



POTENCIACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA ANTI- PD-L1 A TRAVÉS DE SU DIRECCIONAMIENTO A CÉLULAS DENDRÍTICAS

Q.F. Diego Duarte Gareta

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Julio, 2024

**POTENCIACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA ANTI-PD-L1 A TRAVÉS DE SU
DIRECCIONAMIENTO A CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Tribunal:

Dr. Marcelo Hill

Dra. Sofía Grille

Dra. Virginia López

Directores:

-Dr. Gualberto González Sapienza.

Área Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República.

-Dra. María Moreno Jauge.

Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, Universidad de la República.

AGRADECIMIENTOS

Durante este trabajo de tesis de maestría he recibido el apoyo tanto a nivel profesional como personal, de todas las personas que me rodean. Nada hubiera sido posible sin ellos y es por esto que ahora les quiero agradecer.

A mi tutor, Gualberto, por recibirme en el laboratorio y acompañar cada paso del desarrollo de la tesis. Por brindar ideas para tratar de afrontar los desafíos que se iban presentando y estar siempre dispuesto a la discusión de resultados.

A mi cotutora, María, por su apoyo incondicional, su energía positiva y disposición para ayudarme en los momentos más difíciles. También a Sofía, Amy y Clara por su disposición a colaborar conmigo en todo en momento.

A los miembros del tribunal evaluador, Marcelo Hill, Sofía Grille y Virginia López, por aceptar corregir este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio de Inmunología, por crear un gran ambiente laboral y estar siempre dispuestos a brindar ayuda. En especial quiero agradecer a los integrantes de la Casita del Fondo, por todos los momentos compartidos, su amistad, escucharme en todo momento y tratar de colaborar siempre.

A mi familia, por su apoyo incondicional de toda la vida, por escucharme siempre entendiendo o no, y acompañarme en todo momento a que persiga mis sueños.

A mis amigos, que siempre están en los buenos y en los malos momentos, para escucharme, darme consejos y hacer que todo sea mejor.

RESÚMEN

Nueva evidencia ha revelado que la principal forma de acción del bloqueo del eje PD-1/PD-L1 es a través de la reversión de la inhibición de las células dendríticas (DC) licenciándolas para promover la continua activación de las células T de memoria progenitoras CD8⁺ exhaustas (T_{pex}), surtiendo así al tumor con células efectoras, que, si bien heredan el perfil exhausto, tienen una potente actividad antitumoral. Sobre esta base, en esta tesis exploramos la potenciación de la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-PD-L1 mediante su direccionamiento a células dendríticas (DC) al combinarlos con un nanobody (Nb) anti-CD11c. Como referencia, además del Nb biespecífico (b-Nb) anti-CD11c/anti-PD-L1, nos propusimos generar un b-Nb anti-CD3/anti-PD-L1, dado que esta combinación ha mostrado una potente actividad antitumoral. Desafortunadamente, si bien se produjo un antígeno recombinante, CD3 $\epsilon\gamma$, formado por la fusión de los ectodominios CD3 ϵ y CD3 γ a través de una secuencia peptídica, ninguno de los Nbs anti-CD3 $\epsilon\gamma$ aislados reconocieron al receptor CD3 nativo en células T.

La actividad anti-tumoral del b-Nb anti-CD11c/anti-PD-L1 se evaluó en modelos murinos de melanoma y carcinoma de colon, utilizando el b-Nb E5/anti-PD-L1 como control, donde E5 representa una Nb irrelevante. Para ambas combinaciones se generaron las versiones bivalentes fusionadas a la región Fc de la IgG2a de ratón (con una mutación LALA que reduce funciones efectoras) con el fin de extender la vida media de las mismas. Se observó una potenciación del efecto terapéutico del bloqueo de PD-L1 cuando este se combinaba con el Nb anti-CD11c, mostrando diferencias significativas tanto a nivel del retardo del crecimiento tumoral como en la prolongación de la supervivencia de los individuos. Este hecho se correlacionó con lo visto en la inmunofenotipificación donde se destacó el aumento relativo en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ en el tumor. A la vez que se observó un aumento en la proliferación de linfocitos T CD8⁺ en el ganglio drenante. Si bien a nivel del tumor la expresión de PD-L1 fue similar, se vio una marcada disminución de su expresión a nivel de las células dendríticas en el ganglio drenante en el grupo tratado con el b-Nb anti-CD11c/anti-PD-L1. Este resultado coincide con lo observado *in vitro* con

células dendríticas derivadas de médula ósea, que estaría mostrando que la unión simultánea a CD11c potencia el bloqueo de PD-L1, liberando la capacidad activadora de las células dendríticas y mejorando de esta forma la eficacia de la inmunoterapia con estos fármacos.

ABREVIATURAS

6xHis	Cola de 6 histidinas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Del inglés: Bovine Serum Albumin (seroalbúmina bovina)
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ELISA	Del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas)
Fc	Fragmento cristalizabile
HA	Epítotope de hemaglutinina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani broth
MALDI-TOF	Del inglés: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y Time-Of-Flight (tiempo de vuelo)
Ni-NTA	Del inglés: Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Niquel-ácido nitrilotriacético)
OmpA	Del inglés: Outer membrane protein A
ON	Del inglés: overnight (equivale a 16-20 horas)
pb	Pares de bases
PBS	Del inglés: phosphate buffered saline (buffer fosfato salino)
PCR	Del inglés: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	Polietilenglicol

PEI	Polietilenimina
rpm	Revoluciones por minuto
scFv	Del inglés: Single-chain variable fragment (fragmento variable de cadena única)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
UA	Unidades de absorbancia
ufc	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
VH	Dominio variable de la cadena pesada de anticuerpos convencionales
VHH	Dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélidos
VL	Dominio variable de la cadena liviana

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
RESÚMEN	ii
ABREVIATURAS	iv
TABLA DE CONTENIDO	vi
INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer.....	1
1.1 Definición.....	1
1.2 Inmunoedición.....	2
1.3 Respuesta inmune antitumoral y mecanismos de escape del tumor	4
2. Inmunoterapias frente al cáncer.....	9
2.1 Terapia basada en anticuerpos	10
2.1.1 Inhibidores de puntos de control del sistema inmune.....	10
2.1.2 Anticuerpos biespecíficos.....	18
HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Protocolos generales	25
1.1 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	25
1.2 Transformación.....	25
1.3 Extracción de ADN plasmídico, secuenciación y análisis de secuencias	25
1.4 ELISA.....	25
1.5 PCR	26
1.6 Cuantificación de ADN y proteínas.....	26
1.7 Electroforesis SDS-PAGE.....	26
1.8 Electroforesis en gel de agarosa.....	27
1.9 Análisis de datos y generación de imágenes.....	27
2. Vectores utilizados	27
2.1 Vector pComb3X.....	27
2.2 Vectores pINQ.....	27
2.3 pcDNA3.1(+).....	28
2.4 pSin-GFP	29
3. Subclonado de nanobodies o CD3 $\epsilon\gamma$	29
4. Expresión de distintas variantes de la proteína CD3 $\epsilon\gamma$	30

4.1 Expresión de CD3 $\epsilon\gamma$ de ratón en <i>E. coli</i>	30
4.2 Generación de CD3 $\epsilon\gamma$ biotinilado	30
4.3 Expresión de CD3 $\epsilon\gamma$ -hFc	31
5. Caracterización de la proteína CD3 $\epsilon\gamma$	31
5.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	31
5.2 ELISA de verificación de la reactividad de CD3 $\epsilon\gamma$ producido en <i>E. coli</i>	31
6. Inmunización de una llama y construcción de bibliotecas de fagos filamentosos	32
6.1 Titulación de anticuerpos de cadena pesada en sueros de llama.....	33
7. Selección de nanobodies mediante <i>panning</i>	34
7.1 Amplificación de fagos.....	34
7.2 Titulación de fagos	35
7.3 <i>Screening</i> preliminar del <i>output</i> de fagos	35
8. Expresión recombinante de nanobodies	36
8.1 Producción de nanobodies biespecíficos	36
8.2 Producción de biespecíficos con Fc IgG2a mouse (LALA).....	37
9. Ensayos de funcionalidad y detección de biespecíficos anti-PD-L1	37
9.1 Ensayos mediante ELISA.....	37
9.2 Ensayos de funcionalidad por citometría de flujo	37
10. Determinación de constantes de afinidad (K_D) e inhibición PD-L1/PD-1 por Nb.....	38
11. Líneas celulares tumorales	39
11.1 Melanoma.....	39
11.2 Cáncer de colon	39
12. Animales de experimentación	39
13. Evaluación de efecto antitumoral	39
14. Estudio de la respuesta inmune	40
14.1 Evaluación de los linfocitos.....	40
14.2 Evaluación de células mieloides.....	41
Figura 2.1. A) Estrategia de <i>gating</i> para linfocitos en el tumor. B) Estrategia de <i>gating</i> para DCs en el ganglio.	43
15. Ensayos <i>in vitro</i> con Células Dendríticas Derivadas de Médula Ósea (BMDCs).....	43
15.1 Obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea	43
15.2 Expresión de PD-L1 en BMDCs tratadas con b-Nbs	44
15.3 Microscopía confocal en BMDCs tratadas con b-Nbs-Fc	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
1. Generación de Nanobodies (Nbs) que reconozcan a la proteína CD3 de ratón.....	46

1.1-Producción del antígeno para la inmunización.....	46
1.2-Inmunización de llama y selección de nanobodies	48
1.3-Generación de variantes inmunogénicas de CD3.....	49
1.4-Construcción de biblioteca de fagos y selección de nanobodies.....	51
1.5-Clonado del ADN de la proteína CD3 $\epsilon\gamma$ en el vector pSIN-GFP para su expresión asociado a la membrana de células HEK293T y reactividad de los Nbs frente al mismo	53
1.6-Reactividad de los Nbs frente a CD3 en esplenocitos de ratón.....	55
2. Generación de anticuerpos biespecíficos con potencial aplicación en modelos murinos de tumores	57
2.1-Expresión de nanobodies biespecíficos (b-Nbs) para inmunoterapia anti-tumoral	57
2.1.1-Clonado y expresión en gran escala de b-Nbs.....	57
2.1.2 Verificación de la funcionalidad de los b-Nbs	59
2.1.3 Exploración de la actividad antitumoral de los b-Nbs en ensayos <i>in vivo</i> ..	61
2.1.4 Evaluación de la permanencia del b-Nb anti-CD11c/PD-L1 en ratones C57BL/6	65
2.2 Expresión de nanobodies biespecíficos Fc (b-Nbs-Fc) para el uso de los mismos como terapia anti-tumoral.....	66
2.2.1 Clonado y expresión en gran escala de b-Nbs-Fc	66
2.2.2 Evaluación de la permanencia del b-Nb-Fc anti-CD11c/PD-L1-Fc en ratones C57BL/6	68
2.2.3 Optimización de la expresión de b-Nbs-Fc.....	69
2.2.4 Verificación de la funcionalidad de los b-Nbs-Fc.....	69
2.2.5 Exploración de la actividad antitumoral de los biespecíficos Fc en ensayos <i>in vivo</i> modelo B16F10.....	71
2.2.6 Exploración de la actividad antitumoral de los b-Nb-Fc en ensayos <i>in-vivo</i> en el modelo CT26.....	73
2.2.7 Intento de optimización de la actividad antitumoral del anti-CD11c/PD-L1-Fc.....	76
en modelo CT26.....	76
2.2.8 Desafío de ratones recuperados con el tratamiento	78
2.2.9 Inmunofenotipificación del microambiente tumoral (TME), ganglio linfático drenante (TDLN) y no drenante del tumor (NDLN) luego del tratamiento con b-Nbs-Fc en modelo CT26	79
2.2.10 Análisis del posible mecanismo de acción de la terapia con anti-CD11c/PD-L1 mediante ensayos <i>in vitro</i> con BMDCs.....	81
2.2.11 Exploración de la actividad antitumoral de los biespecíficos Fc en ensayos <i>in vivo</i> modelo MC38	83

2.3 Expresión de nanobodies junto con scFv-Atezolizumab-Fc (b-Nbs-Atezo) para el uso de los mismos como terapia anti-tumoral.....	85
2.3.1 Clonado y expresión en gran escala de b-Nbs-Atezo.....	85
2.3.2 Verificación de la funcionalidad de los b-Nbs-Atezo	86
2.3.3 Exploración de la actividad antitumoral de los biespecíficos-scFvAtezo en ensayos <i>in vivo</i> modelo MC38	89
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	92
REFERENCIAS	95

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

1.1 Definición

El término cáncer se utiliza para referirse a un conjunto de enfermedades complejas y heterogéneas caracterizadas por la proliferación descontrolada de células anormales que han adquirido mutaciones genéticas que generan una alteración en su ciclo celular. Los desencadenantes de este fenómeno pueden ser diversos, pero destacan mutaciones en regiones específicas del genoma que confieran la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores. Los genes supresores de tumores son responsables de regular el crecimiento celular, la diferenciación y la muerte celular programada, asegurando así que las células se dividan de manera controlada y se eliminen si están dañadas o son potencialmente cancerosas. Por otro lado, los oncogenes son versiones mutadas o activadas de genes normales que pueden promover el crecimiento celular descontrolado y la formación de tumores cuando están activados inapropiadamente. En conjunto, los genes supresores de tumores y los oncogenes son componentes clave en la adquisición de los llamados *hallmarks* del cáncer, contribuyendo a la transformación celular y la progresión tumoral [1, 2]. Además de los cambios genéticos, el cáncer implica una interacción dinámica entre las células tumorales y las células inmunes del huésped. De dicha interacción se puede generar un microambiente donde predomine la inmunosupresión, permitiendo la evasión del sistema inmune por parte de las células cancerosas, facilitando su proliferación y metástasis (diseminación del tumor original a otras partes del organismo). Por lo tanto, el cáncer es una enfermedad que involucra tanto a la genómica celular, como también a la inmunología tumoral, donde las respuestas inmunes y las terapias dirigidas a restaurarlas juegan un papel crucial en el control y tratamiento de la enfermedad [3-5].

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, registrándose una incidencia de 20 millones de nuevos casos y cerca de 10 millones de fallecimientos en el año 2022 [6]. En Uruguay se diagnostican anualmente unos 14.000 nuevos casos (exceptuando cáncer de piel no melanoma) y más de 8.000 uruguayos mueren por esta enfermedad cada año.

Una de cada 4 muertes en nuestro país es debida al cáncer, siendo la segunda causa de muerte luego de las enfermedades cardiovasculares [7].

1.2 Inmunoedición

Durante un largo tiempo, el concepto de que el sistema inmune podía detectar y matar células cancerosas, llamado inmunovigilancia del cáncer, estuvo plagado de controversias. Iconos de la inmunología del siglo XX, como Paul Ehrlich, F. Macfarlane Burnet y Lewis Thomas, hipotetizaron que la inmunovigilancia del cáncer ocurría, pero la evidencia definitiva faltaba hasta el cambio al siglo XXI [8]. Con modelos de tumores de ratón robustos, Robert Schreiber y colegas proporcionaron evidencia inicial de que la inmunovigilancia del cáncer, de hecho, ocurría en huéspedes inmunocompetentes [9]. Además, Schreiber y colegas demostraron que el sistema inmune destruía a las células cancerosas, pero además moldeaba su crecimiento. Esta función dual de la inmunidad para controlar el cáncer (eliminación, equilibrio) y promover el cáncer (escape) se convirtió en la base de la hipótesis de la inmunoedición del cáncer [8, 10]. En este contexto, la idea original de la inmunovigilancia del cáncer se convirtió en parte de la fase de eliminación de la inmunoedición del cáncer. La hipótesis de la inmunoedición del cáncer integra las complejas interacciones célula tumoral-inmune que ocurren dentro del microambiente tumoral para moldear la inmunogenicidad más allá de la antigenicidad.

La inmunoedición del cáncer es un concepto que resulta de las acciones duales del sistema inmune, por un lado, para proteger al huésped, y por otro resultar modulado negativamente por el microambiente tumoral dando lugar a la progresión del tumor. Se postula que consiste en tres fases: eliminación, equilibrio y escape (**Figura 1.1**). La inmunoedición del cáncer se activa luego de que haya ocurrido una transformación y los mecanismos antitumorales intrínsecos no inmunológicos hayan fallado. La fase de eliminación consiste en la cooperación entre el sistema inmune innato y el adaptativo para destruir al tumor naciente, lo que conduce a la "eliminación" del mismo, siendo este el principal postulado de la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer. Sin embargo, si el sistema inmune no logra erradicar las células tumorales en crecimiento, el cáncer puede entrar en la fase de equilibrio, donde su crecimiento está restringido inmunológicamente, pero el cáncer no es eliminado [11]. Esta fase puede ser un evento prolongado, pero adaptaciones del tumor con el establecimiento de un microambiente tumoral supresor pueden llevar a la fase de escape, donde se manifiesta la enfermedad de cáncer

clínicamente, pudiendo diseminarse a otros órganos. Durante esta fase, las células tumorales pueden reclutar células inmunes para crear un microambiente tumoral inmunosupresor y las células inmunes pueden inducir a las células tumorales a expresar moléculas de control inmunitario [12].

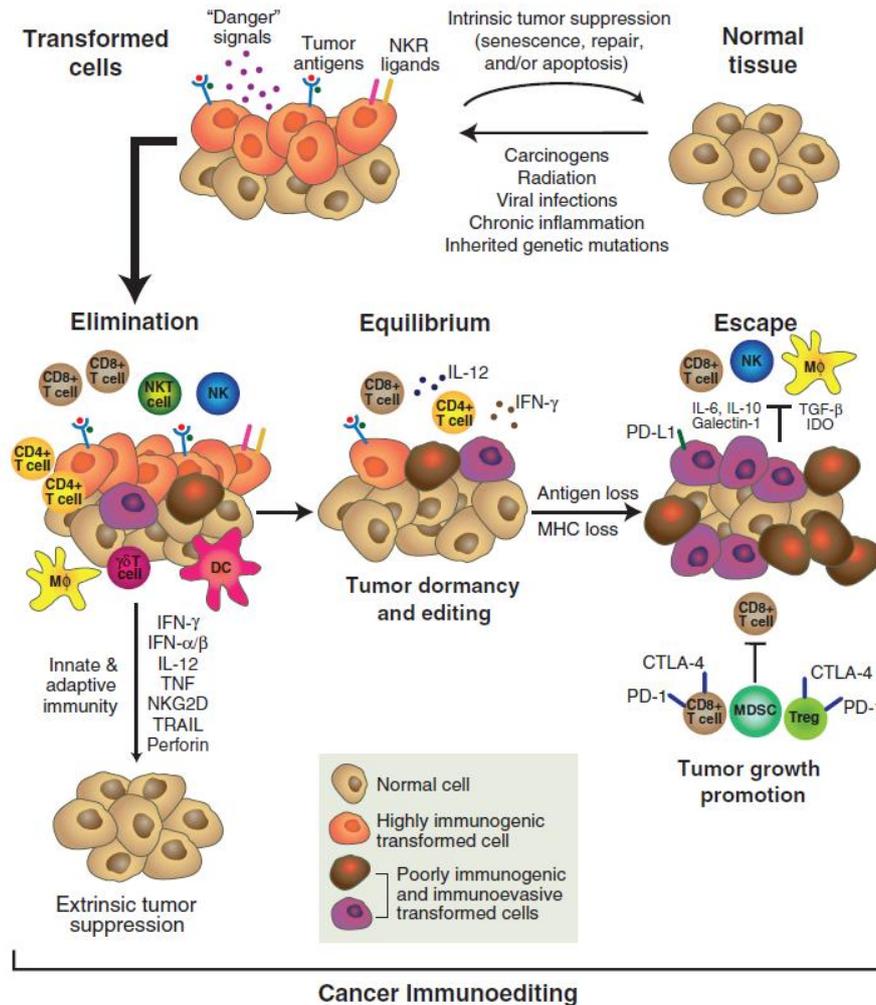


Figura 1.1. El concepto de immunoedición del cáncer. Las células en el tejido se encuentran expuestas constantemente a distintos carcinógenos, radiaciones, infecciones virales, etc. Los mecanismos intrínsecos celulares son capaces de controlar las transformaciones malignas. Pero si estos fallan, se da lugar al control del crecimiento tumoral por parte del sistema inmune. La immunoedición del cáncer consta de tres fases secuenciales: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación células T CD8+ y CD4+, NK, macrófagos M1, células dendríticas actúan coordinadamente en la erradicación del tumor. En la fase de equilibrio el sistema inmune es capaz de controlar el crecimiento del tumor, pero no logra eliminarlo completamente. Mecanismos de evasión por parte del tumor como la falta de expresión de antígenos que sean reconocidos por las células T, expresión de receptores inhibitorios, secreción de citoquinas (TGF-β, IL-10, IL-6), generan un microambiente inmunosupresor. Imagen tomada de Schreiber, R.D. *et al.*, 2011 [13].

1.3 Respuesta inmune antitumoral y mecanismos de escape del tumor

Para que una respuesta inmune anticancerígena lleve a una efectiva eliminación de las células cancerosas, una serie de eventos escalonados deben suceder y expandirse de forma secuencial. Estos pasos conforman el llamado Ciclo Cáncer-Inmunidad (CI) (**Figura 1.2**). En el primer paso, neoantígenos creados por la oncogénesis son liberados y capturados por las células dendríticas (DCs) para su procesamiento. Para que este paso produzca una respuesta de células T anticancerígenas, debe ir acompañado de señales proinflamatorias tales como citoquinas y factores liberados por células tumorales moribundas o por la microbiota intestinal, y la consecuente activación de la inmunidad innata. Luego, las DCs maduras presentan los antígenos capturados en moléculas MHCII, y eventualmente MHCI, a las células T en el ganglio linfático drenante (dLN), lo que resulta en el *priming* y activación de respuestas de células T efectoras contra los antígenos específicos del tumor. Finalmente, las células T efectoras activadas circulan e infiltran el lecho tumoral, reconocen específicamente a las células cancerosas a través de la interacción entre su receptor de células T (TCR) y su antígeno correspondiente unido a MHCI, eliminando a su célula blanco. La eliminación de la célula cancerosa libera antígenos adicionales asociados al tumor generando una continua retroalimentación del ciclo, que lleva a obtener una respuesta más potente [14]. En este proceso, ocurre además un proceso de amplificación en el sitio del tumor, que ocurre cuando las células T provenientes de los dLN ingresan al tumor. Allí, las células T encuentran células presentadoras de antígenos (en particular DCs) intercaladas dentro del parénquima tumoral, en agregados linfoides asociados al tumor, o en estructuras de órganos linfoides terciarios (TLS) morfológicamente identificables. Las células T pueden entonces expandirse y diferenciarse contribuyendo a la eliminación directa de las células tumorales [15].

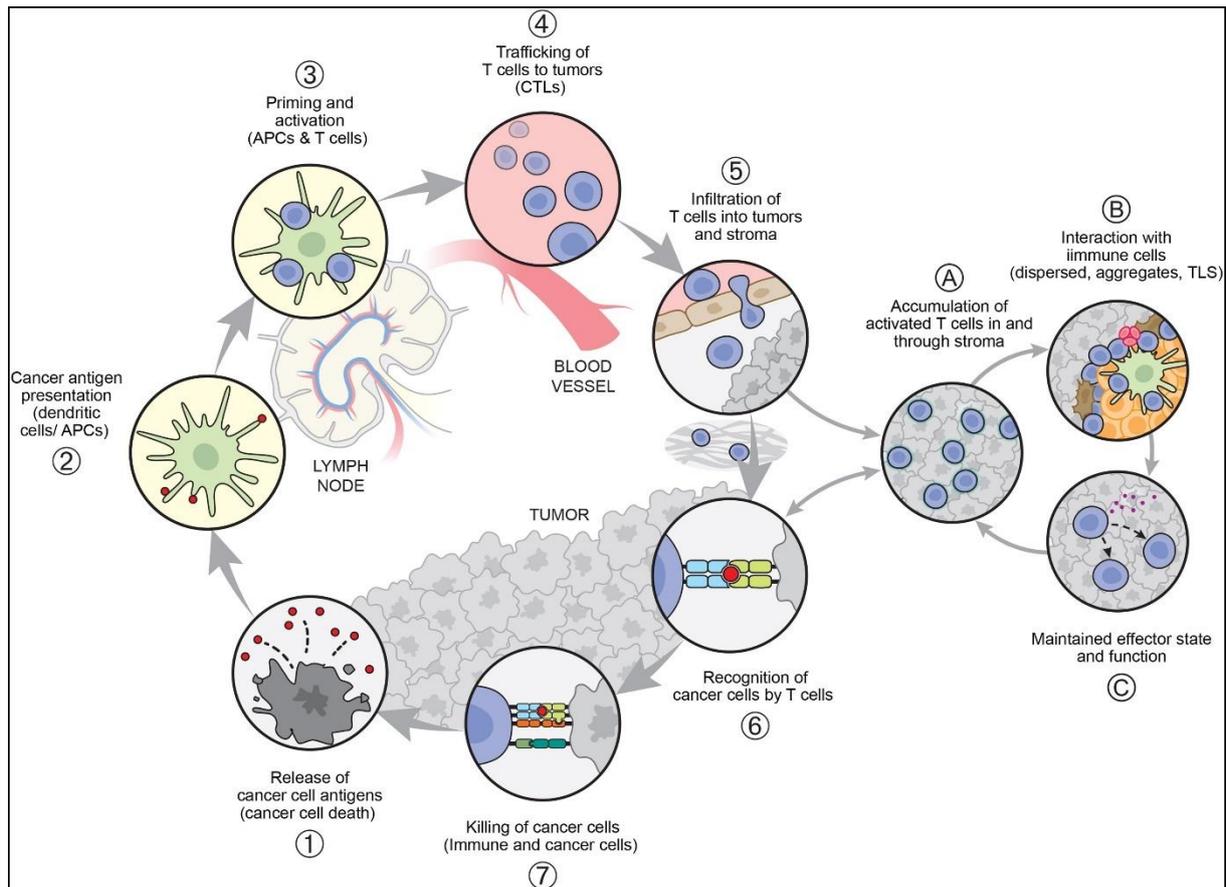


Figura 1.2. El ciclo cáncer-inmunidad y el subciclo de amplificación en el microambiente tumoral. Representación de la migración de las células T y sus posibles destinos en el estroma tumoral, determinados a través de su interacción con las células inmunes intratumorales, su persistencia y función dentro del microambiente tumoral (TME). Las células T dentro del TME pueden responder en una serie de pasos que representan un subciclo de lo que ocurre sistémicamente más allá del tumor. Las abreviaturas son las siguientes: APCs, células presentadoras de antígenos; CTLs, linfocitos T citotóxicos; TLS, estructura de ganglio linfático terciario. Imagen tomada de Mellman, I., *et al.*, 2023 [15].

En cada etapa del ciclo descrito anteriormente puede haber señales capaces de estimular o inhibir la respuesta inmune antitumoral, de hecho, en los pacientes con cáncer la actividad de este ciclo no es la “óptima”, esto se puede deber a que los antígenos tumorales no se están detectando o están siendo tratados como propios y se generen células T reguladoras. También puede suceder que las células T no migren apropiadamente al tumor y no puedan infiltrarlo o que las células tumorales desarrollen un microambiente tumoral inmunosupresor [14]. Existe una relación compleja entre el cáncer y el sistema inmune, donde aumentar nuestra comprensión sobre la misma posibilitará el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que puedan ser implementadas en la clínica.

Se considera que para los tumores sólidos, sean o no del mismo tipo, existen diferentes fenotipos inmunológicos, o "inmunotipos". Los tres inmunotipos clásicos son: inflamado inmune, excluido inmune y desierto inmune, que se definen, respectivamente, como tumores que contienen un infiltrado inmune abundante, tumores donde el infiltrado de células T está limitado al estroma tumoral en lugar del parénquima tumoral, y tumores que no exhiben infiltrado inmune (**Figura 1.3**) [16-18]. Aunque los inmunotipos probablemente son una simplificación excesiva de lo que puede ser una característica dinámica de los tumores, que también pueden ser alterados durante la evolución tumoral o por intervención terapéutica [19], representan un sistema de clasificación útil basado en el mecanismo, en donde los tumores inflamados (también llamados “calientes”), aunque no en todos los casos presentan una buena respuesta a las inmunoterapias, por lo que en caso de tener un perfil distinto, se buscan estrategias para transformarlo en este inmunotipo.

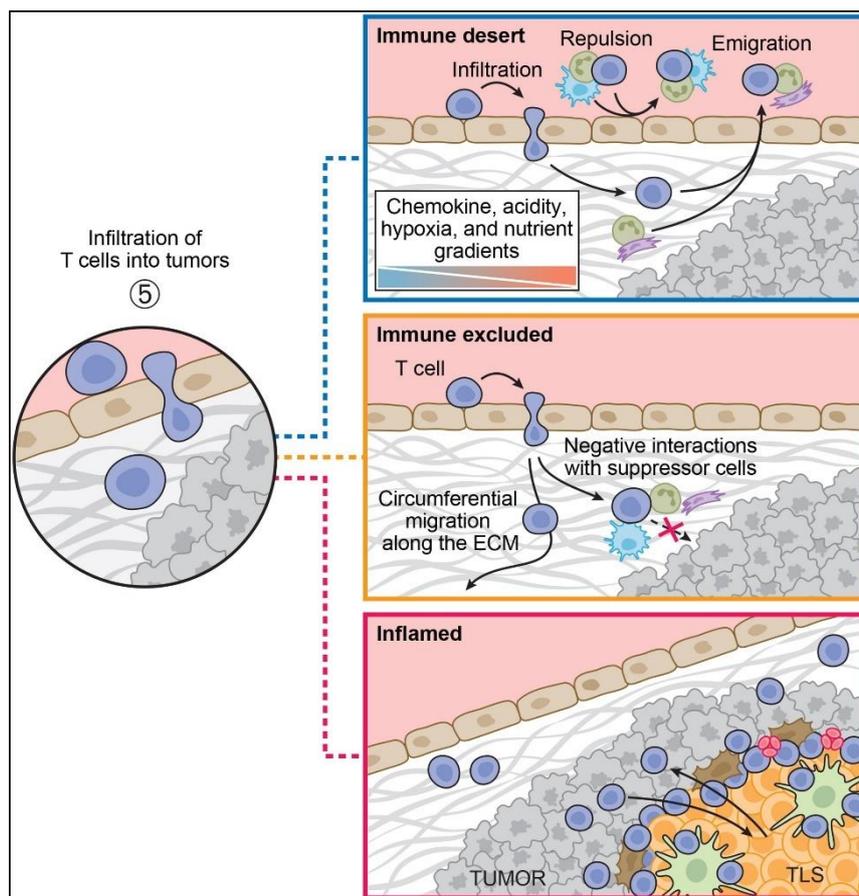


Figura 1.3. Inmunotipos Se describen tres inmunotipos primarios: desierto inmune (azul), excluido inmune (naranja) e inflamado (rojo). En un desierto inmune, hay una clara escasez de cualquier célula inmune dentro del TME. Esto puede estar relacionado con la repulsión o emigración de células inmunes causada por el tumor, o por

la falta de quimioquinas atrayentes. En los tumores excluidos inmunes, la presencia de estroma y matriz extracelular (ECM) puede prevenir la migración efectiva de las células T hacia el contacto directo con las células cancerosas, dejándolas excluidas de los nidos de células cancerosas reales. En los tumores inflamados, la presencia de células inmunes estimuladoras, incluyendo estructuras de nódulos linfáticos terciarios (TLS) peritumorales o intratumorales, puede proporcionar una estimulación adicional a los linfocitos infiltrantes del tumor, aumentando su capacidad funcional, supervivencia y proliferación. Imagen tomada de Mellman, I., *et al.*, 2023 [15].

Como se mencionó en el ciclo CI, uno de los principales participantes de la respuesta antitumoral son los linfocitos T CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos (CTL). Estos destruyen a las células blanco mediante apoptosis mediada por granzimas y perforinas o a través de la muerte celular mediada por FasL-Fas. En los tumores, se pueden encontrar muchos estadios diferentes de las células T CD8⁺, en donde es muy común la presencia de un fenotipo disfuncional o exhausto que describiremos más adelante [20, 21]. Otro integrante de importancia, son las células T CD4⁺ colaboradoras, que influyen sobre una gran variedad de otras células inmunes, en particular, contribuyen a las respuestas efectivas de las células T CD8⁺. Dentro de estos, el subtipo Th1 ejerce funciones antitumorales muy relevantes al proporcionar ayuda a las CTL y a las células B, y al matar directamente a las células cancerosas mediante la producción de IFN- γ y TNF- α . Por otro lado, el subtipo Th2 secreta mediadores que inhiben la respuesta Th1 y promueven funciones protumorales [22, 23]. Las principales citoquinas y quimioquinas que participan en la respuesta antitumoral y permiten la activación y el reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ son IFN- γ , IL-2, IL-12, CXCL9, CXCL10, CXCL11, TNF- α [4, 24-32]. Las DCs son críticas para iniciar y regular las respuestas inmunes adaptativas. Al integrar información del TME y transmitirla especialmente a los linfocitos T, las DCs tienen el potencial de moldear la inmunidad antitumoral. Sin embargo, los tumores emplean una variedad de estrategias para limitar y manipular la actividad de las DCs y así evadir el control inmunológico [33, 34]. Las células B son comúnmente encontradas en los tumores, especialmente en los TLS, pero su rol es aún controversial y variado [35]. Los linfocitos B pueden ejercer efectos antitumorales a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la opsonización y fagocitosis mediada por macrófagos M1, y la activación del complemento. Pero, por otro lado, pueden favorecer el crecimiento tumoral al promover la inflamación y la inmunosupresión mediante la secreción de mediadores antiinflamatorios y proangiogénicos [36, 37]. Las células NK pueden eliminar a células tumorales que carecen de la expresión de MHC de clase I, sin embargo, los tumores en progresión evaden la eliminación por las mismas a través de varios mecanismos, como la regulación al alza de receptores inhibitorios que disminuyen la citotoxicidad de las mismas y la movilización de células mieloides inmunosupresoras y Tregs [38].

Como se describió de forma muy simplificada, hay una gran variedad de células inmunes que participan de la respuesta antitumoral, pero si no se logra erradicar a las células malignas, el sistema entra en un equilibrio que va ejerciendo una presión selectiva sobre los tumores y van permaneciendo variantes de células cancerosas más hábiles para evadir la destrucción mediada por el sistema inmune (**Figura 1.4**). Con el tiempo, los tumores presentan mecanismos para eludir o inhibir a la inmunidad tanto por medios intrínsecos como extrínsecos. Las alteraciones intrínsecas dentro de las células tumorales evaden a la inmunidad, por ejemplo mediante la regulación negativa de la presentación de antígenos (MHC), la regulación positiva de los inhibidores de la apoptosis (Bcl-XL, FLIP), o la expresión de moléculas inhibitorias en la superficie celular que agotan o matan directamente a las células T citotóxicas (PD-L1, FasL). Además, las células tumorales secretan factores que inhiben las funciones de las células inmunes efectoras (TGF- β , IL-10, VEGF, LXR-L, IDO, gangliósidos o MICA soluble) o reclutan células reguladoras para generar un microambiente inmunosupresor (IL-4, IL-13, GM-CSF, IL-1 β , VEGF o PGE2). Una vez reclutadas, las células reguladoras atenúan la inmunidad antitumoral a través de la liberación de citoquinas inmunosupresoras y alteraciones en el contenido de nutrientes del microambiente. Específicamente, la secreción de IL-4 e IL-13 conduce al reclutamiento y polarización de macrófagos M2 a partir de precursores mieloides, los cuales expresan TGF- β , IL-10 y PDGF que inhiben a las células T. La liberación de factores estimulantes de colonias (CSFs), IL-1 β , VEGF o PGE2 por las células tumorales resulta en la acumulación de células mieloides supresoras (MDSCs), que pueden bloquear la función de las células T mediante la expresión de TGF- β , ARG1 e iNOS. Las células T reguladoras (Tregs) también pueden inhibir a las células T efectoras a través de múltiples mecanismos, incluyendo la expresión de CTLA-4 [39].

