductor, aún a bajas concentraciones comienza a observarse la reducción del dímero, y se puede apreciar que a una relación molar 20:1 la proporción del mismo comienza a ser despreciable. Por lo tanto, podemos asumir esta relación como un buen compromiso entre la mínima relación molar que asegura una buena disponibilidad de moléculas reactivas, y evitar un exceso que amenace la reducción del disulfuro intradominio. Hay que considerar que durante la corrida electroforética algunas moléculas podrían volver a oxidarse, y por lo tanto estaríamos sobreestimando la proporción dímero-monómero.



**Figura 4.8.** SDS-PAGE de pruebas de reducción del nanobody T9-Cys con DTT en las relaciones molares indicadas.

El nanobody T9-Cys, al igual que otros nanobodies expresados en el periplasma de *E. coli*, presenta un enlace disulfuro intramolecular que forma parte de su estructura nativa. El mismo involucra los residuos Cys24 y Cys98 (PDB: 5VM0). En principio debería cuestionarse si el uso de un agente reductor fuerte y pequeño como el DTT no alcanza también a reducir este enlace, pudiendo impactar en la estabilidad y en la funcionalidad

del nanobody. Como se comentó en la introducción, Pleiner y colaboradores produjeron nanobodies contra nucleoporinas del complejo de poro nuclear y los caracterizaron en función del compartimiento de expresión: periplasma de la cepa BLR (ambiente oxidativo), citoplasma de BLR (ambiente reductor) o citoplasma de la cepa SHuffle (ambiente parcialmente oxidativo) [65]. Encontraron que la temperatura de transición ( $T_m$ ) disminuye significativamente cuando los nanobodies son expresados en el ambiente reductor del citosol de BLR, lo que se relaciona directamente con una disminución en la estabilidad térmica debido a la ausencia del enlace disulfuro interno. Sin embargo, en un ensayo de afinidad por una de las nucleoporinas blanco, no se observaron diferencias en el comportamiento del nanobody estabilizado por el disulfuro interno respecto al nanobody no estabilizado (producido en ambiente reductor). En vista de estos antecedentes, es razonable esperar que tras el tratamiento de T9-Cys con el agente reductor DTT, independientemente de que se afecte o no el enlace disulfuro interno, se mantenga la capacidad de reconocimiento del antígeno correspondiente, pero posiblemente con un compromiso en la estabilidad térmica. Para confirmar lo primero se realizó un ELISA comparando la reactividad de T9-Cys sin reducir, con la de T9-Cys tras un tratamiento con un exceso molar 30:1 de DTT (**figura 4.9**). La capacidad de reconocimiento se mantiene, aunque con un valor de  $SC_{50}$  2.3 veces mayor. En este caso, no se descarta que la aparente pérdida de afinidad sea el resultado de una pérdida del efecto de avidéz al pasar completamente a la forma monómerica.



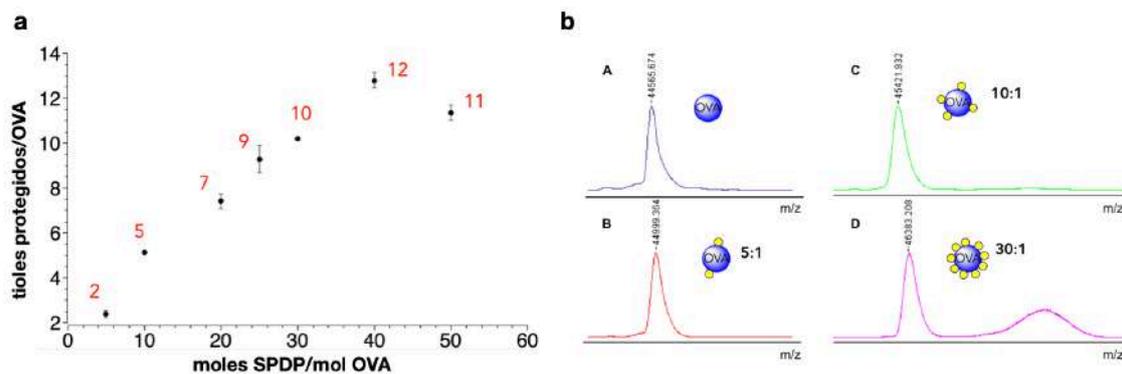
**Figura 4.9.** Curva de ELISA evaluando la reactividad de T9-Cys no reducido (▲) versus T9-Cys tratado con DTT 30:1 (●). La placa se sensibilizó con TCC-BSA 2 µg/mL y se reveló con un anticuerpo anti-6xHis conjugado a peroxidasa (abcam #ab1187).

En cuanto a la estabilidad, aunque no se ha abordado en esta tesina, queda planteada la posibilidad de estudiarla determinando la  $T_m$  mediante técnicas como microcalorimetría o fluorimetría diferencial de barrido, pero sí se considera un punto importante a evaluar por lo que implicaría para la preservación y aplicación *in vivo* de los conjugados a generar.

Algunos autores que han trabajado con nanobodies modificados con una cisteína en C-terminal y se han enfrentado al problema de la dimerización, han optado por el uso de reductores más suaves como 2-mercaptotilamina para preservar el enlace disulfuro intramolecular [76, 77].

#### **4.1.6 Activación de ovoalbúmina con SPDP**

Para conjugar los nanobodies-Cys a la OVA, en primera instancia se trabajó con el reactivo SPDP. Éste reacciona con aminas primarias de la OVA a través del grupo NHS éster, para mediar la conjugación al nanobody a través de un enlace disulfuro. En la **figura 4.10a** se muestra el resultado de la titulación de OVA activada con SPDP a distintas relaciones molares, obtenido mediante un método espectrofotométrico que sigue la absorbancia del grupo saliente producto de la reducción con DTT (**figura 3.6**, materiales y métodos). El número de tioles protegidos por molécula de OVA es equivalente al número de grupos amino activados. Dado que la proteína presenta 20 residuos de lisina (UniProt: P01012) más el grupo amino terminal, es razonable observar una tendencia de aumento en el número de tioles protegidos con el aumento en la relación molar SPDP:OVA. Al alcanzar una relación molar mayor a 40:1 ya se observa una tendencia de saturación con un máximo de 11-12 grupos agregados. Estos resultados indican que es posible determinar el grado de activación de la proteína, y tener control sobre la relación molar que resulte más adecuada para el objetivo final. En la **figura 4.10b**, se estima el número de tioles protegidos/OVA a partir de espectros MALDI-TOF, considerando que cada grupo genera un cambio de masa de +198 Da. Se observaron 2, 4 y 9 tioles protegidos/OVA, para las relaciones molares 5:1, 10:1 y 30:1, respectivamente. Estos resultados son compatibles con las medidas obtenidas por titulación espectrofotométrica.



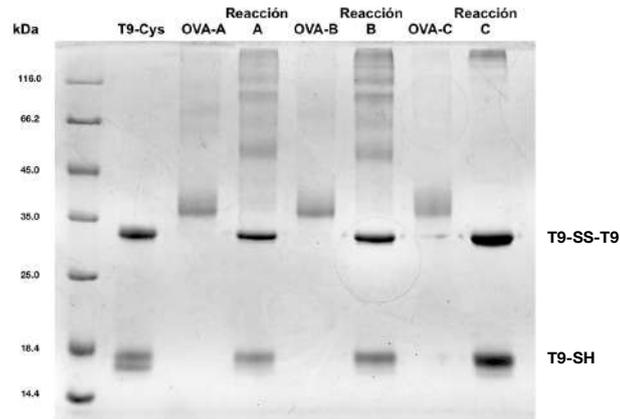
**Figura 4.10. Estimación del número de grupos activos por molécula de OVA.** a) Titulación de tioles en OVA a partir de medidas de absorbancia a 343 nm. El experimento se realizó por triplicado y las barras representan la desviación estándar. La proteína fue cuantificada por BCA. Los números en rojo indican el número estimado de grupos SPDP conjugados para cada relación molar. b) Espectros MALDI-TOF obtenidos para OVA modificada con SPDP en un exceso molar de 5 (B), 10 (C) y 30 (D), y OVA no modificada (A).

#### 4.1.7 Caracterización de productos de conjugación Nb-OVA

Se llevaron a cabo reacciones a pequeña escala con el nanobody T9-Cys y OVA activada por SPDP en relación 5:1 (OVA-A), 10:1 (OVA-B) y 30:1 (OVA-C). La relación molar T9:OVA utilizada se corresponde con un exceso molar de dos veces la cantidad de nanobody sobre el total de grupos amino activados en la OVA. El nanobody fue incubado previamente con DTT 20:1 para asegurar que se encuentre en la forma monomérica, y el exceso de DTT eliminado por gel filtración.

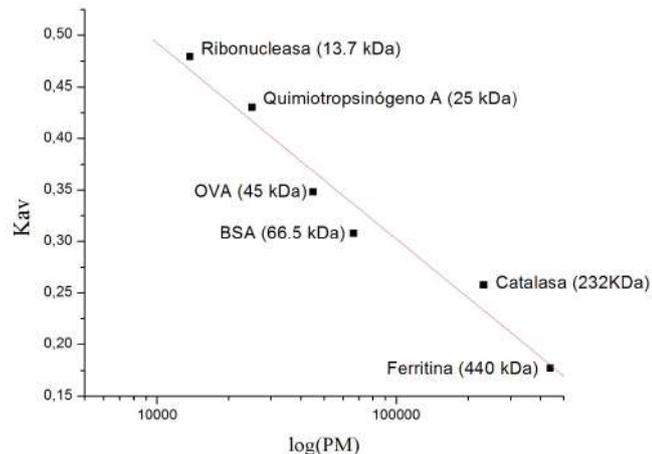
En la **figura 4.11** se muestra el resultado de la SDS-PAGE de los productos de conjugación corridos en condiciones no reductoras. Se puede apreciar que para la reacción con OVA-C, la cual presenta el mayor número de grupos activados (entre 9 y 10), predominan los productos de peso molecular mayor a 116 kDa y no se observa una banda a la altura de OVA-C sin conjugar. Esto indica que la mayoría de las moléculas de OVA reaccionaron con moléculas de T9-Cys uniendo al menos cuatro de éstas a través de los grupos activos disponibles. Con respecto a las reacciones con OVA-A y OVA-B, se observan productos de menor peso molecular, en concordancia con un menor número de grupos activos disponibles para reaccionar.

En paralelo a la reacción con OVA, se observa la re-oxidación del exceso de T9-Cys (banda inferior a los 35 kDa). Esto ocurre inevitablemente al remover el agente reductor de la solución e incubar las proteínas durante cierto tiempo.



**Figura 4.11.** SDS-PAGE no reductora de las reacciones de T9-Cys con OVA en distintos grados de activación con SPDP. OVA-A: activada con SPDP 5:1. OVA-B: activada con SPDP 10:1. OVA-C: activada con SPDP 30:1. En el carril correspondiente a T9-Cys se cargó el nanobody previamente reducido con DTT 20:1 e incubado en las mismas condiciones que las reacciones de conjugación.

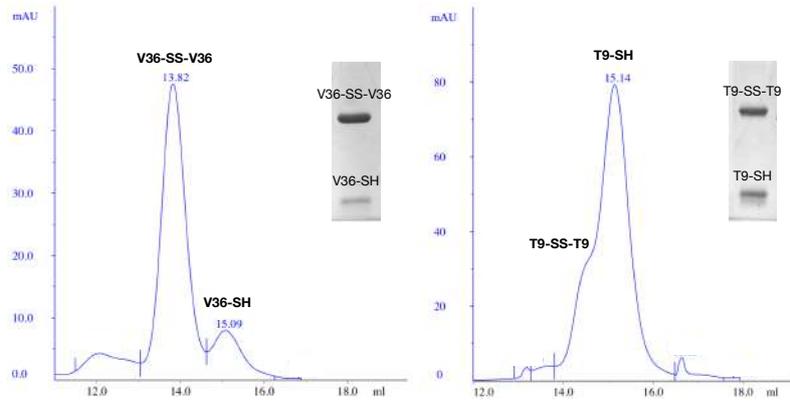
Para la caracterización de los productos de conjugación por cromatografía de gel filtración o SEC, inicialmente se realizaron corridas de proteínas estándares para generar una curva que permita estimar el peso molecular de los productos. Se grafica el coeficiente de partición  $K_{av}$  en función del logaritmo del peso molecular para las proteínas indicadas, donde  $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$  (**figura 4.12**). El volumen muerto de la columna ( $V_o$ ) se determinó con el polímero azul dextrano ( $V_e = 7.89$  mL).



**Figura 4.12.** Curva de calibración obtenida con corridas de proteínas estándares en columna Superosa 12 HR 10/30, en PBS, a 0.75 mL/min. Ecuación de la recta:  $K_{av} = -0.19 \log (PM) + 1.25$ .  $R^2 = 0.96$ .

