



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



**cima**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
MÉDICA APLICADA  
UNIVERSIDAD DE NAVARRA

# Nanobodies inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 con potencial aplicación en inmunoterapia contra el cáncer

Tesis presentada para obtener el título de  
Magíster en Biotecnología

Autor:

Lic. Noelia Silva Pilipich

Director:

Dra. Lucía Vanrell Majó

Co-director:

Dr. Gualberto González Sapienza

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Agosto de 2018

## **Nota de confidencialidad**

Este documento y la información que contiene se proporcionan de manera confidencial, con el único propósito de obtener el título de Magíster en Biotecnología por la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), y no puede ser divulgado a ningún tercero ni utilizarse para ningún otro propósito sin el permiso expreso por escrito de los Dres. Lucía Vanrell, Gualberto González y Cristian Smerdou.

## Resumen

El sistema inmune es capaz de identificar y eliminar de forma específica a las células tumorales. La mayoría de los tumores presentan infiltrados de linfocitos (TILs), siendo los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> una pieza clave en la actividad antitumoral del sistema inmune. Sin embargo, en el microambiente tumoral se desarrolla un ambiente inmunosupresor que puede disminuir la actividad de los TILs, y por lo tanto afectar su habilidad para eliminar a las células tumorales. De hecho, muchos tipos tumorales son capaces de sobre-expresar ligandos de receptores co-inhibidores de células T (por ejemplo: PD-L1, ligando de PD-1), por lo que el bloqueo de estas señales de inhibición es una estrategia interesante para la revigorización de la respuesta inmune antitumoral.

En los últimos años la industria farmacéutica se ha volcado hacia el desarrollo de anticuerpos monoclonales bloqueantes de vías de co-inhibición de células T (en particular CTLA-4 y PD-1/PD-L1), con los cuales se ha obtenido un éxito sin precedentes en varios tipos tumorales. Algunos anticuerpos ya se encuentran aprobados por distintas agencias reguladoras de medicamentos para su uso en pacientes con melanoma y cáncer de pulmón, entre otros. Sin embargo, estos tratamientos presentan desventajas que limitan su aplicación. En primer lugar, su muy elevado costo y la falta de biomarcadores que sean buenos indicadores pronóstico de la respuesta de los pacientes a estas terapias. Por otro lado, los efectos adversos de carácter autoinmune relacionados con estas terapias en ocasiones son graves y requieren de la discontinuación del tratamiento.

Los nanobodies son anticuerpos monodominio recombinantes derivados del dominio de unión al antígeno de los anticuerpos de cadena pesada presentes en camélidos y algunos peces cartilaginosos. Representan uno de los fragmentos de reconocimiento específico más pequeño conocido (con un peso aproximado de 15 kDa), y poseen propiedades únicas que les otorgan numerosas ventajas para su utilización en diversas aplicaciones biotecnológicas. Las principales ventajas que presentan son su elevada estabilidad fisicoquímica, solubilidad y especificidad, así como la facilidad en su manipulación genética debido a su naturaleza monodominio, y su correcta expresión a partir de distintos sistemas, tanto procariotas como eucariotas. Estas características los convierten en candidatos prometedores para su expresión a partir de las células del propio individuo mediante terapia génica.

El trabajo de esta tesis se focalizó en la selección de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1 (tanto las variantes humanas como las murinas), con potencial aplicación en el área de la inmunoterapia contra el cáncer. Para evaluar la actividad antitumoral de estos nanobodies, se utilizaron vectores de terapia génica derivados del virus adeno-asociado (AAV). Una de las ventajas de utilizar vectores de terapia génica es la posibilidad de promover la expresión localizada de la proteína terapéutica en el sitio

tumoral, disminuyendo los efectos adversos derivados de la administración sistémica, como ocurre en el caso de los anticuerpos monoclonales en la clínica.

En una primera etapa de esta tesis, se seleccionaron nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1 mediante la técnica de *phage display*, utilizando bibliotecas en fagos filamentosos generadas a partir de llamas (*Lama glama*) inmunizadas con los antígenos correspondientes. Esta etapa fue realizada en la Cátedra de Inmunología de Facultad de Química (Universidad de la República, Uruguay), mientras que el resto de los experimentos fueron llevados a cabo en el Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra (España).

Posteriormente, los nanobodies seleccionados fueron evaluados en ensayos *in vitro* para determinar su capacidad de inhibición de la unión PD-1/PD-L1. Tras haber identificado dos nanobodies capaces de inhibir la unión PD-1/PD-L1 *in vitro*, se subclonaron en vectores de AAV y se verificó la correcta expresión de los mismos a partir de estas construcciones en células eucariotas mediante transfecciones.