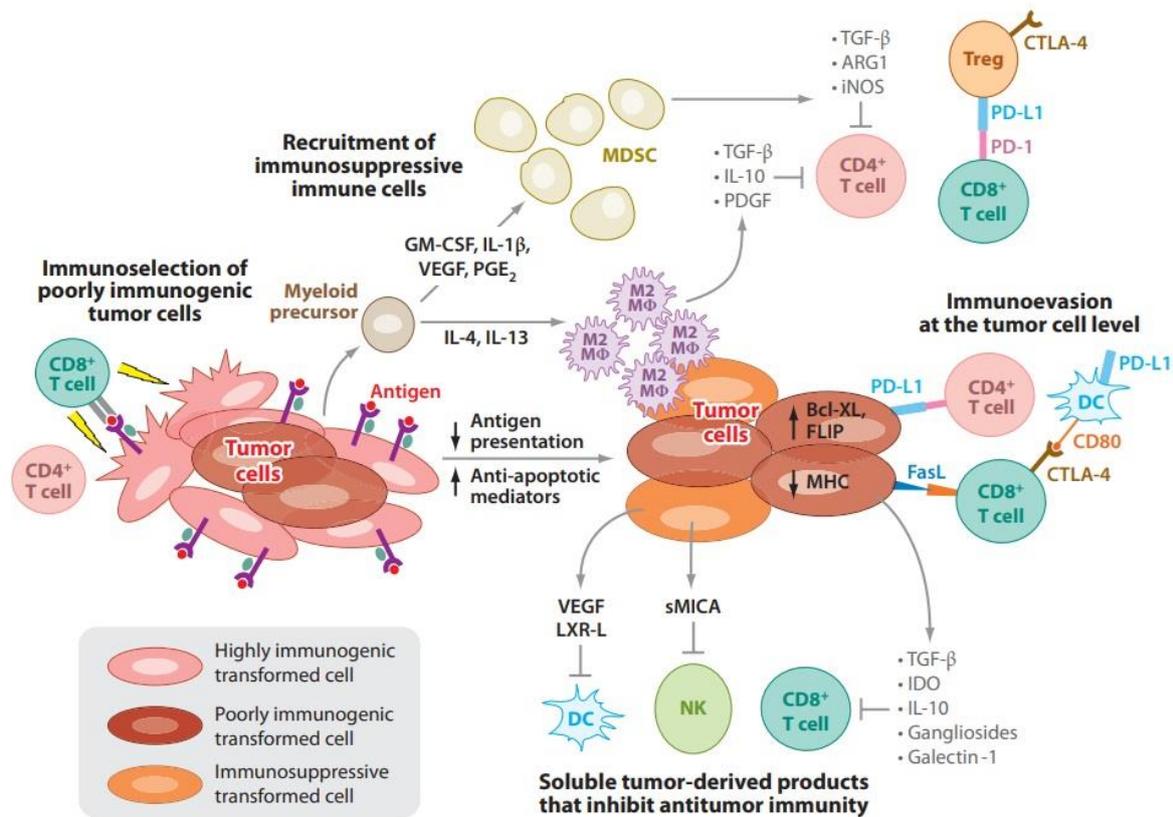


Figura 1.4. Mecanismos de escape del tumor. Como se describió arriba las células tumorales presentan distintos mecanismos para evadir la respuesta inmune antitumoral. Las abreviaciones en la figura son: ARG1, arginasa 1; Bcl-XL, linfoma de células B extra largo; CTLA-4, proteína 4 asociada al linfocito T citotóxico; DC, célula dendrítica; FasL, ligando de Fas; FLIP, proteína inhibidora similar a la enzima convertidora de interleuquina-1 asociada al dominio de muerte fragmentario estimulante de la apoptosis; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; IDO, indoleamina 2,3-dioxigenasa; IL, interleuquina; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; LXR-L, ligando del receptor X hepático; MDSC, células mieloides supresoras; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; MICA, secuencia A relacionada con polipéptidos de clase I del MHC; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; PD-L1, ligando 1 de la muerte celular programada; PGE2, prostaglandina-E2; TGF-β, factor de crecimiento transformante-β; Treg, célula T reguladora; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular. Imagen tomada de Vesely, M.D., *et al.*, 2011 [39].

2. Inmunoterapias frente al cáncer

Como se ha visto hasta el momento, el sistema inmune tiene la capacidad para reconocer y destruir células cancerosas, aunque estas últimas por medio de distintos mecanismos logran escapar y es allí donde se llega a manifestar la enfermedad clínicamente. El conocimiento de estas interacciones que continúa en aumento, llevó al desarrollo de las inmunoterapias aprovechando o modulando la capacidad de la respuesta inmune en combatir el cáncer.

La llegada de la inmunoterapia contra el cáncer ha revolucionado tanto la práctica clínica de la oncología como la comprensión de su biología. Una proporción cada vez mayor de pacientes

con cáncer ahora recibe agentes inmunoterapéuticos como tratamiento estándar en etapas tempranas y avanzadas de la enfermedad. Estos pacientes comprenden un rango cada vez más amplio de indicaciones y genotipos de cáncer, lo que demuestra que el sistema inmune juega un papel fundamental en prácticamente todos los tipos y etapas del cáncer. Esta generalidad, combinada con el potencial de beneficio a largo plazo y seguridad, ha impulsado el notable crecimiento del campo que posee un promisorio futuro.

Se las puede clasificar en diferentes categorías según el tipo de intervención inmunológica, incluyendo el empleo de citoquinas, la transferencia adoptiva de células, vacunas antitumorales, virus oncolíticos, y la terapia basada en anticuerpos, siendo esta última el marco en el cual se desarrolló este trabajo de tesis.

2.1 Terapia basada en anticuerpos

La terapia basada en anticuerpos para el tratamiento del cáncer utiliza el potencial que tienen estas proteínas del sistema inmune para reconocer y unirse específicamente a su blanco, y de esta manera, interferir con el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales de varias maneras. Esta forma de terapia ha revolucionado el tratamiento del cáncer, ofreciendo opciones más específicas y, en muchos casos, más efectivas que las terapias convencionales. Existen distintas formas de acción que incluyen, la inhibición de señales de crecimiento, la marcación de células cancerosas para su destrucción por el sistema inmune, la interferencia con los mecanismos de angiogénesis que nutre al tumor, la entrega de compuestos citotóxicos directamente a las células tumorales, el direccionamiento de la actividad de células T citotóxicas contra las células tumores mediante anticuerpos biespecíficos, etc. Un mecanismo adicional, que ha representado una revolución en la terapia basada en anticuerpos, es el de anticuerpos que bloquean puntos de control de la inmunidad [40].

2.1.1 Inhibidores de puntos de control del sistema inmune

Algunas células del sistema inmune expresan receptores encargados de modular la activación de su respuesta, con el fin de que la misma no sea excesiva y por lo tanto disminuir el daño colateral y la autoinmunidad. Estas moléculas son las llamadas puntos de control inmune. El antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el receptor de muerte celular programada 1

(PD-1) y su ligando (PD-L1) son los ejemplos más potentes de moléculas de control inmunitario que participan en regular la respuesta de células T, ejerciendo su efecto biológico en distintos sitios del cuerpo y en diferentes momentos durante la vida de las mismas [41]. El empleo de anticuerpos que bloqueen la interacción de los mismos con sus respectivos ligandos ha sido utilizado para el tratamiento de una amplia variedad de cánceres, lo que finalmente le valió a James P. Allison y Tasuku Honjo el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2018.

Inhibidores de punto de control de primera generación anti-CTLA-4

CTLA-4 es un miembro de la familia de receptores de CD28. Su expresión puede ser tanto de forma inducida en la membrana de células T convencionales activadas por antígeno, así como de forma constitutiva en células T reguladoras de forma de controlar la respuesta de las células T efectoras [42]. CD28 y CTLA-4 compiten por la unión de CD80 y CD86 que son expresados por las APCs como por ejemplo las células dendríticas. La interacción CD28-CD80/CD86 provee una señal coestimuladora crítica requerida además de la interacción TCR-MHC para desencadenar la proliferación, supervivencia y producción de citoquinas por parte del linfocito T. CTLA-4 genera un balance de esa señal coestimuladora uniéndose con una afinidad mayor a CD80/CD86, dando señales de inhibición a la célula T [43]. Se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra CTLA-4 que impiden la interacción con sus ligandos CD80/CD86, como tremelimumab e ipilimumab, y se usaron para el tratamiento de pacientes con cáncer avanzado [44, 45]. Los ensayos clínicos mostraron la regresión de la enfermedad en varios tipos de tumores [46-49], aunque también se observaron reacciones autoinmunes severas que llevaron a que ciertos estudios debieran ser concluidos tempranamente [47]. El mecanismo de acción detrás de la inmunoterapia anti-CTLA-4 involucra principalmente la reactivación de la capacidad activadora de las células dendríticas tanto de linfocitos vírgenes como de células T de memoria progenitoras CD8⁺ exhaustas (T_{pex}). A esto se suma el bloqueo del efecto supresor de la Treg, que a través de CTLA-4 inhiben la actividad de los linfocitos T activados. Dado que ipilimumab es un anticuerpo humano de la subclase IgG1 que presenta unión a los receptores Fc activadores, también se ha postulado que participa eliminando las células T reguladoras, particularmente, debido a que estas expresan a CTLA-4 constitutivamente y en gran cantidad [50].

Inhibidores de punto de control de segunda generación anti-PD-1/PD-L1

PD-1 es una proteína transmembrana que es expresada por linfocitos T, B, y células NK, todas estas células una vez que sean activadas [51-56]. Al interactuar con su ligando, media una transformación epigenética y transcripcional en las células T, creando un nuevo fenotipo hiporespondedor llamado exhausto, que se asemeja a la senescencia [57-60]. Existen dos ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2, expresados constitutivamente en tejidos no linfoides y que pueden ser regulados al alza en células inmunes por citoquinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α (PD-L2 está más restringido a células dendríticas y macrófagos en condiciones de inflamación) [61-64]. Es importante destacar que PD-L1 también se expresa en células mieloides presentes en el microambiente tumoral (células dendríticas, macrófagos, células mieloides supresoras), así como en algunas células malignas. [65, 66]. Esto establece una barrera protectora contra la inmunidad antitumoral al agotar a las células T antitumorales PD-1+ que se aproximan [67]. Por lo tanto, el romper este mecanismo de escape tumoral se propuso como una estrategia prometedora para la inmunoterapia del cáncer y abrió oportunidades para un estudio más profundo de la inhibición de PD-1/PD-L1 [68]. Los modelos preclínicos demostraron que el bloqueo de PD-L1 aumentaba la duración de las interacciones entre células dendríticas y células T, y promoviendo la activación de células T *in vivo* [69]. Además, el tratamiento anti-PD-L1 en ratones con tumores resultó en respuestas mejoradas de células T específicas del tumor y en la inhibición del crecimiento tumoral [68, 70, 71]. La efectividad de la inhibición de PD-1/PD-L1 en la regresión tumoral alentó las pruebas clínicas en humanos con cáncer avanzado. Los anticuerpos monoclonales que bloquean PD-1 (ejemplo: nivolumab) y PD-L1 (ejemplo: MDX-1105 y atezolizumab) mostraron una regresión sorprendente en pacientes con diversos cánceres incurables, incluyendo melanoma, cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma de células renales [72-74]. En múltiples ensayos clínicos, la terapia anti-PD-1 resultó en una tasa de respuesta general del 30-40% en pacientes con melanoma avanzado [75-77]. Un hallazgo especialmente esperanzador fue una tasa de respuesta del 26% en pacientes con melanoma cuya enfermedad había progresado con ipilimumab [78]. La FDA aprobó los anticuerpos anti-PD-1, nivolumab y pembrolizumab, para melanoma en 2014 y, desde entonces, para otras malignidades. Atezolizumab se convirtió en el primer inhibidor de PD-L1 en recibir la aprobación de la FDA para el tratamiento del cáncer urotelial en 2016, a pesar de obtener una tasa de respuesta general de solo el 15%, que sin embargo superó la tasa de control histórico del 10% [79]. Otros inhibidores de PD-L1 (avelumab y durvalumab)

también han sido aprobados, y los tratamientos con estos inhibidores se han expandido para incluir cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma de células de Merkel en la piel.

La interacción de PD-1 con su ligando en células T activadas pone un freno sobre las mismas al provocar la detención del ciclo celular, la supresión de la migración y la reducción de los mediadores citolíticos [80]. Esto seguramente evolucionó para reducir la actividad inflamatoria y destructiva sobre los tejidos sanos, particularmente en el caso de exposición crónica al antígeno. Sin embargo, frente a un tumor en crecimiento constante, la expresión de PD-1 conspira contra el desarrollo de la respuesta antitumoral y su bloqueo la desata. Por ejemplo, los pacientes con melanoma metastásico que responden a la terapia anti-PD-1 (pembrolizumab) muestran una elevada proliferación de células T CD8⁺ intratumorales que se correlaciona con una disminución del tamaño del tumor [81]. Un aumento en la expresión de PD-L1 en líneas celulares tumorales tras el tratamiento con IFN- γ se asocia con un aumento de la apoptosis de células T específicas del tumor, lo que resulta en una mayor tumorigenicidad *in vivo* [70]. Así, la inhibición de PD-1/PD-L1 no solo promueve la expansión, migración y actividad citolítica de células T específicas del tumor, sino que también puede prevenir su muerte. No sorprende que el aumento de las respuestas de células T con la terapia anti-PD-1/PD-L1 mostrase una correlación con los tumores que expresan altos niveles de PD-L1. Aunque, interesantemente, más destacada fue la correlación con el nivel de expresión de PD-L1 por parte de células inmunes infiltrantes (células dendríticas, macrófagos y células T) en múltiples tipos de cáncer [18]. En cuanto a los efectos adversos, siempre que hay una buena respuesta inmune parece que estos van de la mano, pero, de todas formas, son más leves para los pacientes tratados con inhibidores de PD-1/PD-L1 que para los tratados con anti-CTLA-4. Los pacientes con toxicidad severa (AEs de grado ≥ 3) aumentan del 10,0% en el grupo de inhibidores de PD-1 al 31,0% en el grupo de inhibidores de CTLA-4 [82, 83]. Este, de todos modos, es siempre un hecho que hay que tener presente, ya que la toxicidad severa es motivo para discontinuar el tratamiento. Por lo que la búsqueda de nuevas alternativas más efectivas, en donde se pueda emplear una menor dosis y se disminuya la toxicidad es de particular interés.

Con la aplicación de los inhibidores de puntos de control inmune dirigidos al bloqueo de CTLA-4, PD-1 y PD-L1, si bien se ha visto una respuesta en pacientes con cáncer avanzado, una gran parte de los pacientes no responde a esta terapia. En consecuencia, la investigación para explorar nuevos blancos implicados en vías inmunoregulatoras está progresando rápidamente. Basándonos en las conclusiones de los estudios preclínicos y clínicos actuales, podemos ver

preliminarmente que los receptores coinhibitorios con mayor potencial incluyen entre otros a: LAG-3, TIGIT, TIM-3, IDO, CD39, NKG2A y SIRP α . Los receptores coestimuladores mas estudiados incluyen a: ICOS, GITR, OX40, 4-1BB y los receptores tipo Toll (TLRs) [84]. Al momento, sólo un anticuerpo que bloquea LAG-3 (relatlimab) ha sido aprobado por la FDA en 2022 para su uso en combinación con nivolumab en melanoma avanzado (irresecable o metastásico).

Inhibición del eje PD-1/PD-L1 y células T exhaustas

En el contexto del cáncer y de infección crónica, el programa de diferenciación de las células T cambia considerablemente y se distingue del de las células T efectoras y de memoria generadas en la infección aguda. Durante esta última, la activación de las células T *naive* por antígenos y señales del TCR, da lugar a la generación de células T precursoras con un fenotipo de memoria flexible, a partir de la cuales se produce la rápida expansión de las células T efectoras. La mayoría de las células T activadas mueren luego de la eliminación del antígeno, mientras que la población de células precursoras pasa ahora a diferenciarse a los distintos tipos de células T de memoria convencionales [85]. Sin embargo, durante una infección crónica o en los procesos tumorales, la situación no termina de resolverse, y la continua presencia de antígenos induce una población de células T precursoras de memoria con un perfil exhausto T_{pex}, que persiste y continuamente da lugar a células T efectoras, que si bien heredan el perfil exhausto, son inicialmente funcionales, pero que ingresan en un programa de diferenciación de varias etapas, que finalmente desemboca en un fenotipo exhausto o agotado disfuncional (T_{ex}) [86-88].

El fenotipo T_{ex} se caracteriza por la pérdida de la capacidad de proliferación, expresa receptores inhibitorios como PD-1, TIM-3 y carece de funciones efectoras como la producción de citoquinas y actividad citotóxica [89]. Estudios recientes sobre las células T_{ex} han demostrado que para que las mismas lleguen a ese estadio hiporespondedor, debe ocurrir un proceso continuo compuesto de múltiples niveles de heterogeneidad. La jerarquía de desarrollo de las células T_{ex} fue detallada por Beltra *et al.* [90], destacando los vínculos de desarrollo entre varios subconjuntos y proporcionando información sobre los mecanismos moleculares involucrados en la transición de las células T [91, 92]. Según sus hallazgos, la generación de las células T_{ex} a partir de T_{pex} es un proceso continuo donde pueden identificarse varias etapas marcadas por fenotipos característicos vinculados a la expresión de Ly108 (un marcador de membrana subrogado de la expresión del factor de transcripción TCF-1) y CD69. Los progenitores T_{pex} 1

(Tex prog1, Ly108+CD69+) son un fenotipo de progenitores quiescente que se encuentran restringidos a los órganos linfoides secundarios. Este fenotipo aumenta la expresión de genes de progenitores de células T (*Tcf7*, *Myb*, *Il7r* y *Sell*), lo que indica su potencial de autorrenovación. Los progenitores Tpex 2 (Tex prog2, Ly108+CD69-) son un fenotipo de progenitores de alta proliferación que se encuentran tanto en los tejidos linfoides como en la sangre. Además, la población Tpex 2 tiene un marcador de ciclo celular activo (genes de ciclina y *Mki67*) y la expresión de genes relacionados con la motilidad celular (*Anxa2*, *Alcam* e *Itgb7*). Ambos estadios se caracterizan por tener activado el factor de transcripción TCF-1 (asociado a la regulación del crecimiento y diferenciación celular, así como a un fenotipo de células T de memoria, con alta capacidad proliferativa y de autorrenovación). El fenotipo intermedio de células Tex (Tex int, Ly108-CD69-) expresa genes citotóxicos y efectores (*Grzma*, *Grzmb*, *Prfl*, *Klrk1*, *Cx3cr1*, *Tbx21*, *Zeb2*, *Id2* y *Prdm1*), indicando que presenta funciones efectoras intermedias. Los Tex int se encuentran en la sangre y en tejidos accesibles a la sangre; también expresan un alto nivel del factor de transcripción T-bet (regula positivamente genes asociados con funciones efectoras al mismo tiempo que mantiene un estado que permite la capacidad de respuesta ante activaciones adicionales o intervenciones terapéuticas), aunque con una expresión moderada de TOX (promueve la expresión de genes que sostienen el agotamiento celular de los linfocitos T y suprime las funciones efectoras, consolidando así el estado exhausto). Finalmente, el fenotipo terminal de células T exhaustas (Tex term, Ly108-CD69+) muestra una pobre actividad proliferativa y una mínima función efectora, a la vez que expresa altos niveles de expresión de receptores inhibitorios (*Pdcd1*, *Lag3*, *Tigit* y *Cd244*) y TOX. Su localización es en los tejidos accesibles a la sangre, pero está ausente en los tejidos linfoides o la circulación [90]. Se describió además la cascada de factores de transcripción (TF) a medida que las células Tex transicionaban de TCF-1^{hi}Tox^{hi} a TCF-1^{int}Tox^{hi}, a TCF-1^{neg}T-bet^{hi}Tox^{int}, y finalmente a TCF-1^{neg}T-bet^{lo}Tox^{hi}Eomes^{hi} durante la conversión de subconjuntos Tex. TCF-1 promueve la expresión de T-bet, facilitando las funciones efectoras y la producción de citoquinas. TOX suprime la expresión de TCF-1 en las células T exhaustas, lo que conduce a la pérdida de propiedades similares a la memoria y promueve el agotamiento terminal. TOX inhibe la expresión de T-bet, contribuyendo a la reducción de la función efectora y la producción de citoquinas características de las células Tex. Si bien TOX es un marcador que se asocia a las Tex disfuncionales, también es fundamental para que no se produzca una muerte inducida por activación de los linfocitos T [93].

El descubrimiento de las células T_{pex} (células T progenitoras exhaustas), caracterizadas por la expresión del factor de transcripción TCF-1, Ly108 y baja expresión del receptor PD-1, permitió entender cómo las células efectoras T_{ex}, de corta vida, eran repuestas continuamente en el tiempo a nivel del tumor, lo que a su vez, permitió una nueva interpretación de como la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control de la inmunidad podía revitalizar la respuesta de células T [94-96].

El bloqueo del eje PD-1/PD-L1 entre las T_{pex} y DCs es el principal mecanismo de acción de este tipo de terapia.

El paradigma inicial era que las células T PD-1⁺ dentro del TME eran sometidas al programa de agotamiento por la interacción con PD-L1 expresado por las células tumorales y que, por tanto, el bloqueo de esta interacción permitía revertir el proceso, logrando el efecto terapéutico observado. En este contexto, inicialmente se consideró que la expresión de PD-L1 por las células cancerosas era un buen predictor del éxito del tratamiento [97]. Si bien este mecanismo tiene un rol en el TME, está limitado debido a que las T_{ex} term, que se encuentran allí sufren cambios epigenéticos irreversibles y carecen de funciones efectoras [98, 99]. Se ha observado en numerosos trabajos que tanto los tumores que no expresan PD-L1 (esto también en la clínica), como aquellos en los que la expresión fue eliminada (knock-out) responden a la terapia de bloqueo del eje PD-1/PD-L1 [100]. Esto fue uno de los indicios de que el efecto terapéutico del bloqueo de este eje podría no depender exclusivamente de la interacción con las células tumorales [101].

Recientemente, varios estudios permitieron comprender mejor el mecanismo de acción de la terapia anti-PD-1/PD-L1, revelando la pérdida del efecto protector cuando: a) se bloquea el tráfico desde los LN al tumor [102], b) se remueven los ganglios linfáticos drenantes pero no los no drenantes [103], y c) se constató la eficacia de administrar un anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo tumoral, que permitió administrar cantidades bajas del fármaco directamente al ganglio drenante sin que llegue al tumor [104]. Esto puso de relieve la importancia de las células dendríticas para la continua activación de las células T_{pex}, principalmente, de las células dendríticas de tipo 1 (cDC1) involucradas en la presentación cruzada [105]. Además, se ha visto que las células T_{pex} pueden residir en tejidos linfáticos terciarios (TLS) dentro del tumor, donde necesitan interactuar con células dendríticas del microambiente tumoral (TME) para activarse y adoptar el fenotipo T_{ex} int con funciones efectoras [106].

El bloqueo de PD-L1 en las cDC1s en el TDLN o en TLS las licencia para activar a las células Tpex, lo cual también requiere otras interacciones claves como CD80-CD28 y 4-1BB-4-1BBL [107, 108]. En particular las células dendríticas CD103+ en el TME son fundamentales para la activación de los linfocitos Tpex y también para atraerlos al tumor mediante la generación de un gradiente de quimioquinas CXCL9 y CXCL10 (**Figura 1.5**) [109].

La comprensión de la dinámica de las células dendríticas y su interacción con las células T exhaustas ha permitido la búsqueda de estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de PD-L1, lo que potencialmente mejora la eficacia del tratamiento y amplía el espectro de pacientes beneficiados por estas terapias. Así, se ha buscado potenciar esta terapia ya sea por ejemplo con la combinación con IL-2 (activación T) favoreciendo la aparición de un nuevo fenotipo exhausto que no evoluciona al estado terminal [110], o también redirigiéndola hacia las DCs con formatos biespecíficos [111, 112].

En resumen, el conocimiento actual indica que el mecanismo principal de funcionamiento de la inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1 es impedir el efecto inhibitorio del PD-L1 sobre las DCs en el tejido linfoide secundario y terciario, y por tanto promover la activación de las células Tpex que proliferan y proveen continuamente al tumor de células “frescas” progenitoras, con marcadores de células exhaustas, pero con funciones efectoras antitumorales que son las responsables de los efectos terapéuticos observados. Si bien esto no asegura que mecanismos de escape del tumor, como la mutación de los neoepítopes que reconocen las Tpex, conduzcan a la pérdida de efecto de esta terapia, la disponibilidad de fármacos que actúen sobre el bloqueo del eje PD-1/PD-L1 de forma más específica y potente, pueden dar lugar a respuestas más rápidas y eficaces que no permitan que el tumor desarrolle mecanismos de evasión como los mencionados.

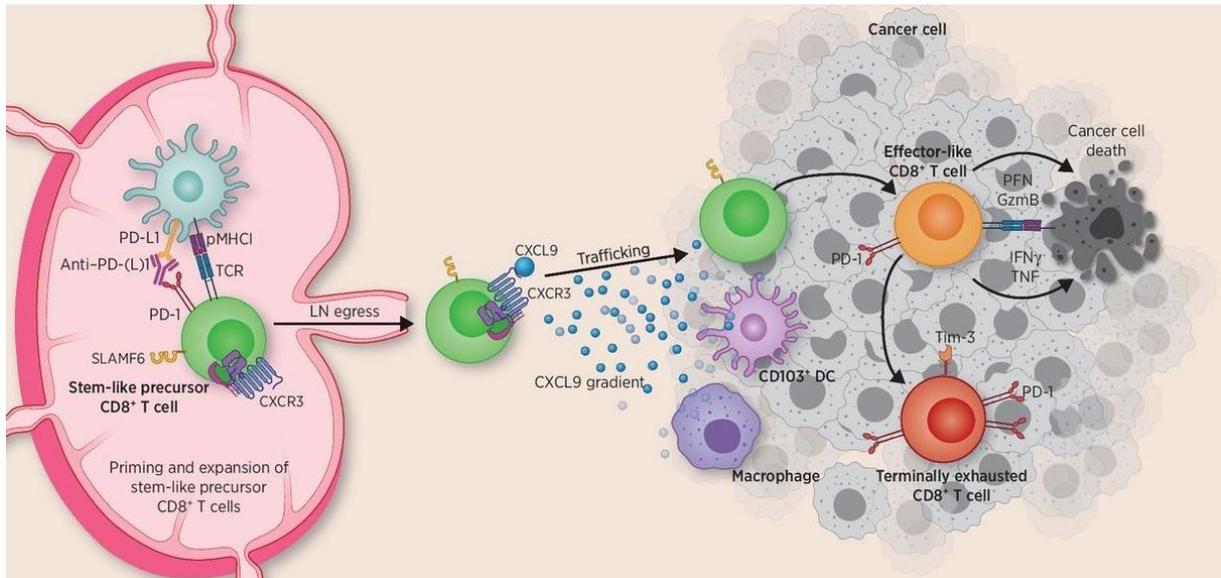


Figura 1.5. Mecanismo de acción anti-PD-1/PD-L1. Los ganglios linfáticos drenantes del tumor (TDLNs) y el eje de quimioquinas CXCR3–CXCL9 son mediadores claves de la actividad del bloqueo de puntos de control inmunitarios anti-PD-1/PD-L1. El bloqueo de este eje permite el *priming de novo* de células T CD8+ progenitoras exhaustas (T_{pex}) en el TDLN. Las células T CD8+ luego de su interacción con las DCs, se desplazan hacia el tumor siguiendo el gradiente de CXCL9 establecido por células dendríticas CD103+ y macrófagos. Dentro del tumor, las células T stem-like sufren una diferenciación adicional hacia un estadio transitorio similar a un efector antes de finalmente convertirse en células T CD8+ exhaustas terminales. Imagen adaptada de Budimir, N., *et al.*, 2022 [109].

2.1.2 Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos (b-Abs) tienen la capacidad de unirse en simultáneo a dos epítopes o antígenos diferentes. Hay una gran variedad de formatos como pueden ser moléculas de IgG completas con o sin funciones efectoras, y también la combinación de pequeños fragmentos scFv, Fab o anticuerpos monodominio (nanobodies). Han generado un gran interés en la última década debido a sus diversos y versátiles mecanismos de acción. La aprobación por parte de la FDA de nueve b-Abs para la terapia contra el cáncer remarca la evolución de esta clase de agentes terapéuticos para ser utilizados en esta patología (**Tabla 1.1**) [113]. La razón principal de su éxito radica en su capacidad para mediar efectos terapéuticos que no pueden lograrse con los anticuerpos mono-específicos, reclutando células efectoras inmunes hacia las células cancerosas o apuntando a diferentes vías de señalización con una sola molécula [114]. Actualmente, más de 300 ensayos clínicos están investigando más de 200 moléculas biespecíficas diferentes, con una proporción significativa dirigida a tumores sólidos y malignidades hematológicas [113].

Tabla 1.1. Anticuerpos biespecíficos aprobados contra el cáncer.

bsAb	International non-proprietary name	Targets	MoA	Format	Year of first approval/region*	Indications	Company
Removab	Catumaxomab	EpCAM×CD3ε	TDCC	Quadroma mouse/rat 1+1	2009 Withdrawn EU 2013	Ovarian ascites, intraperitoneal	Trion Pharma/ Fresenius
Blinicyto	Blinatumomab	CD19×CD3ε	TDCC	BITE 1+1	2014 United States/EU, Japan	ALL	Amgen
Rybrevant	Amivantamab	EGFR×MET	Signalling inhibition, ADCC	Duobody 1+1	2021 United States/EU	NSCLC EGFR exon 20 insert mutation	J&J
KIMMTRAK	Tebentafusp	gp100-HLA-A*02×CD3ε	TDCC	scFv-TCR fusion 1+1	2022 United States/EU	Uveal melanoma	Immunocore
Lunsumio	Mosunetuzumab	CD20×CD3ε	TDCC	KiH 1+1 IgG	2022 United States/EU	Relapsed/refractory follicular NHL	Roche group
Kaitanni	Cadonilimab	PD1×CTLA4	Dual checkpoint inhibition	IgG-scFv tetrabody 2+2	2022 China	Hepatocellular carcinoma	Akeso Bio
Tecvayli	Teclistamab	BCMA×CD3ε	TDCC	Duobody 1+1	2022 United States/EU	Relapsed/refractory multiple myeloma	J&J
Columvi	Glofitamab	CD20×CD3ε	TDCC	CrossMAb 2+1	2023 United States/EU	Relapsed/refractory DLBCL	Roche group
(T)Epkinyli	Epcoritamab	CD20×CD3ε	TDCC	Duobody 1+1	2023 United States/EU, Japan	Relapsed/refractory DLBCL	Genmab, Abbvie
Talvey	Talquetamab	GPRC5D×CD3ε	TDCC	Duobody 1+1	2023 United States/EU	Relapsed/refractory multiple myeloma	J&J
Elrexio	Elranatamab	BCMA×CD3ε	TDCC	bsAb 1+1	2023 United States/EU	Relapsed/refractory multiple myeloma	Pfizer

ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; ALL, acute lymphocytic leukaemia; BCMA, B cell maturation antigen; BITE, bispecific T cell engager; bsAb, bispecific antibody; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; EGFR, epidermal growth factor receptor; EpCAM, epithelial cellular adhesion molecule; GPRC5D, G-protein-coupled receptor class C group 5 member D; MoA, mechanism of action; NSCLC, non-small cell lung cancer; NHL, non-Hodgkin lymphoma; scFv, single-chain variable fragment; TCR, T cell receptor; TDCC, T cell-dependent cellular cytotoxicity. *Region of approval limited to the United States, the European Union (EU), Japan and China; products may also be approved in other countries. Status as of end of 2023.

Abreviaciones: ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; ALL, leucemia linfocítica aguda; BCMA, antígeno de maduración de células B; BiTE, activador biespecífico de células T; bsAb, anticuerpo biespecífico; DLBCL, linfoma difuso de células B grandes; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; EpCAM, molécula de adhesión celular epitelial; GPRC5D, receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5 miembro D; MoA, mecanismo de acción; NSCLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas; NHL, linfoma no Hodgkin; scFv, fragmento variable de simple cadena; TCR, receptor de células T; TDCC, citotoxicidad celular dependiente de células T. Las aprobaciones están limitadas a Estados Unidos, la Unión Europea, Japón y China; también pudieron ser aprobados en otros países. Estado hasta el final de 2023. Tabla extraída de Klein, C., *et al.*, 2024 [113].

La mayoría de los anticuerpos biespecíficos aprobados por la FDA y la EMA son los llamados *T-cell engagers*, y están dirigidos, por un lado, contra receptores de las células T (típicamente CD3) y por el otro contra antígenos tumorales [115]. Esta forma de activar a las células T de una forma independiente de la interacción TCR/MHC-péptido y de forma específica por las células tumorales, ha resultado de gran beneficio en el tratamiento de cierto tipo de leucemias, y se continúa en la exploración de su aplicación efectiva en tumores sólidos [116-118]. Por otro lado, también se ha utilizado el potencial de los anticuerpos biespecíficos para promover un bloqueo combinado de puntos de control de la inmunidad. Así, el cadonilimab, que recientemente obtuvo su aprobación, es un anticuerpo biespecífico que combina el bloqueo simultáneo de PD-1 y CTLA-4 en las células T [119]. Estas estrategias actúan directamente

sobre las células T, pero a la luz de los estudios recientes que hemos comentado que ponen de manifiesto el rol de las DCs, resulta interesante redirigir por ejemplo la terapia anti-PD-L1 a estas células buscando potenciarla.

Anticuerpos biespecíficos basados en nanobodies

Una de las alternativas que está tomando cada vez más un mayor protagonismo es la generación de b-Abs a partir del empleo de anticuerpos monodominio, nanobodies (nbs). Los nanobodies derivan del dominio variable de los anticuerpos carentes de cadena liviana que se encuentran presentes en los camélidos y poseen numerosas ventajas biotecnológicas. Entre estas se pueden destacar: la facilidad de la construcción de bibliotecas de expresión de nanobodies en fagos filamentosos a partir de camélidos inmunizados, la posibilidad de dirigir la selección de candidatos durante el enriquecimiento (*panning*) de la biblioteca, y el pequeño tamaño de su gen (aprox. 400 bp) que facilita el manejo genético y la expresión recombinante como proteína de fusión [120, 121]. A esto se suma su alta estabilidad y valores de afinidad que rivalizan los de los anticuerpos convencionales [120, 121]. Esto los convierte en dominios de unión ideales para la generación de b-Abs en una gran variedad de formatos. Algunas de las posibles alternativas son las observadas en la **Figura 1.6**.

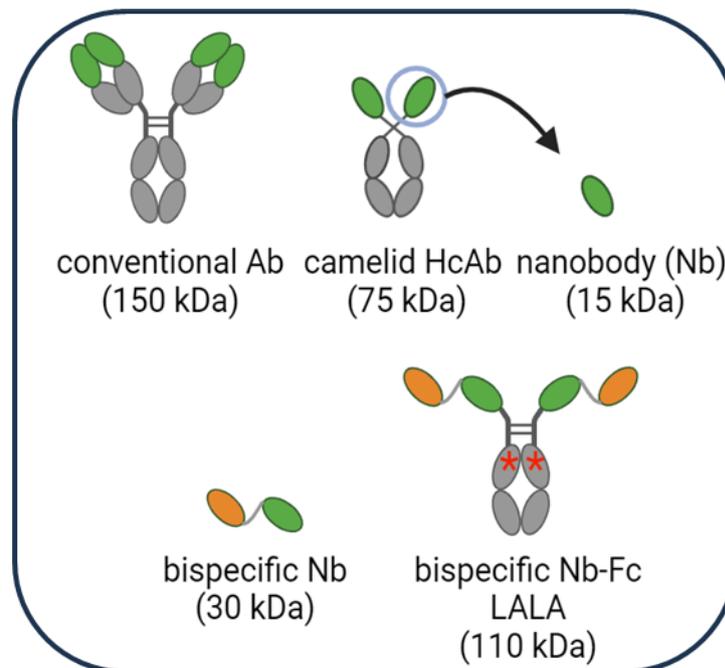


Figura 1.6. Anticuerpos monodominio como alternativa para la generación de anticuerpos biespecíficos. En la imagen se observan arriba a la izquierda una representación esquemática de los anticuerpos convencionales, en el centro a los anticuerpos de cadena pesada presentes en los camélidos, a la derecha al dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada también llamado nanobody (Nb). Abajo tenemos dos posibles formatos para la generación de b-Abs basados en Nbs. A la izquierda dos dominios con distinta especificidad unidos por una secuencia espaciadora. A la derecha en un formato con Fc mutado que solo extiende su permeancia. Imagen creada con BioRender.

Respecto a los formatos, cabe señalar que los nanobodies biespecíficos carentes de región Fc presentan un tamaño reducido (aprox. 30 kDa), lo que les otorga una alta penetrabilidad en tumores sólidos. Sin embargo, debido a su rápida eliminación renal, de 1-2 horas, requieren una administración constante [122]. Para solucionar este problema (aunque también restringen su penetración en el tumor), se están desarrollando diversas estrategias para extender su tiempo de permanencia, como la conjugación con polietilenglicol (PEG), expresión junto a un dominio de unión a albumina o mediante su fusión a regiones Fc [123].

La adición de regiones Fc generalmente se realiza con el objetivo principal de prolongar la permanencia de la proteína mediante su unión al receptor neonatal Fc (FcRn), donde el Fc carece de funciones efectoras, ej. IgG4, o posee mutaciones como la LALA (sustitución de Leu por Ala en posiciones 234 y 235), que reduce la unión a los receptores de Fc γ R y al componente C1q del complemento [124, 125].

Apuntando a desarrollos con potencial para ser aplicados en la clínica, es importante considerar que, si bien los nanobodies son una alternativa al formato convencional de anticuerpos terapéuticos, tienen una alta homología con la familia VH3 de genes de inmunoglobulinas humanas y hay un enorme número de nanobodies en ensayos clínicos. Caplacizumab un nanobody bivalente, ya ha sido aprobado para el tratamiento de púrpura trombocitopénica trombótica [126]. Además KNO46 un nanobody humanizado biespecífico anti-PD-L1/CTLA-4-Fc está en etapas de ensayos clínicos para el tratamiento de múltiples tipos de cáncer [127].