En paralelo a la corrida de los productos de conjugación se realizó una corrida de los nanobodies T9-Cys y V36-Cys sin conjugar, cuyos cromatogramas se presentan en la **figura 4.13**. Puede apreciarse un pico a un volumen de elución de 15.14 mL para T9-

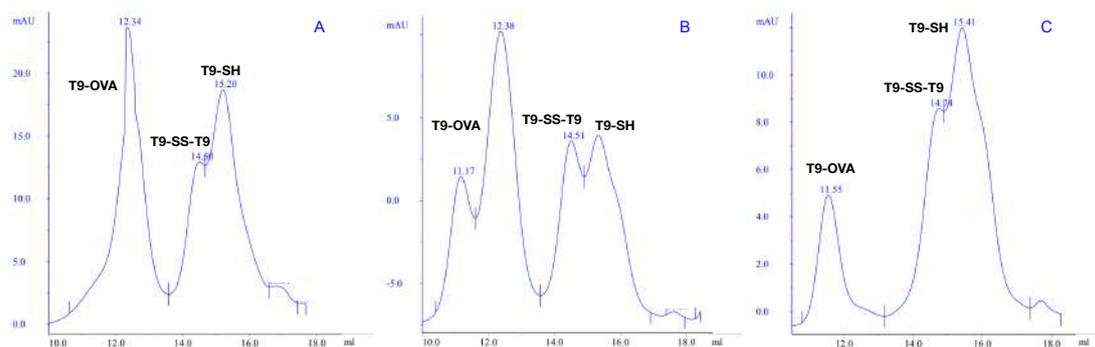
Cys, con un hombro a 14.5 mL aproximadamente, y dos picos de 15.09 y 13.82 mL para V36-Cys. Este perfil de elución bien podría representar los estados dímérico (Nb-SS-Nb) y monomérico (Nb-SH), a menor y mayor volumen de elución, respectivamente.



**Figura 4.13.** Cromatograma de SEC de los nanobodies V36-Cys (izquierda) y T9-Cys (derecha). La cromatografía se realizó en una columna Superosa 12 a un flujo de 0.75 mL/min.

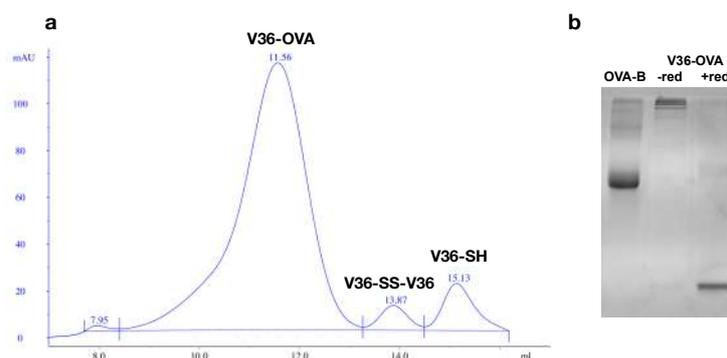
Algo que llama particularmente la atención es la diferencia en la proporción dímérico-monómero observada para los dos nanobodies, tanto en la SDS-PAGE como en el cromatograma de SEC. Claramente el nanobody V36-Cys tiene una mayor tendencia a formar dímeros (estado oxidado), mientras que el nanobody T9-Cys presenta una gran proporción de moléculas monoméricas (estado reducido). Dado que ambos nanobodies provienen del compartimiento oxidante del periplasma, lo que debería fomentar la formación del dímérico, cabe cuestionarse si realmente todas las moléculas conservan el residuo de cisteína C-terminal, particularmente en el caso del T9.

En la **figura 4.14** se presentan los cromatogramas de las reacciones de T9-Cys con OVA A, B y C. Se puede apreciar que en todos aparece un doble pico en el rango de los 14 y los 15 mL, correspondiendo a los estados dímérico y monomérico, respectivamente, del nanobody T9-Cys libre. Los picos identificados a menor volumen de elución representan los productos de conjugación, que como puede apreciarse tienden a ser de mayor peso molecular (menor  $V_e$ ) a medida que se aumenta el grado de activación de OVA en la reacción, en concordancia con lo observado en la **figura 4.11**.



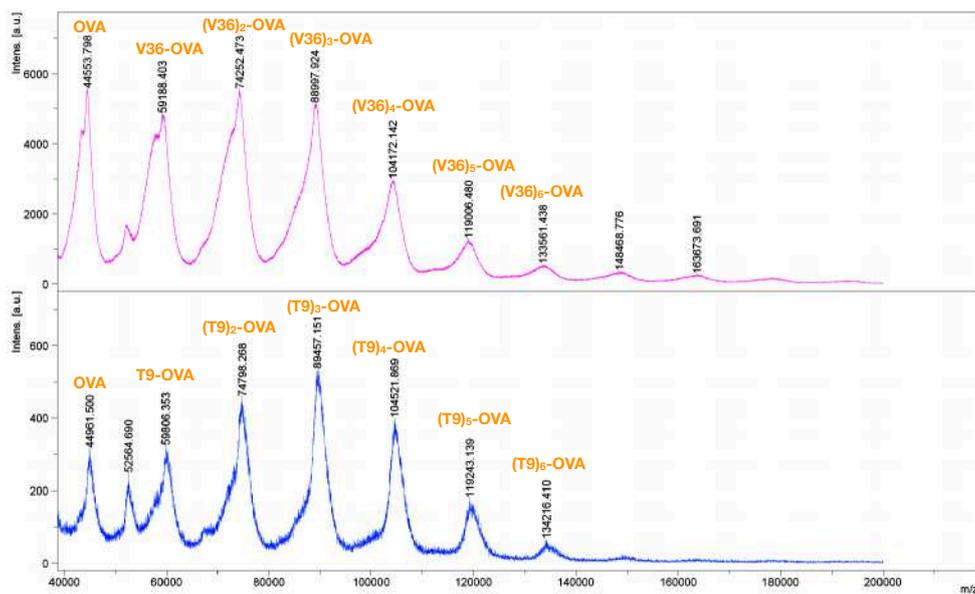
**Figura 4.14.** Cromatogramas de SEC de las reacciones A, B y C de OVA con nanobody T9-Cys. La cromatografía se realizó en una columna Superosa 12 a un flujo de 0.75 mL/min.

También se caracterizó la reacción de OVA-B con V36-Cys, en las mismas condiciones que se realizó para la reacción con T9-Cys, pero a mayor escala. Se colectó un pico ancho centrado en los 11.56 mL de volumen de elución (**figura 4.15a**) correspondiente a los productos de conjugación. Al realizar una corrida electroforética de esta fracción en condiciones reductoras, se observa que el producto se disocia, confirmando la unión a través de enlace disulfuro (**figura 4.15b**).



**Figura 4.15. a)** Cromatograma de SEC de la reacción de V36-Cys con OVA-B. La cromatografía se realizó en una columna Superosa 12, en PBS, a un flujo de 0.75 mL/min. **b)** SDS-PAGE de la reacción con y sin agente reductor, comparada con OVA-B.

Los productos de conjugación de OVA-B con T9-Cys y V36-Cys se caracterizaron por MALDI-TOF (**figura 4.16**). Pueden apreciarse picos correspondientes a proteínas con distinto peso molecular: OVA no conjugada (45 kDa), y conjugados con masas moleculares de  $(45 + n \cdot 15)$  kDa, siendo  $n$  el número de moléculas de nanobody asociadas. Por ejemplo, el pico de  $m/z = 89$  kDa representa el producto de conjugación de OVA con 3 moléculas de nanobody.

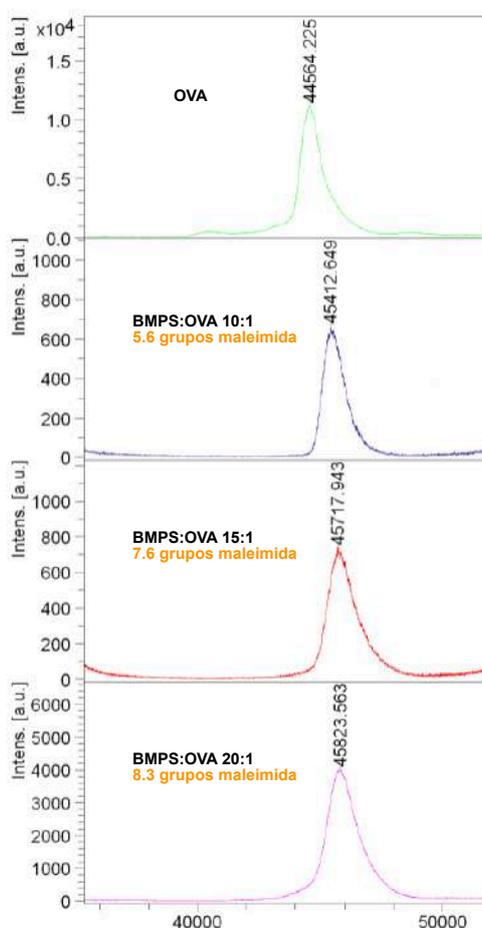


**Figura 4.16.** Espectros de masas MALDI-TOF de las reacciones de conjugación de OVA-B a V36-Cys y a T9-Cys.

#### 4.1.8 Activación de ovoalbúmina con el reactivo heterobifuncional BMPS y conjugación a Nb-Cys vía enlace tioéter

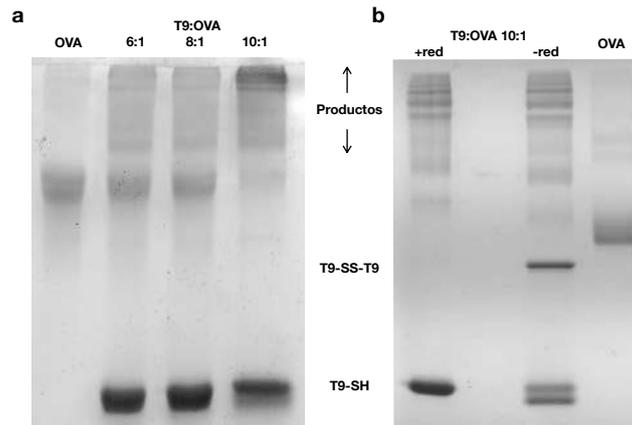
El reactivo BMPS se adquirió posteriormente como una mejor alternativa al SPDP debido a que la conjugación proteína-proteína se da a través de un enlace tioéter, no reducible, lo cual garantiza la obtención de un producto más estable para ser utilizado en experimentos de inmunización.

Se evaluaron distintas relaciones molares BMPS:OVA por espectrometría de masas (**figura 4.17**). La estimación del número de grupos maleimida por molécula de OVA se obtiene de la diferencia de masa respecto a la proteína sin conjugar y considerando un cambio de masa de +151 Da por cada grupo amino activado.



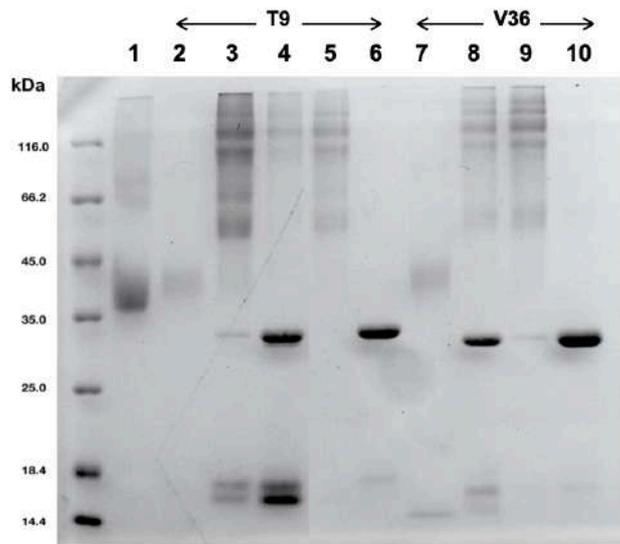
**Figura 4.17.** Espectros de masas MALDI-TOF de OVA activada con BMPS en distintas relaciones molares y OVA sin activar.

Se procedió a trabajar con OVA tratada con BMPS 10:1 (5-6 grupos maleimida), buscando un compromiso entre lograr una proteína con varias copias de nanobody, pero no demasiadas para no correr el riesgo de enmascarar epítopes de la OVA. En primer lugar se realizaron pruebas de conjugación al nanobody T9-Cys evaluando tres relaciones molares (**figura 4.18a**). Para relaciones T9:OVA de 6:1 y 8:1 la eficiencia de la reacción es baja, puesto que se observa claramente la banda correspondiente a OVA en el gel de SDS-PAGE. Los productos de la relación 10:1 —equivalente a una relación 2:1 respecto al número de grupos maleimida— mostraron la mayor eficiencia de reacción. Éstos se corrieron en presencia o ausencia de agente reductor en el buffer de carga de SDS-PAGE, y no se observa disociación de OVA y T9 como es de esperar para la conjugación vía enlace tioéter.