En la última etapa de la tesis, se seleccionó uno de los nanobodies inhibidores de la unión PD-1/PD-L1 para su evaluación *in vivo*. Para ello, se generaron las partículas virales recombinantes de AAV8 conteniendo en su genoma recombinante el cassette de expresión para el nanobody. En primer lugar, las partículas virales recombinantes fueron inoculadas por vía sistémica en ratones C57BL/6 para evaluar la expresión del nanobody a largo plazo. Luego se evaluó la actividad antitumoral del nanobody expresado a partir de estos vectores virales en un modelo de tumor subcutáneo derivado de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal MC38.

La propuesta y los resultados presentados en esta tesis son novedosos en el área de la inmunoterapia contra el cáncer, puesto que el desarrollo de nanobodies inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 es un campo de investigación que está comenzando a ser explorado, con muy pocos trabajos publicados y que además no están enfocados en el área de la inmunoterapia. Además, el uso de vectores de terapia génica para nanobodies es un área con muy pocos antecedentes, no existiendo reportes de expresión de nanobodies a partir de vectores de AAV como terapia contra el cáncer.

Palabras clave: Cáncer; PD-1; PD-L1; Nanobodies; Inmunoterapia; Terapia génica; AAV

## Lista de abreviaciones

AAV	Virus adeno-asociado
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AKT	Protein-quinasa B
APC	Célula presentadora de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BCR	Receptor de células B
BSA	Seroalbúmina bovina
BTLA	Atenuador de linfocitos B y T
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
CDR	Región determinante de complementariedad de los dominios de inmunoglobulina
CHO	Línea celular derivada de ovario de hámster chino
CMV	Citomegalovirus
CTL	Linfocito T citotóxico
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
Da	Daltons
DC	Célula dendrítica
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EF1 $\alpha$	Factor de elongación 1 $\alpha$
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FR	Región estructural de los dominios de inmunoglobulina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
GITR	Del inglés: " <i>glucocorticoid-induced TNF receptor family gene</i> "
GMEM	Medio mínimo esencial de Glasgow
HEK	Línea celular derivada de riñón embrionario humano
HEPES	Ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il)-etanosulfónico
HNSCC	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
HRP	Peroxidasa de rábano
i/p	Intraperitoneal
i/t	Intratumoral
i/v	Intravenoso
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IgC	Dominio de inmunoglobulina de tipo constante
IgV	Dominio de inmunoglobulina de tipo variable
IL	Interleuquina
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
ITIM	Motivo inhibitorio de inmuno-receptor basado en tirosina
ITR	Repetido terminal invertido
ITSM	Motivo interruptor de inmuno-receptor basado en tirosina
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
KO	Del inglés: " <i>knock-out</i> "

LAG-3	Gen 3 de activación de linfocitos
LB	Medio Luria-Bertani
MAT	Microambiente tumoral
MCA	3'-Metilcolantreno
MDSCs	Células supresoras de origen mieloide
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMP	Metaloproteasa de matriz
MP	Marcador de peso molecular
NK	Del inglés: " <i>Natural killer</i> "
nM	Nanomolar
ns	No significativo
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PD-L1	Ligando 1 del receptor de muerte programada 1
PD-L2	Ligando 2 del receptor de muerte programada 1
PE	Ficoeritrina
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidil-inositol trifosfato
pM	Picomolar
poliA	Señal de poliadenilación
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rAAV	Virus adeno-asociado recombinante
RAG	Gen activador de la recombinación
RGMb	Molécula b de guía repulsiva
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SFFV	Del inglés: <i>Spleen Focus-Forming Virus</i>
SFV	Del inglés: <i>Semliki Forest Virus</i>
SHP	Fosfatasa con dominio homólogo a la región 2 de Src
SI	Sistema inmune
SIA	Sistema inmune adaptativo
SII	Sistema inmune innato
T amb	Temperatura ambiente
TAM	Macrófago asociado al tumor
TCR	Receptor de la célula T
TGF	Factor de crecimiento transformante
TIGIT	Dominio de inmunoglobulina e ITIM de célula T
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumor
TIM-3	Proteína 3 con dominio de inmunoglobulina y mucina de célula T
TMB	Tetrametil-bencidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VISTA	Del inglés: " <i>V-domain Immunoglobulin Suppressor of T cell Activation</i> "
wt	Del inglés: " <i>wild-type</i> "
ZAP70	Protein-quinasa 70 asociada a la cadena zeta