En nuestro grupo de investigación, mediante la plataforma de descubrimiento de nanobodies que fue desarrollada, ya se han aislado anticuerpos monodominio contra diversos receptores de la inmunidad. En lo que corresponde a los intereses de este trabajo se incluyen: (i) Nanobodies anti-PD-1 y anti-PD-L1, que han mostrado una potente actividad anti-tumoral en modelos murinos cuando se administraron utilizando vectores virales [128, 129]; (ii) Nanobodies contra los receptores de ratón CD11b (expresado por células mieloides en general) [130], el cual se

usó en un formato biespecífico combinándolo con un nanobody anti-toxina tetánica que permitió demostrar, en un modelo *in vivo* de neutralización de 10 dosis letales de la toxina, un aumento exponencial del poder de neutralización del biespecífico comparado con el nanobody anti-toxina monovalente [131]; y (iii) Nanobodies contra CD11c de ratón que surgieron del trabajo de tesis doctoral de Martín Rossotti, donde se aisló y caracterizó un nanobody anti-CD11c de ratón que se une a un epítipo solapante de uno de los anticuerpos anti-CD11c más usados, el clon N418. Este marcador es particularmente interesante ya que se expresa predominantemente en las DCs y ha sido utilizado para el direccionamiento de antígenos tumorales como HER-2 hacia estas células [132].

CD11c es una glicoproteína de superficie celular que forma parte del complejo receptor CR4 formando un heterodímero con la integrina $\beta 2$ (CD18). Como se mencionó, se expresa principalmente en las células dendríticas, aunque también puede encontrarse en monocitos, macrófagos, granulocitos y algunas células NK. Existen algunas diferencias en la expresión y función de CD11c entre ratones y humanos. En ratones, CD11c es un marcador ampliamente utilizado para identificar células dendríticas (DCs). Su expresión es especialmente alta en las células dendríticas convencionales (cDCs) y plasmocitoides (pDCs) en varios tejidos, incluyendo el bazo y los ganglios linfáticos [133]. Además, CD11c se expresa en niveles variables en algunos macrófagos y células NK, pero generalmente es menos expresado en otras células del sistema inmune [134]. En humanos, CD11c también se utiliza como marcador para células dendríticas, pero su expresión es más heterogénea [135]. Las células dendríticas mieloides (mDCs) y las células dendríticas mononucleares presentan altos niveles de CD11c [133]. Los monocitos y ciertos macrófagos también muestran niveles significativos de expresión de CD11c [136]. Las funciones de CD11c en adhesión, migración y presentación de antígenos son críticas en ambos organismos, reflejando su papel esencial en la inmunidad, pero hay que ser precavidos a la hora de extrapolar un resultado de una especie a otra.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Inicialmente, nuestra hipótesis apuntó a conectar las células dendríticas (DCs) con las células tumorales a través de un nanobody biespecífico, utilizando como blancos respectivos a CD11c y PD-L1. Esto podría tener dos beneficios: a) bloquear la actividad de PD-L1 de las células tumorales, y b) promover la fagocitosis de células tumorales y por tanto la presentación de antígeno. Si bien esta forma de acción podría ocurrir, con la aparición de la nueva información sobre el mecanismo principal que sustenta la inmunoterapia de bloqueo de puntos de control y la evidencia que fue generando esta tesis, nuestra hipótesis de trabajo evolucionó. En efecto, considerando que el mecanismo principal del bloqueo del eje PD-1/PD-L1 es el licenciamiento de las células dendríticas para activar a las células T_{pex}, el principal modo de acción de un nanobody biespecífico anti-CD11c/anti-PD-L1 ocurriría en cis sobre la DC, que al poseer ambos receptores uniría el Nb biespecífico con mayor avidéz, resultando en un bloqueo “preferencial”, que a su vez por entrecruzamiento podría eventualmente promover su internalización. Este desbloqueo del efecto inhibitor de PD-L1, permitiría un mayor grado de activación de las células T_{pex} lo que generaría un efecto antitumoral más potente. De esta forma podría aportarse datos preclínicos que muestren el potencial de una estrategia innovadora para potenciar la terapia ICB y mejorar la proporción de pacientes que se benefician de la misma.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Mejorar la terapia antitumoral con inhibidores del eje PD-1/PD-L1 mediante la unión simultánea a PD-L1 y otros receptores inmunes presentes en células presentadoras de antígeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Generar nanobodies individuales contra blancos de la inmunidad ya validados en formatos biespecíficos contra tumores como CD3, para la construcción de anticuerpos con doble especificidad con probada actividad antitumoral, que sirvan como control de los innovadores.
- 2- Construir los vectores para expresar nanobodies biespecíficos anti-R/anti-PD-L1 sin y con Fc, donde R representa a los siguientes receptores CD11c o CD11b, partiendo de las secuencias de los nanobodies contra estos receptores ya aislados en nuestro laboratorio.
- 3- Producir y purificar los nanobodies mencionados en el objetivo específico 2 mediante su expresión en *E. coli* o células HEK293T según corresponda.
- 4- Verificar la funcionalidad de los anticuerpos generados controlando su reactividad por citometría de flujo en células que expresen dichos receptores.
- 5- Realizar estudios de activación y de intensidad de unión sobre Células Dendríticas Derivadas de Médula Ósea (BMDCs) con los anticuerpos biespecíficos generados.
- 6- Estudiar en forma comparativa el grado de protección que se obtiene con los distintos nanobodies biespecíficos en un modelo tumoral de ratón.
- 7- Caracterizar las poblaciones celulares en el TME y ganglios drenantes y no drenantes en ratones tratados y no tratados.
- 8- Aplicar a otros tumores y comparar del grado de protección del mejor nanobody biespecífico identificado en el objetivo específico 6, con el que se obtiene usando anticuerpos de referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Protocolos generales

1.1 Cultivo de *Escherichia coli*

Los cultivos bacterianos de *E. coli* fueron incubados, excepto si se indica lo contrario, a 37 °C bajo agitación a 250 rpm. Las concentraciones finales de los diferentes antibióticos utilizados para suplementar los medios de cultivo tanto sólidos como líquidos fueron las siguientes: tetraciclina 10 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL y kanamicina 40 µg/mL.

1.2 Transformación

Las transformaciones se realizaron mediante electroporación en cubetas de 2 mm (Sigma-Aldrich) utilizando el equipo MicroPulser™ (BIO-RAD). Inmediatamente luego de la electroporación las células se incubaron en medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression: triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, MgCl₂ 10 mM, y glucosa 20 mM, pH 7,0) a 37 °C con agitación a 250 rpm durante 1 hora, y fueron plaqueadas en placas de medio LB agar con el antibiótico correspondiente, las cuales fueron incubadas a 37 °C toda la noche (ON, 16-20 horas).

1.3 Extracción de ADN plasmídico, secuenciación y análisis de secuencias

Se realizaron cultivos ON en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado a partir de colonias aisladas, de los cuales el ADN plasmídico se extrajo utilizando el kit comercial Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen #27104). Las secuencias fueron obtenidas a través del servicio de secuenciación de la empresa Macrogen (Korea) y analizadas utilizando el programa MEGA6.

1.4 ELISA

Para los ensayos en formato ELISA se utilizaron placas de alta adherencia de 96 pocillos transparentes (Greiner Bio-One #655061), que fueron sensibilizadas agregando 100 µL de una solución de proteína en buffer fosfato salino (PBS) e incubando durante 1 hora a 37°C o alternativamente ON a 4 °C. El bloqueo se realizó incubando los pocillos con 200 µL de solución bloqueante durante 30 minutos a 37 °C. Todas las subsiguientes incubaciones se realizaron agregando 100 µL por pocillo e incubando 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 450 rpm. Para el revelado de los ensayos se utilizó una proteína conjugada a peroxidasa de rábano, desarrollando la reacción de revelado incubando 100 µL por pocillo de la solución del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (TMB 0,096 mg/mL y H₂O₂

0,004% en buffer acetato 0,1 M, pH 5,5) durante 5-15 minutos en las mismas condiciones de temperatura y agitación, luego de lo cual la reacción fue detenida mediante el agregado de 50 μ L de H₂SO₄ 2 M. En todos los casos, luego de cada incubación se realizaron 6 lavados con PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T). Para las distintas incubaciones posteriores al bloqueo, a no ser que se indique lo contrario, se utilizó como buffer diluyente una dilución 1/10 en PBS de la solución bloqueante. La lectura de las placas de ELISA se realizó en el equipo FLUOstar OPTIMA. Se realizaron medidas a 450 nm, corrigiendo las mismas según el valor de absorbancia a 620 nm para eliminar contribuciones de absorbancia inespecífica.

1.5 PCR

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

1.6 Cuantificación de ADN y proteínas

Las medidas de concentración de ácidos nucleicos (ARN y ADN) y proteínas fueron realizadas utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), midiendo absorbancia a 260 nm y 280 nm respectivamente. Para determinar la concentración de ADN se utilizó el coeficiente de absorptividad 0,020 (ng/ μ L)⁻¹cm⁻¹, mientras que para las proteínas se utilizaron los coeficientes de absorptividad molar estimados a partir de las secuencias aminoacídicas.

1.7 Electroforesis SDS-PAGE

Para la visualización de proteínas se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida 12,5% en presencia del agente desnaturizante dodecilsulfato sódico (SDS) y en condiciones reductoras (salvo cuando se indica lo contrario), con posterior tinción con solución colorante de azul de Coomassie. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras fueron incorporadas en buffer de carga 6X (Tris-HCl 0,35 M, SDS 10% m/v, glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,175 mM y DTT (ditiotreitól) 0,1 M) y calentadas durante 5 minutos a 100 °C. Se utilizó el marcador de peso molecular Pierce Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific #26610).

1.8 Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar y en algunos casos purificar ADN, se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0), preparado con los agentes intercalantes de ADN GelRed (Sigma-Aldrich #SCT123) o GoodView (SBS Genetech #HGV-2), que permiten la visualización del ADN bajo luz UV. A las muestras se les agregó la cantidad correspondiente de buffer de carga 6X (Thermo Fisher Scientific #R0611) antes de ser sembradas. Para las purificaciones de ADN a partir de un fragmento de gel de agarosa se utilizó el kit comercial Qiaquick Gel Extraction (Qiagen #28704).

1.9 Análisis de datos y generación de imágenes

Para la generación de gráficos se utilizaron los programas GraphPad Prism 8 y Microsoft Excel. Para la generación de imágenes esquemáticas de secuencias de ADN se utilizó el programa SnapGene Viewer.

2. Vectores utilizados

2.1 Vector pComb3X

pComb3X es un vector fagémido desarrollado por Barbas *et al.* [137]. Posee un origen de replicación y señal de encapsidación para el fago M13, y como marcador de selección presenta un gen de resistencia a ampicilina. Este plásmido puede incorporarse en partículas virales cuando una célula que lo contiene es infectada con un fago *helper* que proporcione las restantes proteínas del fago. Codifica la proteína de superficie viral pIII, la cual puede expresarse fusionada a una proteína foránea, en este caso un nanobody, para su presentación en la partícula viral. El clonado de nanobodies es realizado a través de dos sitios de restricción para la enzima SfiI (GGCCNNNN↓NGGCC) ubicados en ambos extremos del nanobody. Dado que los nucleótidos variables (NNNNN) en los sitios de reconocimiento son diferentes en 5' y 3', el uso de esta enzima facilita el clonado direccional. El casete de expresión resultante incluye en el extremo amino-terminal al nanobody, seguido de una cola de poli-histidina (6xHis), el péptido HA (un epítipo de la proteína viral hemaglutinina) y la proteína pIII del fago.

2.2 Vectores pINQ

El vector pINQ-H6HA [138] es un vector derivado del vector pET-28a(+) (Novagen), y como tal posee el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección. Es utilizado para la expresión de proteínas junto con el tag HA. Presenta los mismos sitios de restricción para la

enzima SfiI que el vector pComb3X, facilitando el subclonado de nanobodies. Permite la expresión inducible de la proteína recombinante, evitando que su posible toxicidad afecte el crecimiento del cultivo. Dicha expresión se encuentra bajo el control del promotor T7, reconocido por la ARN polimerasa del bacteriófago T7, por lo que este vector debe transformarse en una cepa que codifique esta polimerasa en su genoma, como *E. coli* BL21(DE3). Dado que tanto la proteína recombinante de interés como la ARN polimerasa T7 se encuentran bajo el control del operador lac, la expresión de ambas es inducible mediante el agregado de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Además, el pINQ presenta la secuencia OmpA, posicionada en el extremo amino-terminal de la secuencia traducida, que codifica un péptido señal que promueve la localización de la proteína en el espacio periplasmático.

El vector pINQ-Bis fue diseñado para permitir la construcción de un nanobody biespecífico formado por dos nanobodies separados por una secuencia espaciadora (GQAGRGGGGSGGGGSGGGGSTSEL). Al igual que pINQ-H6HA, presenta sitios de restricción para la enzima SfiI que permiten el clonado direccional del nanobody que ocupa la posición amino-terminal, pero presenta además sitios de restricción para las enzimas SpeI y XhoI, que permiten el clonado direccional del nanobody que ocupa la posición carboxilo-terminal. Presenta las mismas características que pINQ-H6HA en cuanto a la regulación de la expresión de la proteína clonada e incluye también la secuencia OmpA para promover la exportación de la proteína al periplasma. Posee como única etiqueta una cola de poli-histidina.

2.3 pcDNA3.1(+)

pcDNA3.1(+) (Invitrogen) es un vector para la expresión de proteínas recombinantes en células de mamíferos. Posee un origen de replicación pUC y un gen de resistencia a ampicilina para su propagación en bacterias. Asimismo, posee un origen para la replicación episomal en células que expresan el antígeno T grande del virus SV-40, como por ejemplo la línea celular HEK293T. La presencia de un promotor y potenciador, ambos derivados de citomegalovirus, promueven un alto nivel de expresión de la proteína recombinante.

En el marco de esta tesis, se diseñó un gen para la expresión de biespecíficos-mFc IgG2a (LALA) en el que luego fue clonada la secuencia del CMV intrón A para mejorar su expresión. En esta construcción, la secuencia del primer nanobody se encontraba flanqueada por los mismos sitios de restricción de SfiI que el resto de los vectores mencionados y el segundo

nanobody por los sitios EcoRI/AgeI y XhoI. Además, otra versión del pcDNA3.1+ fue generada en donde se puede clonar el ADN de una proteína entre los sitios SfiI para la expresión fusionada a la región Fc de la IgG1 humana seguida del Twin-Strep-tag.

2.4 pSin-GFP

Este vector permite la expresión del gen de interés en la membrana de células HEK293T, ofreciendo un indicador de transfección exitosa (expresión de GFP) al momento de analizar las células transfectadas por citometría. Cuenta con un promotor SFFV, la secuencia líder VSV-G para el direccionamiento a la membrana celular, luego la región donde la proteína de interés puede ser clonada entre los sitios SfiI (donde su expresión es hacia el espacio extracelular), la región transmembrana VSV-G y finalmente la secuencia que codifica para la EGFP (enhanced Green Fluorescent Protein).

3. Subclonado de nanobodies o CD3 ϵ γ

El subclonado de nanobodies o CD3 ϵ γ se realizó mediante la obtención de un inserto digerido a través de sitios de restricción asimétricos reconocidos por la enzima SfiI, y su ligación en forma direccional en un vector de destino digerido que presentara extremos cohesivos. La obtención del inserto fue tanto por amplificación por PCR o digestión directa del mismo en el vector en el que se encontraba. Para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del nanobody (según se describe en la sección 1.5) utilizando el cebador directo “5” (5'-GTTACTCGCGGCCAGGCGGCCATG-3') y el cebador reverso “6” (5'-CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAG-3'). Estos cebadores se hibridan a los sitios de restricción de SfiI, permitiendo la amplificación del nanobody de interés y al mismo tiempo proporcionando los sitios para una posterior digestión utilizando esta enzima. Los productos de PCR fueron purificados mediante gel de agarosa utilizando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction (Qiagen) y posteriormente digeridos con SfiI (Thermo Fisher Scientific #ER1821) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El producto de digestión fue purificado mediante el kit comercial Qiaquick PCR Purification (Qiagen #28104). Cuando no era posible la amplificación por PCR, se realizó una digestión de ~10 μ g del vector de partida con la enzima de restricción apropiada, y el inserto liberado fue purificado mediante gel de agarosa utilizando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction (Qiagen).

Los vectores de destino se obtuvieron mediante la digestión de ~10 µg de plásmido con la misma enzima, seguido de una purificación mediante gel de agarosa en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las ligaciones se realizaron con la enzima T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific #EL0011) utilizando una relación molar 1:3 vector:inserto. En el caso de clones individuales, los productos de ligación fueron transformados en células *E. coli* DH5-α y plaqueados en placas de LB agar-kanamicina. Se obtuvo el ADN plasmídico de colonias aisladas y el clonado se verificó mediante secuenciación como se describe en la sección 1.3.

4. Expresión de distintas variantes de la proteína CD3εγ

4.1 Expresión de CD3εγ de ratón en *E. coli*.

Para generar nanobodies contra CD3 se utilizó una construcción compuesta por los ectodominios épsilon y gama de CD3 de ratón como describen Kim *et al.* [139]. Para su expresión, el gen sintético correspondiente al ADN de CD3εγ murino fue clonado entre los sitios *sfi*I del vector pINQ-H6-HA (descrito previamente), y este plásmido se utilizó para transformar células BL21. La producción fue en medio LB toda la noche, a 28°C, con una concentración 10 µM de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). El protocolo de lisis se basó en el reportado por Olichon *et al* [140]. Por cada 250 mL de cultivo, las células fueron resuspendidas en 2,5 mL de buffer TES (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 0,5 mM y sacarosa 0,5 M, pH 8,0). La suspensión fue congelada a -80°C y descongelada en hielo, posteriormente se le agregaron 2,5 mL de buffer TES y fue incubada en hielo durante 30 minutos. El paso final de la lisis consistió en inducir el shock osmótico suplementando la suspensión celular con 7,5 mL de una dilución 1/5 de buffer TES en agua e incubando en hielo durante 30 minutos. La fracción soluble del extracto fue obtenida mediante centrifugación a 30.000g durante 20 minutos a 4 °C. Para la purificación se utilizó el equipo ÄKTA y columnas de Ni-NTA (buffer de equilibrio: fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0), y la elución fue con un buffer conteniendo imidazol 250 mM (buffer de elución: fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0). Finalmente, se dializó en PBS utilizando membranas de cutoff de 13 kDa (Sigma-Aldrich).

4.2 Generación de CD3εγ biotinilado

Para la biotinilación química de CD3εγ se utilizaron distintas relaciones molares de CD3εγ:Biotina 1:1,25; 1:2,5; 1:5; 1:20. Se preparó una solución de Biotina-NHS (Thermo

Fisher Scientific, #20217) en DMSO de 10 µg/mL y se agregó el volumen correspondiente según la relación molar a una solución de la proteína en PBS. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se dializó en PBS.

4.3 Expresión de CD3εγ-hFc

El ADN de CD3εγ fue clonado entre los sitios SfiI del vector pcDNA3.1-intrónA-hFc (para producir a la proteína asociada a la región Fc de la IgG1 humana), para la expresión transitoria en HEK293T. En este vector, el casete de expresión contiene la secuencia líder Igκ para la secreción de la proteína. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4,5 g/L)) (Capricorn Scientific) suplementado con suero fetal bovino 10% (Capricorn Scientific) y una solución de antibiótico-antimicótico (Thermo Fisher Scientific #15240062), a 37 °C y CO₂ 5%. Se transfectaron cultivos celulares de aproximadamente 80% de confluencia en botellas T175 (Greiner, #660160) utilizando PEI MAX (Polysciences, #24765-100). Se utilizó una relación masa:masa de PEI:ADN 5:1 (36 µg de ADN por botella T175). Luego cada 72 hs, y en dos oportunidades, se cambió el medio de cultivo y lo recolectado fue sometido a centrifugación a 300g durante 10 minutos a 4 °C quedándonos con el sobrenadante, y la proteína fue purificada utilizando una columna de estreptactina de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5. Caracterización de la proteína CD3εγ

5.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La proteína producida y las versiones biotiniladas fueron analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, con el equipo Microflex (Bruker). Se utilizó como matriz ácido sinapínico 10 mg/mL en una mezcla 50:50 de acetonitrilo:TFA 0,1%.

5.2 ELISA de verificación de la reactividad de CD3εγ producido en *E. coli*

Se sensibilizó con CD3εγ recombinante 2 µg/mL y bloqueó con BSA 1% en PBS. Luego se incubó con un anticuerpo comercial anti-CD3ε-biotina (eBioscience™, clon: 145-2C11, #13-0031-82) desde 1 µg/mL siguiendo con diluciones seriadas al tercio, 100 µL por pocillo, 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Thermo Fisher Scientific #S911) (1 µL en 10 mL de PBS, BSA 0.1%) 100 µL por pocillo, 1 hora a temperatura ambiente y reveló con el sustrato.

6. Inmunización de una llama y construcción de bibliotecas de fagos filamentosos

Por motivos que serán discutidos en la sección Resultados y Discusión 1, se construyeron dos bibliotecas de fagos filamentosos durante el transcurso de esta tesis, para seleccionar clones anti-CD3. En ambos casos, se inmunizó la misma llama 149 del Parque Lecocq. Para la primera biblioteca, se administraron 3 dosis de proteína CD3 $\epsilon\gamma$ recombinante con 500 μg de antígeno por dosis. Las dosis fueron administradas por vía subcutánea en adyuvante incompleto de Freund en los días 0, 21 y 49. Para la segunda biblioteca, luego de aproximadamente 6 meses se administraron 2 dosis adicionales de CD3 $\epsilon\gamma$ -hFc 400 μg , CD3 $\epsilon\gamma$ -Biotina-Avidina 500 μg y CD3 $\epsilon\gamma$ 200 μg . Los procesos de inmunización fueron evaluados siguiendo la evolución del título de anticuerpos de cadena pesada mediante ELISA, como se describe en el punto 1.4 de la sección Materiales y Métodos (M&M), usando leche como bloqueante y revelando con anti-VHH conjugado a peroxidasa (GenScript, #A01861).

Para la construcción de las bibliotecas, se extrajeron 200 mL de sangre 8 días después de la última dosis, y se purificaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente utilizando Lymphocyte Separation Media (densidad 1,077 g/mL) (Capricorn Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas fueron generadas a partir de 2×10^7 y 4×10^7 células respectivamente, de las cuales se extrajo el ARN utilizando el reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific #15596026) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El ARN fue retro-transcripto utilizando la retrotranscriptasa RevertAID (Thermo Fisher Scientific #EP0442) y oligodT. Los fragmentos génicos correspondientes a estos dominios fueron amplificados desde el ADNc obtenido utilizando los cebadores directos:

VH1 (5'-catgcatgactcgcggcccaggcggccatggcccaggtgcagctggtgcagtctgg-3'),

VH3 (5'-catgcatgactcgcggcccaggcggccatggcccaggtgcagctggtggagtctgg-3'),

VH4 (5'-catgcatgactcgcggcccaggcggccatggcccaggtgcagctgcaggagtctggg-3')

El cebador reverso utilizado fue JH (5'-ccacgattctggccggcctggcctgaggagacrgtgacctgggtcc-3')

El protocolo de amplificación fue el descrito en la sección 1.5 de M&M, pero en este caso se realizaron 25 ciclos de amplificación. Los amplicones fueron purificados mediante gel de

agarosa, digeridos con la enzima de restricción SfiI (a través de los sitios de restricción incorporados por los cebadores) y clonados en el vector fagémido pComb3X.

A continuación, 2 µg del vector resultante fueron electroporados en células *E. coli* ER2738. Luego de una incubación en medio SOC (15 mL) durante 1 hora a 37 °C, 250 rpm, se tomó una alícuota de 500 µL a partir de la cual se plaquearon diferentes diluciones en placas de LB agar-ampicilina para determinar la diversidad de la biblioteca. El resto del cultivo fue diluido en 30 mL de medio SB (triptona 30 g/L, extracto de levadura 20 g/L y MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 10 g/L, pH 7,0) suplementado con ampicilina para una concentración final de 40 µL. Luego de una 1 hora de cultivo, se agregó ampicilina para una concentración final de 100 µg/mL y se incubó 1 hora más. El cultivo fue diluido en 250 mL SB-ampicilina (manteniendo la concentración de 100 µg/mL) y se infectó con fago *helper* M13KO7 (7×10^7 ufc). Luego de 90 minutos de cultivo, se agregó kanamicina (50 µg/mL) y el cultivo se incubó ON en las mismas condiciones.

Al día siguiente, el sobrenadante de cultivo fue obtenido por centrifugación a 12.000g durante 15 minutos a 4 °C. Las partículas de fagos fueron precipitadas mediante el agregado de 0,2 volúmenes de polietilenglicol 8000 (PEG 8000) 20%-NaCl 2,5 M, e incubadas en hielo durante 1 hora. Luego de una centrifugación a 15.000g durante 20 minutos a 4 °C, los fagos fueron resuspendidos en 30 mL de PBS. Para alcanzar una mayor pureza, los fagos fueron precipitados nuevamente de la misma forma, y luego de la centrifugación fueron resuspendidos en 5 mL de una solución conservadora compuesta por PBS-BSA 1% estéril. Se realizó una centrifugación final a 10.000g durante 5 minutos a 4 °C para eliminar posibles células que hayan permanecido luego de la centrifugación inicial. Finalmente, las bibliotecas fueron alícuotadas y almacenadas a -80 °C.

6.1 Titulación de anticuerpos de cadena pesada en sueros de llama

Para la titulación de anticuerpos anti-CD3 se realizaron ensayos ELISA según se describe en la sección 1.4 de M&M, utilizando placas sensibilizadas ON a 4 °C con proteína CD3εγ recombinante 2 µg/mL y bloqueadas con PBS-leche 5%. Se incubaron diluciones seriadas de sueros de llama en PBS-leche 1% y para el revelado se incubó con una dilución 1/10.000 de un anticuerpo monoclonal anti- VHH conjugado a peroxidasa (Genscript #A01861) en PBS-leche 1%-Tween 20 0,05%. Para el análisis de resultados, se realizaron ajustes sigmoides mediante

GraphPad Prism 8. Como control, los sueros también fueron evaluados para confirmar que no fueran reactivos contra el bloqueante utilizado.

7. Selección de nanobodies mediante *panning*

El proceso de *panning* se realizó mediante dos estrategias, sensibilizando en cuatro pocillos de ELISA de alta adherencia con CD3 ϵ γ o estreptavidina 5 μ g/mL y bloqueando con PBS-BSA 1%. En los pocillos con estreptavidina se incubó con CD3 ϵ γ-biotina 5 μ g/mL 1h a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados con PBS-T (Tween 20 0,05%) y a continuación se agregaron 3×10^{11} ufc por pocillo de la biblioteca de fagos en un volumen final de 100 μ L, y fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Los fagos no unidos fueron descartados y se realizaron 10 lavados con PBS-T, luego se incubó la placa con este buffer durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se realizaron 10 lavados más. Los fagos fueron eluidos agregando 50 μ L/pocillo de tripsina 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, #T4799) en buffer Tris salino (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e incubando durante 30 minutos a 37 °C.

Para la selección de clones anti-CD3, se realizaron tres rondas de *panning*.

7.1 Amplificación de fagos

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

Al día siguiente, el sobrenadante de cultivo fue recuperado mediante centrifugación a 12.000g durante 15 minutos a 4 °C. A partir del mismo, los fagos fueron precipitados agregando 0,2

volúmenes de PEG 8000 20% e incubando en hielo durante 1 hora. Los fagos precipitados fueron obtenidos mediante centrifugación en las mismas condiciones y resuspendidos en 1 mL de PBS-BSA 1%. Finalmente, los fagos fueron sometidos a una centrifugación a 17.000g durante 1 minuto para separar posibles células que hayan permanecido luego de la centrifugación inicial.

En rondas sucesivas de *panning*, se agrega a los pocillos 100 μ L de este amplificado en lugar de la biblioteca de fagos.

7.2 Titulación de fagos

Para evaluar y controlar el proceso de *panning*, los fagos obtenidos (*outputs* y amplificados) deben ser titulados. Para la titulación, se infectaron alícuotas de 100 μ L de un cultivo de bacterias *E. coli* ER2738 en medio SB-tetraciclina ($DO_{600nm} = 0,8-1,0$ UA) con 10 μ L de diluciones seriadas de una solución de fagos (*output* o amplificado) en medio SB. Luego de una incubación de 30 minutos a 37°C sin agitación, las alícuotas fueron plaqueadas en placas de LBagar-ampicilina e incubadas ON. Dado que el vector fagémido confiere resistencia a ampicilina, el recuento de colonias permite cuantificar los fagos presentes en un *output* o amplificado (como unidades formadoras de colonias, ufc).

7.3 Screening preliminar del *output* de fagos

Para realizar una evaluación primaria de un *output* obtenido, se inocularon cultivos de 2 mL en medio SB-ampicilina con 12 colonias aisladas de una placa de titulación del *output* a evaluar, las cuales contenían el vector fagémido pComb3X. Al alcanzar una $DO_{600nm} = 0,6$ UA la expresión de nanobodies fue inducida mediante el agregado de IPTG 1 mM y los cultivos fueron crecidos ON a 37 °C.

Al día siguiente los sobrenadantes de cultivo fueron obtenidos mediante centrifugación a 5.000g durante 10 minutos a 4 °C y analizados mediante ELISA. Se incubaron diluciones 1/2 de los sobrenadantes sobre pocillos sensibilizados con el antígeno de interés y bloqueados con PBS-BSA 1%, y la unión de los nanobodies fue detectada utilizando una dilución 1/10.000 del anticuerpo anti-VHH conjugado a peroxidasa o 1/3.000 de un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (Roche #12013819001).

Para el *screening* de nanobodies, se evaluó la reactividad tanto contra CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\gamma$ -biotina y CD3 $\epsilon\gamma$ -hFc. En el primer y último caso, los pocillos fueron sensibilizados con proteína CD3 $\epsilon\gamma$

o CD3 $\epsilon\gamma$ -hFc 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en el caso de la proteína CD3 $\epsilon\gamma$ -biotina los pocillos fueron sensibilizados con estreptavidina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y luego del bloqueo se incubó CD3 $\epsilon\gamma$ -biotina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

8. Expresión recombinante de nanobodies

8.1 Producción de nanobodies biespecíficos

La expresión de nanobodies biespecíficos se realizó en bacterias *E. coli* BL21(DE3) utilizando el vector pINQbis. Para optimizar la expresión de cada uno, se realizaron cultivos a pequeña escala (2 mL) evaluando diferentes concentraciones de inductor, temperaturas de cultivo. Los cultivos en medio LB fueron inducidos a $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ UA. Al día siguiente, para generar extractos celulares se centrifugó 1 mL de cada cultivo a 5.000g durante 10 minutos, y se resuspendió en 200 μL del reactivo de lisis celular B-PER (Thermo Fisher Scientific #78243). El mismo se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 15.000g durante 5 minutos. Luego de separar el sobrenadante (correspondiente a la fracción soluble del extracto), el pellet fue resuspendido en 200 μL de urea 8 M, incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugado a 17.000g durante 10 minutos para obtener la fracción insoluble del extracto (correspondiente al sobrenadante de esta centrifugación). Las fracciones fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE.

Los cultivos a mayor escala (1 L o 2 L, siempre en matraces de 2 L con 250 mL de medio suplementado con kanamicina) fueron inducidos y crecidos ON a 20°C (E5-anti-PD-L1 3 μM IPTG; anti-CD11b/PD-L1 1 μM IPTG) o 24°C (anti-CD11c/PD-L1 1 μM IPTG), luego de lo cual las células fueron obtenidas mediante centrifugación a 5.000g durante 10 minutos a 4°C. A continuación, fueron lisadas mediante shock osmótico como se describió en el punto 4.1 de la sección M&M.

Para la purificación de los biespecíficos se siguieron los mismos pasos que en punto 4.1 de la sección M&M, con la excepción de la realización de lavados con Tritón X-114 (SIGMA-ALDRICH, #MKBJ0238V) como describen Reichelt *et al.* [141] para la remoción de las endotoxinas provenientes de las bacterias que podrían interferir en futuros ensayos *in vivo*. Con este fin, se realizaron lavados con 50 mL de Tritón X-114 0,1% en PBS, luego con 20 mL de PBS apirógeno y finalmente se eluyó con PBS-imidazol 250 mM apirógeno. Para eliminar el

imidazol se hizo una gel-filtración en condiciones estériles en columnas PD-10 (illustra NAP-25 GE Healthcare) equilibrada en PBS apirógeno.

8.2 Producción de biespecíficos con Fc IgG2a mouse (LALA)

Para su expresión, el ADN de los diferentes Nbs fue clonado entre los sitios SfiI o para el caso del scFv de atezolizumab entre los sitios EcoRI y XhoI del vector pcDNA3.1 intrón A mFc (para producir biespecíficos asociados a la región Fc de la IgG2a de ratón con mutación LALA (234, 235) que reduce funciones efectoras). Se siguieron los mismos pasos que en la sección 4.3 de M&M, y luego se purificaron los anticuerpos utilizando una columna de proteína A. Se usó PBS como buffer de equilibrio, se realizaron lavados con 50 mL de Tritón X-114 0,1% en PBS, luego con 20 mL de PBS apirógeno, buffer pH 4,5 (NaCl 0,15 M, ácido acético 0,58% en agua apirógena) para remover las inmunoglobulinas bovinas provenientes del suero y finalmente se eluyó con buffer pH 3,0 (glicina 0,1 M en agua apirógena), en dónde cada fracción ácida recolectada fue neutralizada con TRIS 1 M pH 9,0. Para intercambiar el buffer se hizo una gel filtración en condiciones estériles en columnas PD-10 (illustra NAP-25 GE Healthcare) equilibrada en PBS apirógeno.

9. Ensayos de funcionalidad y detección de biespecíficos anti-PD-L1

9.1 Ensayos mediante ELISA

Se sensibilizó con mouse-PD-L1-hFc recombinante (SinoBiological #50010-M03H o Acrobiosystems #PD1-M5251) 0,5 µg/mL y bloqueó con BSA 1% en PBS. Luego se incubó con los diferentes biespecíficos desde 120 ng/mL siguiendo con diluciones seriadas al medio, 100 µL por pocillo, 1 hora a temperatura ambiente. Para la determinación de la concentración de biespecíficos en suero de ratón se utilizaron diluciones apropiadas, desde 1/10.000 hasta 1/20. Por último, se incubó con anti-VHH o anti-Mouse IgG2a conjugados a peroxidasa (Fortis Life Science #A90-107P) (1 µL en 10 mL de PBS, BSA 0,1%) 100 µL por pocillo, 1 hora a temperatura ambiente y reveló con el sustrato.

9.2 Ensayos de funcionalidad por citometría de flujo

Se emplearon distintas líneas celulares como: células tumorales B16F10 que expresan PD-L1; células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) que expresan CD11c o macrófagos J774A.1 que expresan CD11b. Luego de la incubación con los distintos biespecíficos a una concentración de 10 µg/mL en FACS buffer (PBS, BSA 0,1%; 2 mM EDTA), se marcó con

anti-VHH-iFluor 647 (GenScript #A01994-200), estreptavidina-ficoeritrina (abcam #ab239759) o anti-mouse IgG2a-PE/Cyanine7 (Biolegend clone: RMG2a-62 #407113). Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson) y para el procesamiento se utilizaron los softwares FACS Diva y FlowJo.

10. Determinación de constantes de afinidad (K_D) e inhibición PD-L1/PD-1 por Nb

La unión de Atezolizumab o anti-CD11c-Atezolizumab a PD-L1 fue caracterizada mediante interferometría de biocapa utilizando el equipo BLItz (ForteBio) y biosensores reactivos a aminas (biosensores AR2G). Los biosensores fueron activados con N-hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), luego de lo cual se inmovilizó el antígeno (proteína PD-L1 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en buffer acetato 10 mM pH 5,0 y finalmente se bloquearon los sensores con etanolamina 1 M, pH 8,5.

Para la determinación de constantes de disociación (K_D), se estableció la línea de base utilizando 400 μL de *kinetic* buffer 10X (PBS suplementado con Tween 20 0,2%, BSA 1% y azida de sodio 0,05%). La cinética de asociación se midió incubando el sensor sobre una gota de 4 μL de proteína en diferentes concentraciones en *kinetic* buffer 10X durante 120 s, mientras que la disociación se monitoreó colocando el sensor en 400 μL de *kinetic* buffer 10X durante 120 s. Para Atezolizumab se realizaron medidas a concentraciones de 50, 200, 300 nM, mientras que para anti-CD11c-Atezolizumab se utilizaron concentraciones de 100, 150, 200 nM. Se realizó un ajuste de los datos mediante el software Blitz Pro (versión 1.2) utilizando un modelo de unión 1:1, a partir del cual se calcularon los parámetros cinéticos.

Por otra parte, se realizó un *binning* de epítopes para determinar si el Nb anti-PD-L1 era capaz de inhibir la unión de PD-1 por su ligando. El Nb fue incubado durante 120 s a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el paso siguiente se incubó PD-1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en conjunto con el Nb anti-PD-L1 unido previamente, para compensar el potencial desplazamiento del Nb ya unido.