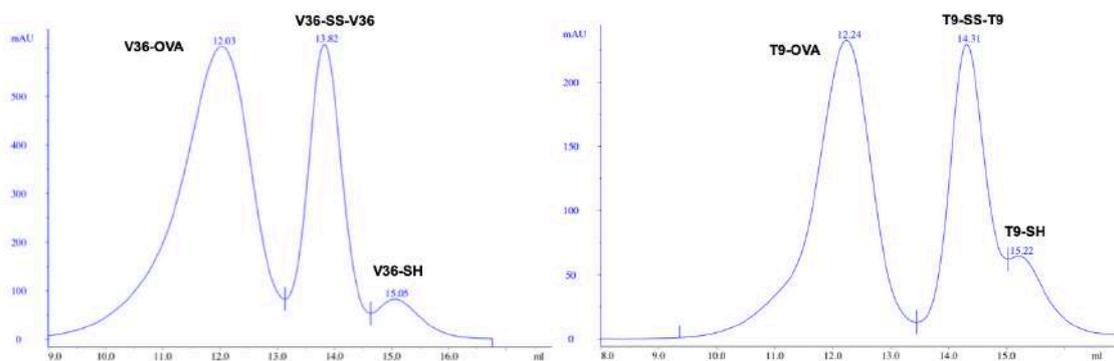
**Figura 4.18.** a) SDS-PAGE de la reacción de OVA activada con BMPS 10:1, con distintas relaciones molares del nanobody T9-Cys. b) SDS-PAGE de la reacción de OVA activada con BMPS con T9-Cys en una relación molar T9:OVA de 10:1, con o sin agente reductor.

Para la producción a mayor escala, los nanobodies T9-Cys y V36-Cys, previamente reducidos, se conjugaron a OVA activada por BMPS en una relación molar de 10:1. Los productos se purificaron en dos pasos, primero por cromatografía de afinidad por Ni-NTA, y segundo por gel filtración. En el primer paso se busca eliminar moléculas de OVA no conjugadas a nanobody, que por su carencia de una cola de polihistidina no interaccionan con la columna. En el segundo paso se pretende separar los productos de conjugación de nanobodies sin reaccionar, gracias a la diferencia significativa de tamaños. En la **figura 4.19** se muestran los resultados de SDS-PAGE con las distintas muestras a lo largo del proceso de purificación. Como se esperaba, en la fracción no unida de la cromatografía de afinidad se obtiene únicamente una banda que coincide con OVA, mientras que en la elución con 500 mM de imidazol se obtienen los productos de conjugación y nanobody libre (monomérico y dimérico). Además, se logró separar exitosamente los productos de conjugación del nanobody libre por gel filtración (carriles 5 y 9).



**Figura 4.19.** SDS-PAGE en condiciones no reductoras. 1: OVA-maleimida. 2: Fracción no unida de la cromatografía en columna de Ni-NTA. 3: Primer pico de elución con 500 mM de imidazol del conjugado T9-OVA. 4: Segundo pico de elución. 5: Purificación por gel filtración. 6: T9-Cys. 7: Fracción no unida de la cromatografía en columna de Ni-NTA. 8: Eluido de la columna de Ni-NTA. 9: Eluido gel filtración. 10: V36-Cys.

Los cromatogramas obtenidos de la gel filtración se muestran en la **figura 4.20**. Se puede apreciar que los productos de conjugación que eluyen a menor volumen de elución, se resuelven satisfactoriamente de los nanobodies libres. La amplitud de los picos evidencia la heterogeneidad de tamaños de los productos de conjugación. En base al volumen de elución en el centro de los picos e interpolando en la curva de calibración de la **figura 4.12**, se estima que se obtienen moléculas de OVA conjugadas a 3.4 moléculas de V36 y a 2.5 moléculas de T9.



**Figura 4.20.** Cromatogramas de gel filtración de los productos de conjugación de OVA a los nanobodies V36-Cys y T9-Cys tras su pasaje por una columna de Ni-NTA. La cromatografía se realizó en una columna Superosa 12, con PBS como buffer y a una velocidad de 0.75 mL/min.

Nuevamente queda en evidencia la mayor capacidad de V36-Cys para reaccionar a través del grupo tiol libre. Por un lado, los productos de conjugación V36-OVA están enriquecidos en moléculas de mayor peso molecular en comparación a la conjugación T9-OVA, y por otro lado, la fracción de nanobody V36 sin reaccionar presenta una relación dímero/monómero notoriamente mayor. Esto lleva a pensar que únicamente las moléculas en forma de dímero, una vez reducidas, son reactivas, y no los monómeros preexistentes. De hecho, al incubar OVA activada por BMPS con T9-Cys no reducido previamente, no se observa la formación de productos de conjugación por SDS-PAGE (figura 4.21).

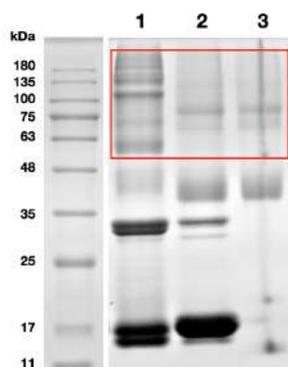


Figura 4.21. 1: OVA incubada con T9-Cys previamente reducido. 2: OVA incubada con T9-Cys no reducido. 3: OVA activada con BMPS 10:1. Marcador de peso molecular preteñido (Maestrogen #02101-250).

Los productos purificados se cuantificaron por BCA y se determinó que se obtuvieron 1.7 mg de V36-OVA y 0.5 mg de T9-OVA, partiendo de reacciones con 1.5 mg de OVA y 5 mg de nanobody. La baja recuperación de T9-OVA se debió particularmente a problemas de manipulación durante la cromatografía de afinidad, y también puede adjudicarse a que la eficiencia de conjugación T9-Cys-OVA fue más baja que la de V36-Cys-OVA.

La estimación del rendimiento en términos molares sería lo más correcto para comparar la cantidad de OVA de partida con la cantidad de OVA conjugada recuperada de la purificación, puesto que se trata de especies de diferente peso molecular. Sin embargo, la heterogeneidad de los productos dificulta esta aproximación. Si tomamos el caso de V36-OVA, y estimamos que en promedio los productos de conjugación corresponden a 3 moles de V36 por cada mol de OVA, entonces tenemos un producto final de 90 kDa, donde el 50% del peso molecular es representado por OVA. Por lo tanto, esto significa una recuperación

de  $1.7/2 = 0.85$  mg de OVA, es decir, un 56% de recuperación respecto a la cantidad inicial de 1.5 mg. Sabemos que parte de esta pérdida es OVA no conjugada, la cual se obtuvo en la fracción no unida de la cromatografía de afinidad. El resto podría ser pérdida del propio producto de conjugación inherente al pasaje por ambas columnas.

Por otro lado, el gasto de nanobody parece excesivo en relación a cantidad recuperada de producto. Como se determinó en las pruebas de conjugación a pequeña escala, resulta inviable utilizar cantidades inferiores porque se ve afectada la eficiencia de la reacción con OVA, lo cual podría deberse a que una proporción importante de las moléculas de nanobody reaccionan entre sí formando dímeros, compitiendo con la reacción de interés. Tampoco se descarta la posibilidad de que la eficiencia de la reacción del nanobody con OVA se vea afectada por la presencia de DTT contaminante, asumiendo que éste no se hubiera eliminado totalmente en el paso de gel filtración posterior a la reducción de los dímeros Nb-SS-Nb. De todos modos, a pesar de la necesidad de utilizar grandes cantidades de nanobody, la fracción no conjugada a OVA puede recuperarse en forma pura de la cromatografía de gel filtración (**figura 4.19**, carriles 6 y 10) para volver a ser utilizada. Además, hay que considerar que el nivel de expresión tanto de T9-Cys como de V36-Cys es muy bueno, e incluso puede mejorarse trabajando con medios de cultivo que promuevan una alta densidad celular, como por ejemplo Terrific Broth.

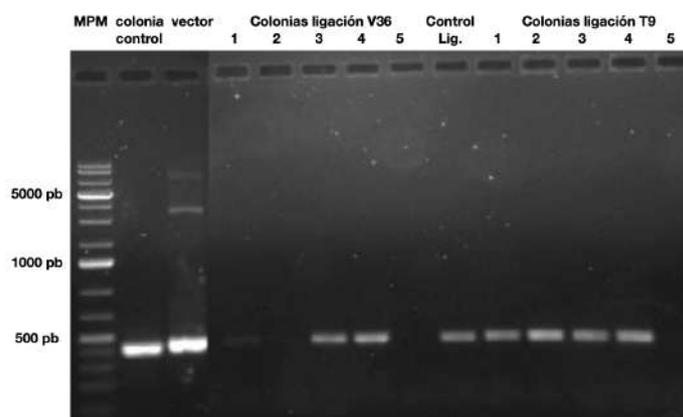
Si se planea utilizar estos conjugados para experimentos de inmunización en ratones, un último paso de purificación que se debe agregar es la remoción de las endotoxinas (lipopolisacárido) provenientes de *E. coli*. Éstas ejercen un potente efecto adyuvante que opacaría la inmunogenicidad propia de las proteínas quiméricas, además de resultar peligrosas para los animales. Como se encontraban disponibles en nuestro laboratorio, se utilizaron columnas de alta capacidad de remoción de endotoxinas (Pierce #88274), compuestas por resinas de poli( $\epsilon$ -lisina). La pérdida de producto en este paso fue de un 10%. No se determinó el contenido final de endotoxinas, sin embargo se estima que, de acuerdo a las propiedades de la columna, es posible remover más de un 99% de LPS del contenido inicial.

Tomando al producto V36-OVA como el mejor de los casos, se obtiene una cantidad final de 1.53 mg de proteína pura y libre de endotoxinas. Si se considera una dosis de inmunización alta, de 10 µg por ratón, habría producto suficiente para 153 administraciones. Extrapolando estos valores a la inversión de 14 mg de nanobody obtenido de 1 L de cultivo, se podría aspirar a cantidades suficientes para casi 430 administraciones.

## 4.2 Producción de antígenos quiméricos recombinantes: nanobodies de fusión a OVA y tiorredoxina

### 4.2.1 Clonado de T9 y V36 en vector pET-32a

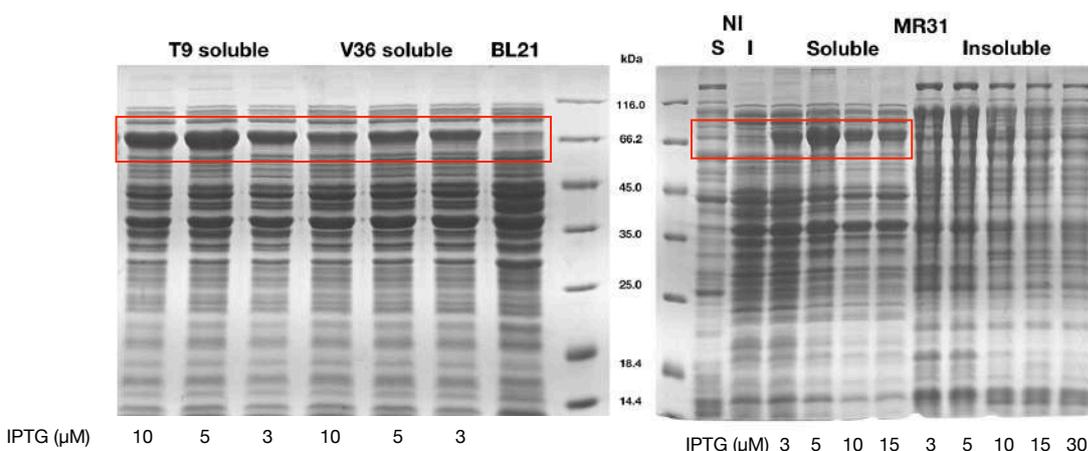
Como alternativa a la conjugación química, se estudió también la producción recombinante de quimeras antígeno-nanobody. Para esto, como se mencionó en la sección 3.8.1, se partió del vector pET-32a Trx-VHH-OVA portando el gen del nanobody MR31. Para producir quimeras con otros nanobodies, éstos se clonaron en el vector mediante digestión con SfiI, y por PCR de colonias con los primers Fw-5 y Rv-6 se identificaron los clones positivos de las ligaciones de T9 y V36 al vector pET-32a (**figura 4.22**). El proceso estuvo facilitado por el hecho de que el MR31 no puede ser amplificado por este par de primers, debido a los motivos expuestos en la sección 3.8.3. El ADN de los clones positivos (V36 3-4; T9 1-4) se extrajo por miniprep y se secuenció para confirmar la identidad de los mismos, para luego proceder a realizar pruebas de expresión.



**Figura 4.22.** Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR de colonias realizadas para evaluar el clonado de los nanobodies T9 y V36 al vector pET-32a.

### 4.2.3 Expresión de quimeras recombinantes Trx-VHH-OVA en el citoplasma de *E. coli* BL21

En la **figura 4.23** se muestran los resultados de SDS-PAGE de las pruebas de expresión realizadas a pequeña escala en LB-ampicilina a 28°C ON, a distintas concentraciones de IPTG. Como puede apreciarse para los tres clones, hay expresión en forma soluble de una proteína superior a 66 kDa que bien puede corresponderse con la quimera Trx-VHH-OVA de 75 kDa. La mejor condición para los clones con los VHHs MR31 y T9 es de 5  $\mu$ M IPTG, y no se observan diferencias apreciables para el clon con V36 en las condiciones ensayadas.