## Tabla de contenido

Resumen .....	3
Lista de abreviaciones.....	5
<b>1. Introducción .....</b>	<b>9</b>
1.1 Cáncer .....	9
1.1.1 Generalidades de los tumores sólidos.....	10
1.2 El cáncer y el sistema inmune .....	12
1.2.1 El rol dual del sistema inmune sobre el cáncer.....	12
1.2.2 Inmunoección del cáncer.....	15
1.2.3 Inmunosupresión en el MAT como mecanismo de evasión.....	18
1.2.4 Inactivación de las células T por el tumor .....	20
1.2.5 Vías de co-inhibición de células T .....	21
1.2.6 Células T exhaustas .....	23
1.2.7 Receptores de co-inhibición en la inmunoterapia contra el cáncer.....	24
1.3 Vía de señalización PD-1/PD-L1 .....	26
1.3.1 Generalidades de PD-1 y sus ligandos.....	26
1.3.2 Características moleculares y estructurales de PD-1 y sus ligandos.....	27
1.3.3 Patrones de expresión de PD-1 y sus ligandos .....	29
1.3.4 Efectos biológicos de la señalización por PD-1 .....	29
1.3.5 Importancia de la vía PD-1/PD-L1/2 en el cáncer.....	32
1.4 Bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 en la inmunoterapia del cáncer .....	33
1.4.1 Estudios preclínicos.....	33
1.4.2 Ensayos clínicos y anticuerpos aprobados .....	34
1.4.3 Blancos emergentes y terapias de combinación.....	36
1.5 Nanobodies.....	38
1.5.1 Características generales .....	38
1.5.2 Los nanobodies como agentes terapéuticos.....	40
1.5.3 Principios de la técnica de <i>phage display</i> .....	42
1.6 Terapia génica .....	47
1.6.1 Generalidades y vectores de terapia génica.....	47
1.6.2 Virus adeno-asociados .....	48
1.6.3 AAVs recombinantes .....	50
1.7 Objetivo general.....	54
1.7.1 Objetivos específicos.....	54
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>55</b>
2.1 Producción de ectodominios recombinantes de PD-1 y PD-L1 .....	55
2.2 Biotinilación química de los ectodominios de PD-1 y PD-L1.....	56
2.3 Mantenimiento de líneas celulares .....	56
2.4 Transfecciones transitorias de células HEK-293 con PD-1 y PD-L1.....	58

2.5.	Inmunización de llamas y generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos.....	60
2.6.	Selección de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1.....	63
2.7.	<i>Screening</i> de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1 .....	65
2.8.	Subclonaje de nanobodies a vector de expresión procariota.....	67
2.9.	Producción de nanobodies recombinantes a gran escala.....	68
2.10.	Ensayos de ELISA de inhibición de la unión PD-1/PD-L1 .....	69
2.11.	Reactivación de células T de ratón <i>in vitro</i> utilizando nanobodies.....	71
2.12.	Subclonaje de nanobodies a pAAVs.....	73
2.13.	Expresión de nanobodies en células eucariotas <i>in vitro</i> .....	75
2.14.	Comparación de la expresión de nanobodies a partir de pAAVs <i>in vitro</i> .....	78
2.15.	Producción de AAVs recombinantes codificantes para el nanobody C11 .....	79
2.16.	Expresión de nanobody C11 a largo plazo a partir del sistema AAV <i>in vivo</i> .....	82
2.17.	Evaluación de la eficacia antitumoral del nanobody C11 .....	83
2.18.	Evaluación de la capacidad de protección de C11 frente al desarrollo tumoral .....	84
2.19.	Análisis estadístico .....	85
2.20.	Soluciones amortiguadoras y reactivos de uso corriente.....	85
<b>3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>87</b>
3.1.	Producción de ectodominios recombinantes de PD-1 y PD-L1 .....	87
3.2.	Generación de células HEK-293 PD-1 <sup>+</sup> o PD-L1 <sup>+</sup> mediante transfección transitoria .. .....	88
3.3.	Generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos .....	90
3.4.	Selección de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1.....	92
3.4.1.	PD-1 .....	92
3.4.2.	PD-L1 .....	95
3.5.	Producción de nanobodies a gran escala en sistema procariota.....	103
3.6.	Ensayos de inhibición de la unión PD-1/PD-L1 por ELISA .....	105
3.7.	Reactivación de células T de ratón <i>in vitro</i> .....	108
3.8.	Expresión de nanobodies en células eucariotas a partir de pAAVs.....	111
3.9.	Comparación de promotores para la expresión <i>in vitro</i> de nanobodies a partir de pAAVs.....	120
3.10.	Producción de AAVs recombinantes codificantes para el nanobody C11 .....	121
3.11.	Expresión <i>in vivo</i> a largo plazo del nanobody C11 a partir de rAAVs .....	122
3.12.	Evaluación de la eficacia antitumoral del nanobody C11 expresado a partir de rAAV8 123	123
3.13.	Evaluación de la capacidad de protección del nanobody C11 frente al desarrollo tumoral.....	127
<b>4.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>129</b>
4.1.	Selección de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1.....	129
4.2.	Evaluación de la capacidad de los nanobodies de inhibir la unión PD-1/PD-L1 <i>in vitro</i> .....	133
4.3.	Expresión de nanobodies en células eucariotas a partir de pAAVs.....	136
4.4.	Evaluación de la eficacia antitumoral de C11 expresado a partir de rAAVs .....	138
4.5.	Perspectivas .....	141
4.6.	Conclusiones .....	145
<b>5.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>147</b>
	Agradecimientos.....	157