11. Líneas celulares tumorales

11.1 Melanoma

Se utilizó la línea celular de melanoma de ratón B16F10, obtenida de American Type Culture Collection (ATCC, N° de línea CRL-6475). La línea fue cultivada en medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%, siguiendo recomendaciones de ATCC.

11.2 Cáncer de colon

Se utilizó la línea celular de cáncer de colon de ratón CT26, obtenida de ATCC (N° de línea CRL-2638). La línea fue cultivada en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) enriquecido con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%, siguiendo recomendaciones de ATCC.

También se utilizó otra línea celular de cáncer colon de ratón MC38, cedida gentilmente por la Dra. Mercedes Segovia. La línea fue cultivada en medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%.

12. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones C57BL/6 y BALB/C, hembras, de 8-12 semanas de edad (Dilave, Uruguay). Estos fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Higiene, con ciclos de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, a 21°C, 60% de humedad, y con agua y ración *ad libitum*. Todos los ensayos con animales de experimentación se realizaron bajo normas y cumpliendo todos los requerimientos de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) para asegurar su salud y bienestar. El protocolo de experimentación animal fue presentado y aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Medicina (Exp. N° 070151-000020-22).

13. Evaluación de efecto antitumoral

La evaluación del efecto protector de los biespecíficos preparados, se estudió en modelos de inmunoterapia anti-tumoral en ratón que han sido puestos a punto en el laboratorio de la Dra. María Moreno del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene. Ver en detalle los diferentes tratamientos para cada experimento en la sección de resultados.

14. Estudio de la respuesta inmune

Se evaluó la respuesta inmune celular ejercida con los biespecíficos en el modelo murino de cáncer de colon CT26. Para llevar a cabo este estudio se obtuvieron muestras de tumor, ganglio linfático drenante (TDLN) y no drenante del tumor (NDLN).

A partir de los tejidos obtenidos en PBS se obtuvo una suspensión celular mediante disgregación mecánica. Para el caso de los ganglios, se realizaron conteos por Cellometer. Se analizó el reclutamiento de células inmunes al tumor o ganglios luego de la terapia mediante citometría de flujo.

14.1 Evaluación de los linfocitos

Las células fueron marcadas con distintos paneles de anticuerpos (Biolegend), de acuerdo a como se muestra en la **tabla 2.1** (CD45 fue usado solo en tumor).

Tabla 2.1. Anticuerpos conjugados a fluoróforos utilizados para inmunofenotipificación para linfocitos.

Marcador	Fluoróforo	Clon
CD45	BV510	30-F11
CD3	PerCPCy5.5	17A2
CD8	FITC	53-6.7
CD4	APCCy7	GK1.5
CD69	PECy7	H1.2F3
PD1	PE	29F.1A12
Ly108	APC	330-AJ
Ki67	PB	11F6

Se definieron linfocitos T colaboradores (CD3+CD4+CD8-), linfocitos T citotóxicos (CD3+CD4-CD8+) dentro de las células CD45+, tratando para esta última población de definir su fenotipo específico y proliferación, en tumor y en células totales de ganglio (**Figura 2.1.A**).

14.2 Evaluación de células mieloides

Las células fueron marcadas con distintos paneles de anticuerpos (Biolegend), de acuerdo a como se muestra en la **tabla 2.2** (CD45 y CD103 fueron usados solo en tumor y CD80 solo en ganglios).

Tabla 2.2. Anticuerpos conjugados a fluoróforos utilizados para inmunofenotipificación de células mieloides.

Marcador	Fluoróforo	Clon
CD45	BV510	30-F11
CD19	APCCy7	GD5
CD11b	PerCPCy5.5	M1/70
CD11c	BV421	N418
F4/80	PECy7	BM8
MHCII (IA-IE)	PE	M5/114.15.2
PD-L1	APC	10F.9G2
CD80	FITC	16-10A1
CD103	FITC	2E7

Se definieron las células mieloides (CD19-CD11b+), células dendríticas (CD19-F4/80-CD11b+MHCII+), macrófagos (CD11b+F4/80+), estudiando el nivel de expresión de PD-L1, CD80 y CD103 (este último dendríticas en tumor) (**Figura 2.1.B** estrategia de *gating* DCs).

Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson) y para el procesamiento de los datos se utilizaron los softwares FACS Diva y FlowJo.

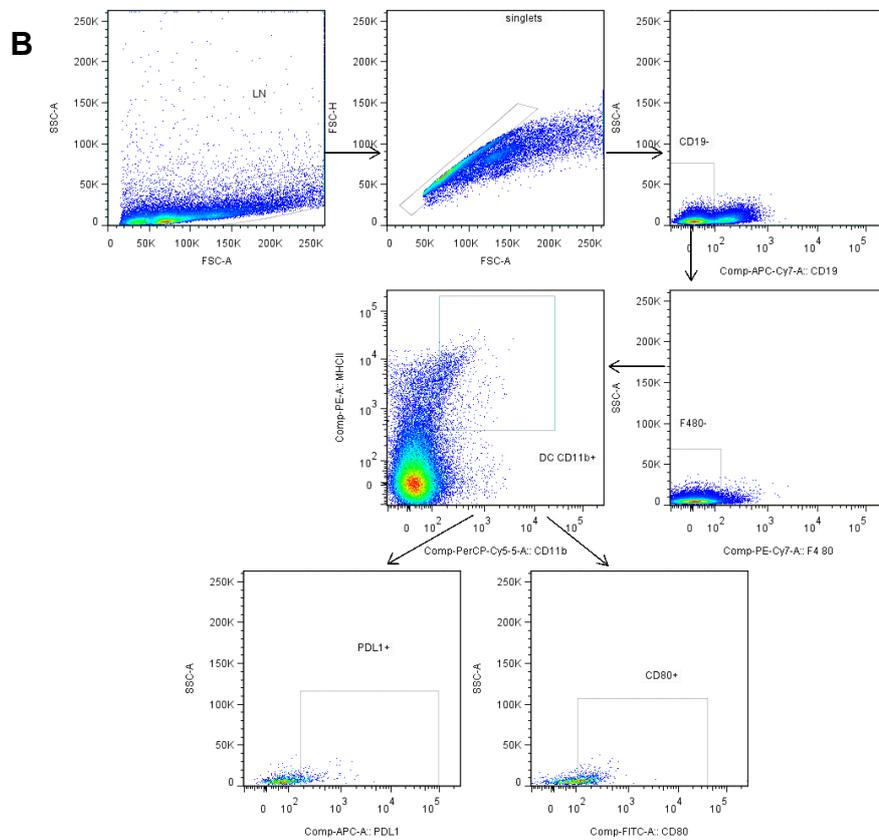
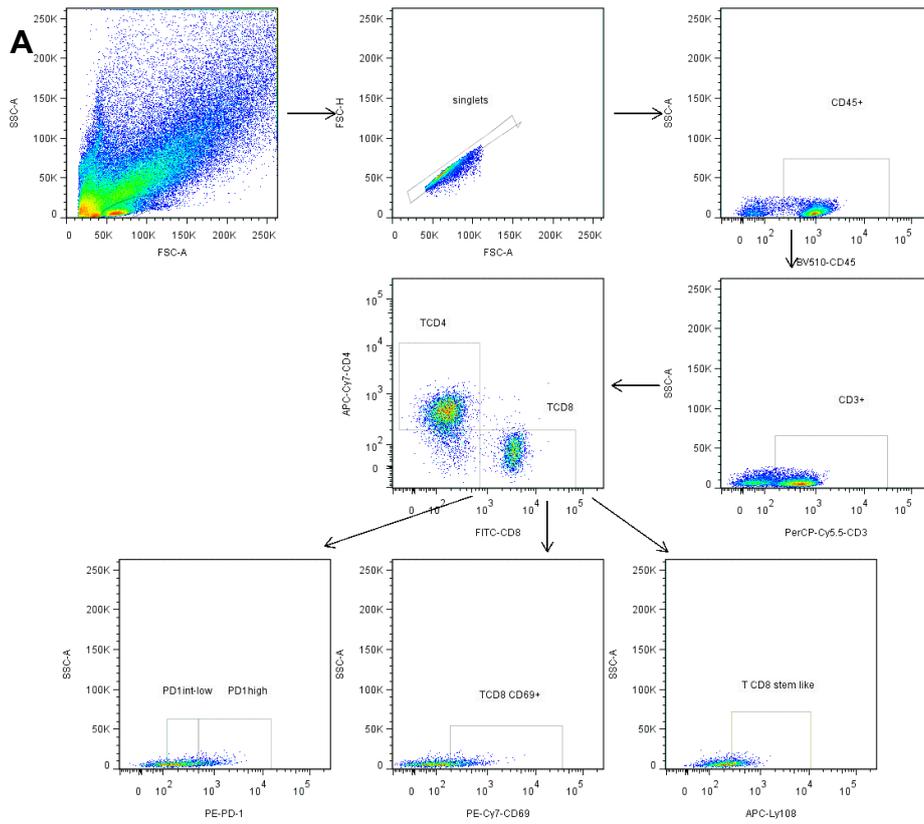


Figura 2.1. A) Estrategia de *gating* para linfocitos en el tumor. B) Estrategia de *gating* para DCs en el ganglio.

15. Ensayos *in vitro* con Células Dendríticas Derivadas de Médula Ósea (BMDCs)

15.1 Obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea

El protocolo de diferenciación utilizado fue descrito por Lutz *et al.* [142]. Los animales se sometieron a eutanasia por dislocación cervical. Se realizó la disección de las patas traseras y se extrajeron los fémures y las tibias en flujo laminar. Los huesos obtenidos se limpiaron de restos de tejido y se embebieron en PBS estéril durante 10 minutos. Para extraer la médula ósea se cortaron las epífisis de los huesos y se colocaron un fémur y una tibia en tubos de 0,5 mL perforados con aguja 27G y a su vez estos en tubos de 1,5 mL. Luego se centrifugó a 13.800g, 3 minutos. Las células recuperadas se contaron en cámara de Neubauer utilizando el indicador de viabilidad Tripán Blue al 0,1% (m/v). El volumen de suspensión celular correspondiente a 3×10^6 precursores de médula ósea se sembró en el centro de una placa de Petri (formando una “nube” compacta de células) conteniendo 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 mM HEPES, antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y 0,25 μ g/mL de anfotericina B), 10% (v/v) Suero Fetal Bovino inactivado por calor (SFB) y 20 ng/mL del factor de diferenciación de células dendríticas GM-CSF (proteína recombinante) o 1% (v/v) de sobrenadante del cultivo de células de plasmocitoma J558, productoras de GM-CSF (cedido gentilmente por el grupo de la Dra. Ana Ferreira que trabaja en nuestro laboratorio). El medio de cultivo compuesto como se menciona antes se denominó “medio completo”. Las condiciones de incubación utilizadas en este caso, y en el resto de este trabajo, fueron: temperatura de 37 °C con atmósfera de 5% (v/v) de CO₂. Los cambios de medio se realizaron como se describe a continuación: al tercer día de cultivo se agregaron 10 ml de medio completo a cada placa de Petri (volumen final 20 ml), a los seis días se removieron 9 ml del medio de cultivo y se agregaron 10 ml de medio completo fresco. Dos días después (octavo día de cultivo) se repitió este último procedimiento. Todos los agregados/cambios de medio se hicieron suavemente con el fin de minimizar la activación de las células, altamente sensibles a estímulos mecánicos. A los 10 días de diferenciación las células se cosecharon, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, y se resuspendieron en medio completo, esta vez conteniendo 5 ng/ml de GM-CSF comercial o 0,25% (v/v) de sobrenadante de las células J558 (“medio de trabajo”).

15.2 Expresión de PD-L1 en BMDCs tratadas con b-Nbs

En placa de 96 pocillos se sembraron 200.000 BMDCs en 100 μ L de medio por pozo. Luego de 1 hora para la adhesión se agregaron los b-Nbs anti-CD11c/PD-L1 o E5/anti-PDL1 desde 5,5 μ g/mL diluciones al décimo hasta 0,005 μ g/mL o los correspondientes b-Nbs-Fc en concentraciones desde 10 μ g/mL diluciones al décimo hasta 0,01 μ g/mL en un volumen de 100 μ L (200 μ L volumen final por pozo). Incubando a 4°C por 1h o a 37°C por 20hs. Después, se retiró 100 μ L de medio y con lo restante se despegaron las células resuspendiendo en el mismo, pasando todo a una placa fondo en V. Posteriormente se centrifugó a 350g, 5 min, 4°C, se descartó el medio y luego se hicieron 3 lavados con FACS buffer (centrifugando luego de cada lavado y descartando el buffer). En el siguiente paso se incubó con suero normal de rata 10%, 25 μ L/pozo, 20 min, 4°C, para bloquear los receptores Fc de las BMDC e inmediatamente se agregó un anticuerpo comercial anti-PD-L1-APC (Biolegend, clon 10F.9G2) dil 1/50, 25 μ L/pozo, incubando 30 min, 4°C. Luego de 3 lavados con FACS buffer (centrifugaciones luego de cada lavado descartando el buffer), las células fueron fijadas con PFA 4% 100 μ L/pozo, 20 min. y después de un lavado se dejaron en 130 μ L de FACS buffer para ser analizadas en el citómetro al otro día.

15.3 Microscopía confocal en BMDCs tratadas con b-Nbs-Fc

Los experimentos de microscopía confocal fueron realizados en colaboración con la Dra. Lucía Canclini en el IIBCE (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable). Se siguieron los mismos pasos para la preparación de BMDCs con ciertas modificaciones en las incubaciones con los b-Nbs. Se agregaron los b-Nbs-Fc anti-CD11c/PD-L1-Fc o E5-anti-PD-L1-Fc (ambos conjugados a AF568) en concentración de 20 μ g/mL en un volumen de 100 μ L (200 μ L volumen final por pozo). Incubando a 4°C, 1h (unión), lavando y luego a 4°C o 37°C 1h. Se centrifugó a 350g, 5 min, 4°C y descartó el medio. Luego se hicieron 3 lavados con FACS buffer (centrifugaciones luego de cada lavado y descartó el buffer). Se realizó bloqueo de Fc con suero normal de rata 10% y luego se agregó el anticuerpo comercial anti-PD-L1-APC dil 1/50 y anti-CD11b-FITC (Nb V36 dil 1/1000), y se incubaron 30 min, 4°C. Luego de 2 lavados con FACS buffer y 1 con PBS, se resuspendieron las células en 25 μ L de PBS y se sembraron sobre vidrio tratado con poly L-lysina en placa de 24 pocillos. Luego de 40 min a temperatura ambiente se agregó PFA 8% 25 μ L incubando otros 30 min para finalmente retirar el líquido con pipeta y agregar DAPI 1/2.000 en PBS 500 μ L/pozo 5 min. Se sacaron los vidrios con pinza y montaron

sobre porta objeto con gota de 10 μ L de Thermo Prolong antifade. Se dejó secando protegido de la luz por 24 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Generación de Nanobodies (Nbs) que reconozcan a la proteína CD3 de ratón

1.1-Producción del antígeno para la inmunización

Con el fin de generar nanobodies (Nbs) que reconocieran a la proteína CD3, se produjo como antígeno una forma recombinante del mismo que contiene a la subunidad épsilon, en la que se encuentra el epítipo definido por el anticuerpo terapéutico muromonab (OKT3) [143]. Consideramos que este era un aspecto importante, porque este anticuerpo ha sido exitosamente usado en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos capaces de conectar células T con células tumorales, los denominados *T cell engagers*. El antígeno utilizado fue descrito por Kim *et al.* [139] y está formado por los ectodominios épsilon y gamma de CD3 unidos por una secuencia espaciadora de 26 aminoácidos (GSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGS) como se representa en la **Figura 3.1**. La presencia del ectodominio gamma es necesaria para el correcto plegamiento del ectodominio épsilon [139]. La secuencia espaciadora fue optimizada por los autores para mejorar el plegamiento y el reconocimiento de cinco anticuerpos monoclonales anti-CD3. En la **Figura 3.1a** se muestra el esquema del casete de expresión clonado en el vector pINQ-H6-HA [138] utilizado para la expresión en *E. coli*. Se obtuvieron 2,2 mg de la proteína purificada por Ni-NTA de un litro de medio de cultivo. En el análisis por SDS page se corrieron las fracciones obtenidas, se verificó su pureza apreciando una única banda con el peso molecular entorno al adecuado (**Figura 3.1b**). Para verificar el estado de agregación se realizó una gel-filtración en la que la proteína eluyó en un solo pico, con un volumen de elusión de 13,0 mL correspondiendo a un peso molecular de 25,4 kDa similar al esperado para la forma monomérica (23,4 kDa) (**Figura 3.1c**). Además, mediante el análisis por MALDI-TOF se obtuvo un peso molecular de 23397,32 MH que es acorde al peso molecular calculado para la proteína de 23382,69 Da.

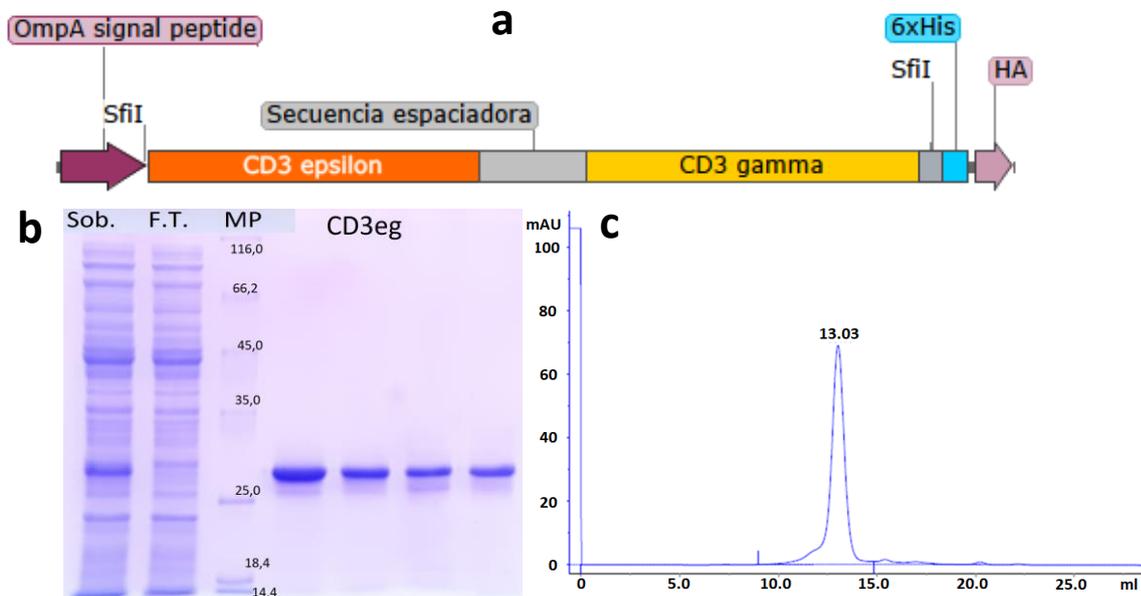


Figura 3.1. Producción de CD3εγ recombinante. a) esquema del casete de expresión utilizado. b) Análisis de la purificación por SDS-PAGE: Sob., extracto celular; F.T., fracción no retenida; MP, marcador de peso molecular; resto, fracciones eluidas con imidazol. c) Análisis de la proteína purificada por gel filtración. Marcadores de peso molecular con su respectivo volumen de elución: Azul dextrano 2000kDa, 6,71mL; Tiroglobulina 660kDa, 8,89mL; Ferritina 440kDa, 8,83mL; Aldolasa 160kDa, 10,32mL; Ovoalbúmina 45kDa, 11,7mL; Quimiotripsinógeno A 25,6kDa, 13,44mL; Ribonucleasa A 13,7kDa, 13,93mL.

Finalmente se confirmó su reactividad empleando la técnica de ELISA con un anticuerpo comercial anti-CD3ε (clon: 145-2C11) (Figura 3.2). Esto permitió verificar que la proteína era reconocida y que reproducía el epítipo nativo definido por el anticuerpo 145-2C11.

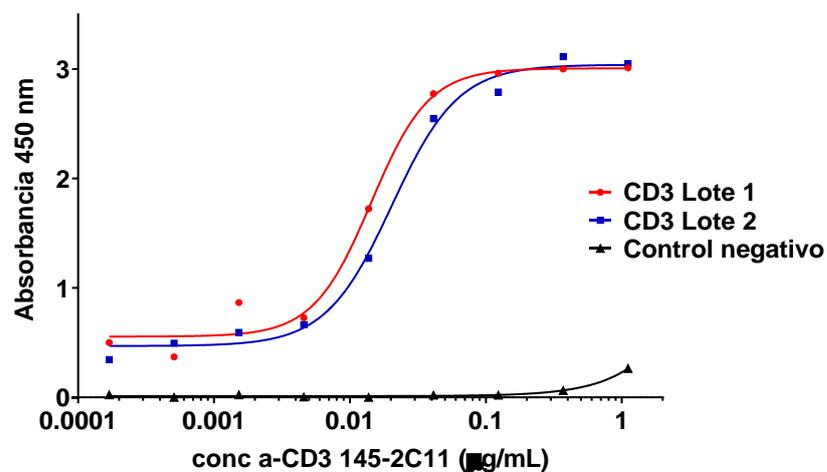


Figura 3.2. ELISA de verificación de reactividad del anticuerpo comercial contra CD3 recombinante. El anticuerpo se ensayó contra dos lotes de antígeno o en ausencia del mismo (control negativo).

1.2-Inmunización de llama y selección de nanobodies

Seguido de esto, CD3 $\epsilon\gamma$ se utilizó para la inmunización de una llama, en la que se le administraron 3 dosis de 500 μg del antígeno en 1 mL de PBS (en esta solución también se encontraban otras proteínas con el objetivo de generar Nbs contra las mismas), emulsionado con 1 mL de AIF (adyuvante incompleto de Freund), en los días 0, 21 y 49. En el momento en que se realizaron las inmunizaciones y 10 días luego de la última, se extrajeron muestras de sangre. Como se puede apreciar en la **Figura 3.3** la respuesta obtenida luego de las 3 dosis no fue de gran magnitud (IC 50 suero 4: 389,3). Por experiencias pasadas y las respuestas de los otros antígenos que estaban presentes se esperaba obtener un título de al menos 2.000.

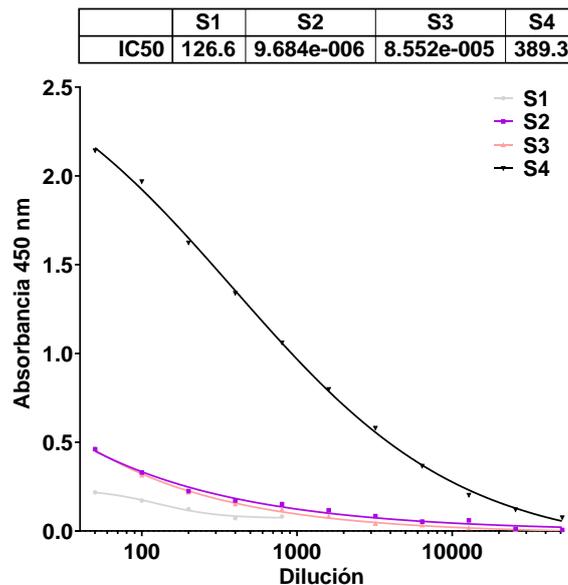


Figura 3.3. Titulación de sueros llama 149 contra la proteína CD3 por ELISA. Los sueros S1-S4, corresponden al día 0 (S1) y las subsiguientes extracciones (S2-S4).

De todos modos, se construyó la biblioteca de fagos y se procedió con el *panning*.

Esta etapa se realizó sensibilizando una placa directamente con la proteína CD3 $\epsilon\gamma$ e incubando con una dilución 1/10 de la biblioteca, para luego de los lavados correspondientes, tripsinizar y eluir los fagos con los Nbs específicos. En el primer *output* se obtuvo un título de $0,9 \times 10^6$ UFC/mL. Luego de otra ronda de *panning* el título del *output* aumentó 2 órdenes a $0,8 \times 10^8$. A partir de este *output* se analizaron 12 clones por

ELISA sin resultados positivos. Ante este resultado negativo se decidió hacer una ronda más de *panning* en el que el título del *output* volvió a aumentar a 5.6×10^8 pero para nuestra mala fortuna en un nuevo *screening* de 12 clones, todos dieron negativo.

Ante esto, se buscaron alternativas para generar variantes de la proteína CD3 que fueran más inmunogénicas para la llama, de forma de aumentar así el título de anticuerpos y construir una nueva biblioteca.

1.3-Generación de variantes inmunogénicas de CD3

Una de las alternativas que primero exploramos fue la de biotinar químicamente a la proteína para que luego al incubarla con avidina se formara un complejo tetramérico con una mayor cantidad de epítopes T provenientes de la avidina. Se realizaron pruebas de biotilación usando distintas relaciones de las cantidades molares proteína:biotina de forma de quedarnos con una proteína con bajo grado de biotilación para intentar que no se modifique la estructura original. El análisis por MALDI-TOF (**Figura 3.4**) mostró que la mejor relación era de 1:1,25 en el que el producto mayoritario muestra el agregado de 2 biotinas.

Paralelamente, se generó la proteína CD3-hFc fusionando CD3 $\epsilon\gamma$ a la región Fc de la IgG1 humana, de forma de aumentar su internalización por las células presentadoras de antígeno y aumentar su vida media [144]. Con este fin el gen de la proteína CD3 $\epsilon\gamma$ se clonó en el vector pcDNA3.1-intronA-hFc, que luego se utilizó para expresar la proteína en células HEK293T. Se purificó del sobrenadante del cultivo por columnas de estreptactina, verificando su pureza por SDS page (**Figura 3.5**).

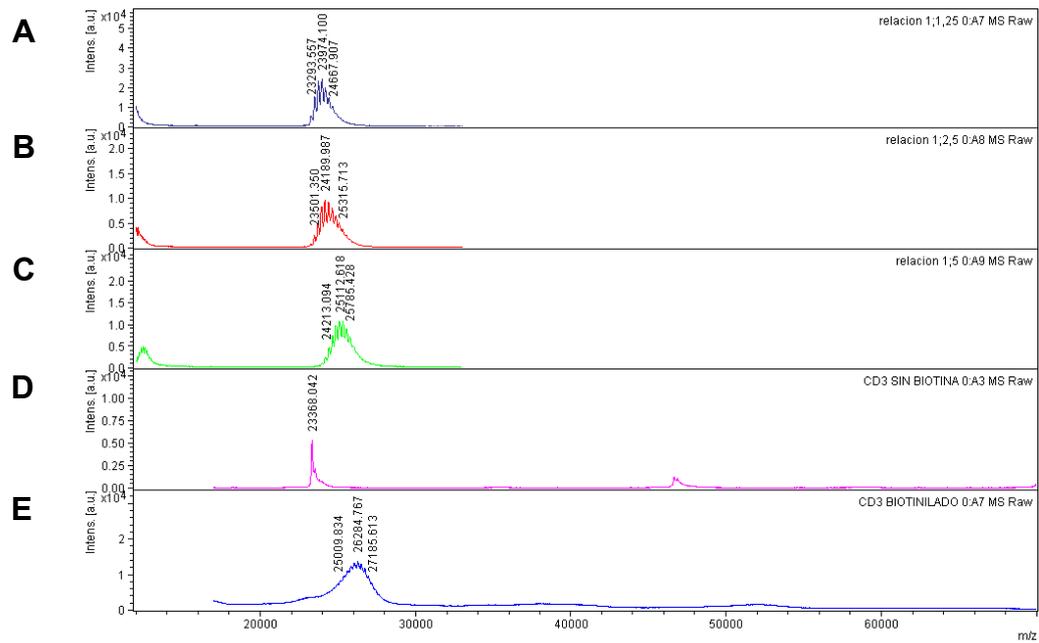


Figura 3.4. Análisis por MALDI-TOF de distintos esquemas de biotinilación de la proteína CD3εγ. Para las pruebas de biotinilación fueron empleadas diferentes relaciones de CD3εγ:Biotina y luego se realizó MALDI-TOF. **A)** CD3εγ:Biotina 1:1.25; **B)** CD3εγ:Biotina 1:2.5; **C)** CD3εγ:Biotina 1:5; **D)** CD3εγ; **E)** CD3εγ:Biotina 1:20.

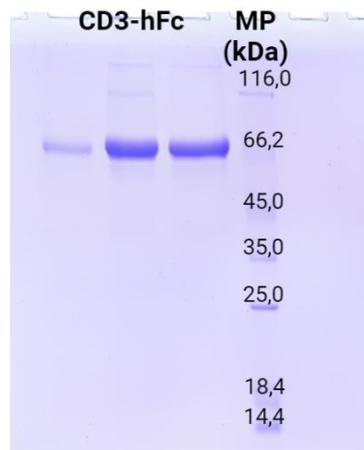


Figura 3.5. Gel SDS-PAGE de la producción de CD3-hFc. Se corrieron las fracciones obtenidas de CD3-hFc y marcador de peso molecular (MP).

Teniendo las nuevas construcciones se volvió a inmunizar a la misma llama 149 en dos oportunidades más (días 248 y 262 respecto a la primera inmunización) con CD3εγ-biotina-avidina 500 µg, CD3εγ 200 µg y CD3-hFc 400 µg en 1 mL de PBS emulsionado con 1 mL de AIF. En la **Figura 3.6** se muestra cómo incrementó el título de anticuerpos a los 14 días posteriores a una inmunización con la nueva mezcla (suero 6, S6), hecho que se mantuvo a los 10 días posteriores al *booster* (suero 7, S7), respecto al resultado que se había obtenido

anteriormente (sueros 4 y 5, S4, S5).

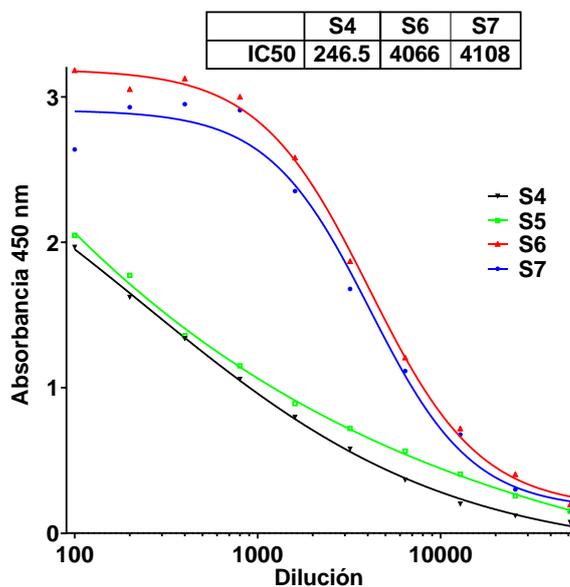


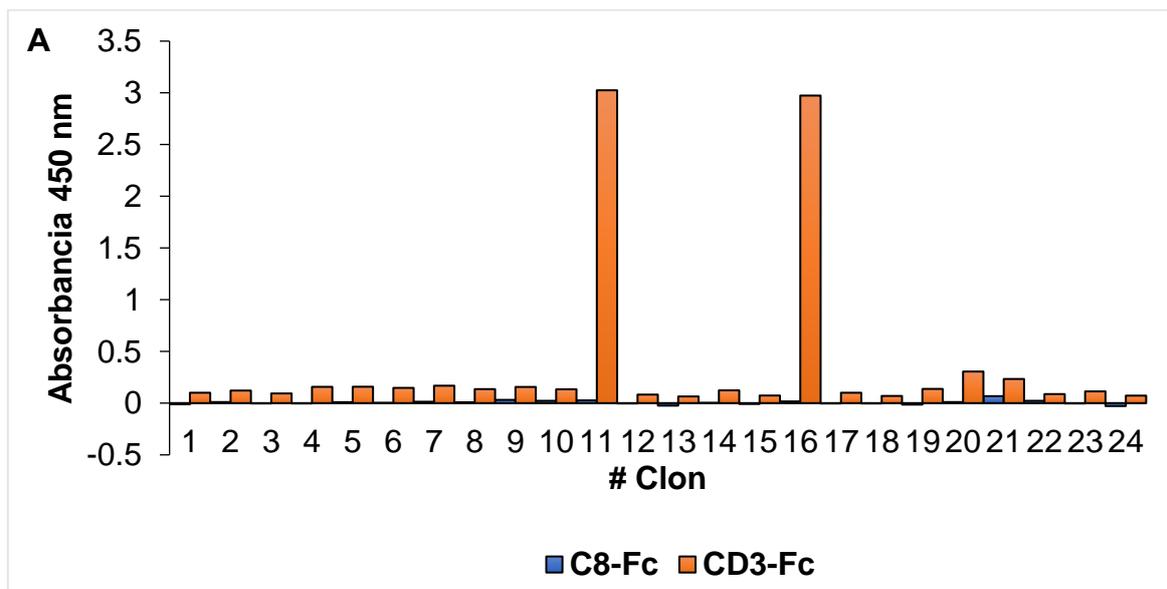
Figura 3.6. Titulación de sueros llama 149 contra la proteína CD3εγ por ELISA.

1.4-Construcción de biblioteca de fagos y selección de nanobodies

A partir de la sangre de la llama 149 obtenida 8 días después de la última inmunización, se construyó una nueva biblioteca de fagos en la que se obtuvo una diversidad de 2×10^8 UFC y un título de 3×10^{12} UFC/mL. Para el *panning* de esta biblioteca se siguieron dos estrategias diferentes. Por un lado, sensibilizando directamente con la proteína CD3εγ, y por otro sensibilizando con estreptavidina y luego incubando con CD3εγ-biotina, de forma que este último quedara capturado y no se perdiesen epítopes conformacionales por la interacción directa con la placa. Luego de dos rondas de *panning* los títulos de los *outputs* para CD3εγ y CD3εγ-biotina fueron $1,1 \times 10^8$ UFC/mL y $1,3 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente. A pesar de este promisorio enriquecimiento, el análisis inicial de 24 colonias arrojó únicamente dos clones positivos, reactivos contra ambas formas del antígeno. La extensión del *screening* a 60 colonias adicionales permitió obtener 5 nuevos clones positivos provenientes del *panning* contra CD3εγ directo, que fueron reactivos

contra las dos versiones del antígeno.

Dada la baja frecuencia de clones obtenida, decidimos explorar si esta podía ser mayor al considerar, además de los VHH de los cuales típicamente derivan los nanobodies, los anticuerpos monodominio convencionales (VH). En efecto, en la generación de nuestras bibliotecas se incorporan ambos, pero aunque la enorme mayoría de los VH no prospera por su insolubilidad, algunos sí lo hacen. El test se realizó en placas de ELISA ensayando los clones contra CD3-hFc y C8-hFc (Nb-hFc irrelevante que oficiaba como control negativo de reactividad contra la región hFc). Cuando se reveló con el anti-VHH se obtuvieron solo 2/24 de clones positivos (los mismos clones que habían sido reactivos frente a CD3 $\epsilon\gamma$ y CD3 $\epsilon\gamma$ -biotina), mientras que sorprendentemente cuando se reveló con el anti-HA se obtuvieron 20/24 clones positivos (**Figura 3.7**).



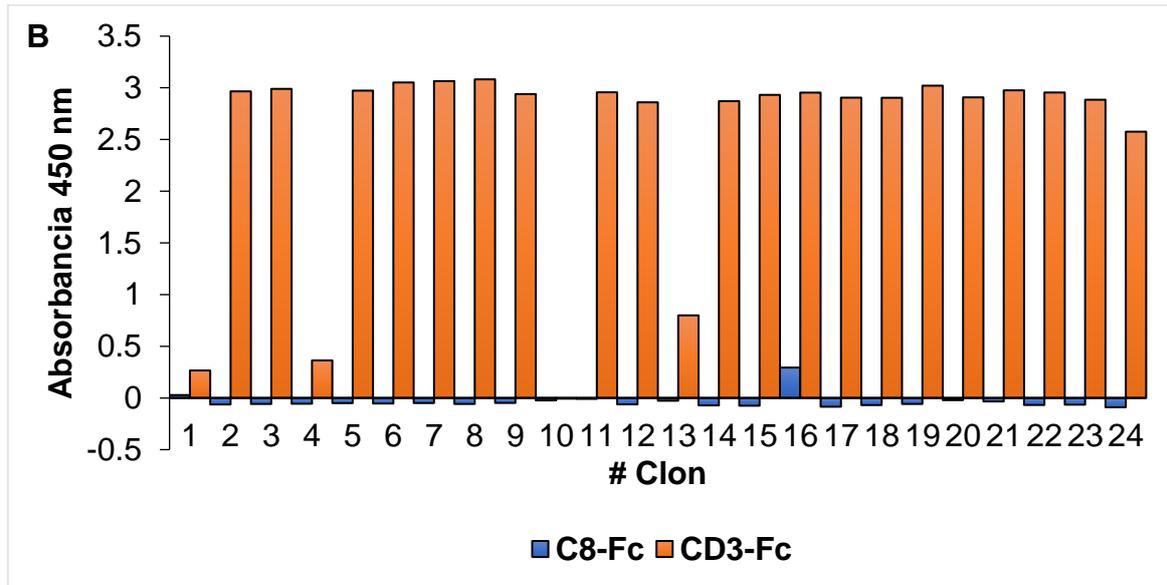


Figura 3.7. Screening del output 2 Nbs anti-CD3. Se sensibilizó una placa de ELISA con la proteína CD3-hFc o C8-hFc (control negativo para verificar que el Nb no reconozca la región hFc). **A)** detección con anti-VHH-HRP o **B)** detección con anti-HA-HRP.