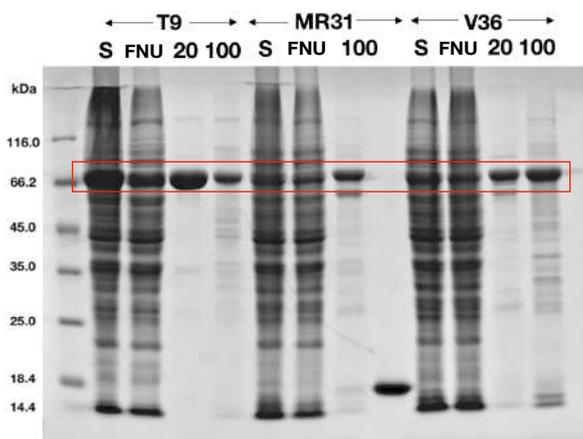


**Figura 4.23.** SDS-PAGE reductora de pruebas de expresión de quimeras Trx-VHH-OVA en *E. coli* BL21(DE3). S: soluble. I: insoluble. NI: no inducido. BL21: células no transformadas.

En vista de estos resultados, se procedió a realizar una producción a mayor escala de las tres proteínas, en cultivos de 200 mL. La lisis se realizó por sonicado en PBS y los sobrenadantes se purificaron por cromatografía IMAC puesto que las construcciones presentan un tag de 6xHis entre la secuencia de tiorredoxina y el VHH. Las fracciones eluidas se dializaron en el buffer para la enzima enteroquinasa (EK) con la cual se trabajó posteriormente.

Las quimeras con T9 y V36 se eluyeron en dos fracciones, con 20% de buffer B (equivalente a 100 mM de imidazol) y con 100% de buffer B (500 mM de imidazol), esta última con un mayor contenido de bandas contaminantes evidenciadas por SDS-PAGE (**figura 4.24**). La quimera con MR31 se eluyó con 500 mM de imidazol en dos picos distinguidos por el seguimiento de absorbancia a 280 nm. El primer pico se corresponde con la banda de 75 kDa observada en el gel, típica de la proteína esperada, pero el segundo pico revela un fragmento de aproximadamente 18 kDa. El mismo podría ser un producto de degradación por proteasas de *E. coli* de la proteína de 75 kDa,

y siendo que fue retenido en la columna, se asume que el fragmento incluye el tag de 6xHis. Por espectrometría de masas se verificó que corresponde a una proteína de 15 kDa.



**Figura 4.24.** SDS-PAGE reductora de la purificación de las quimeras recombinantes Trx-VHH-OVA por IMAC. S: sobrenadante del lisado bacteriano. FNU: fracción no unida. 100: elución con 100% de buffer B. 20: elución con 20% de buffer B.

La estimación de la concentración proteica se realizó mediante medidas de absorbancia a 280 nm y aplicando los coeficientes de extinción molar teóricos. En la **Tabla 4.1** se resumen los resultados. Para la proteína Trx-T9-OVA se obtuvo el mayor rendimiento.

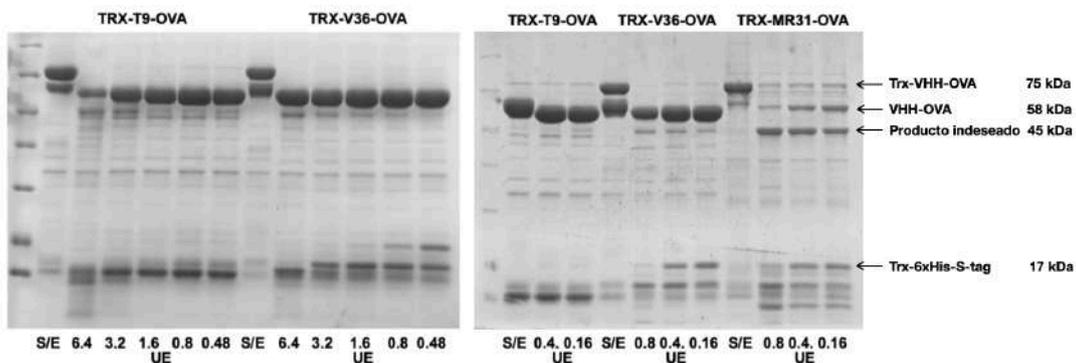
Se continuó trabajando con las fracciones eluidas con 20% de buffer B en el caso de las quimeras Trx-T9-OVA y Trx-V36-OVA ya que presentan menor cantidad de bandas de proteínas contaminantes. De todas maneras, hubiese sido prudente realizar lavados más exhaustivos de la columna.

**Tabla 4.1.** Rendimientos de la purificación de las quimeras recombinantes.

	Abs 280 nm	Coefficiente de extinción teórico ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	PM (Da)	Concentración estimada (mg/mL)	Volumen (mL)	Cantidad estimada (mg)	Cantidad estimada (mg/L de cultivo)
<b>TRX-T9-OVA 20%B</b>	3.07	65320	75113.45	3.53	2.0	7	<b>35</b>
<b>TRX-V36-OVA 20%B</b>	1.24	65320	74995.48	1.42	2.0	2.8	<b>14</b>
<b>TRX-MR31-OVA 100%B (pico 1)</b>	2.186	68300	75134.19	2.40	1.0	2.4	<b>12</b>

#### 4.2.4 Evaluación de la digestión con enteroquinasa a pequeña escala

Para obtener las quimeras VHH-OVA se eliminó la secuencia de tiorredoxina A, para lo cual existe un sitio de digestión para la proteasa enteroquinasa ( $^{154}$ DDDDK $^{158}$ †). Se llevaron a cabo reacciones a pequeña escala, con 12.5 µg de proteína a 1.25 mg/mL y distintas cantidades de enzima, incubando a 25°C, 16 horas. En la **figura 4.25** se muestran los resultados de SDS-PAGE de las primeras pruebas realizadas con las proteínas Trx-VHH-OVA. Para las muestras no tratadas con enzima (S/E), se observa una doble banda a la altura de los 66 kDa, la de mayor peso molecular corresponde a la proteína total de 75 kDa, mientras que la de menor peso molecular podría ser un producto de degradación espontánea o por proteasas de *E. coli* que se vea favorecida por la incubación a temperatura ambiente. Al observar las muestras tratadas con enzima, aparece una nueva banda de peso molecular ligeramente menor, que bien podría corresponderse con el fragmento deseado VHH-OVA cuyo peso molecular se predice en 58 kDa. Si la proteína se digiriera en un único sitio, es de esperar que se libere un segundo fragmento de 17 kDa constituido por tiorredoxina seguida de un tag de 6xHis y un péptido S-tag. Como se indica en la figura, es posible que este fragmento se corresponda con la banda a la altura de 18.4 kDa, que está presente en algunas muestras tratadas con cantidades bajas de enzima, lo que podría indicar que con cantidades mayores se obtienen productos de degradación inespecífica, de menor peso molecular.

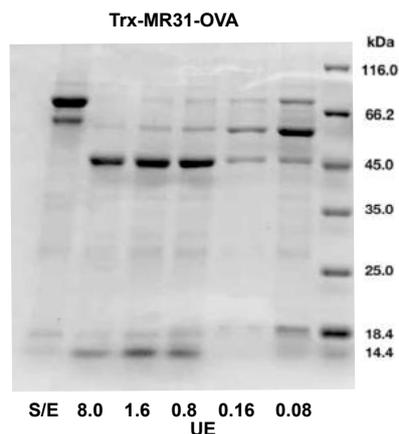


**Figura 4.25.** SDS-PAGE de pruebas de digestión de las quimeras Trx-VHH-OVA con la enzima enteroquinasa (NEB #P8070S), realizadas en termociclador a 25 °C, 16 horas. En el gel de la izquierda se muestran las digestiones de Trx-T9-OVA y Trx-V36-OVA con cantidades de 6.4, 3.2, 1.6, 0.8 o 0.48 unidades de enzima (UE) cada 12.5 µg de proteína. En el gel de la derecha se muestran las digestiones de las mismas proteínas y también de Trx-MR31-OVA, pero con cantidades inferiores de enzima. S/E: incubación sin enzima.

Observando los carriles correspondientes a T9 y V36, puede sugerirse que la digestión en el sitio de interés es prácticamente 100% eficiente en las condiciones de 6.4 a 0.48 UE, pero se mantiene una buena eficiencia de digestión a cantidades tan bajas como 0.16 UE. El patrón de bandas observado para la proteína con V36 es similar al de la

proteína con T9. Sin embargo, la proteína con MR31 (anti-CD11c) presenta un resultado desalentador, puesto que gran parte de este sustrato es sobredigerido a un producto de 45 kDa (que aparece en baja proporción para los otros nanobodies), y la banda correspondiente al producto de interés (58 kDa) aparece en menor proporción en comparación a las reacciones con Trx-T9-OVA y Trx-V36-OVA. Cabe cuestionarse si la secuencia de aminoácidos del nanobody MR31 presenta otro sitio proclive a ser digerido por enteroquinasa, además del sitio específico  $^{154}$ DDDDK $^{158}$ .

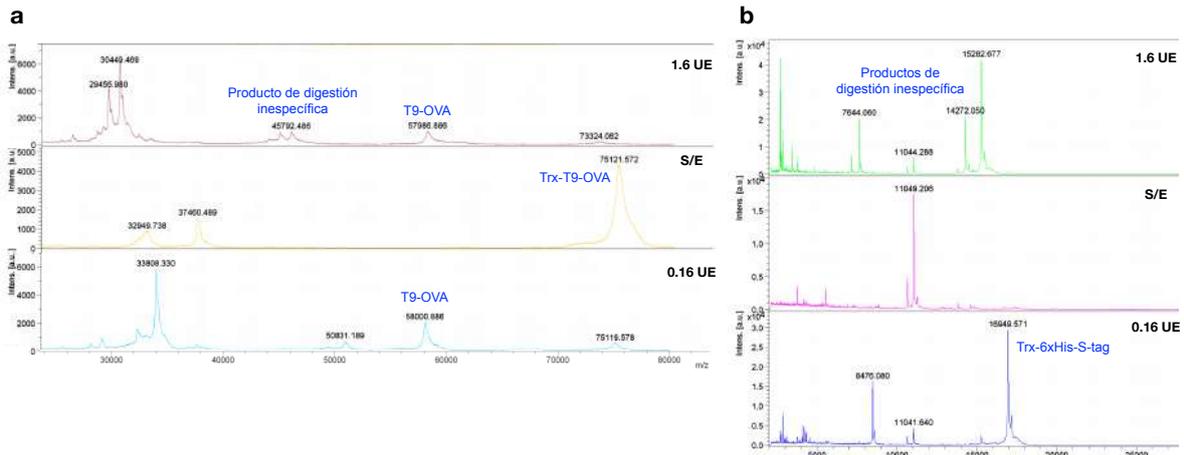
Al realizar una prueba de digestión de Trx-MR31-OVA con una cantidad de enzima aún menor, de 0.08 unidades, se obtiene una mayor proporción del producto de 58 kDa respecto al de 45 kDa, pero con una pérdida en la eficiencia de digestión (**figura 4.26**). La disminución del tiempo de incubación también fue una variable evaluada, pero no se logró modificar el patrón de digestión por incubación durante tiempos menores (1, 2, 3, 4 y 5 horas).



**Figura 4.26.** SDS-PAGE de pruebas de digestión de Trx-MR31-OVA con unidades de enzima (UE) de 8.0 a 0.08, o sin enzima (S/E), realizadas en termociclador a 25 °C, 16 horas.

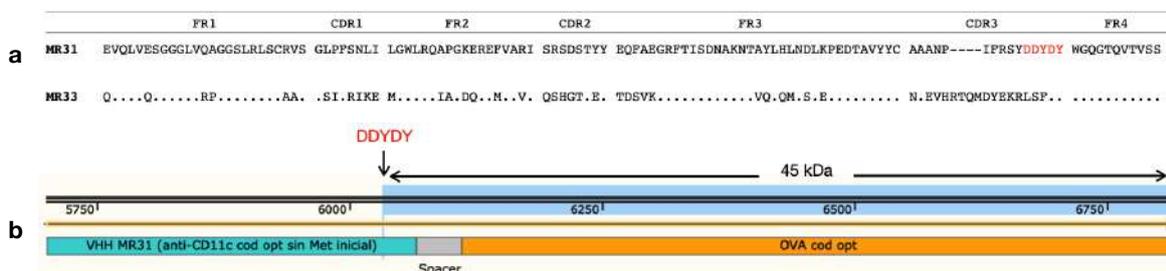
El análisis por SDS-PAGE se complementó con el análisis por espectrometría de masas, que permite asignar con precisión los pesos moleculares a los productos obtenidos. En la **figura 4.27a** puede apreciarse claramente que en el espectro de masas correspondiente a Trx-T9-OVA sin digerir se destaca un pico de relación m/z de 75121, acorde al peso molecular esperado de 75 kDa. La señal de este producto disminuye notoriamente en las muestras tratadas con 1.6 o 0.16 UE, mientras aparece un producto de aproximadamente 58 kDa correspondiente al fragmento deseado T9-OVA. En la muestra tratada con 1.6 UE, se confirma la presencia de un producto de digestión inespecífica de 45 kDa. En la **figura 4.27b** se aprecian los productos de digestión en un

rango de relación m/z de 0 a 20000. En la muestra tratada con 0.16 UE se identifica claramente un pico de 17 kDa que bien podría corresponder al segundo fragmento liberado por la digestión en el sitio específico y que comprende la secuencia Trx-6xHis-S-tag. Éste producto no se observa cuando la digestión se realiza con 1.6 UE, sino que aparecen productos de menor peso molecular sugiriendo digestión inespecífica. Los picos no identificados en los espectros podrían corresponder a proteínas contaminantes.