# 1. Introducción

---

## 1.1 Cáncer

El término cáncer agrupa a un conjunto de enfermedades relacionadas de origen genético, en donde algunas células adquieren la capacidad de proliferación descontrolada tras la adquisición de mutaciones. El cáncer es la segunda causa de mortalidad en el mundo y su incidencia va en aumento, por lo que se estima que en las próximas décadas será la principal causa de morbilidad y mortalidad tanto en países desarrollados como en países en desarrollo. Según los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud, durante el año 2012 se registraron 14,1 millones de casos nuevos y 8,2 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad. Los tres tipos de cáncer más frecuentes registrados fueron el de pulmón, el de mama y el colorrectal [1].

Los tratamientos convencionales para el cáncer incluyen cirugía, quimioterapia y radioterapia. Actualmente, otras estrategias están siendo implementadas con muy buenos resultados en distintos tipos de cáncer. Una de ellas es la inmunoterapia, la cual agrupa un conjunto de tratamientos muy distintos entre sí que se basan en la activación de distintos componentes del sistema inmune para potenciar su capacidad de reconocimiento y eliminación de las células tumorales.

Durante esta sección se introducirán las características de las células tumorales y del microambiente tumoral, y más adelante se detallará la relación compleja que existe entre el cáncer y el sistema inmune del individuo, haciendo énfasis en los mecanismos que pueden desarrollar las células tumorales para evitar ser eliminadas por el sistema inmune. En particular, esta tesis se centra en una vía de inhibición de células T que puede ser explotada por las células tumorales para evitar su eliminación: la señalización por el receptor PD-1 (del inglés: "*Programmed Death 1*"). Como se explicará más adelante, el bloqueo de esta vía de señalización es una diana terapéutica interesante en el contexto del cáncer. De hecho, ya se encuentran aprobados distintos anticuerpos monoclonales con este fin para su uso a nivel clínico. Sin embargo, el elevado costo de estos tratamientos y los efectos secundarios adversos que pueden generarse son dos desventajas importantes que aún están presentes.

Como se explicará a lo largo de la introducción, en esta tesis se propone generar un tipo especial de anticuerpos, con propiedades diferentes a las de los anticuerpos convencionales, que sean capaces de bloquear la unión de PD-1 con su ligando más importante, PD-L1 (del inglés: "*Programmed Death 1 Ligand 1*"), y que por ende constituyan potenciales agentes antitumorales. Además, debido a las propiedades de este tipo de anticuerpos, se plantea la posibilidad de administrarlos a partir de un vector viral de terapia génica en lugar de administrarse como proteína recombinante, ya que

esto podría suponer múltiples ventajas a nivel clínico, como se argumentará a lo largo de esta introducción.

### 1.1.1 Generalidades de los tumores sólidos

Los tumores sólidos son tejidos anormales complejos y dinámicos, formados por distintos tipos celulares. Además de las células tumorales, un tumor sólido cuenta con una variedad de células normales reclutadas que participan activamente en la progresión tumoral a través de distintos mecanismos, y que constituyen el estroma asociado al tumor. Dentro de las células que conforman el estroma tumoral se pueden encontrar: células endoteliales y pericitos, que conforman la vasculatura asociada al tumor; fibroblastos, que actúan como soporte de las células epiteliales o pueden participar en la reparación de los tejidos (miofibroblastos); células progenitoras y células madre estromales, que dan lugar a diferentes tipos celulares; y células del sistema inmune (SI) [2,3].