1.5-Clonado del ADN de la proteína CD3 $\epsilon\gamma$ en el vector pSIN-GFP para su expresión asociado a la membrana de células HEK293T y reactividad de los Nbs frente al mismo

A los efectos de simular la expresión del CD3 en la membrana de células eucariotas, y así evaluar si los Nbs que habían sido capaces de reconocer por ELISA a la proteína, también lo hacían cuando esta se encontraba en un formato similar al que se encuentra naturalmente; el gen de CD3 $\epsilon\gamma$ fue clonado en el vector pSIN-GFP desarrollado por el grupo, **Figura 3.8**. Este sistema permite la expresión del gen de interés en la membrana de células HEK293T, ofreciendo un indicador de transfección exitosa (expresión de GFP) al momento de analizar las células transfectadas por citometría.

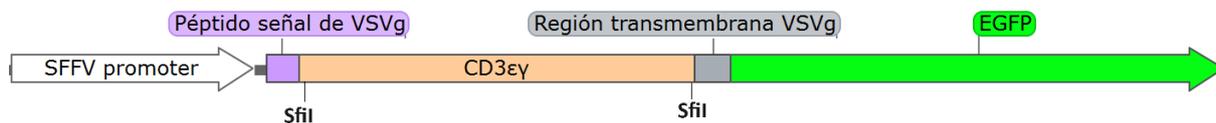


Figura 3.8. Casete de expresión de CD3 $\epsilon\gamma$ en el vector pSIN-GFP para expresión en células HEK293T.

Para la transfección se utilizaron diferentes relaciones de PEI (agente transfectante): ADN, 5:1, 10:1 y 20:1, siendo la relación 10:1 la que mostró una mayor expresión CD3 $\epsilon\gamma$ al

analizarla mediante citometría con un anticuerpo anti-CD3-APC (clon: 17A2) (**Figura 3.9**).

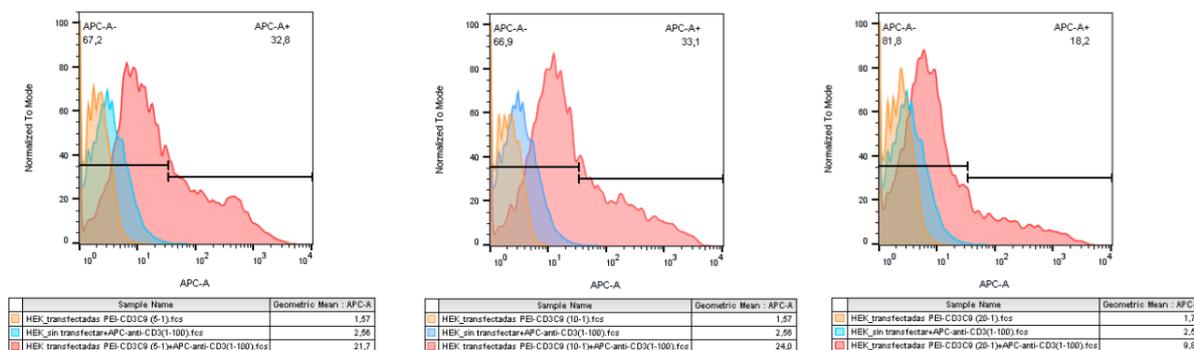


Figura 3.9. Citometría de flujo células HEK293T transfectadas con CD3-pSIN-GFP. En la figura se observan: células HEK293T transfectadas con PEI:CD3-pSIN-GFP en naranja; células HEK293T sin transfectar marcadas con anticuerpo comercial anti-CD3-APC (clon 17A2) utilizado en una dilución 1/100 en celeste; células HEK293T transfectadas con PEI:CD3-pSIN-GFP marcadas con anticuerpo comercial anti-CD3-APC (clon 17A2) utilizado en una dilución 1/100 en rojo. Las relaciones en masa de cantidad de PEI:CD3-pSIN-GFP para las transfecciones fueron: 5:1 (imagen de la izquierda); 10:1 (imagen del centro); 20:1 (imagen de la derecha), siempre a partir de 2µg de CD3-pSIN-GFP.

También confirmamos que la proteína CD3εγ se estaba expresando asociada a la GFP, ya que como se observa en la **Figura 3.10**, las células APC positivas además son GFP positivas. Este resultado es también valioso, porque habilita en un futuro a transfectar células con un receptor celular de interés, y seleccionarlas por *cell-sorting* de acuerdo a la alta expresión de GFP como un proxy de alta expresión del receptor. De esta forma el receptor blanco permanecerá intacto (no se usan anticuerpos para detectarlo), y dichas células podrán utilizarse para una futura inmunización de una llama y/o para el *panning* de forma de obtener nanobodies contra el receptor en un entorno “nativo”.

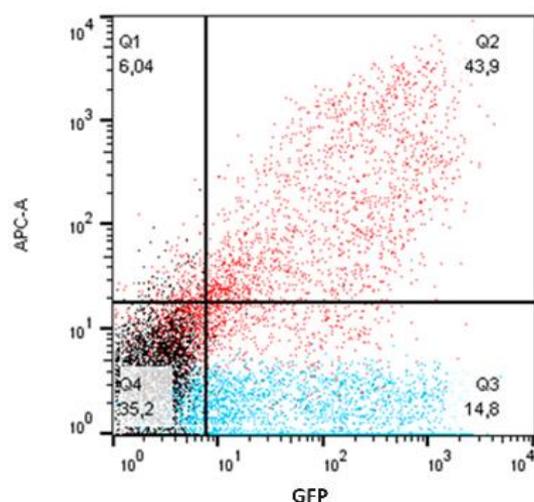


Figura 3.10. Citometría de flujo células HEK293T transfectadas con CD3 ϵ -GFP. En la figura se observan: células HEK293T transfectadas con PEI:CD3-pSIN-GFP (relación 10:1) en celeste; células HEK293T sin transfectar marcadas con anticuerpo comercial anti-CD3-APC (clon 17A2) utilizado en una dilución 1/100 en negro; células HEK293T transfectadas con PEI:CD3-pSIN-GFP (relación 10:1) marcadas con anticuerpo comercial anti-CD3-APC (clon 17A2) utilizado en una dilución 1/100 en rojo.

Utilizando la condición que dio mejores resultados para la transfección, se analizaron los Nbs que habían reconocido a CD3 ϵ por ELISA. Como se aprecia en la **Figura 3.11.B** para un Nb anti-CD3 ϵ representativo, en todos los casos, los mismos fueron reactivos contra la proteína CD3 ϵ expresada en la superficie celular.

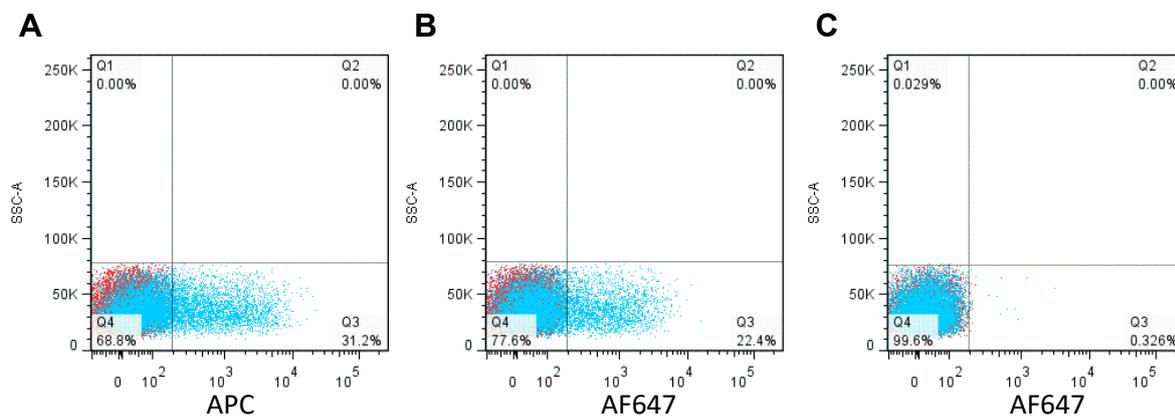


Figura 3.11. Reactividad de los Nbs anti-CD3 ϵ contra células HEK293T transfectadas con CD3 ϵ -GFP. Rojo: células sin transfectar; celeste: células transfectadas. **A)** marcado con el anticuerpo comercial anti-CD3-APC, **B)** y **C)** marcado con un Nb anti-CD3 ϵ representativo, o con un Nb control negativo, respectivamente, detectados con un anticuerpo anti-VHH-AF647.

1.6-Reactividad de los Nbs frente a CD3 en esplenocitos de ratón

A pesar de estos resultados fuertemente promisorios, cuando se evaluó si los nanobodies

eran capaces de reconocer a la proteína CD3 nativa en la membrana de las células T de esplenocitos, ninguno de los clones ensayados resultó positivo, como se muestra en la **Figura 3.12** para un clon representativo.

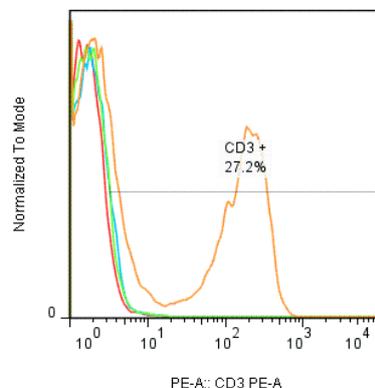


Figura 3.12. Reactividad de los Nbs anti- CD3 $\epsilon\gamma$ contra esplenocitos de ratón. La suspensión de esplenocitos se incubó con sobrenadantes de un Nb irrelevante (rojo), uno de los Nb anti CD3 $\epsilon\gamma$ (verde) o el anticuerpo anti-CD3-PE (clon: 145-2C11) (naranja). Los Nbs se detectaron por su tag HA con un anticuerpo anti-HA-PE.

Éste último resultado fue bastante desconcertante, y a pesar del empleo de distintas estrategias de *panning* como incubar la biblioteca de fagos directamente con esplenocitos de ratón, alternando con rondas de CD3 $\epsilon\gamma$ en placa, no logramos modificar este resultado. El resultado aún más sorprendente considerando que los anticuerpos comerciales reconocieron tanto a la proteína CD3 $\epsilon\gamma$ recombinante producida en nuestro laboratorio como al CD3 nativo en esplenocitos. Dado que la secuencia espaciadora utilizada (GSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGS) es rica en aminoácidos cargados y podría ser inmunodominante, la reactividad de los clones se verificó contra una versión de CD3 $\epsilon\gamma$ expresada en células HEK239T usando el vector pSIN-GFP y sustituyendo la secuencia espaciadora por (GGGS)₆GG. No se observó pérdida de reactividad de los Nbs. Una vez descartada esta posibilidad, consideramos que la interpretación más probable surge de considerar que los nanobodies son muy susceptibles a los cambios conformacionales, una establecida diferencia respecto a los anticuerpos convencionales [145]. Bajo esta premisa, los epítopes que definen los Nbs que seleccionamos en la proteína CD3 $\epsilon\gamma$ no serían suficientemente idénticos a los encontrados en el complejo de TCR-CD3. En base a esto, sería necesaria revisar la estrategia de inmunización de llamas, utilizando otras versiones de las subunidades de CD3 y controlando la respuesta de anticuerpos del animal contra esplenocitos de ratón, de forma de asegurar la reactividad cruzada con la proteína nativa

para generar nuevamente una biblioteca de fagos.

2. Generación de anticuerpos biespecíficos con potencial aplicación en modelos murinos de tumores

2.1-Expresión de nanobodies biespecíficos (b-Nbs) para inmunoterapia anti-tumoral

2.1.1-Clonado y expresión en gran escala de b-Nbs

Como se mencionó previamente, el objetivo de esta actividad estuvo orientado a generar nanobodies biespecíficos combinando un Nb anti-PD-L1 con Nbs contra los receptores CD11c y CD11b de los receptores del complemento CR4 (CD11c/CD18) y CR3 (CD11b/CD18) (**Figura 3.13**). Estos últimos generados por nuestro grupo. En el caso del Nb anti-PD-L1, se utilizó el nanobody C3 reportado por Broos *et al.* [146]. Se trata de un nanobody de alta afinidad (K_D 0,5 nM) contra el receptor murino y humano, aunque la afinidad por este último es sustancialmente inferior (K_D 170 nM). Si bien la descripción original de este Nb no especificaba su capacidad de bloquear la interacción con PD-1, esta fue verificada una vez que comenzamos a expresarlo como se describe más adelante. A los efectos de generar los b-Nbs, se partió del vector pINQbis generado en el grupo (**Figura 3.13**). En este existen dos sitios de clonado: a) sitios SfiI iguales a los existentes en bibliotecas de nanobodies (Nbs) en fagos (para el Nb N-terminal), y b) por los sitios SpeI/SacI y XhoI (para el Nb C-terminal). Los sitios a y b permiten clonar los nanobodies de interés, en el primer caso directamente como se aislaron de la biblioteca, y en el segundo mediante su amplificación por PCR con los *primers* adecuados. Dado que uno de los blancos fijos de nuestras construcciones sería PD-L1, el nanobody (Nb) que reconoce este marcador se clonó en la segunda posición, mientras que en la primera posición, en la que el clonado es más sencillo, se introdujeron los distintos Nbs a combinar con el Nb anti-PD-L1.



Figura 3.13. Casete de expresión en el vector pINQbis para la generación de nanobodies biespecíficos. Cuenta con la secuencia OmpA para la expresión en periplasma del b-Nb compuesto por los dos Nbs de

interés en tándem, unidos por una secuencia espaciadora (GQAGRGGGGSGGGGSGGGGSTSEL). Los dos sitios SfiI, iguales a los existentes en bibliotecas de Nbs en fagos, permiten clonar directamente desde los clones aislados de la biblioteca el primer Nb, y el segundo Nb se clona mediante PCR con los primers mostrados en la figura y posterior digestión con las enzimas señaladas.

Se generaron nanobodies biespecíficos combinando el Nb anti-PD-L1 con nanobodies anti-CD11c, anti-CD11b o un nanobody irrelevante anti-Omalizumab (E5) (reconoce el paratope de ese anticuerpo que es específico de la IgE humana, este oficia como un nanobody irrelevante en la posición N-terminal y, por lo tanto, como un control negativo de la funcionalidad que tienen los otros nanobodies colocados en esa posición, ya que el solo tener el anti-PD-L1 podría tener efecto terapéutico). De esta forma se buscó conectar células dendríticas (anti-CD11c) o células mieloides en general (anti-CD11b) con células tumorales que expresan PD-L1 (buscando aproximar en el espacio las células inmunes a las células tumorales y favorecer así sus funciones efectoras), o bien generar un aumento de la especificidad de unión del Nb anti-PD-L1 por el PD-L1 expresado en células presentadoras (APC) y actuar de esta forma mejorando el *priming* de linfocitos T específicos contra el tumor. Los b-Nbs fueron expresados en *E. coli* con rendimientos de entre 3-12 mg de proteína purificada por Ni-NTA por litro de medio de cultivo (previo a esto se realizaron pruebas de expresión en pequeña escala en cada caso, para determinar la concentración de agente inductor y temperatura óptima para la producción en gran escala). Como se observa en el gel de SDS page **Figura 3.14** a modo de ejemplo para uno de ellos, se verificó la presencia de una banda en el entorno de los 30 kDa acorde a lo esperado.

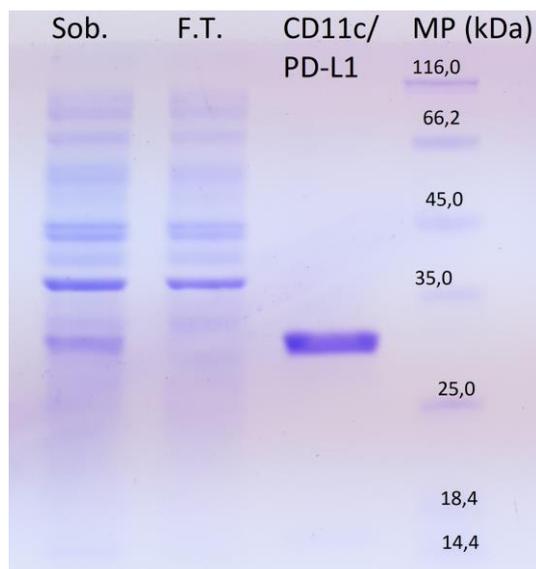


Figura 3.14. Gel SDS page de la producción de anti-CD11c/PD-L1. Se corrieron: el sobrenadante (Sob.: extracto celular), flow through (F.T.: fracción recogida durante la inyección del sobrenadante que contiene a las proteínas que no se unen a la columna de purificación), la fracción obtenida de anti-CD11c/PD-L1 y marcador de peso molecular (MP).

2.1.2 Verificación de la funcionalidad de los b-Nbs

La reactividad de los mismos se evaluó por citometría de flujo frente a BMDC (expresan CD11c) para el anti-CD11c/PD-L1, una línea de macrófagos J774.A1 (expresa CD11b) para el anti-CD11b/PD-L1 y contra células tumorales B16F10 (melanoma metastásico de ratón) que expresan PD-L1 para los tres biespecíficos (**Figura 3.15**). En todos los casos se observó reactividad, por lo que podemos asumir que ambos componentes del b-Nb están funcionales en el mismo. También, se analizó la capacidad del Nb anti-PD-L1 para inhibir la unión PD-1/PD-L1 mediante interferometría de biocapa (BLI). Como se observa para el caso del b-Nb E5-anti-PD-L1 en la **Figura 3.16**, la saturación con el b-Nb del sensor cubierto con mPD-L1, impide completamente la unión de mPD-1.

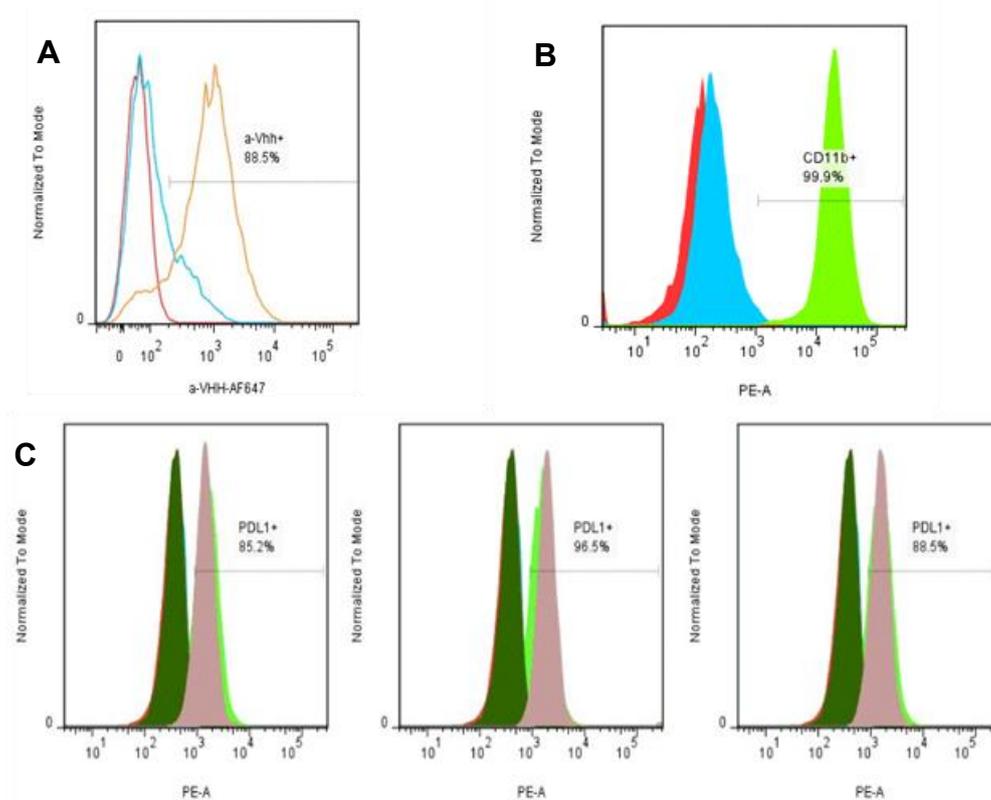


Figura 3.15. Funcionalidad de los b-Nbs sobre diferentes líneas celulares. En la figura se observan: **A)** BMDC incubadas con anti-CD11c/PD-L1 (naranja), E5-anti-PD-L1 (celeste) o PBS (rojo); la unión de los Nbs se detectó con anti-VHH-iF647. **B)** Células J774.A1 incubadas con anti-CD11b/PD-L1-biotina (verde), o PBS (celeste), rojo, sin teñir); la unión del Nb se detectó con estreptavidina-PE. **C)** Células B16F10 incubadas con anti-CD11c/PD-L1-biotina (izquierda), anti-CD11b/PD-L1-biotina (centro) o E5-anti-PD-L1-biotina (derecha) (gris); Nb anti-Tetc-biotina (verde oscuro); anticuerpo comercial anti-PD-L1-biotina (verde claro); control isotópico del comercial-biotina (naranja); o PBS (celeste), rojo (sin teñir); la unión en todos los casos se detectó con estreptavidina-PE.

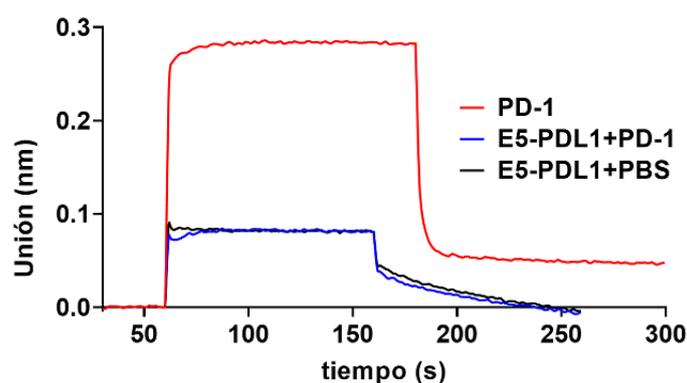


Figura 3.16. Inhibición PD-L1/PD-1 por el Nb anti-PD-L1 por interferometría de biocapa (BLI). Se utilizaron biosensores sensibilizados con mPD-L1. Rojo: curva asociación y disociación de PD-1 usado a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Azul y negro: los sensores fueron incubados previamente a saturación con el Nb E5-anti-PD-L1, y se incubaron luego con PD-1 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o PBS (blanco), respectivamente, en presencia del Nb E5-anti-PD-L1.

2.1.3 Exploración de la actividad antitumoral de los b-Nbs en ensayos *in vivo*

Comparación de la actividad anti-tumoral de los nanobodies con especificidad por CR3 y CR4.

En una primera exploración se utilizó el modelo B16F10 que es un melanoma metastásico de ratón, debido a que verificamos por citometría de flujo una alta expresión de PD-L1 en comparación con otra línea tumoral que también teníamos disponible CT26 carcinoma de colon (**Figura 3.17**).

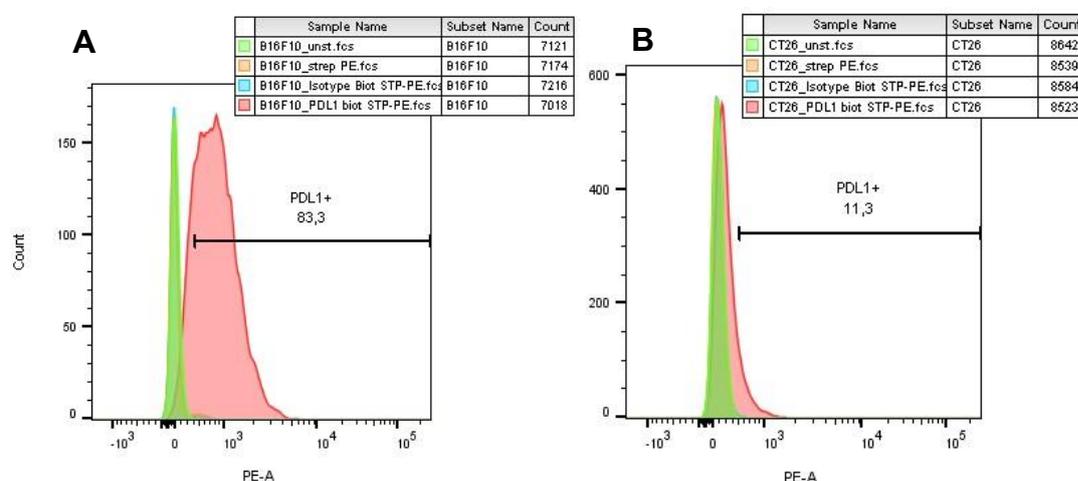


Figura 3.17. Expresión de PD-L1 en líneas celulares tumorales de ratón. A) células B16F10 o B) células CT26, incubadas con anti-PD-L1-biotina (comercial) (rojo), control isotípico-biotina (celeste) o PBS (naranja, verde (sin teñir)); luego la unión se detectó con estreptavidina-PE.

Para el experimento *in vivo*, se inyectaron de forma subcutánea $2,5 \times 10^5$ células tumorales B16F10 (ATCC) en el flanco derecho de ratones C57Bl/6. En los días 10, 13 y 17 desde que inició el experimento, se administró intratumoralmente 100 μ g de los diferentes biespecíficos anti-CD11c/PD-L1, anti-CD11b/PD-L1, o anti-omalizumab (E5)/PD-L1, todos vehiculizados en 100 μ L de PBS. Además, teníamos un grupo control al que se le inyectaba 100 μ L de PBS. Cuando el volumen tumoral de un ratón ($V = \text{Largo} \times \text{Ancho} \times \text{Profundidad} \times \pi/6$) superaba los 4000 mm^3 era sacrificado. Sólo el grupo tratado con el anti-CD11c/PD-L1 mostró un retardo significativo en el crecimiento tumoral respecto al grupo PBS, aunque esto no llegó a ser estadísticamente significativo ($P=0,0519$, al día 21, test ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett). No se llegó a observar una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la supervivencia (**Figura 3.18**).

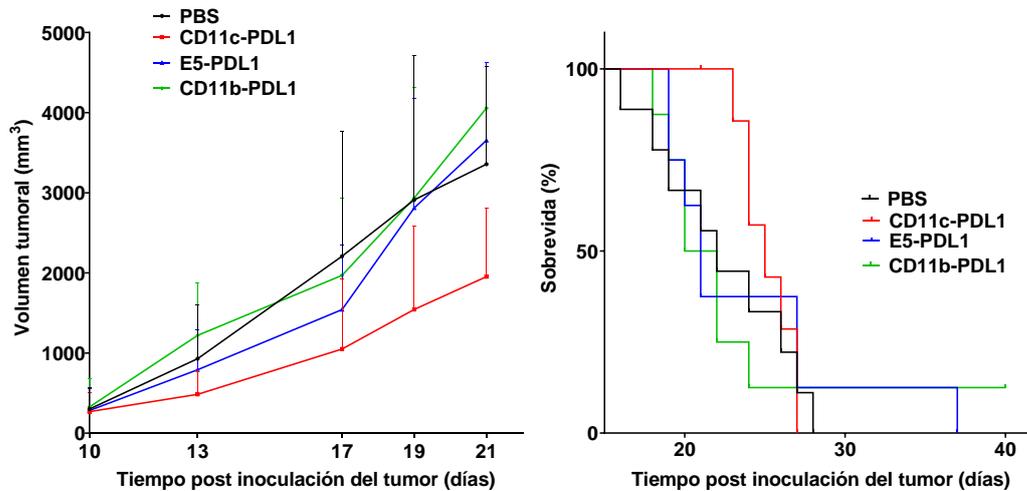


Figura 3.18. Comparación de la actividad anti-tumoral de los nanobodies con especificidad por CR3 y CR4. Grupos tratados con PBS (negro), anti-CD11c/PD-L1 (rojo), anti-CD11b/PD-L1 (verde), o anti-Omalizumab(E5)/PD-L1 (azul) (n=8-9 por grupo). Se muestra a la izquierda el gráfico de evaluación del crecimiento tumoral (promedio + desviación estándar), en la derecha se observa el gráfico de supervivencia.

Optimización de la actividad anti-tumoral del nanobody con especificidad por CR4

De modo de ensayar condiciones más favorables para evidenciar el efecto protector del b-Nb anti-CD11c/PD-L1, se comenzó el tratamiento a tiempos más tempranos y con un aumento en el número de dosis. Cada ratón se inyectó por vía subcutánea en la zona de implantación del tumor (cuando el tumor no era palpable) o intratumoral, en los días 5, 8, 12, 15, 19, 22 y 26 (desde que inició el experimento). El grupo tratado con el anti-CD11c/PD-L1 mostró un retardo en el crecimiento tumoral respecto al grupo PBS que llegó a ser estadísticamente significativo (*P=0,0498 al día 22, test ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett). También se observó una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la supervivencia entre anti-CD11c/PD-L1 con PBS (**P=0,0078 Log-rank (Mantel-Cox) test), así como también entre anti-CD11c/PD-L1 con anti-omalizumab(E5)/PD-L1 (*P=0,0333 Gehan-Breslow-Wilcoxon test) (**Figura 3.19**). Aunque en menor medida, en estas condiciones también se observó un efecto del tratamiento con el b-Nb E5/PD-L1 respecto al PBS.

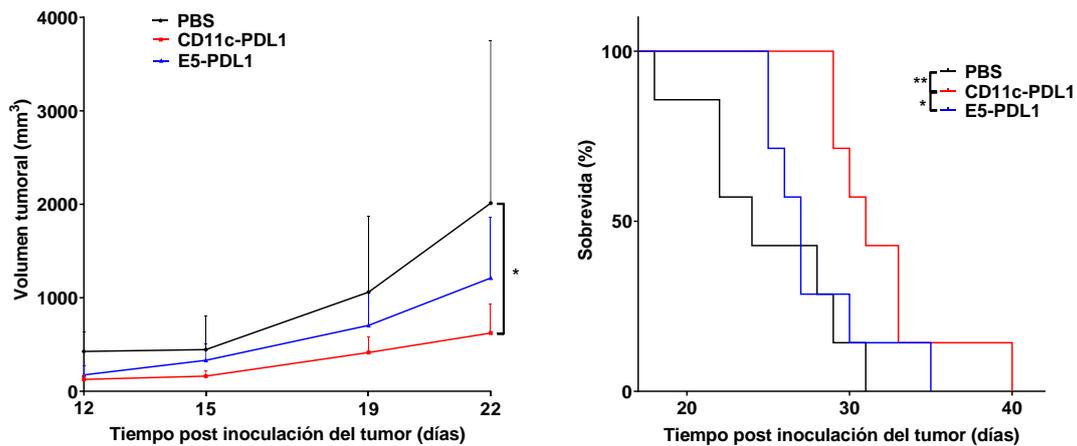


Figura 3.19. Actividad antitumoral del b-Nb anti-CD11c/PD-L1 en el modelo B16F10. Grupos tratados con PBS (negro), anti-CD11c/PD-L1 (rojo) o anti-Omalizumab(E5)/PD-L1 (azul) (n=7-8 por grupo). Se muestra a la izquierda el gráfico de evaluación del crecimiento tumoral (promedio + desviación estándar), en la derecha se observa el gráfico de supervivencia. *, P< 0,05; **, P<0,01.

Evaluación de la capacidad adyuvante de Imiquimod y Poly IC para el tratamiento de melanoma combinándolo con b-Nbs-anti-PD-L1

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* realizados hasta ese momento mostraron una buena respuesta a tiempos tempranos, pero en el mediano plazo una propagación de esta línea tumoral de muy rápido crecimiento. Dado que una de las razones podía ser un bajo reclutamiento de células inmunes efectoras en el tumor, se intentó mejorar el resultado del bloqueo de PD-L1 utilizando una terapia conjunta con un agente inmunoestimulador que promoviera un entorno inflamatorio en el microambiente tumoral. Inicialmente se realizó un experimento exploratorio analizando el reclutamiento celular por citometría de flujo. Para esto se utilizó Imiquimod, que es un potente inmunomodulador perteneciente a la familia de la imidazoquinolina, que actúa activando el TLR7. El otro adyuvante utilizado fue poly IC que es un análogo de ARN de doble hebra (dsRNA) que activa el TLR3 endosomal, y también el MDA5 (tipo RIG-1) citoplasmático, aunque en caso de acceder al citosol.

Para estudiar su efecto se inyectaron de forma subcutánea, células tumorales B16F10 (melanoma metastásico de ratón) en el flanco derecho de ratones C57Bl/6. A un grupo de ratones se le aplicó de forma tópica en la zona del tumor, Imiquimod crema 5% a partir del día 11 de implantación del tumor, reapplicándolo cada dos días hasta el día 21. Otro grupo

se trató los días 11, 16 y 21 mediante inyección intratumoral de 50 µg de poly IC en 100 µL de PBS. Un tercer grupo sin tratamiento ofició de control. Se sacrificaron los ratones al día 23, se extrajo el tumor y el TDLN (ganglio linfático drenante del tumor) y se evaluó la capacidad de reclutar células CD45+ y dentro de esta población, a las células dendríticas maduras, dado que estas constituyen el blanco de acción del componente anti-CD11c de nuestro b-Nb (**Figura 3.20**).

Para comparar los resultados entre los grupos tratados contra el grupo control, se realizó un análisis estadístico mediante un ANOVA de una vía, seguido de un test de Dunnett (**p < 0,001, *p < 0,05 versus grupo control), resultando una diferencia significativa en el caso de las células dendríticas maduras a nivel del ganglio linfático drenante para el Imiquimod respecto al control (**p=0,0004) y al poly IC (*p=0,0331); y también para el poly IC respecto al control (*p=0,0158).

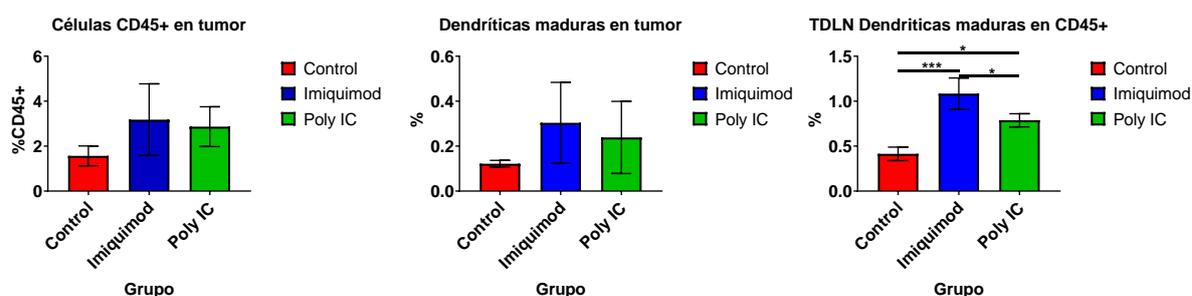


Figura 3.20. Ensayo de reclutamiento celular. Grupos tratados con Poly IC (verde), Imiquimod (azul), control (rojo) n=4 ratones por grupo. En el día 23 los ratones fueron sacrificados y se les extrajo el tumor y TDLN (ganglio linfático drenante del tumor), que luego de ser procesados fueron marcados con los anticuerpos: CD45-FITC (marcador de leucocitos), CD11b-APC-Cy7, CD11c-PE-Cy7 y MHCII-PE (marcador de células presentadoras), finalmente las muestras fueron adquiridas en el citómetro. En la imagen a la izquierda se observa el promedio por grupo del porcentaje de células CD45 positivas en el tumor; en el centro el promedio por grupo del porcentaje de células dendríticas maduras en el tumor (población que expresa los 4 marcadores); a la derecha el promedio por grupo del porcentaje de células dendríticas maduras, dentro de la población CD45 positiva del TDLN.

Dado el mayor poder de reclutamiento del Imiquimod, se eligió este compuesto para la terapia en conjunto con los nanobodies biespecíficos anti-PD-L1, incluyendo nuevamente el b-Nb anti-CD11b/PD-L1 para considerar la posibilidad de que su actividad pudiese mejorar en este nuevo contexto. Para ello, todos los ratones portadores de melanoma fueron tratados con imiquimod a partir del día 6, cada dos días, hasta el día 26 post-implantación del tumor. Además, los ratones recibieron el tratamiento de b-Nbs por vía intratumoral, en

los días 11, 14, 18, 21 y 25 (desde que inició el experimento). La combinación Imiquimod-anti-CD11b/PD-L1 no tuvo efecto en relación al grupo control (Imiquimod-PBS). El experimento volvió a confirmar un mejor efecto del tratamiento con el anti-CD11c/PD-L1, respecto al anti-CD11b/PD-L1 o PBS. De todas formas, en comparación con experimentos anteriores, el uso de Imiquimod no implicó una mejora respecto a la evolución del volumen tumoral, aunque sí es de destacar que hubo una importante prolongación de la supervivencia global (**Figura 3.21**). A pesar de este último aspecto positivo, el siguiente aspecto que decidimos considerar fue el de la biodisponibilidad de los b-Nbs.