**Figura 4.27.** Espectros de masas MALDI-TOF adquiridos para las reacciones de digestión de Trx-T9-OVA con 1.6 o 0.16 UE, y espectro de la proteína sin digerir. **a)** Rango m/z de 20000-80000. **b)** Rango m/z de 2000-40000.

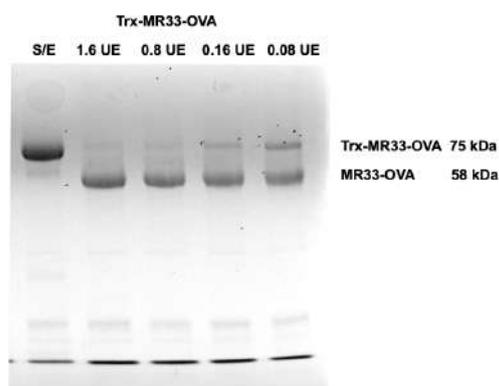
Debido a que los inconvenientes que se presentaron en la digestión de la proteína Trx-MR31-OVA no lograron superarse, se procedió a clonar el VHH anti-CD11c denominado MR33. En el CDR3 de MR31 se identifica una secuencia de aminoácidos DDYDY (**figura 4.28a**), que por su similitud al sitio de corte enteroquinasa DDDDK y por su ubicación (**figura 4.28b**), podría ser la secuencia responsable de promover la digestión que resulta en un producto de 45 kDa. Esta secuencia no está presente en MR33.



**Figura 4.28.** **a)** Secuencias proteicas de los nanobodies anti-CD11c MR31 y MR33, alineadas. Se identifican las regiones framework y los CDRs. Los puntos indican aminoácidos idénticos. En rojo se resalta el posible sitio de corte indeseado en la secuencia del MR31, que daría lugar al producto de 45 kDa. **b)** Localización de la secuencia DDYDY en la construcción Trx-MR31-OVA.

La quimera Trx-MR33-OVA se logró producir en condiciones similares a Trx-MR31-OVA, habiendo optimizado previamente la concentración de IPTG, excepto que se obtuvieron peores rendimientos, recuperando aproximadamente 2 mg de 500 mL de cultivo.

La digestión de Trx-MR33-OVA con enteroquinasa resulta en el producto esperado de 75 kDa para todas las condiciones ensayadas (1.6, 0.8, 0.16 y 0.08 UE), y no hay evidencia del producto de 45 kDa (**figura 4.29**). Por lo tanto, se continuó trabajando con este nanobody en lugar del MR31.

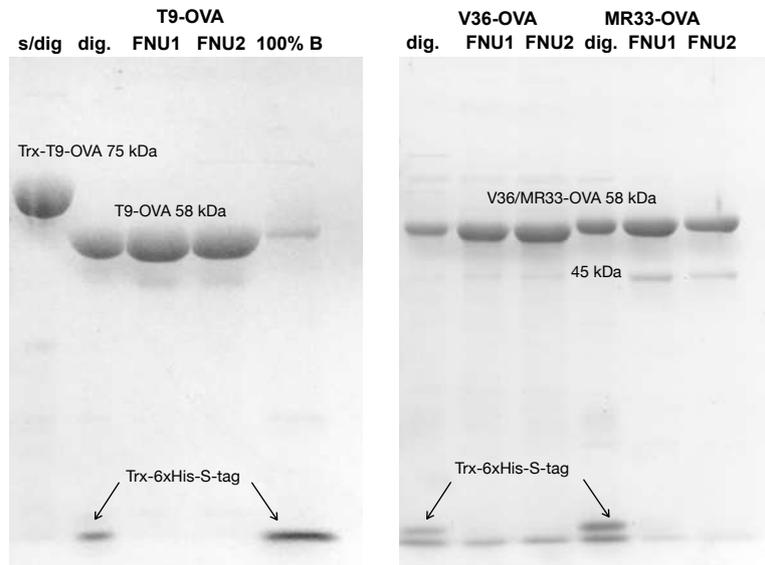


**Figura 4.29.** SDS-PAGE de reacciones de digestión de Trx-MR33-OVA con EK, realizadas en 30  $\mu$ L con 25  $\mu$ g de proteína y 1  $\mu$ L de enzima, a 25  $^{\circ}$ C, 16 horas.

#### 4.2.5 Digestión a gran escala y purificación de los antígenos recombinantes VHH-OVA

Como se comentó en la sección 3.8.9., para la digestión a gran escala se utilizó una versión de enteroquinasa que presenta 6xHis tag (GenScript #Z03376), a modo de simplificar la purificación reduciéndola a un único paso cromatografía de afinidad Ni-NTA. Para ello se optimizó la reacción a pequeña escala de manera similar a como se hizo con la enteroquinasa de NEB, y se determinó que la relación m/m óptima a utilizar es de 1:800 (EK:proteína). En la **figura 4.30** se muestran los resultados de la purificación realizada mediante incubación en batch de las quimeras con resina de Ni-NTA, evaluada por SDS-PAGE. Se logró obtener los productos de interés VHH-OVA libres del fragmento con Trx, el cual se retiene en la resina y es eluido al aumentar la concentración de imidazol (100% B). En el caso de V36-OVA, se observan dos bandas de peso molecular pequeño que eluyeron en la fracción no unida, que podrían tratarse de productos de sobredigestión del fragmento con Trx, que no conservaron la cola de polihistidina. Con respecto a MR33-OVA, si bien en la digestión a pequeña escala no se

observaron productos de sobredigestión de 45 kDa, sí se observan en las fracciones 1 y 2 de la purificación. De todos modos, la proporción es mucho menor que la observada para MR31-OVA.



**Figura 4.30.** SDS-PAGE de la purificación de quimeras recombinantes digeridas a gran escala con EK-His, a una relación m/m de 1:800. FNU: fracción no unida, colectada en fracciones 1 y 2. 100% B: fracción eluida con 500 mM de imidazol.

Para la quimera T9-OVA se obtuvo un buen rendimiento: a partir de 1620  $\mu\text{g}$  de Trx-T9-OVA digerida, cantidad equivalente a  $2.2 \times 10^{-8}$  mol, se recuperaron 1024  $\mu\text{g}$  de T9-OVA luego del pasaje por la resina de Ni-NTA, cantidad equivalente a  $1.8 \times 10^{-8}$  mol. Esto se traduce en un rendimiento del 82%.

Por último, para todos los antígenos se realizó un paso de eliminación de endotoxinas a través de las columnas de poli( $\epsilon$ -lisina) mencionadas en 4.1.8.

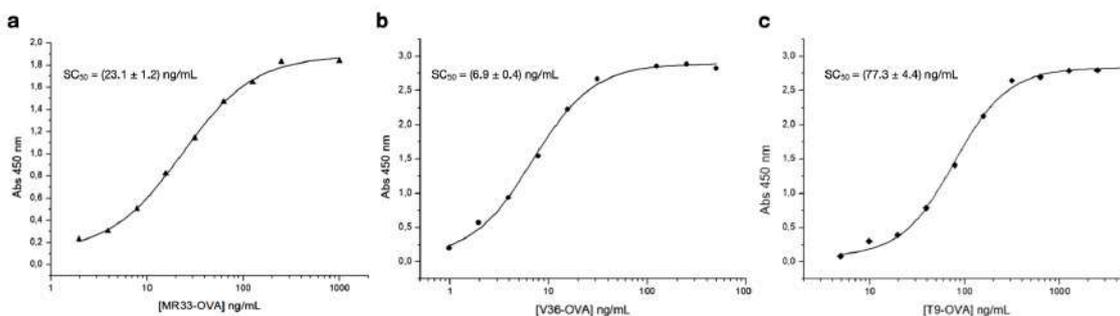
En la **Tabla 4.2** se calcula el rendimiento total de la producción de los antígenos quiméricos recombinantes en base a los rendimientos molares. En el caso de V36-OVA y MR33-OVA se observó precipitación en la resina, determinando una baja recuperación. De todas maneras, para fines de inmunización de ratones con dosis altas de 10  $\mu\text{g}$  de antígeno, esta estrategia de producción es más que satisfactoria.

**Tabla 4.2.** Rendimiento de la producción de las quimeras recombinantes T9-OVA, V36-OVA y MR33-OVA libres de endotoxinas. \*Se calcula en base a los rendimientos descritos en la Tabla 4.2 y se corrige por el PM.

	Cantidad purificada del extracto citoplasmático (mg/L de cultivo)*	Rendimiento purificación post-digestión (%)	Rendimiento post-eliminación de endotoxinas (%)	Rendimiento acumulado (%)	Cantidad total de antígeno quimérico para inmunización (mg/L de cultivo)
<b>T9-OVA</b>	27	82	65	53	<b>14.3</b>
<b>V36-OVA</b>	10.8	51	68	35	<b>3.9</b>
<b>MR33-OVA</b>	3	21	100	21	<b>0.63</b>

#### 4.2.6 Evaluación de la reactividad de las quimeras recombinantes por ELISA

Las tres quimeras recombinantes digeridas y purificadas demostraron ser reactivas contra sus respectivos blancos por ELISA (**figura 4.31**). Los heterodímeros recombinantes CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18) se reconocieron en un formato de captura con un nanobody anti-CD18 de forma que se conserva en gran medida la estructura nativa de los mismos. Sin embargo, no fue posible realizar una comparación con los nanobodies monoméricos producidos en periplasma debido a la falta de un tag en común con las construcciones quiméricas.



**Figura 4.31.** Reactividad por ELISA de las proteínas quiméricas recombinantes VHH-OVA. **a)** y **b)** Captura del antígeno CR4 o CR3 (2  $\mu\text{g/mL}$ ) mediante sensibilización con 2  $\mu\text{g/mL}$  de estreptavidina y 2  $\mu\text{g/mL}$  de IB7 (nanobody anti-CD18 biotinilado), y diluciones seriadas de MR33-OVA (**a**) o V36-OVA (**b**). **c)** Sensibilización con 2  $\mu\text{g/mL}$  del antígeno TCC-BSA y diluciones seriadas de T9-OVA. En los tres casos la detección de las quimeras se realizó incubando con un suero de conejo policlonal anti-OVA 1/500, seguida de incubación con un anticuerpo IgG de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa 1/4000 (Southern Biotech #4030-05).

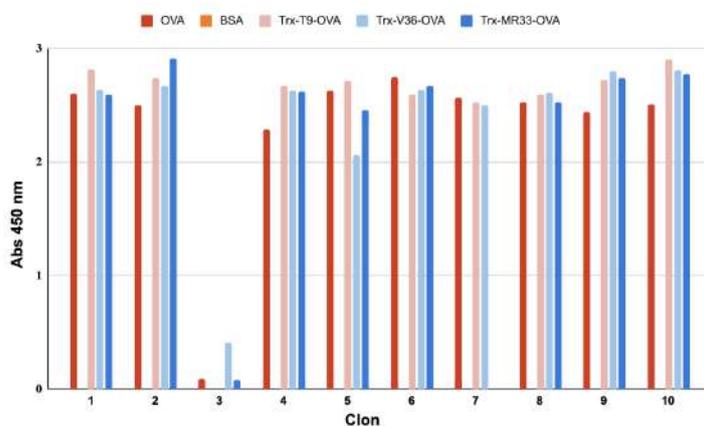
Se puede realizar una aproximación comparando el parámetro  $SC_{50}$  de la curva de T9-OVA con la curva de T9 (**figura 4.7**), con valores de 7s7 ng/mL y 48 ng/mL, respectivamente. En términos molares éstos equivalen a 1.3 nM (quimera) y 3.2 nM (monómero). La aparentemente mejor afinidad de la quimera podría deberse al método de detección: la señal es amplificada porque se usa un suero policlonal anti-OVA (varios

sitios de unión en la quimera), en contraste con la detección de T9 monomérico con anti-His (1 a 1).

### 4.3 Selección de VHHs anti-OVA por *phage display*

Para la evaluación de la reactividad de las quimeras anti-CD11c y anti-CD11b contra sus receptores celulares mediante citometría de flujo con células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de ratón, se realizó una selección de nanobodies anti-OVA por la técnica de *phage display*.

A partir de una biblioteca de  $1.6 \times 10^{10}$  fagos/mL, se obtuvo un total de  $2.8 \times 10^8$  fagos/mL en el output de la segunda ronda de panning. En el screening de 10 clones seleccionados al azar a partir de este output, se encontraron nueve clones positivos contra OVA nativa y que también reaccionaron contra la OVA recombinante de las proteínas Trx-VHH-OVA (**figura 4.32**). Ninguno de éstos reaccionó contra la proteína BSA que se usó para bloqueo. El resultado de la **figura 4.32** corresponde a ensayos con los sobrenadantes de cultivos incubados directamente, aunque también se ensayaron diluciones 1/10 y 1/100 observando saturación de la señal de absorbancia.



**Figura 4.32.** Screening de 10 clones de VHHs seleccionados al azar a partir del output de la segunda ronda de panning, expresados a partir del vector pComb3X. La absorbancia a 450 nm corresponde a ensayos ELISA realizados contra OVA o quimeras recombinantes como antígenos de sensibilización, o BSA como control, con los sobrenadantes de los cultivos y detección con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (abcam #ab128131).