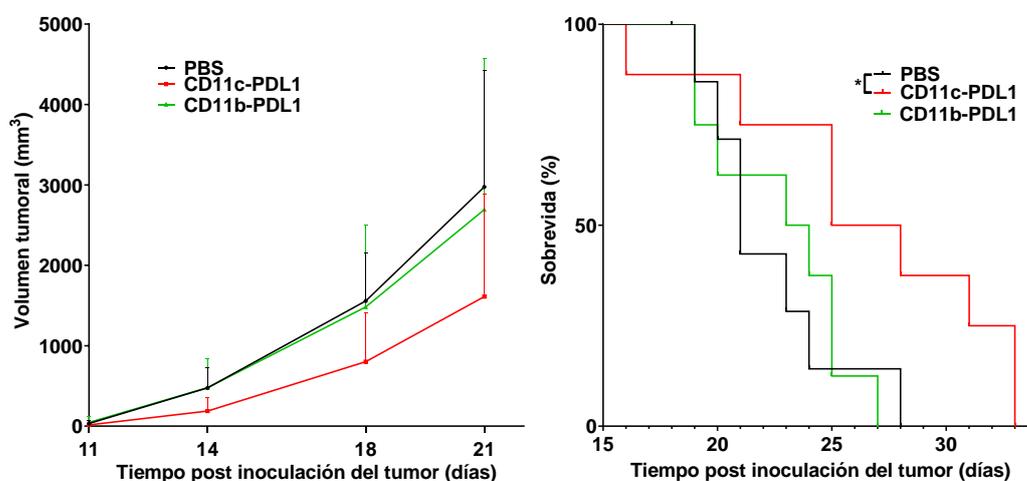


Figura 3.21. Terapia combinada con b-Nbs e Imiquimod en el modelo B16F10. Se inyectaron de forma subcutánea $2,5 \times 10^5$ células tumorales B16F10 en el flanco derecho de ratones C57Bl/6. Se usaron 3 grupos de ratones $n=8$ a los que se les aplicó de forma tópica en la zona del tumor, Imiquimod crema 5% a partir del día 6 cada dos días hasta el día 26. A su vez, se inyectó por vía intratumoral en los días 11, 14, 18, 21 y 25 (desde que inició el experimento) con $100 \mu\text{g}$ de anti-CD11b/PD-L1 o anti-CD11c/PD-L1 (vehiculizados en $100 \mu\text{L}$ de PBS), o $100 \mu\text{L}$ de PBS. Se muestra a la izquierda el gráfico de evaluación del crecimiento tumoral (promedio + desviación estándar), en la derecha se observa el gráfico de supervivencia. *, $P < 0,05$.

2.1.4 Evaluación de la permanencia del b-Nb anti-CD11c/PD-L1 en ratones C57BL/6

Luego de estos intentos nos preguntamos si otra variable que podría estar afectando negativamente la actividad de los b-Nbs era su pequeño tamaño, 30 kDa. Aunque en principio el pequeño tamaño podía ser una ventaja por tener una mayor penetración en el tumor comparado a anticuerpos convencionales, también podía estar asociado a una rápida eliminación renal disminuyendo su biodisponibilidad. La preocupación sobre la permanencia en suero fue confirmada en un ensayo *in vivo* como se observa en la **Figura**

3.22. Luego de su administración subcutánea, la concentración sérica aumenta rápidamente en la primera hora, no siendo detectable más allá de las 20h, con una vida media de aproximadamente 5 h.

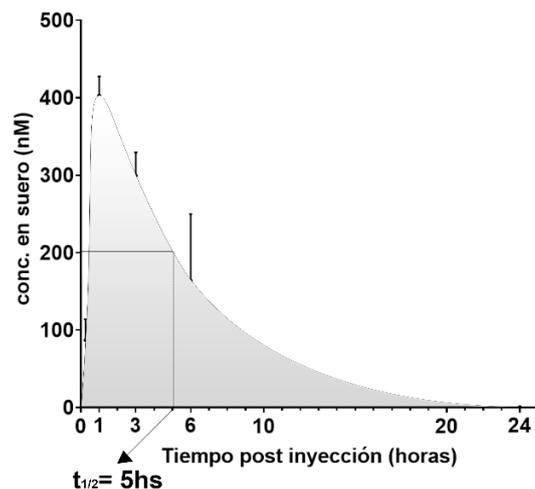


Figura 3.22. Permanencia b-Nb anti-CD11c/PD-L1 en ratones C57BL/6. Se inyectaron de forma subcutánea 100 μ g del b-Nb anti-CD11c/PD-L1 en ratones C57BL/6 naïve (n=4). Luego se realizaron extracciones de sangre de la vena submandibular a los 15 min, y 1, 3, 6 y 24 h post-inyección, quedándonos con el suero. Posteriormente se cuantificó la concentración en suero de b-Nb para cada muestra mediante un ELISA con m-PD-L1, detectando el b-Nb con un conjugado anti-VHH-HRP. La cuantificación se realizó contra una curva estándar del b-Nb. En la figura se observa el promedio de la concentración del anti-CD11c/PD-L1 detectada en suero a distintos tiempos luego de la administración (promedio + desviación estándar, n=4).

Aunque este resultado podría deberse a una captación del b-Nb por el conjunto de células del animal que expresan CD11c o PD-L1, asumimos que el factor principal podría ser la eliminación renal del fármaco y que contrarrestando este efecto podíamos mejorar su actividad antitumoral.

2.2 Expresión de nanobodies biespecíficos Fc (b-Nbs-Fc) para el uso de los mismos como terapia anti-tumoral

2.2.1 Clonado y expresión en gran escala de b-Nbs-Fc

En función de lo anterior, se generó una versión del b-Nb fusionada a la región Fc de la IgG2a de ratón modificada. Dado que, como ocurre con los anticuerpos terapéuticos contra el eje PD-1/PD-L1 de uso en la clínica, sólo nos interesa el efecto de bloqueo de este eje, la región Fc utilizada contiene la mutación L234A L235A (LALA) en el dominio CH2.

Estas mutaciones reducen las funciones efectoras, sin afectar su interacción con el receptor neonatal (FcRn), que es el que permite extender la vida media en la sangre de las IgGs. Para esto se diseñó el casete de expresión Igκ leader-Nb1-Nb2-mFcIgG2a-LALA mostrado en la **Figura 3.23**, que se clonó en el vector pcDNA3.1. La expresión está bajo el control del promotor CMV y el péptido líder de la cadena Ig kappa promueve la secreción de la proteína recombinante al exterior de la célula. En nuestro caso, el Nb anti-CD11c es el primer nanobody y el anti-PD-L1 el segundo.

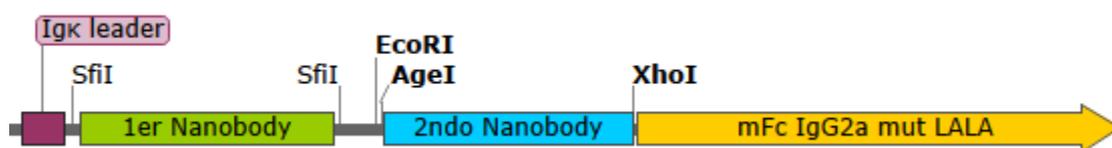


Figura 3.23. Casete Nb1-Nb2-mFcIgG2a-LALA para la expresión de nanobodies biespecíficos con una región Fc IgG2a carente de funciones efectoras.

Dicho plásmido fue transfectado en células HEK293T y se logró obtener aproximadamente 1 mg de proteína purificada por proteína A de 240 mL de medio de cultivo colectado a las 72 h post transfección. En un primer momento el anti-CD11c/PD-L1-Fc se eluyó de la columna de proteína A con un buffer glicina pH 3,5, que además del b-Nb-Fc contenía como impureza a las inmunoglobulinas presentes en el suero fetal bovino utilizado para suplementar el medio de cultivo de las células. Dado que las IgG bovinas presentan una menor afinidad por la proteína A, se realizó una nueva purificación agregando un paso adicional de lavado con buffer pH=4,5 y luego una elución final con buffer pH=3,5. Como se observa en la **Figura 3.24** la fracción eluida a pH=4,5 corresponde a la IgG proveniente del suero fetal bovino ya que presenta tanto cadena pesada como liviana al igual que el control de la IgG de ratón, mientras que la fracción eluida a pH=3,5, correspondiente al b-Nb-Fc, aparece como una única banda dado que no posee cadena liviana. En ausencia de agente reductor, la mIgG y la fracción eluida a pH=4,5 aparecen con el tamaño esperado de 150 kDa, en tanto que el b-Nb-Fc aparece como una banda de menor tamaño acorde al peso molecular teórico de 110 kDa.

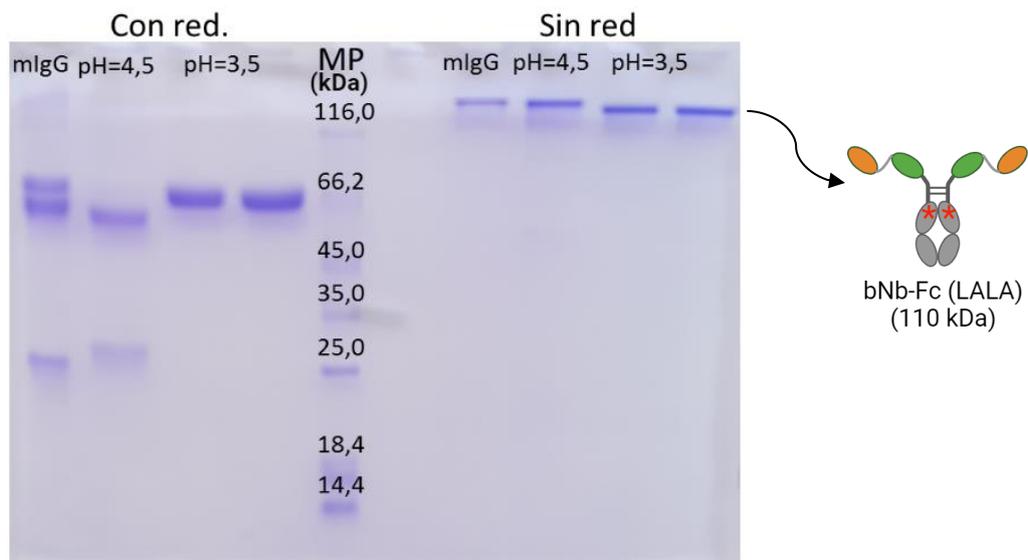


Figura 3.24. Análisis por SDS-PAGE de la purificación del b-Nb-Fc anti-CD11c/PD-L1-Fc por proteína A. Se corrieron las fracciones con y sin agente reductor: IgG de ratón (mIgG: control IgG convencional), elución pH=4,5 (IgG convencional bovina “impureza” presente en el suero utilizado en la producción), elución pH=3,5 (anti-CD11c/PD-L1-Fc sólo cadena pesada) y marcador de peso molecular (MP).

2.2.2 Evaluación de la permanencia del b-Nb-Fc anti-CD11c/PD-L1-Fc en ratones C57BL/6

La extensión de la vida media del b-Nb-Fc se estimó mediante un ensayo *in vivo* como se describe en la **Figura 3.25**. La vida media del anti-CD11c/PD-L1-Fc fue de aproximadamente 3 d. Dicho resultado es un poco inferior a datos reportados para otras IgG2a inyectadas en ratones (6-8 días [147]), pero aumentó 14 veces en relación al valor de vida media del b-Nb sin Fc.

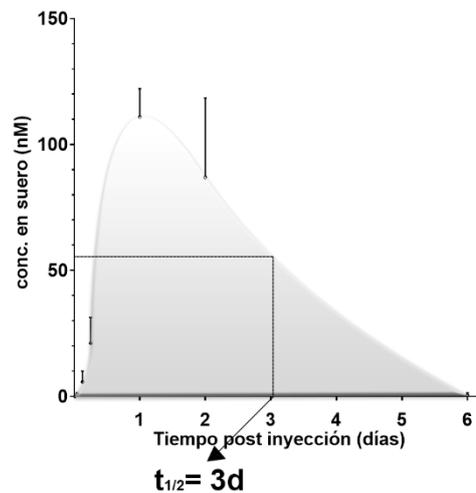


Figura 3.25. Permanencia b-Nb-Fc anti-CD11c/PD-L1-Fc en ratones C57BL/6. Se inyectaron de forma subcutánea 100 μ g del b-Nb-Fc anti-CD11c/PD-L1-Fc en ratones C57BL/6 nave (n=3). Luego se realizaron extracciones de sangre de la vena submandibular a los 15 min., 1, 3, y 6 h, y 1, 2 y 6 días post-inyección. Posteriormente se cuantificó la concentración en suero de b-Nb-Fc para cada muestra mediante un ELISA con m-PD-L1, detectando el b-Nb-Fc con un conjugado anti-mIgG2a-HRP. La cuantificación se realizó contra una curva estándar del b-Nb-Fc. En la figura se observa el promedio de la concentración del anti-CD11c/PD-L1-Fc detectada en suero a distintos tiempos luego de la administración (promedio + desviación estándar, n=3).

2.2.3 Optimización de la expresión de b-Nbs-Fc

Si bien en un primer momento se logró obtener aproximadamente 1 mg del anti-CD11c/PD-L1-Fc purificado por proteína A por 240 mL de medio de cultivo, para ser utilizado en modelos de ratón como terapia antitumoral era crucial poder mejorar el rendimiento de esa expresión. A tales efectos, el casete de expresión de los b-Nbs-Fc se transfirió a un versión modificad del pcDNA3.1 desarrollada en el grupo, la que contiene el intrón A de CMV intercalada entre el promotor y el casete de expresión. De esta forma, y duplicando el tiempo de recolección de sobrenadante, fue posible aumentar la cantidad de b-Nbs-Fc unas 4 veces. Con este nuevo sistema se produjeron de aquí en más los distintos b-Nbs-Fc utilizados en este trabajo.

2.2.4 Verificación de la funcionalidad de los b-Nbs-Fc

Se verificó que los b-Nbs-Fc fueran capaces de reconocer a mPD-L1 mediante un ensayo de ELISA. Como se observa en la **Figura 3.26** ambos mostraron un reconocimiento dependiente de la concentración y con afinidades muy buenas similares, como se muestra en los EC50 del orden de los ng/mL. A su vez empleando citometría de flujo frente a células

B16F10 que expresan PD-L1 (**Figura 3.27.A**), se verificó la unión al receptor en forma nativa (**Figura 3.27.B**). Por otro lado, la reactividad anti-CD11c se verificó sobre BMDC, **Figura 3.28**. En este caso se observa la reactividad diferencial, dado que el E5-anti-PD-L1-Fc si bien no reacciona con el CD11c, si lo hace con el PD-L1 expresado por las BMDC.

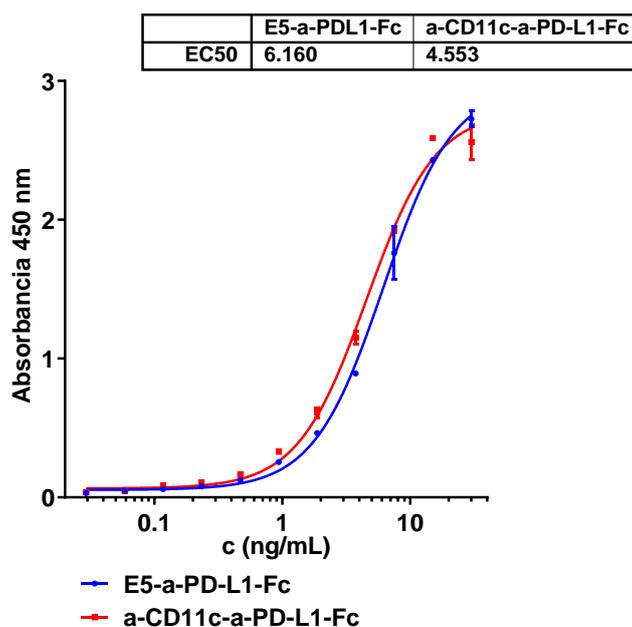


Figura 3.26. ELISA de verificación de la funcionalidad de los b-Nbs-Fc frente a m-PD-L1. Los valores de saturación 50% (EC50) se expresan en ng/mL. Se sensibilizó la placa de ELISA con la proteína mPD-L1-hFc y se utilizaron diluciones seriadas de los b-Nbs-Fc (E5-anti-PD-L1-Fc en azul, anti-CD11c/PD-L1-Fc en rojo), para finalmente detectar la unión de los b-Nbs-Fc con un conjugado anti-mIgG2a-HRP, el cual previamente se verificó que carecía de reactividad con la región Fc humana.

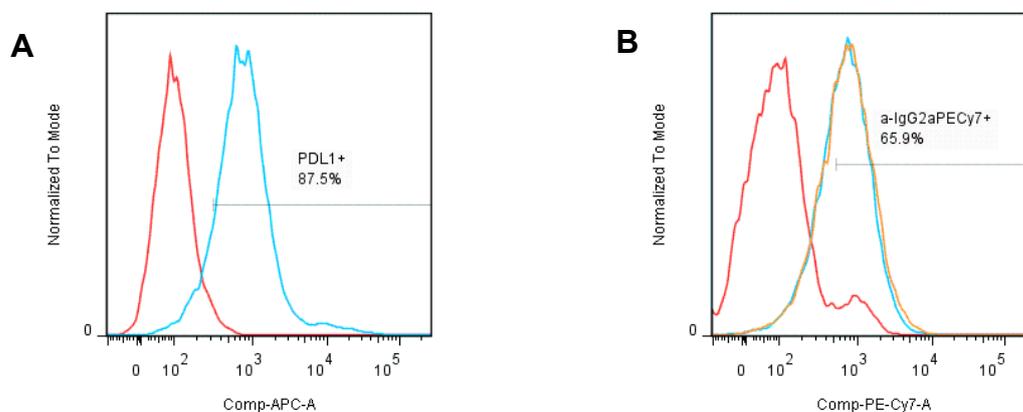


Figura 3.27. Funcionalidad de los b-Nbs-Fc sobre células B16F10 que expresan PD-L1. **A)** Células B16F10 incubadas con PBS (rojo) o anti-PD-L1-APC (celeste) (control positivo). **B)** Células B16F10

incubadas con PBS (rojo), anti-CD11c/PD-L1-Fc (naranja), E5-anti-PD-L1-Fc (celeste) y detectadas con anti-mouseIgG2a-PECy7.

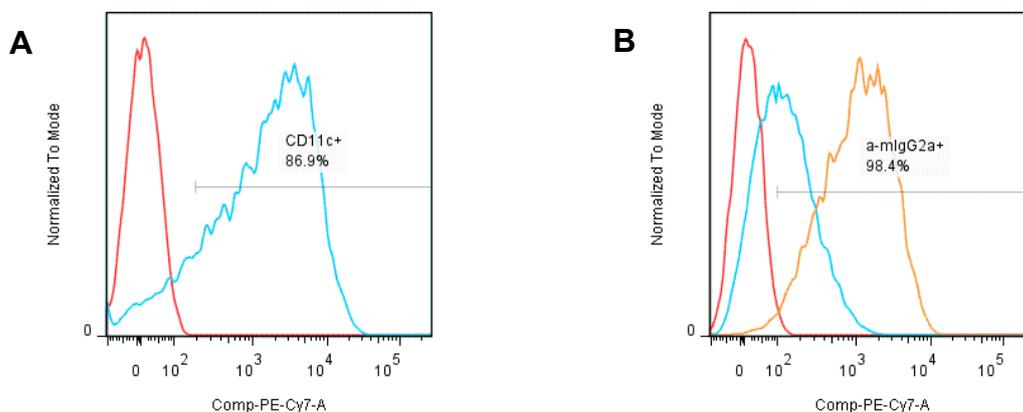


Figura 3.28. Funcionalidad del anti-CD11c/PD-L1-Fc sobre BMDC. **A)** Células BMDC incubadas con PBS (rojo) o anti-CD11c(N418)-PECy7 (celeste) (control positivo). **B)** Células BMDC incubadas con PBS (rojo), anti-CD11c/PD-L1-Fc (naranja), o E5-anti-PD-L1-Fc (celeste), detectadas con anti-mouseIgG2a-PECy7.

2.2.5 Exploración de la actividad antitumoral de los biespecíficos Fc en ensayos *in vivo* modelo B16F10

Una vez disponibles, los b-Nbs-Fc se ensayaron en el modelo de melanoma B16F10, con las siguientes modificaciones: i) se comenzó el tratamiento a tiempos tempranos donde el tumor fuera palpable (día 7), ii) en función de su mayor vida media, se administró por vía sistémica (intraperitoneal), y iii) se utilizó una menor dosis, limitada por la cantidad que teníamos en ese momento (se trató de una primera exploración y todavía no se había optimizado la producción). Para nuestra sorpresa, no se logró observar un efecto terapéutico (**Figura 3.29**). Desafortunadamente, hubo demasiadas modificaciones para sacar conclusiones claras, aunque seguramente el cambio en la vía de administración tuvo un fuerte impacto, a lo que se suma el empleo de una menor dosis (30% en molaridad respecto a los b-Nbs sin Fc). Ambos efectos no pudieron ser compensados por el aumento de permanencia de los b-Nbs-Fc.

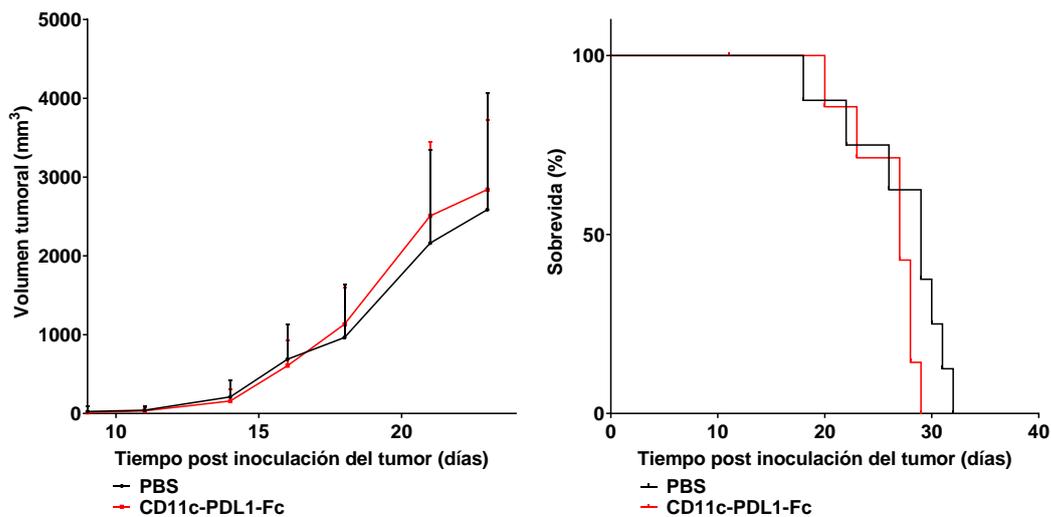


Figura 3.29. Exploración de la actividad antitumoral del anti-CD11c/PD-L1-Fc en el modelo B16F10. Se inyectaron de forma subcutánea $2,5 \times 10^5$ células tumorales B16F10 en el flanco derecho de ratones C57Bl/6. En los días 7, 9 y 11 post implantación del tumor, se administró por vía intraperitoneal 100 μ L de PBS o 50 μ g de anti-CD11c/PD-L1-Fc vehiculizados en 100 μ L de PBS (n=8 por grupo). Se muestra a la izquierda el gráfico de evaluación del crecimiento tumoral (promedio + desviación estándar), en la derecha se observa el gráfico de supervivencia.

Esta contrariedad nos llevó a revisar la elección del modelo tumoral al emplear. La elección inicial del modelo de melanoma se realizó, exclusivamente, en función de su disponibilidad y su alta expresión de PD-L1. La revisión de la bibliografía, mostró que la terapia de bloqueo del eje PD-1/PD-L1 en B16F10 tiene una muy baja tasa de respuesta, en CT26 (modelo que también teníamos disponible) mediana respuesta y MC38 (aún no lo teníamos) alta respuesta [148] (**Figura 3.30**).

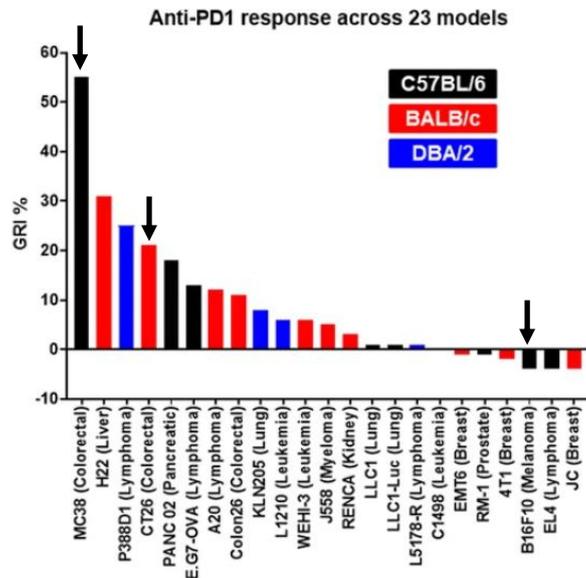


Figura 3.30. Porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento tumoral con tratamiento anti-PD-1 en 23 modelos tumorales singénicos en diferentes cepas de ratón. Se encuentran señalados con flechas negras los modelos utilizados durante la tesis. Imagen adaptada de Sato *et al.*, 2021 [148].

Debido a esto, resolvimos cambiar a un modelo con mejor respuesta a esta inmunoterapia, de modo de hacer más evidente el efecto de las distintas modificaciones que veníamos ensayando. Sobre esta premisa, pasamos en primera instancia a utilizar el modelo de carcinoma de colon CT26, que si bien vimos anteriormente contaba con una baja expresión de PD-L1, esta aumenta en el contexto de su inoculación *in vivo* [149].

2.2.6 Exploración de la actividad antitumoral de los b-Nb-Fc en ensayos *in-vivo* en el modelo CT26

Para el empleo de este nuevo modelo se inyectaron de forma subcutánea $0,8 \times 10^5$ células tumorales CT26 (ATCC) y se trataron con 80 μg de los b-Nbs-Fc a los días 5, 7 y 9. El grupo tratado con el anti-CD11c/PD-L1-Fc mostró un notorio retardo en el crecimiento tumoral. También se observó una extensión en la sobrevida de los individuos del grupo tratado con anti-CD11c/PD-L1-Fc respecto al PBS (**** $P < 0,0001$ Log-rank (Mantel-Cox) test), así como también respecto al E5-anti-PD-L1-Fc (* $P = 0,0136$ Log-rank (Mantel-Cox) test) (Figura 3.31).

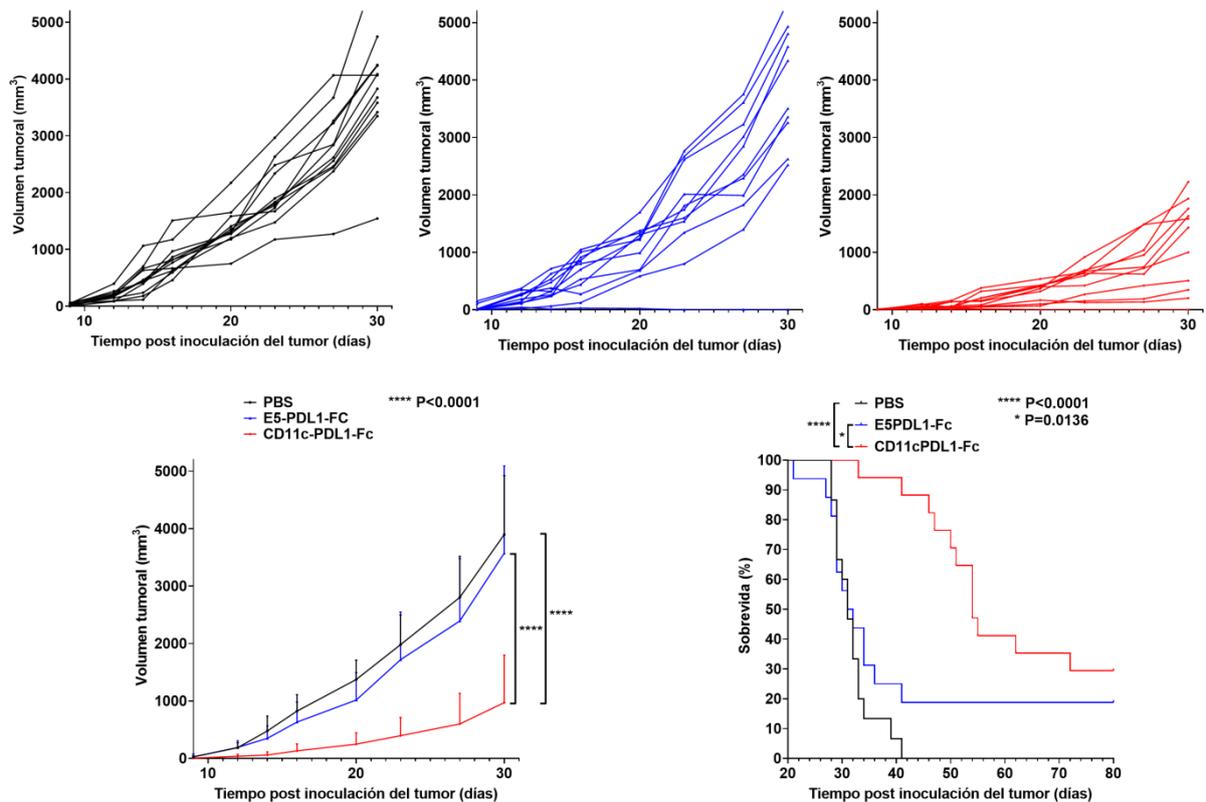


Figura 3.31. Actividad antitumoral del anti-CD11c/PD-L1-Fc en el modelo CT26. Arriba: gráficos del crecimiento tumoral individual de los ratones tratados con PBS (negro, n=15), E5-anti-PD-L1-Fc (azul, n=16), o anti-CD11c-PD-L1-Fc (rojo, n=17). Abajo: izquierda, gráfico de evaluación del crecimiento tumoral (promedio + desviación estándar, pool de dos experimentos independientes); derecha, gráfico de supervivencia. El análisis estadístico fue llevado a cabo usando un test de ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett (volumen tumoral) o el test Log-rank (Mantel-Cox) (supervivencia). *, P < 0,05; ****, P < 0,0001.

En el nuevo modelo obtuvimos un cambio radical a lo que se venía observando anteriormente, con animales que lograron eliminar el tumor, particularmente para la terapia con el anti-CD11c/PD-L1-Fc (aprox. el 30%). Si bien en el grupo control E5-anti-PD-L1-Fc también se lograron curar algunos ratones (aprox. el 20%), hubo una pobre respuesta en el resto.

Además, dentro de este experimento, se extrajo sangre de algunos individuos para la cuantificación del anti-CD11c/PD-L1-Fc en suero y poder así tener más información sobre su permanencia con este esquema de tratamiento. Al día 10 (1 día después de haber recibido la tercera dosis) desde que se inyectaron las células tumorales, se llegó a cuantificar una concentración de 472 nM (~52 µg/mL) del b-Nb-Fc (Figura 3.32). Para nuestra sorpresa

al día 12 la concentración cayó abruptamente a un valor de 9 nM, siendo que esperábamos que hubiese estado a la mitad de lo cuantificado en el día 10 basándonos en la curva de permanencia que se había construido anteriormente en ratones sin tumor (**Figura 3.25**). Aquí se evidenció un potencial problema que podía estar vinculado a la generación de anticuerpos anti droga (ADA) contra el b-Nb-Fc, aunque la menor concentración plasmática podría también deberse a la forma de administración intratumoral, particularmente considerando que *in vivo*, el tumor aumenta la expresión de PD-L1 [149]. Estas incógnitas se tratarían de resolver en los siguientes experimentos.

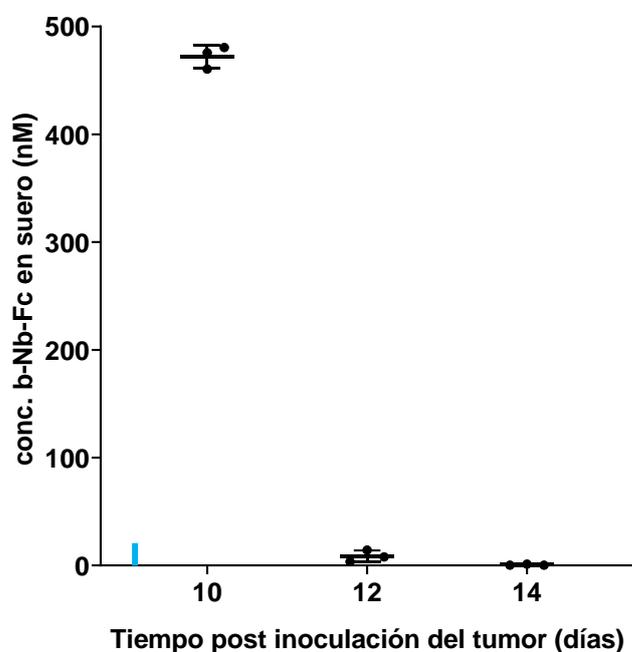


Figura 3.32. Concentración del b-Nb-Fc anti-CD11c/PD-L1-Fc en suero en el modelo CT26 descrito en sección 2.2.6 de M&M. Se escogieron aleatoriamente tres animales, y se les realizaron extracciones de sangre de la vena submandibular en los días 10, 12 y 14, cuantificando la concentración en suero del b-Nb-Fc para cada muestra mediante un ELISA contra m-PD-L1. En la figura se observa el promedio de la concentración del anti-CD11c/PD-L1-Fc en suero en ratones Balb/c con tumor CT26 (promedio \pm desviación estándar, $n=3$). El día 9, momento de administración de la tercera dosis del esquema 5, 7, 9, se muestra en celeste.

2.2.7 Intento de optimización de la actividad antitumoral del anti-CD11c/PD-L1-Fc en modelo CT26

Para asegurar un mayor período de exposición del tumor a los b-Nbs-Fc, buscamos espaciar las dosis, especulando además con que esto pudiese contribuir a disminuir la aparición de ADA. Con este fin, se procedió a dosificar a los animales en los días 5, 9 y 13 post inoculación del tumor. El grupo tratado con el anti-CD11c/PD-L1-Fc mostró nuevamente el mayor retardo en el crecimiento tumoral, aunque solo un individuo logró la erradicación del tumor. También se volvió a observar una mayor extensión en la sobrevida de los individuos del grupo tratado, aunque con menores diferencias que en experimento anterior (Figura 3.33).

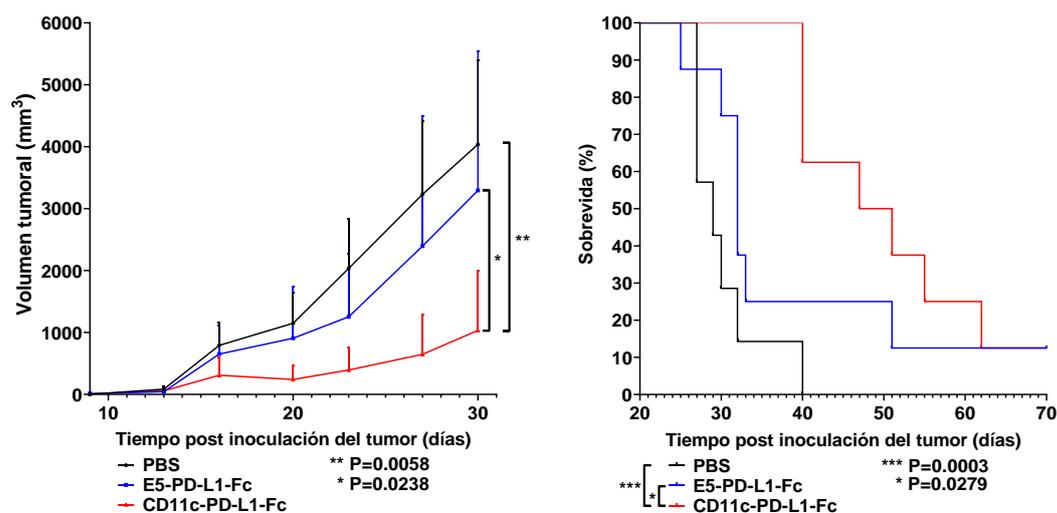


Figura 3.33. Optimización de la actividad antitumoral del anti-CD11c/PD-L1-Fc en el modelo CT26. Se inyectaron de forma subcutánea $0,8 \times 10^5$ células tumorales CT26 en el flanco derecho de ratones Balb/c. En los días 5, 9 y 13 desde que inició el experimento, se administró por vía subcutánea (cuando el tumor no era palpable) o intratumoralmente 80 μg de los b-Nbs-Fc. Se muestra a la izquierda el gráfico de evaluación del crecimiento tumoral (promedio + desviación estándar, $n=6-8$ por grupo), en la derecha se observa el gráfico de sobrevida. El análisis estadístico fue llevado a cabo usando un test de ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett (volumen tumoral); tests: Log-rank (Mantel-Cox) o Gehan-Breslow-Wilcoxon (sobrevida). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

La cuantificación del anti-CD11c/PD-L1-Fc en suero mostró que, dos días después de haber recibido la primera dosis (día 7 post implantación del tumor (p.i.t.)) la concentración del b-Nb-Fc en suero fue 416 nM ($\sim 46 \mu\text{g/mL}$), pasando a ser la mitad al día 9, y a partir

del día 13 fue prácticamente indetectable (**Figura 3.34.A**). Fue muy sorprendente que con este esquema de dosificación (5, 9, 13 p.i.t.) al día posterior de la tercera dosis (14 p.i.t.) el valor diera cercano al límite de cuantificación del ELISA, considerando que con el esquema (5, 7, y 9 p.i.t.), al día siguiente a la última dosis la concentración de b-Nb-Fc fue 472 nM. De esto volvieron a surgir las dos hipótesis que veníamos manejando: i) retención en el tumor, apoyado por el hecho de que al día 13 p.i.t. los tumores son mayores que al día 9 p.i.t., y ii) que al haber transcurrido más tiempo de la primera dosis, la concentración de ADA pudiera ser mayor.

Para tratar de verificar esto último, a los sueros del último experimento, se les determinó el título anticuerpos contra el Nb anti-PD-L1 mediante un ELISA utilizando como antígeno el b-Nb E5-anti-PD-L1 (de forma de determinar la presencia de anticuerpos solamente contra el Nb anti-PD-L1). A partir del día 13 p.i.t. aparece cierto título de anticuerpos (160 UA), que aumenta y parece estancarse a partir del día 14 p.i.t., (252, 259 y 290 UA, en los días 14, 16 y 20 p.i.t., respectivamente) (**Figura 3.34.B**). Los títulos fueron bajos, por lo que surge la pregunta: ¿Son estos valores suficientes para neutralizar la cantidad de b-Nb-Fc administrado? Para contestar esta pregunta realizamos un experimento en el que se adicionó una cantidad equivalente a 500 nM del anti-CD11c/PD-L1-Fc, a suero *naïve*, y a los tres sueros del día 14 y del día 20 p.i.t. y los mismos se analizaron por ELISA contra PD-L1, para verificar si la cantidad medida del b-Nb-Fc en los sueros del experimento era similar a la del suero *naïve*. Como se muestra en la **Figura 3.34.C**, aunque parecería haber una menor cantidad detectable del b-Nb-Fc en los sueros del día 14 y 20, la diferencia no es significativa, y está lejos de justificar la ausencia de b-Nb-Fc en el suero de los ratones durante el tratamiento.

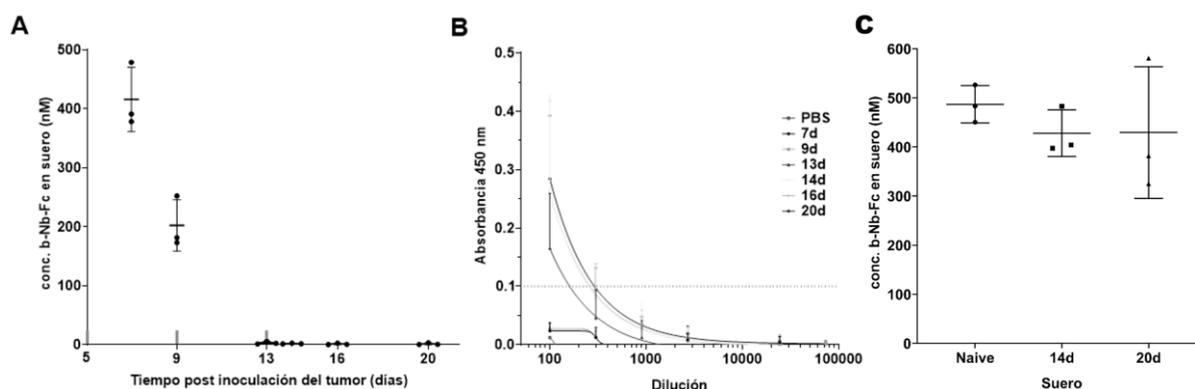


Figura 3.34. Permanencia anti-CD11c/PD-L1-Fc y anticuerpos anti-Nb anti-PD-L1 en modelo CT26 descrito en la sección 2.2.7. A) Concentración del anti-CD11c/PD-L1-Fc, determinada por ELISA contra PD-L1 previo a la administración de la dosis correspondiente, en el suero de tres ratones tratados con este anticuerpo (promedio \pm desviación estándar, n=3). Los días en que se administraron las tres dosis del bNb se muestran en celeste. **B)** Curvas de titulación de los sueros de ratones tratados con anti-CD11c/PD-L1-Fc determinadas con el ELISA con Nb-anti-PD-L1, revelados con anti-mouse IgGs-HRP (n=3). Arbitrariamente, se utilizó el valor de absorbancia de 0,1 para establecer un valor de título de ADA en unidades arbitrarias (UA). **C)** Determinación de la concentración de anti-CD11c/PD-L1-Fc en muestras de suero adicionadas.

2.2.8 Desafío de ratones recuperados con el tratamiento

Para el caso de los ratones “curados” con el tratamiento anti-CD11c/PD-L1-Fc en los días 5, 7 y 9, esto es, animales que presentaron tumores palpables al inicio pero que los eliminaron durante el tratamiento, los mismos se volvieron a desafiar con una inyección de células tumorales, esta vez en el flanco izquierdo. A su vez se contó con un grupo control de ratones *naïve*. Para el grupo de ratones curados, en ningún caso se observó desarrollo del tumor, mientras que todos los ratones *naïve* los desarrollaron (**Figura 3.35**). De este modo, se verificó la generación de una respuesta inmune de memoria protectora que no permitió la proliferación de las células tumorales administradas.

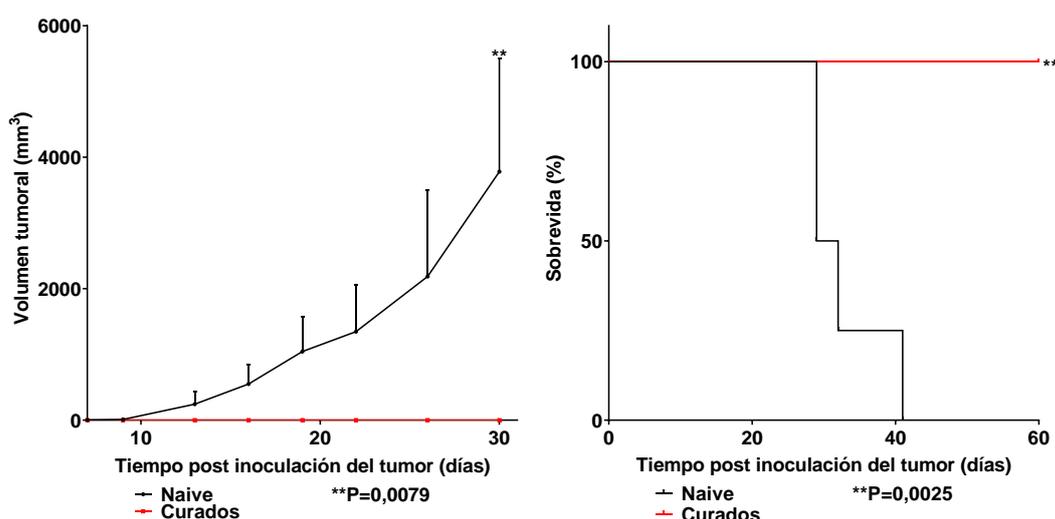


Figura 3.35. Desafío de ratones curados con anti-CD11c/PD-L1-Fc. Luego de 75 días de finalizado el experimento descrito en la sección 2.2.6, los ratones curados (n=5) y ratones *naïve* (n=4) fueron inoculados en el flanco izquierdo con $0,8 \times 10^5$ células tumorales CT26. Se muestra a la izquierda el gráfico de evaluación del crecimiento tumoral (promedio + desviación estándar), en la derecha se observa el gráfico de supervivencia.

El análisis estadístico fue llevado a cabo usando un test de Mann-Whitney (volumen tumoral) o el test Log-rank (Mantel-Cox) (sobrevida). **, $P < 0,01$.

2.2.9 Inmunofenotipificación del microambiente tumoral (TME), ganglio linfático drenante (TDLN) y no drenante del tumor (NDLN) luego del tratamiento con b-Nbs-Fc en modelo CT26

Utilizando el esquema de tratamiento a días 5, 7 y 9 p.i.t, se realizó una inmunofenotipificación (n=6 por grupo) sacrificando a los animales al día 13 desde que comenzó el experimento. Se procesaron tanto los tumores como los ganglios drenantes y no drenantes de cada animal, para finalmente analizar las distintas poblaciones celulares por citometría de flujo (**Figura 3.36**). Entre los resultados más destacados cabe resaltar para el grupo tratado con anti-CD11c/PDL1-Fc un aumento en el porcentaje de células inmunes CD45+ (* $P=0,0269$, **Figura 3.36.B**) y dentro de éstas un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8 y CD4 (** $P=0,0059$, **Figura 3.36.C y D**, respectivamente) en el tumor. A su vez en el ganglio drenante se vio una mayor actividad de proliferación reflejada por un aumento en el total de linfocitos T CD8+, Ki67+ (* $P=0,0298$, **Figura 3.36.E**) que, en menor medida, también se observó para el grupo tratado con el E5/anti-PD-L1-Fc. Otra observación que vale la pena remarcar es que al analizar la expresión de PD-L1 a nivel del tumor entre los grupos fue similar, pero en el ganglio drenante vemos una marcada disminución del mismo a nivel de las células dendríticas (DCs) (**Figura 3.36.G**), con una clara diferencia en relación al b-Nb-Fc E5/anti-PD-L1-Fc. Dado que experimentos anteriores mostraron que el tratamiento con anti-CD11c disminuye la expresión de CD11c a niveles indetectables, las DCs se identificaron como CD19-, F480-, MHCII+, CD11b+, lo que sólo abarca las DCs de tipo II, dejando afuera las DCs de tipo I que tienen un rol sustancial en la presentación cruzada y activación de linfocitos T CD8+. El mismo análisis se realizó para la versión sin Fc de los b-Nbs, con resultados prácticamente idénticos.

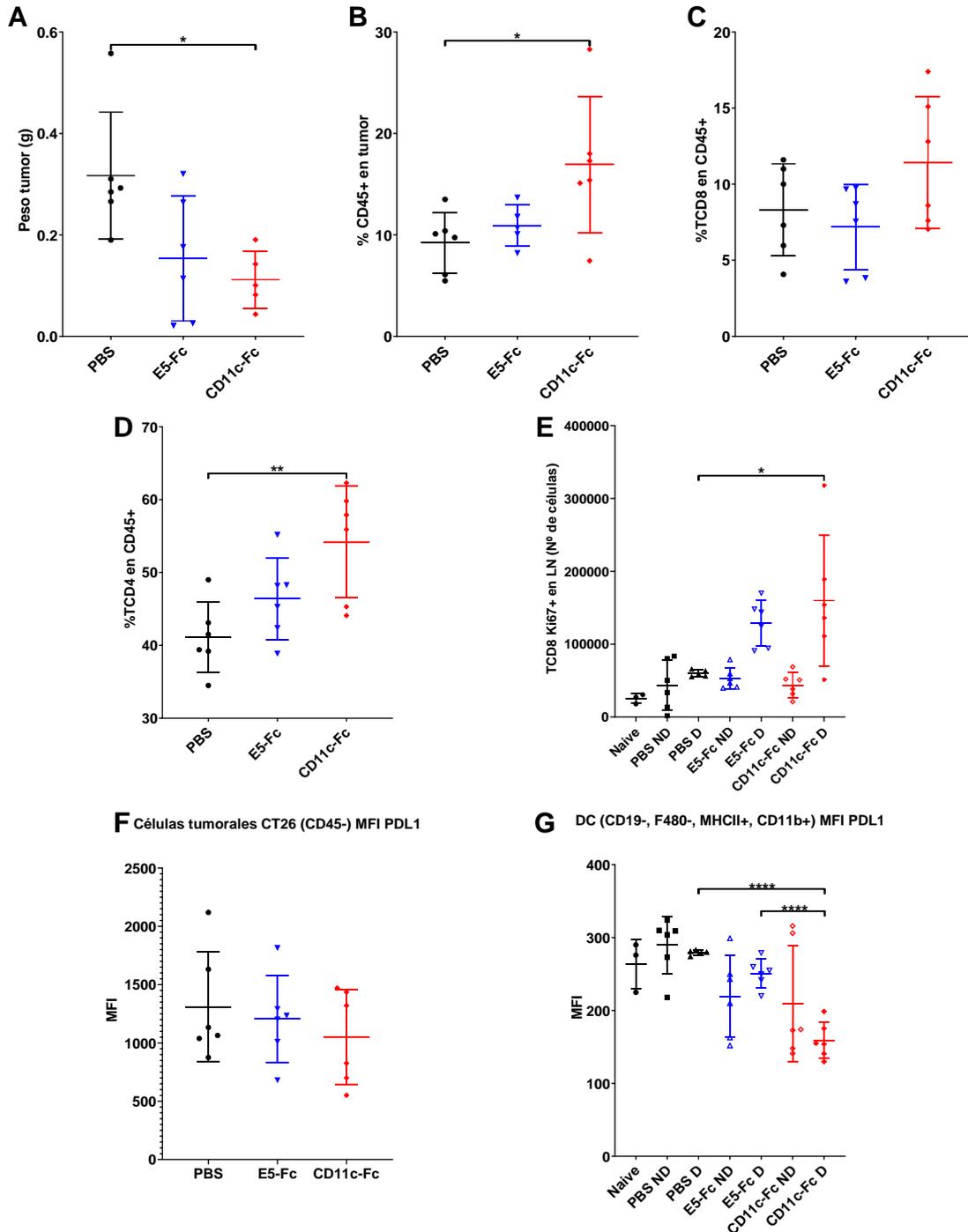


Figura 3.36. Inmunofenotipificación del TME y LN en modelo CT26. Se inyectaron de forma subcutánea $0,8 \times 10^5$ células tumorales CT26 en el flanco derecho de ratones Balb/c. En los días 5, 7 y 9 desde que inició el experimento, se administró por vía subcutánea (cuando el tumor no era palpable) o intratumoralmente $80 \mu\text{g}$ de los b-Nbs-Fc ($n=6$). Se sacrificaron los animales al día 13 y se procesaron tanto los tumores como ganglios drenante y no drenante de cada uno, para finalmente analizar las distintas poblaciones celulares por citometría de flujo. **A)** Peso tumoral día 13 (4 días de finalizado el tratamiento). **B)** Infiltrado de células

inmunes CD45+. **C)** Infiltrado de linfocitos T CD8+. **D)** Infiltrado de linfocitos T CD4+. **E)** Linfocitos T CD8+ Ki67+ en ganglios. **F)** Nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales CT26. **G)** Nivel de expresión de PD-L1 en DCs. PBS (ratones tratados con PBS); E5-Fc (ratones tratados con E5-anti-PD-L1-Fc); CD11c-Fc (ratones tratados con anti-CD11c/PD-L1-Fc); X ND (ganglio no drenante de ratones tratados con X), X D (ganglio drenante de ratones tratados con X), *Naïve* (ganglio de ratones *Naïve*, sin tumor). *P<0,05; **P<0,01; ****P<0,0001; test de ANOVA de una vía seguido de un test de Turkey.

Estos resultados mostraron que el anti-CD11c/PD-L1-Fc da lugar a la proliferación linfocitaria en el ganglio drenante, así como al reclutamiento linfocitario en el tumor. A su vez, la menor disponibilidad del ligando inhibidor PD-L1 en las DCs del ganglio drenante, arroja luz sobre el posible mecanismo que sustenta el efecto antitumoral observado. En efecto, dado que el anti-CD11c/PD-L1 puede unir simultáneamente dos receptores sobre la DC, su avidéz es mayor que su contraparte monoespecífica, lo que se traduce en un direccionamiento y bloqueo preferencial de PD-L1 sobre las DCs que, como se ha comentado, son fundamentales para la continua reactivación de las células T de memoria progenitoras CD8+ con marcadores de agotamiento (T_{pex}), que surten al tumor con células efectoras PD-1+.

2.2.10 Análisis del posible mecanismo de acción de la terapia con anti-CD11c/PD-L1 mediante ensayos *in vitro* con BMDCs

Para tratar de demostrar que el hecho de que la combinación con un nanobody anti-CD11c en la construcción biespecífica generaba un mejor bloqueo de PD-L1 a nivel de las células dendríticas, se realizaron experimentos *in vitro* con BMDC (células dendríticas derivadas de médula ósea (expresan tanto el receptor CD11c como PD-L1). Para este análisis también retomamos el uso de los b-Nbs carentes de Fc, que no son bivalentes y en los que el efecto de avidéz podía ser más evidente. Para esto se incubaron las BMDCs con distintas concentraciones de E5-anti-PD-L1 o anti-CD11c/PD-L1 ambos sin y con Fc a 4°C, 1h o a 37°C toda la noche. Luego de lavar, se detectó la expresión de PD-L1 con el anticuerpo comercial anti-PD-L1-APC (clon: 10F.9G2) con actividad antitumoral *in vivo* probada (siempre a 4°C 1h) y se midió la MFI por citometría de flujo para este último (**Figura 3.37**). Una disminución en la MFI respecto a cuando no se incubaba con el b-Nb, nos indicaba que había un mayor bloqueo de PD-L1 en las BMDCs (ya sea porque el nanobody bloquea el sitio de unión de 10F.9G2 a 4°C, y/o además, por tratarse de un receptor endocítico que

por esta vía podría estar disminuyendo la expresión del receptor a 37°C. Como se detalla en la **Figura 3.37** al incubar a 4°C con los b-Nbs se apreció una disminución en la MFI en forma dosis dependiente, siendo el efecto más notorio para los b-Nbs equipados con el Nb anti-CD11c, sugiriendo un mejor efecto del bloqueo de PD-L1 a causa de un aumento de la avidéz. En la incubación de 37°C, se observó una marcada reducción de la expresión de PD-L1 con ambas formas de b-Nbs, aunque vuelve a reflejarse un mayor efecto para los b-Nbs equipados con el Nb anti-CD11c, evidente a baja concentración para el anti-CD11c/PD-L-Fc, y a mayores concentraciones para el anti-CD11c/PD-L1 sin Fc.

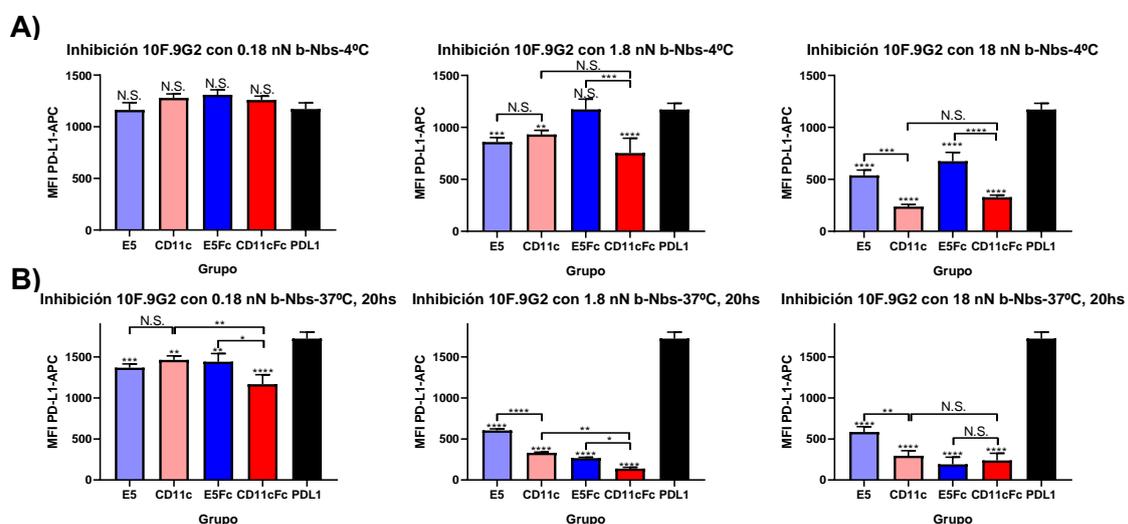


Figura 3.37. Inhibición anti-PD-L1 (clon: 10F.9G2) con los b-Nbs. Se incubaron BMDCs con distintas concentraciones de b-Nbs: E5 (E5-anti-PD-L1), CD11c (anti-CD11c/PD-L1), E5Fc (E5-anti-PD-L1-Fc), CD11cFc (anti-CD11c/PD-L1-Fc), o PBS, en **A)** 4°C, 1h, y en **B)** 37°C toda la noche. La expresión de PD-L1 remanente se detectó con el anticuerpo anti-PD-L1 comercial (clon: 10F.9G2)-APC. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001; N.S. (no significativo) test de ANOVA de una vía seguido de un test de Turkey.

El posible efecto de activación de BMDCs por los b-Nbs se analizó *in vitro* incubando las BMDCs con los b-Nbs durante 18 h a 37°C y analizando por citometría la expresión de CD80, CD86, MHCII y CD40. No se observaron cambios significativos respecto a las células incubadas con PBS (resultados no mostrados).

Para estudiar la internalización mediada por los b-Nbs se realizaron experimentos de microscopía confocal de fluorescencia como se detalla en la **Figura 3.38**. BMDCs se incubaron con los b-Nbs marcados con AF568 a 37°C durante una hora para permitir la unión y eventual

internalización de los mismos. Luego se marcaron con un anticuerpo anti-PDL1-APC (10F.9G2) a 4°C para detectar el remanente de PD-L1 en la superficie de las células y con anti-CD11b-FITC como marcador de membrana. Solamente se observó una marcada internalización del receptor con formación de vesículas endocíticas en el caso del b-Nb que contiene el anti-CD11c. Este resultado aportó evidencias adicionales sobre el mecanismo por el cual este b-Nb resulta ventajoso respecto a la unión monoespecífica, dado que no sólo disminuye las posibilidades de interacción con PD-1 por bloqueo de PD-L1, sino que también la dificulta al promover la internalización de este receptor.

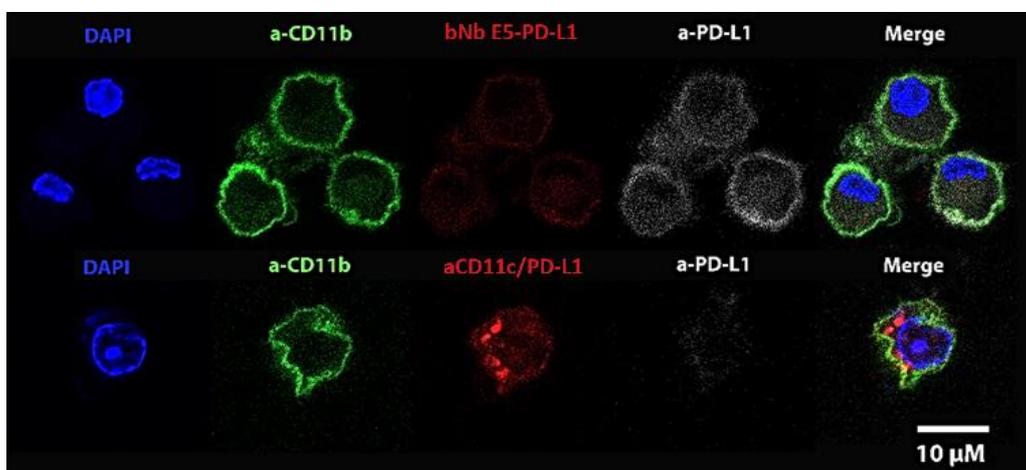


Figura 3.38. Microscopía confocal de fluorescencia b-Nbs-Fc con BMDCs. Se incubaron BMDCs con E5-anti-PD-L1-Fc-AF568 o anti-CD11c/PD-L1-Fc-AF568 a 37°C, 1h para permitir la eventual internalización de los b-Nbs. Luego de lavarlas, las células fueron incubadas con los anticuerpos anti-PD-L1-APC (10F.9G2) y anti-CD11b-FITC a 4°C, 30 min. Fijadas en PFA 4%, finalmente se incubaron con DAPI, 5 min a T ambiente.

2.2.11 Exploración de la actividad antitumoral de los biespecíficos Fc en ensayos *in vivo* modelo MC38

El modelo MC38 (carcinoma de colon para utilizar en ratones C57Bl/6) se obtuvo en etapas avanzadas de la tesis. Es uno de los más utilizados para la evaluación de la inmunoterapia de inhibición de puntos de control en la literatura, por lo que consideramos que era valioso explorarlo. A su vez, como se ha mencionado, es uno de los que presenta la mejor respuesta a esta terapia **Figura 3.30**. En el primer experimento se utilizó el esquema de dosificación 5, 7 y 9 p.i.t., y se incluyó además el anticuerpo comercial anti-PD-L1 10F.9G2 (Bio X

Cell #BE0101), que es ampliamente utilizado en modelos murinos por su potente acción terapéutica. La dosis de este anticuerpo se ajustó de forma de inyectar cantidades equivalentes a la de los b-Nbs-Fc en términos molares.

Como se aprecia en la **Figura 3.39**, el grupo tratado con E5-anti-PD-L1-Fc respondió mejor (a lo que se venía observando) respecto al grupo del PBS, confirmando que el MC38 es más sensible a esta terapia. De todas formas, y muy importante, siguió quedando claro que la combinación anti-PD-L1 con anti-CD11c da lugar a un mejor efecto terapéutico, tanto en la evolución del volumen tumoral como en la supervivencia. Llamativamente, el monoclonal 10F.9G2, a pesar de ser monoespecífico, también mostró una alta eficacia, que resultó similar a la del anti-CD11c/PD-L1-Fc. Aquí es importante considerar que el anticuerpo 10F.9G2 es una IgG2b de rata, que ejerce potentes funciones efectoras en modelos de ratón, y de hecho existen versiones comerciales de este anticuerpo denominadas “*effectorless*” (ej. el anti-mPD-L1-mIgG1e3 (10F.9G2) de Invivogen) que sustituyen el Fc IgG2b de rata por una versión mutada del mFc para eliminar estas funciones. En este sentido, cabe destacar que los anticuerpos monoclonales utilizados como inhibidores de puntos de control en humanos son típicamente IgG4 o IgG1 silenciadas, con el fin de eliminar efectos secundarios indeseados, y desde este punto de vista, el Fc mIgG2a-LALA usado en nuestras construcciones se acerca más a las estrategias de bloqueo aprobadas. De todas formas, es importante considerar que la fuerte actividad del anticuerpo 10F.9G2 también podría ser inherente al mismo, ya sea por el sitio a donde se une a PD-L1, su afinidad, la disposición espacial de sus paratopes resultante de la región bisagra y Fabs de IgG2b de rata que promueva una eficiente interacción con los receptores PD-L1, etc.

Hasta ese momento, en nuestra construcción, el dominio de reconocimiento de PD-L1 era un Nb obtenido de la literatura de muy buena afinidad, reportado para su uso en imagenología de tumores, pero sin probada actividad terapéutica. Por esta razón, decidimos demostrar el incremento de actividad antitumoral anti-PD-L1 a través de su direccionamiento a células dendríticas, utilizando un anticuerpo anti-PD-L1 de probada actividad terapéutica, para lo cual seleccionamos el anticuerpo atezolizumab.

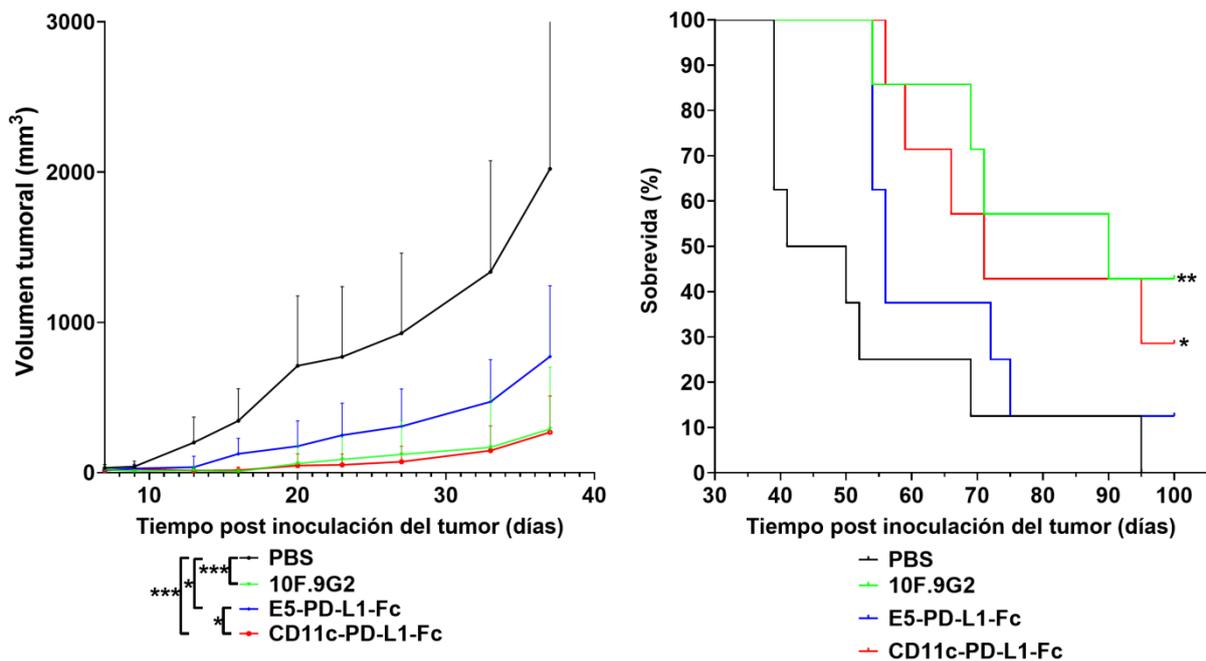


Figura 3.39. Actividad antitumoral del anti-CD11c/PD-L1-Fc en el modelo MC38. En los días 5, 7, 9 p.i.t, los ratones se trataron con PBS (negro), 10F.9G2 (verde), E5-anti-PD-L1-Fc (azul), o anti-CD11c/PD-L1-Fc (rojo). Se muestra a la izquierda el gráfico de evaluación del crecimiento tumoral (promedio + desviación estándar, n=7-8 por grupo), en la derecha se observa el gráfico de supervida. El análisis estadístico fue llevado a cabo usando un test de ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett, o t test (volumen tumoral), o el test Log-rank (Mantel-Cox) (supervida). *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001.

2.3 Expresión de nanobodies junto con scFv-Atezolizumab-Fc (b-Nbs-Atezo) para el uso de los mismos como terapia anti-tumoral

2.3.1 Clonado y expresión en gran escala de b-Nbs-Atezo

Atezolizumab es un anticuerpo monoclonal aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer [150], que es capaz de reconocer a PD-L1 inhibiendo su interacción con PD-1 y con CD80 [151]. Reacciona tanto con el receptor humano como murino con alta afinidad (KD=0,43 y 0,13 nM, respectivamente), posibilitando su uso en modelos tumorales de ratón singénicos [152, 153]. Tomando ventaja de estas características, se diseñó un anticuerpo biespecífico con el mFc IgG2a-LALA, sustituyendo en el casete de expresión Nb1-Nb2-mFcIgG2a-LALA (**figura 3.23**) el Nb anti-PD-L1 por el scFv del atezolizumab. El diseño de este scFv incluye el dominio variable de la cadena liviana unido por un *linker* de (G₄S)₃ al dominio variable de la cadena pesada como describen Kim *et al.* [154]. Con

este sistema se produjeron en células HEK293T los anticuerpos biespecíficos anti-CD11c-scFvAtezo-Fc (anti-CD11c-Atezo) y el E5-scFvAtezo (E5-Atezo), obteniéndose 4,2 y 2,9 mg de proteína purificada por cada 100 mL de cultivo. El análisis por SDS-PAGE permitió confirmar la pureza de los nuevos biespecíficos, así como el tamaño esperado de los mismos y sus componentes en relación al marcador de PM y los controles (**Figura 3.40**).

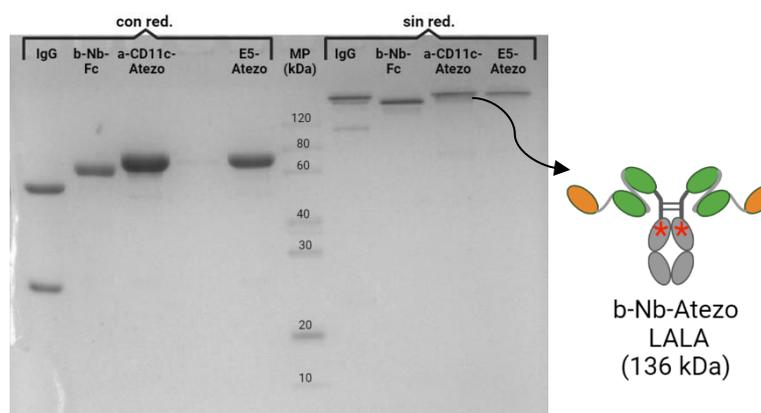


Figura 3.40. Gel SDS page de la producción de los anticuerpos biespecíficos anti-CD11c-Atezo y E5-Atezo. Se incluyó una IgG de rata y el b-Nb-Fc (anti-CD11c/PD-L1-Fc) como control. A la derecha se representa esquemáticamente el formato de los biespecíficos generados, con los dominios en verde representando el scFv y en naranja el Nb.

2.3.2 Verificación de la funcionalidad de los b-Nbs-Atezo

Se verificó que los b-Nbs-Atezo fueran capaces de reconocer a mPD-L1 mediante un ensayo de ELISA. Como se observa en la **Figura 3.41**, ambos mostraron un reconocimiento dependiente de la concentración, con concentraciones de saturación al 50% (EC50) del orden pM. Sin embargo, en el caso de anti-CD11c/PD-L1-Fc y el anti-PD-L1 comercial (10F.9G2) los valores de EC50 fueron aproximadamente un orden superior. Esta diferencia podría ser explicada por la presencia de la secuencia peptídica que artificialmente une los dominios VL-VH en el scFv del Atezolizumab, y que no necesariamente reproduce la orientación original de los mismos. De todas formas, la afinidad del Atezolizumab original (Leinco Technologies #LT1750) y de los biespecíficos se estudió además por BLI (**Figura 3.42**), que a diferencia del ELISA que es representativo del equilibrio de la unión, en el caso del BLI obtenemos parámetros de la cinética de la

interacción. Si bien en el caso del Atezolizumab se obtuvo un valor de $KD=0,72$ nM muy similar al reportado, no fue posible estimar la afinidad de los biespecíficos, porque si bien tienen una k_{on} notoriamente más lenta que la del Atezolizumab, su k_{off} es extremadamente lenta, al punto que está fuera del rango de medida del instrumento (Blitz-Sartorius) que disponemos. Por lo cual, traduciendo al efecto biológico, esto sugiere que una vez formado el complejo, y por tanto el bloqueo de PD-L1, el mismo es muy estable.

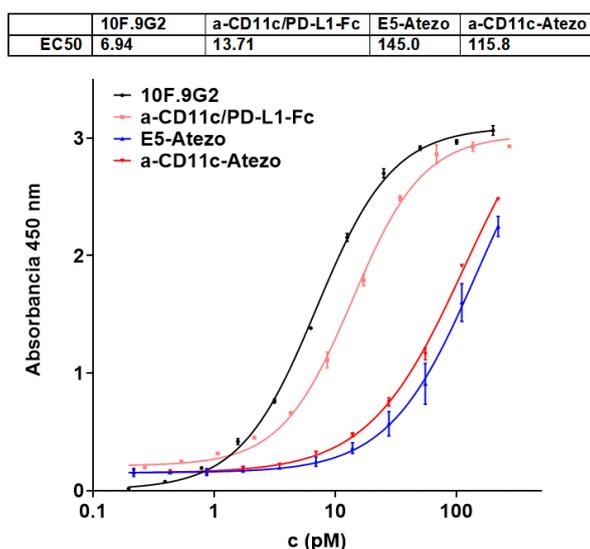


Figura 3.41. ELISA de verificación de la funcionalidad de los b-Nbs-Atezo frente a m-PD-L1. Se sensibilizó con la proteína mPD-L1-hFc y se utilizaron diluciones seriadas de los b-Nbs-Atezo (E5-Atezo en azul, anti-CD11c-Atezo en rojo), o de anti-CD11c/PD-L1-Fc en naranja, para finalmente agregar anti-IgG2amouse-HRP y revelar con el sustrato. Además, se utilizaron diluciones seriadas del anti-mPD-L1 comercial 10F.9G2 (IgG de rata), agregando para este caso un anti-IgG-rat-HRP.