El ADN de los clones positivos fue secuenciado a partir del vector pComb3X, y las secuencias proteicas correspondientes se muestran en la **figura 4.33**. La secuencia del clon 1 no se incluye puesto que el resultado de la secuenciación no fue concluyente.

Con respecto a la diversidad de secuencias, el clon 2 y el clon 8 son prácticamente idénticos, difiriendo en el antepenúltimo residuo del CDR2 que resulta en un cambio de un aminoácido (treonina) por otro similar (serina). El resto de las secuencias son diferentes si se analizan las regiones de mayor variabilidad (CDRs), lo cual podría reflejar la diversidad de epítopes reconocidos por el conjunto de clones. En total se obtuvieron siete VHHs diferentes.

Curiosamente, en el FR2 del clon 6 se identifica un codón stop UAG (amber), a pesar de que el VHH fue funcional en el ensayo. Esto se explica porque la cepa de *E. coli* ER2738 con la cual se realizó el panning es de tipo supresora, lo que significa que no interpreta el codón amber como un codón stop, y en su lugar introduce el aminoácido glutamina. Sin embargo, en una cepa de *E. coli* no supresora como BL21(DE3) éste nanobody resultaría en una proteína truncada.

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
clon 2	MAEVLVESGGGLVQAGGSLRLSCTAS	GRT-FLYR	MGWFRQAPGNERELVA	AINRGGVTTY	YSDYVKGRETIISRDNAKKTVYLQMNSLKPEDTAVYSC	AASG----YGGMDISSQVHY	WGQGTQVTVSS (8)
clon 4	..Q.....	..AV..IIPSHNG	..A.....R.....	TVTSRGS-T	.A.S.....AV.....N.....	..F..NLAN-----EWSIRM	.....
clon 5	..Q...Q.....	..A.S.LG.FSN.A	..R...K...F	..SSTSSL.P	.A.SM.....N.....T.....	..Y..KWAPYSLTEVPSTTF.PD.	.....
clon 6	.....Q.....	..F.....A...SIGSIDY	..A.Y.*...K...F	..S.TV--QRAN	.A.SV.....EK.E..L...N..A.....	..Y..N.IIRE-----PMRDYAN.	.....
clon 7	.....D.....	..A...SFDS.A	..V..K...F	GCSWS.GL.N	.T.S.....N.....	..Y..DWAPYGSTOWS-DPRQ.D.	.....
clon 9	..Q...Q.....	..A...D.SSI	..K...S	..S.S.AS.	.....D.N..F.....	..T.....F.D....N.	.....
clon 10	..Q...Q.....	..P.....A...E.TSI	..RS..K...F	..S.S.AI.F	.....S.....S.....	..A.....P.....	.....

**Figura 4.33.** Secuencias proteicas de VHHs anti-OVA alineadas respecto al clon 2, elegido arbitrariamente. Los puntos marcan residuos idénticos a los correspondientes al clon 2. El clon 2 es el mismo clon que el 8, indicado entre paréntesis. El asterisco rojo indica la presencia de un codón stop en el clon 6. Los residuos recuadrados y marcados en azul son característicos de las secuencias de VHHs.

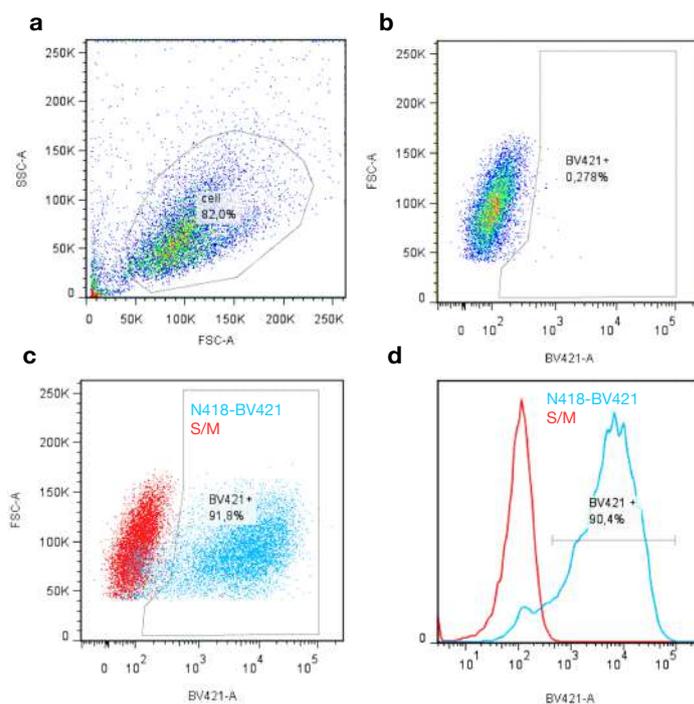
El clon 9, denominado OV9, se eligió al azar y se clonó en un vector de expresión pINQ y se produjo en forma biotinilada en la cepa BL21 pBir con un muy buen rendimiento, obteniendo aproximadamente 9 mg de nanobody purificado por IMAC (**figura 4.34**) a partir de 200 mL de cultivo. Éste fue utilizado en los experimentos de citometría de flujo con el objetivo de realizar la detección de las quimeras recombinantes mediante incubación con el nanobody biotinilado seguida de incubación con estreptavidina conjugada a ficoeritrina (STP-PE).



**Figura 4.34.** SDS-PAGE del nanobody OV9 biotinilado purificado por IMAC. FNU: fracción no unida.

#### **4.4 Análisis de la funcionalidad de los antígenos quiméricos por citometría de flujo con BMDC**

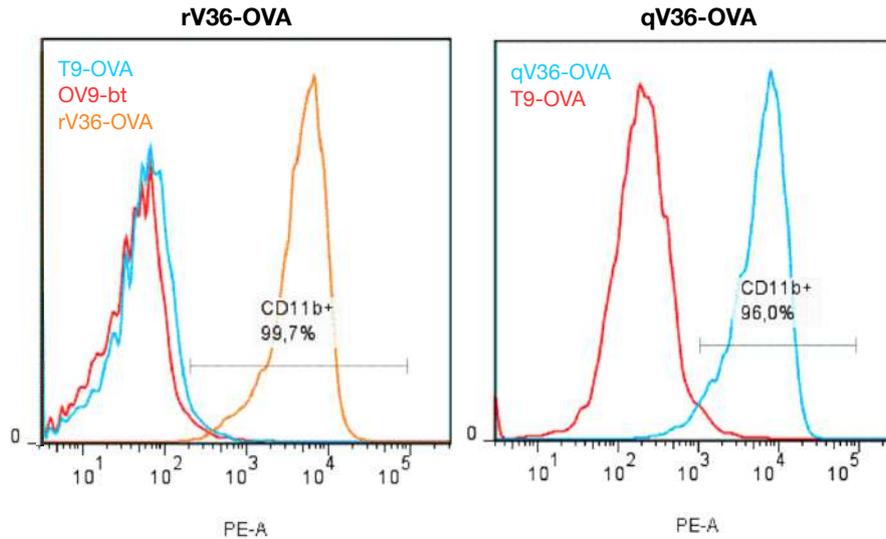
En primer lugar, el análisis por citometría de flujo de una muestra de BMDC sin marcar reveló una población de células que se representa en el gráfico de puntos de la **figura 4.35a**. Se seleccionó una ventana de células totales (cell) y a partir de ésta se definieron los eventos correspondientes a células individuales (singuletes). A continuación, se fijó un umbral para identificar células positivas para el fluoróforo BV421 (Brilliant Violet 421) (**figura 4.35b**). Con una muestra de células marcadas con el anticuerpo monoclonal N418 (anti-CD11c) conjugado a BV421, se determinó que un aproximadamente un 90% de las células totales fueron positivas para CD11c (**figuras 4.35c y 4.35d**). Típicamente las células dendríticas son distinguidas por la co-expresión de CD11c y de MHC de clase II [78], por lo que sería más correcto definir esta población utilizando anticuerpos para ambos marcadores. Sin embargo, como el objetivo de este experimento fue evaluar la funcionalidad de las quimeras anti -CD11b y -CD11c, no se intentó realizar el doble marcado.



**Figura 4.35.** **a)** Gráfico de puntos SSC vs. FSC representando la población total de BMDC. **b)** A partir de la ventana de células totales se definió una ventana de células positivas para BV421. **c)** En celeste, células marcadas con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del anticuerpo monoclonal N418 (anti-CD11c) conjugado a BV421, y en rojo células sin marcar (S/M). **d)** Histograma de las mismas muestras representadas en c. Cada muestra corresponde a una cantidad inicial de  $1.5 \times 10^5$  células.

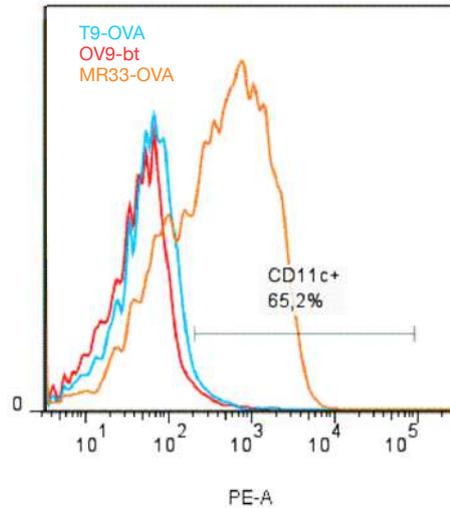
#### 4.4.1 Las quimeras V36-OVA y MR33-OVA reconocen a sus blancos celulares

Para analizar la unión de los antígenos quiméricos anti -CD11b y -CD11c a sus respectivos receptores, se realizó su detección con el nanobody OV9 biotinilado (OV9-bt) más STP-PE y se definió el umbral de células positivas para PE con una muestra control de células incubadas con OV9-bt y STP-PE o incubadas también con T9-OVA en el primer paso. Con respecto al histograma de T9-OVA, éste se solapa casi totalmente con el histograma correspondiente a OV9-bt+STP-PE, por lo tanto la unión inespecífica del nanobody T9 a la superficie de BMDC es despreciable, demostrando ser un buen control negativo para estas células blanco. Con las quimeras anti-CD11b de fusión recombinante (rV36-OVA) y de conjugación química (qV36-OVA) se logró identificar cerca de un 100% de células CD11b+ (**figura 4.36**), confirmando la reactividad de las mismas contra el receptor en su forma nativa y la funcionalidad del formato de detección. El nanobody OV9 resultó ser un reactivo útil e incluso se puede simplificar su aplicación poniendo a punto su conjugación directa a un fluoróforo.



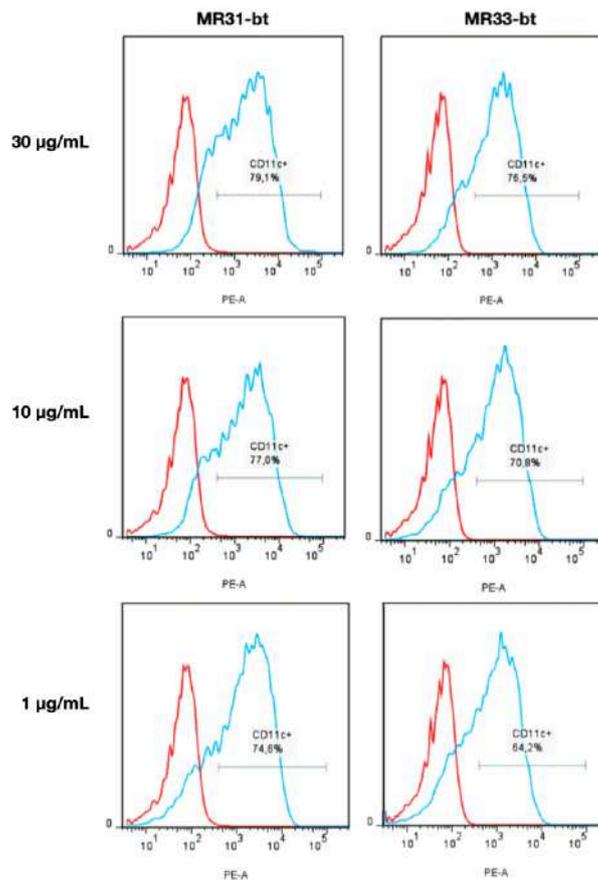
**Figura 4.36.** Histogramas correspondientes al marcado de BMDC ( $1.5 \times 10^5$  células por pocillo) con  $30 \mu\text{g/mL}$  de rV36-OVA o qV36-OVA. Ambas quimeras fueron detectadas en dos pasos de incubación con  $100 \mu\text{g/mL}$  de OV9-bt y con  $1 \mu\text{g/mL}$  de STP-PE (abcam #239759).

Con la quimera MR33-OVA se logró identificar un 65% de células CD11c+ (**figura 4.37**). Este porcentaje se encuentra alejado del 90% que se obtiene marcando con el anticuerpo N418, y no logró mejorarse incrementando la concentración de la quimera. Una razón que explica la diferencia observada es que la quimera se encuentra sometida a tres pasos de lavado (luego de su incubación, luego de la incubación de OV9-bt, y luego de la incubación de STP-PE), mientras que el anticuerpo N418 se somete a un único paso de lavado. Al repetir el experimento se incluyó un control de incubación con N418 y tres pasos de lavado, observando una disminución del 6% de células CD11c+, por lo tanto esto no explicaría en su totalidad el bajo porcentaje de marcado con MR33-OVA. Otra razón a tener en cuenta es que se trata de distintos fluoróforos (BV421 y PE), y por lo tanto el nivel de fluorescencia de cada uno podría determinar la sensibilidad de la detección.