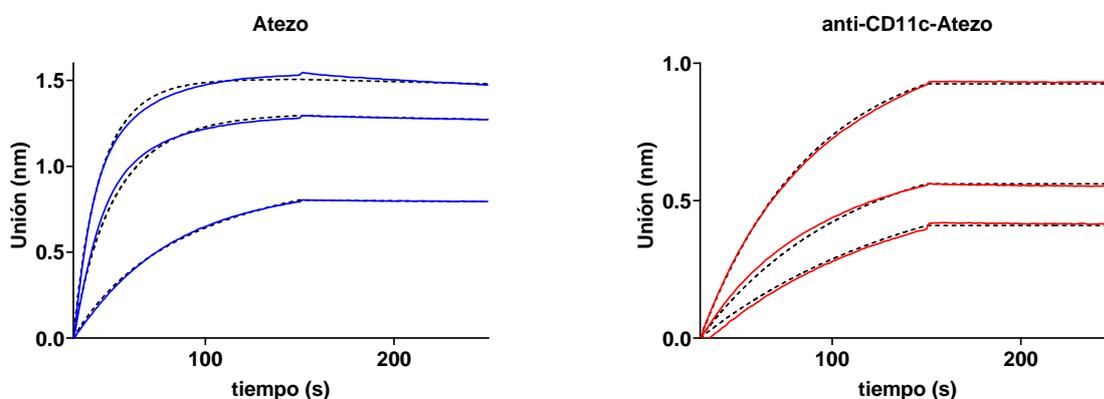


Figura 3.42. Sensogramas obtenidos por Interferometría de Biocapa para la determinación de las constantes cinéticas de asociación y disociación de Atezolizumab comercial y del anti-CD11c-Atezo. La asociación y disociación de Atezolizumab (azul) fue medida a las concentraciones de 300, 200 y 50 nM, mientras que para el anti-CD11c-Atezo (rojo) se utilizaron 200, 150, 100 nM. Se emplearon biosensores reactivos de aminas con PD-L1 inmovilizado covalentemente, en el instrumento BLItz (ForteBio). Los datos se ajustaron globalmente a un modelo de relación de unión 1:1 (líneas discontinuas).

A su vez, empleando la citometría de flujo frente a células MC38 que expresan PD-L1 (**Figura 3.43.A**), se verificó la unión al receptor en forma nativa como se encuentra en las células (**Figura 3.43.B**).

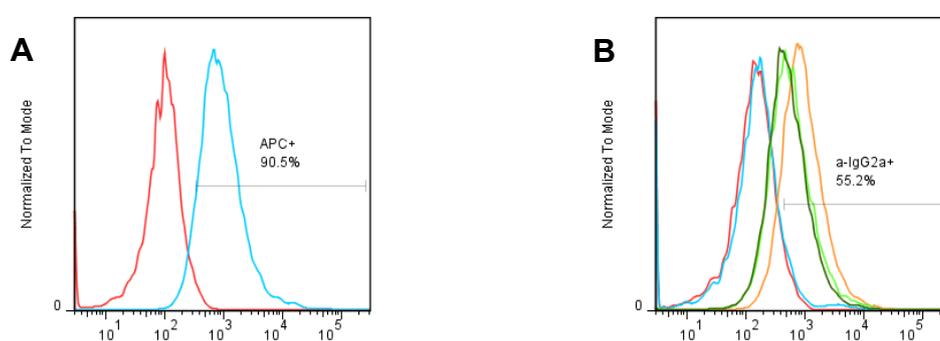


Figura 3.43. Funcionalidad de los b-Nbs-Atezo sobre células MC38 que expresan PD-L1. **A)** Células MC38 incubadas con PBS (rojo) o anti-PD-L1-APC (celeste). **B)** Células MC38 incubadas con PBS (rojo), anti-CD11c/PD-L1-Fc (naranja), anti-CD11c-Atezo (verde oscuro), E5-Atezo (verde claro), la unión de los distintos anticuerpos se detectó con un conjugado anti-mouseIgG2a-PECy7.

Para el caso del anti-CD11c-Atezo también se verificó la capacidad de unirse a BMDCs que expresan CD11c (**Figura 3.44.A**), utilizando la citometría de flujo como se aprecia en la **Figura 3.44.B**.

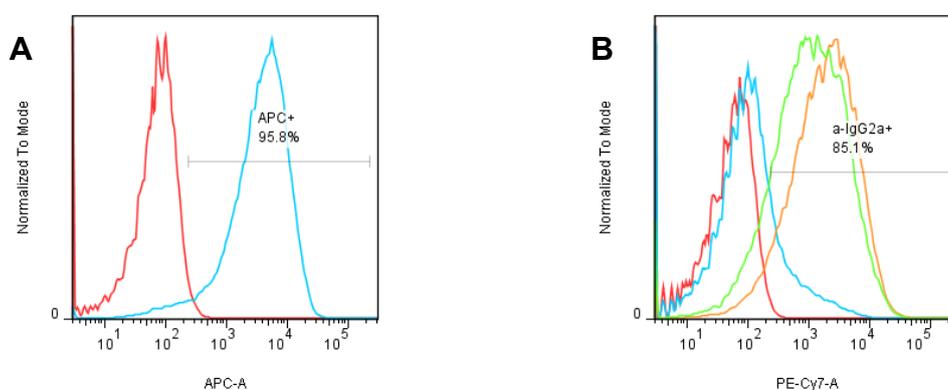


Figura 3.44. Funcionalidad del anti-CD11c-Atezo sobre BMDCs. **A)** BMDCs incubadas con PBS (rojo), anti-CD11c(N418)-EFluor660 (celeste) (control positivo de la expresión de CD11c). **B)** BMDCs incubadas

con PBS (rojo), anti-CD11c/PD-L1-Fc (naranja), anti-CD11c-Atezo (verde), mouse IgG irrelevante (celeste). La unión de los anticuerpos biespecíficos se detectó con un anti-mouseIgG2a-PECy7.

2.3.3 Exploración de la actividad antitumoral de los biespecíficos-scFvAtezo en ensayos *in vivo* modelo MC38

Para esta actividad, decidimos continuar trabajando con el modelo MC38, pero para tornarlo más desafiante, se duplicó el número de células tumorales inyectadas y se comenzó el tratamiento un par de días más tarde, usando el esquema de administración 7, 9, 11. Además de los grupos tratados con anti-CD11c-Atezo, E5-Atezo y control (PBS), se incluyó un grupo tratado con el anticuerpo monoclonal Atezolizumab (Leinco Technologies #LT1750). Como se aprecia en la **Figura 3.45**, al día 36, el grupo tratado con el anti-CD11c-Atezo mostró un significativo retardo en el crecimiento tumoral respecto a los demás tratamientos. Curiosamente, el Atezolizumab, no mostró una potente actividad como terapia monoespecífica, a diferencia de lo observado para el 10F.9G2 en el experimento anterior, y se comportó en forma similar al E5-Atezo. De todas formas, el resultado más relevante de este experimento fue la demostración, con un anticuerpo de reconocida actividad antitumoral, que una vez más, el direccionamiento a células dendríticas a través de CD11c en formato de anticuerpo biespecífico, potencia la terapia de bloqueo de PD-L1. Las diferencias observadas respecto al tratamiento monoespecífico se tradujeron en una mayor supervivencia a tiempos tempranos en el caso del tratamiento con anti-CD11c-Atezo, que corresponden a la etapa en la cual se realiza el tratamiento. A tiempos mayores, luego de los dos meses p.i.t., el control sobre el crecimiento tumoral parece perderse, y al cuarto mes, el número de ratones sin tumor tiende a ser similar en todos los grupos tratados con anticuerpos. Una observación similar puede derivarse del experimento descrito para el modelo CT26 en la sección 2.2.6, y deja abierta la pregunta de si este fenómeno se podrá contrarrestar realizando un tratamiento prolongado en el tiempo.

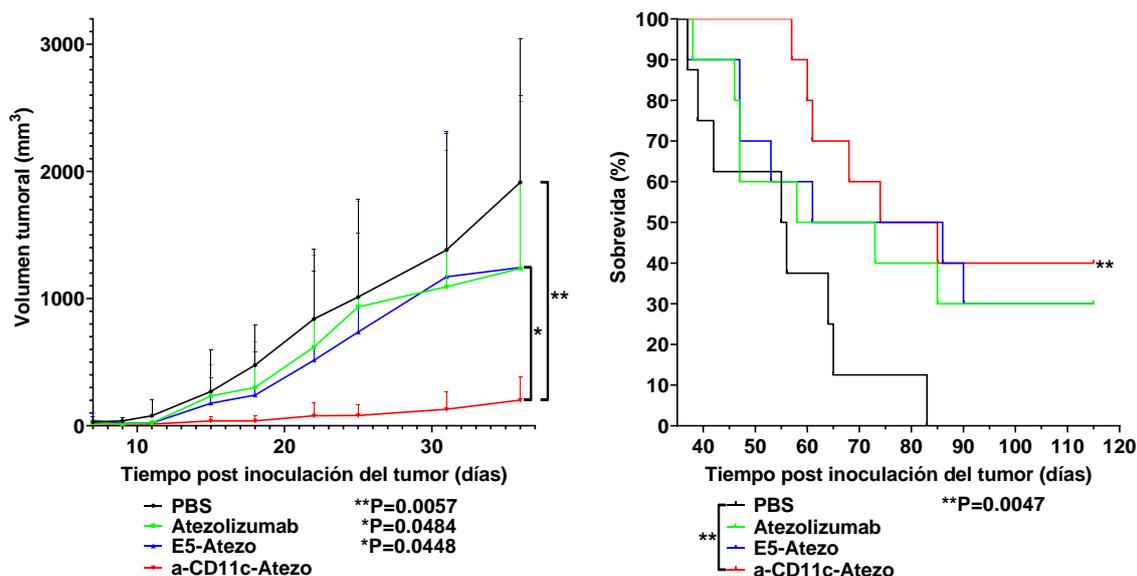


Figura 3.45. Actividad antitumoral del anti-CD11c-Atezo en el modelo MC38. Se inyectaron de forma subcutánea 1×10^6 células tumorales MC38 en el flanco derecho de ratones C57Bl/6. En los días 7, 9 y 11 desde que inició el experimento, se administró intratumoralmente 80 μg de los b-Nbs-Atezo o 85 μg del anti-PD-L1 comercial (Atezolizumab). Se muestra a la izquierda el gráfico de evaluación del crecimiento tumoral (promedio + desviación estándar, $n=8-10$ por grupo), en la derecha se observa el gráfico de supervivencia. El análisis estadístico fue llevado a cabo usando un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnett (volumen tumoral), t test (volumen tumoral), o el test Log-rank (Mantel-Cox) (supervivencia). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Habiendo empleado anticuerpos biespecíficos en los que se sustituyó el Nb anti-PD-L1 por el scFvAtezolizumab, se continuaron observando muy buenos resultados con el biespecífico que contaba con el anti-CD11c. Si bien por ahí se podría esperar una respuesta más potente, siendo que el Atezolizumab por sí solo ya ha demostrado tener actividad antitumoral en estos modelos, debería realizarse un ajuste en cuanto a la dosis y el esquema terapéutico. Por ejemplo, en el modelo MC38, una versión quimérica del Atezolizumab con los dominios de reconocimiento humanos y la región Fc de la IgG2a de ratón (para disminuir su inmunogenicidad en los ratones) se administró en una dosis de 10 mg/kg, 3 veces por semana 1 vez, o repitiendo el ciclo 2 o 3 veces, obteniendo una inhibición del crecimiento tumoral (%TGI) del 76%, 98% y 103% respectivamente [152]. Mientras que en nuestro caso se administraron dosis de 4,0 mg/kg, 3 veces por semana 1 vez. Podría plantearse un experimento similar a esos donde fue utilizado el Atezolizumab en dosis más altas y que el tamaño tumoral inicial sea mayor al que hemos utilizado hasta este momento. Pero como concepto general cabe resaltar que tanto usando un Nb o un scFv anti-PD-L1,

se obtuvo una respuesta antitumoral potente al combinarlos con el Nb anti-CD11c, muy superadora a cuando este último no está presente.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis comenzamos a explorar el uso de anticuerpos biespecíficos basados en nanobodies como inmunoterapia de tumores. Utilizando a PD-L1 como un blanco con un rol dual, antígeno tumoral y blanco de bloqueo del eje PD-1/PD-L1, se apuntó a dos estrategias: a) generar un nanobody anti-CD3 que nos permitiera construir un b-Nb anti-CD3/PD-L1 para explorar su actividad para redirigir la acción citotóxica de las células T al tumor; y b) generar b-Nbs anti-CD11c/PD-L1 y anti-CD11b/PD-L1 con el fin de promover, ya sea, la captación de células tumorales por células dendríticas/mieloides, y/o direccionar el bloqueo de PD-L1 sobre estas células.

La estrategia elegida para la obtención de Nbs contra CD3 nativo resultó ineficaz. El complejo TCR-CD3 involucra múltiples asociaciones, que son particularmente fuertes entre las subunidades de los heterodímeros CD3 $\epsilon\gamma$ y CD3 $\epsilon\delta$, los cuales a su vez presentan interacciones de menor afinidad con los ectodominios del TCR $\alpha\beta$ [155]. Dada la fuerte interacción entre las subunidades CD3 ϵ y CD3 γ que es determinante de su estructura, decidimos seguir la estrategia reportada por Kim *et al.* [139] y expresarlas como un único polipéptido utilizando el espaciador reportado por estos autores. Como habían reportado los mismos para varios anticuerpos anti-CD3 comerciales, la proteína recombinante CD3 $\epsilon\gamma$ resultó efectivamente reconocida por el anticuerpo comercial que utilizamos como control positivo. Sin embargo, y a pesar de numerosos intentos de selección, todos los Nbs seleccionados que reaccionaron con CD3 $\epsilon\gamma$ no fueron reactivos con el CD3 nativo sobre esplenocitos. Este trabajo fue una clara demostración de la importancia que tiene el antígeno utilizado en la inmunización para obtener Nbs con la funcionalidad deseada. Sobre todo, teniendo en cuenta que, a diferencia de los anticuerpos convencionales, los Nbs poseen menos tolerancia para el reconocimiento de su epítipo si la conformación original no está completamente conservada. Dado que algunos autores han reportado la exitosa obtención de anticuerpos anti-CD3 inmunizando directamente con células T CD4+ [156], una estrategia similar podría ser abordada en el futuro.

Afortunadamente, la exploración de la combinación en un formato biespecífico de los nanobodies anti PD-L1 y anti-CD11c/b si arrojó resultados positivos. En una primera etapa donde se utilizaron formatos biespecíficos carentes de región Fc en el modelo tumoral de

melanoma metastásico B16F10 se logró obtener un indicio de que la combinación con el anti-CD11c podía estar teniendo un efecto terapéutico. Luego de buscar distintas alternativas de tratamiento no logrando los resultados deseados, nos cuestionamos si la ventaja de tener una proteína de pequeño tamaño, con una alta penetrabilidad en los tumores sólidos, podía estar afectando negativamente al ser eliminada rápidamente.

Al verificarse una corta vida media, esto nos llevó al diseño de nuevas construcciones con una región Fc que solo aumentara la permanencia y no brindara funciones efectoras, al igual que en los anticuerpos contra inhibidores de puntos de control aprobados para uso clínico. Se logró optimizar la expresión de estas proteínas, hecho importante debido a las cantidades necesarias para experimentos *in vivo* y verificar la extensión de su vida media. Al emplear el b-Nb-Fc con anti-CD11c en el mismo modelo de melanoma, pero con ciertas variantes en el tratamiento que pudieron ser perjudiciales, no se obtuvo un buen resultado.

Consultando la bibliografía decidimos el cambio a otros modelos tumorales que podían ser más respondedores a la terapia monoespecífica anti-PD-L1 y así obtener un efecto más potente con nuestro biespecífico. De esta manera, se obtuvieron muy buenos resultados en el modelo de carcinoma de colon CT26, es verdad que comenzando con el tratamiento a tiempos tempranos, pero con una clara diferencia en favor de la combinación con el anti-CD11c tanto en retardar el crecimiento tumoral como en la extensión de la supervivencia o la cura de algunos individuos. Este hecho se pudo correlacionar con lo visto a nivel de las poblaciones inmunes tanto en el TME como TDLN. Debido a estos resultados y los múltiples trabajos remarcando la importancia del bloqueo de PD-L1 sobre las DCs en este tipo de terapias, hubo un cambio en el enfoque de nuestra hipótesis inicial, considerando la posibilidad de que nuestra terapia biespecífica estaba actuando redirigiendo y mejorando el bloqueo de PD-L1 en estas células. Para tratar de fundamentar este mecanismo fue que se hicieron experimentos en BMDCs en donde se apreció un mejor bloqueo de PD-L1 tanto por una avidéz aumentada como por una internalización del receptor.

Finalmente se consiguió otro modelo de carcinoma de colon, MC38, en el cual se demostró nuevamente la ventaja de la combinación con el anti-CD11c incluso usando otro dominio para inhibir PD-L1/PD-1 (scFv Atezolizumab) de probada actividad terapéutica.

Si bien los tratamientos en ambos modelos de carcinoma comenzaron a tiempos tempranos, siempre se observó una clara ventaja en la terapia con el biespecífico con anti-CD11c frente

a la monoespecífica. Cabe resaltar que la dosis empleada fue menor a la dosis utilizada comúnmente por los anti-PD-L1 en estos mismos modelos murinos. Esto podría ser trasladado a la clínica para generar un efecto similar o superior a lo obtenido hasta el momento, empleando una menor dosis lo que llevaría probablemente a una menor aparición de efectos adversos, por lo que el tratamiento podría extenderse más en el tiempo generando mayores beneficios.

Con esta tesis se abrió la puerta para continuar trabajando en el grupo con distintos biespecíficos basados en el bloqueo de PD-L1 que también tengan la capacidad de unirse a otros receptores de las DCs, como en el caso de una nueva tesis de maestría en curso donde ya se han obtenido nuevos resultados prometedores y con la aprobación de un FMV de ANII. Con la realización de nuevos experimentos donde se logre evidenciar los efectos observados en modelos más desafiantes, quizá con el agregado de algún dominio que promueva la activación de las DCs como podrían ser IFN de tipo 1 o agonistas de CD40 (ya obtenidos en el grupo), se podría tratar de trasladar la idea del direccionamiento de la terapia anti-PD-L1 a su uso clínico.

REFERENCIAS

1. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat. Med., 2004. **10**(8): p. 789-799.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
3. Gajewski, T.F., H. Schreiber, and Y.-X. Fu, *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment*. Nat. Immunol., 2013. **14**(10): p. 1014-1022.
4. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-148.
5. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 56-61.
6. *Cancer TODAY, IARC*. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>.
7. *CHLCC. Resumen Estadístico – TODOS LOS CÁNCERES. Incidencia y Mortalidad periodo 2015-2019. Tendencia de la Mortalidad hasta 2020*. 12/03/2024]; Available from: <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/RESUMENES-ESTADISTICOSpara-los-canceres-mas-frecuentes--uc264>.
8. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
9. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
10. Shankaran, V., et al., *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
11. Koebel, C.M., et al., *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 903-7.
12. Gubin, M.M. and M.D. Vesely, *Cancer immunoediting in the era of immuno-oncology*. Clin. Cancer Res., 2022. **28**(18): p. 3917-3928.
13. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
14. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
15. Mellman, I., et al., *The cancer-immunity cycle: Indication, genotype, and immunotype*. Immunity, 2023. **56**(10): p. 2188-2205.
16. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. Nature, 2017. **541**(7637): p. 321-330.
17. Hegde, P.S. and D.S. Chen, *Top 10 challenges in cancer immunotherapy*. Immunity, 2020. **52**(1): p. 17-35.
18. Herbst, R.S., et al., *Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 563-567.
19. Ortiz-Muñoz, G., et al., *In situ tumour arrays reveal early environmental control of cancer immunity*. Nature, 2023. **618**(7966): p. 827-833.
20. Philip, M. and A. Schietinger, *CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer*. Nat. Rev. Immunol., 2022. **22**(4): p. 209-223.
21. van der Leun, A.M., D.S. Thommen, and T.N. Schumacher, *CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis*. Nat. Rev. Cancer, 2020. **20**(4): p. 218-232.
22. Borst, J., et al., *CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy*. Nat. Rev. Immunol., 2018. **18**(10): p. 635-647.
23. DeNardo, D.G., et al., *CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages*. Cancer Cell, 2009. **16**(2): p. 91-102.
24. Balkwill, F., *Tumour necrosis factor and cancer*. Nat. Rev. Cancer, 2009. **9**(5): p. 361-371.
25. Borrello, I. and D. Pardoll, *GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience*. Cytokine Growth Factor Rev., 2002. **13**(2): p. 185-193.
26. Boyman, O. and J. Sprent, *The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system*. Nat. Rev. Immunol., 2012. **12**(3): p. 180-190.
27. Carson, M.J., et al., *CNS immune privilege: hiding in plain sight*. Immunol. Rev., 2006. **213**(1): p. 48-65.

28. Groom, J.R. and A.D. Luster, *CXCR3 in T cell function*. *Exp. Cell Res.*, 2011. **317**(5): p. 620-631.
29. Ikeda, H., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting*. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002. **13**(2): p. 95-109.
30. Mocellin, S., et al., *Tumor necrosis factor; cancer and anticancer therapy*. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005. **16**(1): p. 35-53.
31. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003. **3**(2): p. 133-146.
32. Waldmann, T.A., *The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design*. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006. **6**(8): p. 595-601.
33. Gerhard, G.M., et al., *Tumor-infiltrating dendritic cell states are conserved across solid human cancers*. *J. Exp. Med.*, 2021. **218**(1).
34. Wculek, S.K., et al., *Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy*. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020. **20**(1): p. 7-24.
35. Downs-Canner, S.M., et al., *B Cell Function in the Tumor Microenvironment*. *Annu Rev Immunol*, 2022. **40**: p. 169-193.
36. Laumont, C.M., et al., *Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities*. *Nat. Rev. Cancer*, 2022. **22**(7): p. 414-430.
37. Yuen, G.J., E. Demissie, and S. Pillai, *B lymphocytes and cancer: A love-hate relationship*. *Trends Cancer*, 2016. **2**(12): p. 747-757.
38. Chan, I.S. and A.J. Ewald, *The changing role of natural killer cells in cancer metastasis*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2022. **132**(6).
39. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 235-71.
40. Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, *Antibody therapy of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 278-87.
41. Fife, B.T. and J.A. Bluestone, *Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways*. *Immunol Rev*, 2008. **224**: p. 166-82.
42. Sansom, D.M., *CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom?* *Immunology*, 2000. **101**(2): p. 169-77.
43. Walker, L.S.K. and D.M. Sansom, *The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses*. *Nature Reviews Immunology*, 2011. **11**(12): p. 852-863.
44. Hoos, A., et al., *Development of Ipilimumab: Contribution to a New Paradigm for Cancer Immunotherapy*. *Seminars in Oncology*, 2010. **37**(5): p. 533-546.
45. Ramagopal, U.A., et al., *Structural basis for cancer immunotherapy by the first-in-class checkpoint inhibitor ipilimumab*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017. **114**(21).
46. Hodi, F.S., et al., *Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(8): p. 4712-4717.
47. Phan, G.Q., et al., *Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(14): p. 8372-8377.
48. Ribas, A., et al., *Antitumor Activity in Melanoma and Anti-Self Responses in a Phase I Trial With the Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Monoclonal Antibody CP-675,206*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(35): p. 8968-8977.
49. Eroglu, Z., et al., *Long term survival with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade using tremelimumab*. *European Journal of Cancer*, 2015. **51**(17): p. 2689-2697.
50. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(8): p. 711-23.
51. Okazaki, T., Y. Iwai, and T. Honjo, *New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(6): p. 779-82.
52. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. *J. Exp. Med.*, 2000. **192**(7): p. 1027-1034.
53. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008. **26**(1): p. 677-704.
54. Okazaki, T., et al., *A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application*. *Nat. Immunol.*, 2013. **14**(12): p. 1212-1218.
55. Beldi-Ferchiou, A., et al., *PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(45): p. 72961-72977.

56. Penalzoza-MacMaster, P., et al., *CD4 T cell depletion substantially augments the rescue potential of PD-L1 blockade for deeply exhausted CD8 T cells*. J. Immunol., 2015. **195**(3): p. 1054-1063.
57. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. International Immunology, 1996. **8**(5): p. 765-772.
58. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. The EMBO Journal, 1992. **11**(11): p. 3887-3895.
59. Okazaki, T. and T. Honjo, *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application*. International Immunology, 2007. **19**(7): p. 813-824.
60. Pauken, K.E. and E.J. Wherry, *SnapShot: T Cell Exhaustion*. Cell, 2015. **163**(4): p. 1038-1038.e1.
61. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nature Medicine, 1999. **5**(12): p. 1365-1369.
62. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation*. The Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(7): p. 1027-1034.
63. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nature Immunology, 2001. **2**(3): p. 261-268.
64. Tseng, S.-Y., et al., *B7-Dc, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells*. The Journal of Experimental Medicine, 2001. **193**(7): p. 839-846.
65. Kuang, D.-M., et al., *Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(6): p. 1327-1337.
66. Zhang, L., T.F. Gajewski, and J. Kline, *PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model*. Blood, 2009. **114**(8): p. 1545-1552.
67. Wherry, E.J. and M. Kurachi, *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(8): p. 486-499.
68. Iwai, Y., et al., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(19): p. 12293-12297.
69. Fife, B.T., et al., *Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal*. Nature Immunology, 2009. **10**(11): p. 1185-1192.
70. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion*. Nature Medicine, 2002. **8**(8): p. 793-800.
71. Iwai, Y., *PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells*. International Immunology, 2004. **17**(2): p. 133-144.
72. Brahmer, J.R., et al., *Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer*. New England Journal of Medicine, 2012. **366**(26): p. 2455-2465.
73. Powles, T., et al., *MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 558-562.
74. Topalian, S.L., et al., *Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer*. New England Journal of Medicine, 2012. **366**(26): p. 2443-2454.
75. Hamid, O., et al., *Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(2): p. 134-144.
76. Robert, C., et al., *Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(4): p. 320-330.
77. Weber, J.S., et al., *Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. The Lancet Oncology, 2015. **16**(4): p. 375-384.
78. Robert, C., et al., *Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial*. The Lancet, 2014. **384**(9948): p. 1109-1117.
79. Rosenberg, J.E., et al., *Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial*. The Lancet, 2016. **387**(10031): p. 1909-1920.
80. Patsoukis, N., et al., *PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation*. Nature Communications, 2015. **6**(1): p. 6692.
81. Tumeh, P.C., et al., *PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 568-571.

82. Barroso-Sousa, R., et al., *Incidence of endocrine dysfunction following the use of different immune checkpoint inhibitor regimens*. JAMA Oncol., 2018. **4**(2): p. 173.
83. Khoja, L., et al., *Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review*. Ann. Oncol., 2017. **28**(10): p. 2377-2385.
84. Kraehenbuehl, L., et al., *Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways*. Nat Rev Clin Oncol, 2022. **19**(1): p. 37-50.
85. Philip, M. and A. Schietinger, *Heterogeneity and fate choice: T cell exhaustion in cancer and chronic infections*. Curr Opin Immunol, 2019. **58**: p. 98-103.
86. Pauken, K.E., et al., *Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade*. Science, 2016. **354**(6316): p. 1160-1165.
87. Philip, M., et al., *Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming*. Nature, 2017. **545**(7655): p. 452-456.
88. Sen, D.R., et al., *The epigenetic landscape of T cell exhaustion*. Science, 2016. **354**(6316): p. 1165-1169.
89. Brunell, A.E., et al., *Exhausted T cells hijacking the cancer-immunity cycle: Assets and liabilities*. Frontiers in Immunology, 2023. **14**.
90. Beltra, J.C., et al., *Developmental Relationships of Four Exhausted CD8(+) T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms*. Immunity, 2020. **52**(5): p. 825-841.e8.
91. Blank, C.U., et al., *Defining 'T cell exhaustion'*. Nat. Rev. Immunol., 2019. **19**(11): p. 665-674.
92. Huang, Q., et al., *The primordial differentiation of tumor-specific memory CD8+ T cells as bona fide responders to PD-1/PD-L1 blockade in draining lymph nodes*. Cell, 2022. **185**(22): p. 4049-4066.e25.
93. Scott, A.C., et al., *TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation*. Nature, 2019. **571**(7764): p. 270-274.
94. Zehn, D., et al., *'Stem-like' precursors are the fount to sustain persistent CD8+ T cell responses*. Nature Immunology, 2022. **23**(6): p. 836-847.
95. Im, S.J., et al., *Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy*. Nature, 2016. **537**(7620): p. 417-421.
96. Callahan, M.K. and J.D. Wolchok, *Recruit or Reboot? How Does Anti-PD-1 Therapy Change Tumor-Infiltrating Lymphocytes?* Cancer Cell, 2019. **36**(3): p. 215-217.
97. Mok, T.S.K., et al., *Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2019. **393**(10183): p. 1819-1830.
98. Blackburn, S.D., et al., *Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15016-21.
99. Paley, M.A., et al., *Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection*. Science, 2012. **338**(6111): p. 1220-5.
100. Oh, S.A., et al., *PD-L1 expression by dendritic cells is a key regulator of T-cell immunity in cancer*. Nature Cancer, 2020. **1**(7): p. 681-691.
101. Tang, H., et al., *PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression*. J Clin Invest, 2018. **128**(2): p. 580-588.
102. Rashidian, M., et al., *Immuno-PET identifies the myeloid compartment as a key contributor to the outcome of the antitumor response under PD-1 blockade*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(34): p. 16971-16980.
103. Fransen, M.F., et al., *Tumor-draining lymph nodes are pivotal in PD-1/PD-L1 checkpoint therapy*. JCI Insight, 2018. **3**(23).
104. Dammeijer, F., et al., *The PD-1/PD-L1-Checkpoint Restrains T cell Immunity in Tumor-Draining Lymph Nodes*. Cancer Cell, 2020. **38**(5): p. 685-700.e8.
105. Wculek, S.K., et al., *Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy*. Nature Reviews Immunology, 2020. **20**(1): p. 7-24.
106. Su, Y., et al., *CD11c-CD8 Spatial Cross Presentation: A Novel Approach to Link Immune Surveillance and Patient Survival in Soft Tissue Sarcoma*. Cancers (Basel), 2021. **13**(5).
107. Ziblat, A., et al., *Batf3(+) DCs and the 4-1BB/4-1BBL axis are required at the effector phase in the tumor microenvironment for PD-1/PD-L1 blockade efficacy*. Cell Rep, 2024. **43**(5): p. 114141.
108. Liu, L., et al., *Rejuvenation of tumour-specific T cells through bispecific antibodies targeting PD-L1 on dendritic cells*. Nature Biomedical Engineering, 2021. **5**(11): p. 1261-1273.
109. Budimir, N., et al., *Reversing T-cell Exhaustion in Cancer: Lessons Learned from PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Blockade*. Cancer Immunol Res, 2022. **10**(2): p. 146-153.

110. Hashimoto, M., et al., *PD-1 combination therapy with IL-2 modifies CD8+ T cell exhaustion program*. Nature, 2022. **610**(7930): p. 173-181.
111. Pandey, M.S., et al., *Simultaneous inhibition of PD-1 and stimulation of CD40 signaling pathways by anti-PD-L1/CD40L bispecific fusion protein synergistically activate target and effector cells*. Int. J. Mol. Sci., 2021. **22**(21): p. 11302.
112. Van Lint, S., et al., *A bispecific Clec9A-PD-L1 targeted type I interferon profoundly reshapes the tumor microenvironment towards an antitumor state*. Mol. Cancer, 2023. **22**(1): p. 191.
113. Klein, C., et al., *The present and future of bispecific antibodies for cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2024. **23**(4): p. 301-319.
114. Guo, X., et al., *Revolutionizing cancer immunotherapy: unleashing the potential of bispecific antibodies for targeted treatment*. Front. Immunol., 2023. **14**: p. 1291836.
115. PEG, B. *Bispecific antibodies-Current Status*. 2023; Available from: <https://www.biochempeg.com/article/252.html>.
116. Baeuerle, P.A. and H. Wesche, *T-cell-engaging antibodies for the treatment of solid tumors: challenges and opportunities*. Curr Opin Oncol, 2022. **34**(5): p. 552-558.
117. Goebeler, M.E. and R.C. Bargou, *T cell-engaging therapies - BiTEs and beyond*. 2020. **17**(7): p. 418-434.
118. Tian, Z., et al., *Bispecific T cell engagers: an emerging therapy for management of hematologic malignancies*. J Hematol Oncol, 2021. **14**(1): p. 75.
119. Pang, X., et al., *Cadonilimab, a tetravalent PD-1/CTLA-4 bispecific antibody with trans-binding and enhanced target binding avidity*. MAbs, 2023. **15**(1): p. 2180794.
120. 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.
121. Muyldermans, S., *Nanobodies: natural single-domain antibodies*. Annu Rev Biochem, 2013. **82**: p. 775-97.
122. Bannas, P., J. Hambach, and F. Koch-Nolte, *Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics*. Front. Immunol., 2017. **8**.
123. Li, Q., et al., *Half-life extension of single-domain antibody-drug conjugates by albumin binding moiety enhances antitumor efficacy*. MedComm, 2024. **5**(5): p. e557.
124. Labrijn, A.F., et al., *Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(8): p. 585-608.
125. Strohl, W.R., *Current progress in innovative engineered antibodies*. Protein Cell, 2018. **9**(1): p. 86-120.
126. Jovčevska, I. and S. Muyldermans, *The Therapeutic Potential of Nanobodies*. 2020. **34**(1): p. 11-26.
127. Li, Q., et al., *The anti-PD-L1/CTLA-4 bispecific antibody KN046 in combination with nab-paclitaxel in first-line treatment of metastatic triple-negative breast cancer: a multicenter phase II trial*. Nature Communications, 2024. **15**(1): p. 1015.
128. Silva-Pilipich, N., et al., *Local delivery of optimized nanobodies targeting the PD-1/PD-L1 axis with a self-amplifying RNA viral vector induces potent antitumor responses*. Cancer Lett, 2023. **561**: p. 216139.
129. Silva-Pilipich, N., et al., *Long-Term Systemic Expression of a Novel PD-1 Blocking Nanobody from an AAV Vector Provides Antitumor Activity without Toxicity*. Biomedicines, 2020. **8**(12).
130. 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.
131. Rossotti, M.A., et al., *Increasing the potency of neutralizing single-domain antibodies by functionalization with a CD11b/CD18 binding domain*. MAbs, 2015. **7**(5): p. 820-8.
132. 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.
133. Williams, M., et al., *Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(8): p. 571-8.
134. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
135. Collin, M. and V. Bigley, *Human dendritic cell subsets: an update*. Immunology, 2018. **154**(1): p. 3-20.
136. Sándor, N., et al., *CD11c/CD18 Dominates Adhesion of Human Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells over CD11b/CD18*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0163120.
137. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 7978-82.

138. 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.
139. Kim, K.S., et al., *Heterodimeric CD3εpsilon-gamma extracellular domain fragments: production, purification and structural analysis*. *J Mol Biol*, 2000. **302**(4): p. 899-916.
140. Olichon, A., et al., *Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains*. *BMC Biotechnology*, 2007. **7**(1): p. 7.
141. Reichelt, P., C. Schwarz, and M. Donzeau, *Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents*. *Protein Expr Purif*, 2006. **46**(2): p. 483-8.
142. Lutz, M.B., et al., *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow*. *J Immunol Methods*, 1999. **223**(1): p. 77-92.
143. Mayrhofer, P. and R. Kunert, *Nomenclature of humanized mAbs: Early concepts, current challenges and future perspectives*. *Hum Antibodies*, 2019. **27**(1): p. 37-51.
144. Alleva, D.G., et al., *Development of an IgG-Fc fusion COVID-19 subunit vaccine, AKS-452*. *Vaccine*, 2021. **39**(45): p. 6601-6613.
145. Pardon, E., et al., *A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology*. *Nat Protoc*, 2014. **9**(3): p. 674-93.
146. Broos, K., et al., *Non-invasive assessment of murine PD-L1 levels in syngeneic tumor models by nuclear imaging with nanobody tracers*. *Oncotarget*, 2017. **8**(26): p. 41932-41946.
147. Vieira, P. and K. Rajewsky, *The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice*. *European Journal of Immunology*, 1988. **18**(2): p. 313-316.
148. Sato, Y., et al., *Tumor-immune profiling of CT-26 and Colon 26 syngeneic mouse models reveals mechanism of anti-PD-1 response*. *BMC Cancer*, 2021. **21**(1): p. 1222.
149. Kleinovink, J.W., et al., *PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(4): p. e1294299.
150. *Atezolizumab (TECENTRIQ)*. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/atezolizumab-tecentriq>.
151. Rosenberg, J.E., et al., *Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial*. *Lancet*, 2016. **387**(10031): p. 1909-20.
152. *PHARMACOLOGY REVIEW(S) Tecentriq (atezolizumab)*. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/761034Orig1s000PharmR.pdf.
153. Lesniak, W.G., et al., *PD-L1 Detection in Tumors Using [(64)Cu]Atezolizumab with PET*. *Bioconjug Chem*, 2016. **27**(9): p. 2103-10.
154. Kim, D.K., et al., *PD-L1-directed PIGF/VEGF blockade synergizes with chemotherapy by targeting CD141(+) cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer*. *Nat Commun*, 2022. **13**(1): p. 6292.
155. Pandey, P.R., et al., *Structural variability and concerted motions of the T cell receptor – CD3 complex*. *eLife*, 2021. **10**: p. e67195.
156. Shiheido, H., et al., *Novel CD3-specific antibody induces immunosuppression via impaired phosphorylation of LAT and PLCγ1 following T-cell stimulation*. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(6): p. 1770-80.