**Figura 4.37.** Marcado de células CD11c+ con 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MR33-OVA. Detección en dos pasos de incubación con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de OV9-bt y con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de STP-PE (abcam #239759).

Por otro lado, también se realizó el marcado con los nanobodies MR31 y MR33 monoméricos y biotinilados (**figura 4.38**), obteniendo porcentajes que fueron mayores a los observados con MR33-OVA y nanobody OV9. Esto indica que la afinidad del nanobody OV9 utilizado para la detección de las quimeras también sería un factor que contribuye a disminuir el porcentaje de células marcadas. El resultado de la **figura 4.38** a su vez permitió evidenciar que el nanobody MR31 tendría una mayor afinidad que el MR33.

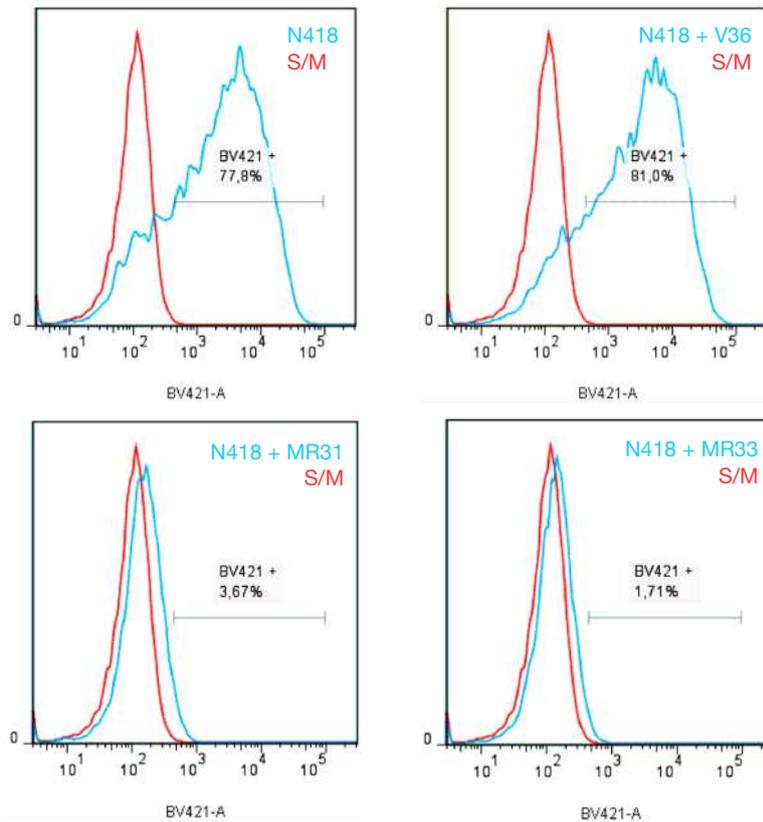


**Figura 4.38.** Marcado de células CD11c+ con nanobodies MR31 y MR33 biotinilados. Detección con 1 µg/mL de STP-PE (abcam #239759).

#### 4.4.2 El nanobody MR33 comparte epítopes con el anticuerpo monoclonal N418

En los trabajos previos realizados por el Dr. Rossotti con los nanobodies anti-CD11c [67], se determinó mediante ensayos de unión a BMDC que el nanobody MR31 inhibe la unión del anticuerpo monoclonal comercial anti-CD11c N418 —como se comentó en la introducción, éste ha sido ampliamente utilizado como anticuerpo para direccionamiento de antígenos a células dendríticas— indicando solapamiento de epítopes. Esta sería una cualidad promisorio del nanobody MR31, si se considera la posibilidad de que determinada región o regiones del receptor sean las responsables de promover la captación del antígeno y la activación de la CD al interactuar con el anticuerpo. Por lo tanto, es de interés evaluar si el nanobody MR33 también comparte epítopes con N418. Para ello se realizaron ensayos de inhibición de la unión de N418-BV421 a BMDC con ambos nanobodies y con el nanobody V36 como control negativo de inhibición. De acuerdo a los resultados de la **figura 4.39** se puede afirmar que tanto

MR33 como MR31 inhiben prácticamente al 100% la unión de N418 cuando éstos se agregan en exceso en el mismo paso de incubación. Este resultado apoya la hipótesis de que el menor porcentaje de células CD11c+ marcadas con los nanobodies monoméricos o con las quimeras en comparación al N418, sería atribuible al uso de diferentes fluoróforos y a la afinidad de los conjugados de detección (STP-PE y OV9-bt).



**Figura 4.39.** Inhibición del anticuerpo N418-BV421 en condiciones de no saturación (500 ng/mL) por los nanobodies MR31-bt (20 µg/mL) y MR33-bt (20 µg/mL). Se partió de una cantidad inicial de  $1.5 \times 10^5$  células/pocillo bloqueadas con suero normal de rata al 10%. El nanobody V36-bt (20 µg/mL) se utilizó como control negativo de inhibición. El anticuerpo N418-BV421 y el nanobody se incubaron en el mismo paso.

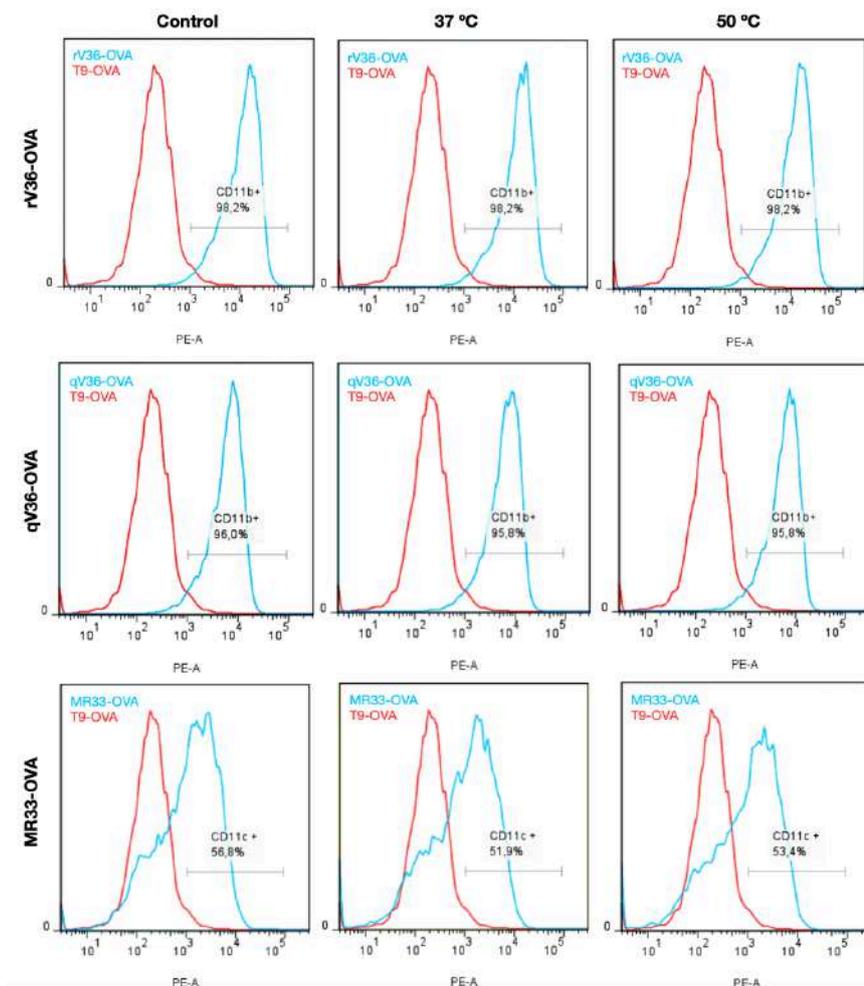
#### 4.4.3 Los antígenos quiméricos son estables a la incubación a 37 y 50°C

Como estos antígenos serán utilizados in vivo, es imprescindible que conserven su funcionalidad al menos en las condiciones de temperatura del organismo de un ratón. Por lo tanto, como forma de evaluar la estabilidad térmica de los antígenos quiméricos, éstos se sometieron a incubaciones de una hora a 37 °C o a 50 °C previo a su incubación con las células (**figura 4.40**). La proteína V36-OVA de fusión recombinante (rV36-OVA) así como la proteína de fusión química (qV36-OVA) conservaron enteramente su

capacidad de marcar células CD11b+ tras las incubaciones. Con respecto a MR33-OVA, se observó una sutil disminución del porcentaje de células CD11c+, pero de todas maneras demostró ser estable a las condiciones de incubación. Esto significa que no sólo los nanobodies mantienen su estructura nativa y por lo tanto su funcionalidad, sino que tampoco se ve alterado el epítipo de OVA que es reconocido por el nanobody OV9 para realizar la detección.

Los resultados se validaron con los nanobodies monoméricos producidos en periplasma como controles, los cuales demostraron mantener su capacidad de marcar.

Hay que considerar que en el caso de las muestras de rV36-OVA y qV36-OVA se trabajó con concentraciones de saturación, por lo tanto es probable que si una pequeña proporción de las moléculas se encuentra afectada ésta no se detecte en el ensayo.



**Figura 4.40.** Ensayos de estabilidad a dos temperaturas. Los antígenos quiméricos se incubaron durante 1 hora a 37 °C o a 50 °C y luego se realizó el marcado de BMDC de igual manera que en los experimentos descritos anteriormente. Concentraciones: rV36-OVA 15 µg/mL, MR33-OVA 15 µg/mL, qV36-OVA 25 µg/mL.

## **5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

En este trabajo se exploraron dos alternativas para la generación de antígenos fusionados a nanobodies, una vía de conjugación química a través de reactivos heterobifuncionales, y una vía de expresión recombinante de las proteínas quiméricas, ambas con resultados satisfactorios.

La vía de conjugación química presenta la potencialidad de generar productos con múltiples moléculas de nanobody por OVA. Esto es valioso porque implica que se promueve la interacción de una molécula de antígeno-nanobody con varias moléculas del receptor celular blanco —emulando el efecto de avididad que caracteriza a los anticuerpos convencionales—, lo cual podría traducirse en la activación de cascadas de señalización por el fenómeno de entrecruzamiento de receptores, y posiblemente estimular vías de activación en células dendríticas. En particular para CD11b esta capacidad fue demostrada por Duarte y colaboradores, quienes observaron que el título de anticuerpos de ratones inmunizados con el antígeno OVA conjugado a un nanobody anti-CD11b se incrementaba al doble al utilizar una forma dimérica del mismo, en comparación a la forma monomérica [68]. Además, a diferencia de otras formas de conjugación química de proteínas, se aseguró la unión de OVA a un residuo específico en el nanobody, sin correr el riesgo de comprometer la funcionalidad del mismo por la alteración de residuos que forman parte del paratope. Sin embargo, dos grandes limitantes se identificaron en esta estrategia. En primer lugar, la disminución en los niveles de expresión de los nanobodies por el agregado de la cisteína C-terminal, que en el caso de los nanobodies anti-CD11c cuyos niveles basales de expresión ya eran bajos, dificultó seriamente su producción. En segundo lugar, la elevada tendencia de los nanobodies a formar dímeros a través de enlaces disulfuro obligó a recurrir a pasos previos de tratamiento con un agente reductor que podrían afectar la estabilidad de los mismos. Además, la conjugación química resulta en productos heterogéneos en cuanto al número de copias de nanobody, dificultando la uniformidad de distintos lotes de producción o incluso de conjugados con diferentes nanobodies. En particular para el nanobody V36-Cys se observó una mejor capacidad para reaccionar a través del grupo tiol de la cisteína, obteniendo productos más desplazados hacia valores de mayor peso molecular.

La vía de expresión de quimeras recombinantes en el citoplasma de *E. coli* resultó en buenos rendimientos y aseguró la expresión en forma soluble de dos nanobodies anti-CD11c (MR31 y MR33), así como de los nanobodies V36 y T9. Esta estrategia se destaca por su practicidad, ya que se puede variar el blanco del producto de conjugación simplemente clonando diferentes secuencias de VHHs en el vector pET-32a mediante

digestión con la enzima SfiI. Si bien en la construcción que diseñamos se obtienen productos con una única copia de nanobody, no se descarta la posibilidad de diseñar construcciones que involucren dos o más copias de nanobodies a modo de sumar la propiedad de avidéz. A diferencia de la vía de conjugación química, en la cual se trabajó con el antígeno OVA en su forma nativa, la expresión recombinante de esta proteína en un sistema procariota resultaría en la carencia de ciertas modificaciones post-traduccionales propias de eucariotas. Sin embargo, a los efectos de usar la OVA para una prueba de concepto de la capacidad de los nanobodies para dirigir antígenos a las CD, las modificaciones descritas para OVA son escasas y no serían relevantes, por ejemplo, se ha descrito un único residuo glicosilado (N-acetilglucosamina en Asparragina 293) [79]. En concordancia con esto, si bien no se estudió la eventual superposición de epítopes, se demostró que un panel de siete VHHs anti-OVA de distinta secuencia reconocen a la OVA recombinante en igual medida que reconocen a la OVA nativa. Por otra parte, las secuencias de los péptidos inmunodominantes de clase I (S257-L264) y clase II (I323-R339) —que en la proteína nativa no sufren modificaciones post-traduccionales— se mantienen idénticas en la proteína recombinante, lo cual no limitaría su aplicación en estudios de la respuesta de células T en modelos de ratones OT-I y OT-II.

Se logró demostrar la funcionalidad de los antígenos quiméricos por citometría de flujo con BMDC, confirmándose la capacidad de reconocer a los receptores CD11b y CD11c en forma nativa. El nanobody T9, elegido como control negativo por tener un blanco irrelevante en el contexto celular, demostró que no se une inespecíficamente a componentes de la superficie extracelular de BMDC. El nanobody MR33 (anti-CD11c) resultó ser un candidato prometedor para ser utilizado en el direccionamiento de antígenos a células dendríticas, por su capacidad de unión a BMDC en forma fusionada a OVA y por su capacidad de inhibir la unión del anticuerpo N418. Como ya se comentó, éste ha sido ampliamente utilizado para el direccionamiento de antígenos a células dendríticas demostrando potenciar la respuesta inmune en ratones, lo cual sugiere que el epítipo al cual se une en CD11c podría ser un aspecto crítico para lograr el efecto deseado.

Por citometría de flujo con BMDC también se demostró que las quimeras recombinantes son estables a incubaciones a 37 y 50°C. La estabilidad térmica era una preocupación ya que los nanobodies que fueron producidos en el periplasma y tratados con DTT para su reducción podrían haber sufrido la pérdida del enlace disulfuro intramolecular, y los producidos en el citoplasma es probable que carezcan de este

enlace debido a las características redox del compartimiento. Para profundizar en este aspecto podrían realizarse ensayos de determinación de la temperatura de transición por calorimetría diferencial de barrido u otra técnica equivalente, comparándola con la de los nanobodies monoméricos y la OVA. A su vez, una buena alternativa para promover la formación de los enlaces disulfuro en el citoplasma sería la expresión de las quimeras recombinantes en la cepa SHuffle de *E. coli*, lo cual por razones de tiempo no pudo ser abordado durante la ejecución de esta tesina.

Los avances presentados para la producción y caracterización de conjugados y formas quiméricas Nb-OVA, constituyen una buena plataforma para el desarrollo de un proyecto de maestría destinado a estudiar *in vivo* la capacidad de los distintos nanobodies para dirigir antígenos a las CD. Para esto, es importante el haber trabajado con la OVA, que constituye uno de los antígenos modelo más estudiados, y haber establecido condiciones para su eficiente conjugación y expresión recombinante fusionada a los nanobodies y a un nanobody irrelevante como control. Los estudios que se pretende realizar evaluando la respuesta inmune a nivel humoral y celular en ratones C57BL/6, incluirán las construcciones realizadas en la tesina, pero también se planea incorporar versiones recombinantes que incluyan múltiples copias de los nanobodies. Además, en vista del gran número de antecedentes en los que se han utilizado anticuerpos monoclonales dirigidos a CD40 como adyuvantes [23, 34, 68-70], se propone seleccionar nanobodies contra este receptor a modo de sumar nanobodies con capacidad activadora a las construcciones con nanobodies de direccionamiento.

## REFERENCIAS

1. Kastenmuller, W., et al., Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype? *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(10): p. 705-11.
2. Guermonprez, P., et al., Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 621-67.
3. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's Immunobiology. 9th Edition*. Janeway's Immunobiology. 2017: Garland Science, Taylor & Francis Group.
4. Malissen, B. and P. Bongrand, Early T Cell Activation: Integrating Biochemical, Structural, and Biophysical Cues. *Annual Review of Immunology*, 2015. **33**(1): p. 539-561.
5. Steinman, R.M., Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nature Medicine*, 2007. **13**: p. 1155-1159.
6. Schittenhelm, L., C.M. Hilkens, and V.L. Morrison, beta2 Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 1866.
7. Kambayashi, T. and T.M. Laufer, Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(11): p. 719-30.
8. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's Immunobiology. 9th Edition*. Garland Science, Taylor & Francis Group, 2017.
9. Karnell, J.L., et al., Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019. **141**: p. 92-103.
10. Merad, M., et al., The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*, 2013. **31**: p. 563-604.
11. Mildner, A. and S. Jung, Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*, 2014. **40**(5): p. 642-56.
12. Kurts, C., CD11c: not merely a murine DC marker, but also a useful vaccination target. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(8): p. 2072-5.
13. Crozat, K., et al., The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med*, 2010. **207**(6): p. 1283-92.
14. Poulin, L.F., et al., Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med*, 2010. **207**(6): p. 1261-71.
15. Carayanniotis, G. and B.H. Barber, Adjuvant-free IgG responses induced with antigen coupled to antibodies against class II MHC. *Nature*, 1987. **327**: p. 59-61.
16. Snider, D.P. and D.M. Segal, Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates. *J Immunol*, 1987. **139**: p. 1609-1616.
17. Frleta, D., D. Demian, and W.F. Wade, Class II-targeted antigen is superior to CD40-targeted antigen at stimulating humoral responses in vivo. *Int. Immunopharmacol.*, 2001. **1**: p. 265-275.

18. Tel, J., et al., DEC-205 mediates antigen uptake and presentation by both resting and activated human plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(4): p. 1014-23.
19. Jiang, W., et al., The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Letters to Nature.*, 1995. **375**: p. 151-155.
20. Bonifaz, L.C., et al., In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med*, 2004. **199**(6): p. 815-24.
21. Dudziak, D., et al., Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*, 2007. **315**(5808): p. 107-11.
22. Idoyaga, J., et al., Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(6): p. 2384-9.
23. Sancho, D., et al., Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest*, 2008. **118**: p. 2098-2110.
24. Caminschi, I., et al., The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood*, 2008. **112**(8): p. 3264-73.
25. Sancho, D., et al., Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*, 2009. **458**(7240): p. 899-903.
26. LeibundGut-Landmann, S., et al., Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol*, 2007. **8**(6): p. 630-8.
27. Joffre, O.P., et al., Efficient and versatile manipulation of the peripheral CD4+ T-cell compartment by antigen targeting to DNGR-1/CLEC9A. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(5): p. 1255-65.
28. Zhang, Y. and H. Wang, Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*, 2012. **135**(4): p. 268-75.
29. Calderwood, D.A., I.D. Campbell, and D.R. Critchley, Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(8): p. 503-17.
30. Steinman, R.M., M. Pack, and K. Inaba, Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunological Reviews*, 1997. **156**: p. 25-37.
31. Wu, J., et al., Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(26): p. 6786-6791.
32. Wang, H., et al., Rapid antibody responses by low-dose, single-step, dendritic cell-targeted immunization. *PNAS*, 1999. **96**: p. 847-852.
33. van Broekhoven, C.L., et al., Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Research*, 2004. **64**: p. 4357-4365.
34. Castro, F.V., et al., CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(8): p. 2263-73.
35. Wei, H., et al., Targeted delivery of tumor antigens to activated dendritic cells via CD11c molecules induces potent antitumor immunity in mice. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(14): p. 4612-21.

36. White, A.L., et al., Ligation of CD11c during vaccination promotes germinal centre induction and robust humoral responses without adjuvant. *Immunology*, 2010. **131**(1): p. 141-51.
37. Ejaz, A., et al., Targeting viral antigens to CD11c on dendritic cells induces retrovirus-specific T cell responses. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45102.
38. Cruz, L.J., et al., Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8(+) T cell response: a comparative study. *J Control Release*, 2014. **192**: p. 209-18.
39. Wang, Q., et al., DC targeting DNA vaccines induce protective and therapeutic antitumor immunity in mice. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **10**: p. 17565-17577.
40. Hamers-Casterman, C., et al., Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993. **363**: p. 446-448.
41. Blanc, M.R., et al., A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type gamma-globulins from camelid sera. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009. **54**(4): p. 207-12.
42. Gonzalez-Sapienza, G., M.A. Rossotti, and S. Tabares-da Rosa, Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 977.
43. Nguyen, V., S. Muyldermans, and R. Hamers, The Specific Variable Domain of Camel Heavy-chain Antibodies is Encoded in the Germline. *JMB*, 1998. **275**: p. 413-418.
44. Muyldermans, S., Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*, 2013. **82**: p. 775-97.
45. Jovcevska, I. and S. Muyldermans, The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs*, 2020. **34**(1): p. 11-26.
46. Beghein, E. and J. Gettemans, Nanobody Technology: A Versatile Toolkit for Microscopic Imaging, Protein-Protein Interaction Analysis, and Protein Function Exploration. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 771.
47. Govaert, J., et al., Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *J Biol Chem*, 2012. **287**(3): p. 1970-9.
48. Vu, B., et al., COMPARISON OF LLAMA VH SEQUENCES FROM CONVENTIONAL AND HEAVY CHAIN ANTIBODIES. *Molecular Immunology*, 1997. **34**: p. 1121-1131.
49. Conrath, K., et al., Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003. **27**: p. 87-103.
50. MM., H., et al., Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Molecular Immunology*, 2000. **37**: p. 579-590.
51. Nguyen, V., A. Desmyter, and S. Muyldermans, *Functional heavy-chain antibodies in Camelidae*. *Adv. Immunol.*, 2001. **79**: p. 261-296.
52. Arbabi Ghahroudi, M., et al., Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters*, 1997. **414**(3): p. 521-526.

53. Tabares-da Rosa, S., 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. *Anal Chem*, 2011. **83**(18): p. 7213-20.
54. Pérez, J., et al., Thermal Unfolding of a Llama Antibody Fragment: A Two-State Reversible Process. *Biochemistry*, 2001. **40**: p. 74-83.
55. Kunz, P., et al., The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 7934.
56. GP, S., Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Antigens on the Virion Surface. *Science*, 1985. **228**: p. 1315-1316.
57. Bazan, J., I. Calkosinski, and A. Gamian, Phage display--a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Hum Vaccin Immunother*, 2012. **8**(12): p. 1817-28.
58. Barbas, C.F., et al., Phage Display: A Laboratory Manual. CSHL PRESS, 2001.
59. Zhao, A., et al., Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy. *Crit Rev Biotechnol*, 2016. **36**(2): p. 276-89.
60. De Meyer, T., S. Muyldermans, and A. Depicker, Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol*, 2014. **32**(5): p. 263-70.
61. Bassette, P.H., et al., Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *PNAS*, 1999. **96**: p. 13703-13708.
62. Olichon, A. and T. Surrey, Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in Escherichia coli. *J Biol Chem*, 2007. **282**(50): p. 36314-20.
63. Zarschler, K., et al., High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli. *Microbial Cell Factories*, 2013. **12**.
64. Djender, S., et al., Bacterial cytoplasm as an effective cell compartment for producing functional VHH-based affinity reagents and Camelidae IgG-like recombinant antibodies. *Microbial Cell Factories*, 2014. **13**.
65. Pleiner, T., et al., Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *Elife*, 2015. **4**: p. e11349.
66. Rossotti, M., et al., Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1850**(7): p. 1397-404.
67. Rossotti, M., Plataforma para acelerar el descubrimiento de nanobodies contra blancos de interés biomédico y sus aplicaciones, in Facultad de Química. 2015, Universidad de la República: Montevideo, Uruguay.
68. Duarte, J.N., et al., Generation of Immunity against Pathogens via Single-Domain Antibody-Antigen Constructs. *J Immunol*, 2016. **197**(12): p. 4838-4847.
69. Fang, T., et al., Targeted antigen delivery by an anti-class II MHC VHH elicits focused alphaMUC1(Tn) immunity. *Chem Sci*, 2017. **8**(8): p. 5591-5597.
70. Woodham, A.W., et al., Nanobody-Antigen Conjugates Elicit HPV-Specific Antitumor Immune Responses. *Cancer Immunol Res*, 2018. **6**(7): p. 870-880.
71. Olichon, A., et al., Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnol*, 2007. **7**: p. 7.

72. LaVallie, E., et al., A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Nature Biotechnology*, 1993. **11**: p. 187-193.
73. Pérez-Schirmer, M., et al., Comparison of three anti-hapten VHH selection strategies for the development of highly sensitive immunoassays for microcystins. *Anal Chem*, 2017. **89**: p. 6800–6806.
74. Lutz, M., et al., An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*, 1999. **223**: p. 77-92.
75. Danese, P. and T. Silhavy, Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, 1998. **32**: p. 59-94.
76. Massa, S., et al., Site-specific labeling of cysteine-tagged camelid single-domain antibody-fragments for use in molecular imaging. *Bioconjug Chem*, 2014. **25**(5): p. 979-88.
77. Debie, P., et al., Effect of Dye and Conjugation Chemistry on the Biodistribution Profile of Near-Infrared-Labeled Nanobodies as Tracers for Image-Guided Surgery. *Mol Pharm*, 2017. **14**(4): p. 1145-1153.
78. Helft, J., et al., GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*, 2015. **42**(6): p. 1197-211.
79. Stein, P., et al., Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95-Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1991. **221**: p. 941-959.