Las células del sistema inmune innato (SII) y sistema inmune adaptativo (SIA) presentes en el estroma tumoral varían en cantidad y variedad según el tipo de tumor y el grado de desarrollo del mismo. Estas células pueden tener diferentes efectos sobre el crecimiento del tumor. Los roles que desempeña el sistema inmune en la carcinogénesis y en el desarrollo tumoral serán detallados en la sección 1.2

Durante el desarrollo temprano del tumor, las células tumorales se visualizan como una población relativamente homogénea, mientras que en etapas tardías se pueden encontrar distintas subpoblaciones debido al aumento de la inestabilidad genómica y a la hiperproliferación. Los defectos en los mecanismos de mantenimiento y reparación del genoma son una ventaja para las células tumorales y necesarios para el desarrollo del tumor, ya que permiten la aceleración de la acumulación de mutaciones y alteraciones hacia la aparición de genotipos favorables para la progresión tumoral. Las alteraciones genómicas varían enormemente de un tumor a otro, y también dentro de células del mismo tumor [2], y se relacionan con la aparición de las siguientes características que presentan las células tumorales:

1. Proliferación sostenida: Las células tumorales son capaces de proliferar en forma descontrolada, a través de distintos mecanismos, la mayoría dependientes de factores de crecimiento [4].
2. Evasión de supresores de crecimiento: Las células tumorales son capaces de evadir programas de inhibición de la proliferación [2] y señales de inhibición dependientes del contacto célula-célula [5,6].
3. Resistencia a la muerte celular: Las células tumorales pueden evadir los programas de muerte celular programada (apoptosis) a través de distintos mecanismos, como la pérdida de función de proteínas censoras de estrés [7].

La necrosis es otra forma de muerte celular que libera el contenido intracelular al espacio extracelular generando señales proinflamatorias. De esta manera, se

reclutan células del sistema inmune que se encargarán de eliminar los restos celulares y promover el restablecimiento de la homeostasis en el tejido. Sin embargo, en el contexto del cáncer, la muerte celular por necrosis podría tener un doble efecto: por un lado, la disminución de la carga tumoral y la activación de las células del SI, y por otro, el reclutamiento de células proinflamatorias que pueden promover el desarrollo del tumor [8], como se explicará en detalle en la sección 1.2.1.

4. Inmortalidad replicativa: Las células tumorales tienen la capacidad de proliferar ilimitadamente, a diferencia de las células normales que son capaces de atravesar limitados ciclos de división celular. La evidencia actual indica que los telómeros son los principales protagonistas de la inmortalización de las células [9].
5. Inducción de angiogénesis: Durante el desarrollo tumoral se activa lo que se conoce como “switch angiogénico”, causando que la vasculatura, normalmente quiescente, se expanda activamente permitiendo la nutrición del tumor y por tanto su progresión [10]. Las células del SII que infiltran el tumor (en particular: macrófagos, neutrófilos, mastocitos y progenitores mieloides), participan en la angiogénesis [11].
6. Invasión y metástasis: Los tumores progresan mediante la invasión local en los tejidos, y también a través de la aparición de nuevas colonias tumorales distantes al tumor primario (metástasis). Este proceso requiere la diseminación de células tumorales a través de la circulación sanguínea y/o linfática, la extravasación de las mismas a otros tejidos y su adaptación al nuevo microambiente para poder proliferar, lo cual puede requerir mucho tiempo [12]. Las células del estroma tumoral pueden colaborar en este proceso, por ejemplo, los macrófagos asociados al tumor (TAMs) pueden promover la invasión local al secretar factores de crecimiento y enzimas modificadoras de la matriz extracelular [13].
7. Reprogramación del metabolismo energético: Las células tumorales deben ajustar su metabolismo energético de manera de poder cumplir con los requerimientos para el rápido crecimiento y proliferación [14].
8. Evasión del sistema inmune: El rol del SI en los procesos de formación y progresión de tumores es un tema que ha generado debate desde hace más de un siglo. Actualmente, se reconocen tres mecanismos a través de los cuales el SI previene el desarrollo de tumores si funciona adecuadamente: 1) protege de infecciones virales, y por lo tanto suprime los tumores inducidos por virus; 2) resuelve los distintos procesos inflamatorios evitando el establecimiento de inflamación crónica, condición que puede favorecer la carcinogénesis (se explicará más adelante); y 3) reconoce y elimina células cancerígenas incipientes [15]. El último punto, conocido como “inmunovigilancia del cáncer”, ocurre cuando las células que se transforman evaden los mecanismos supresores de tumores intrínsecos de las células normales. El SI es responsable de monitorizar constantemente los tejidos, así como de reconocer y eliminar estas células cancerígenas incipientes. Como contrapartida, las células tumorales pueden desarrollar distintos mecanismos de evasión a través de los cuales son capaces de pasar “inadvertidas” al control constante del SI o

disminuir la actividad citotóxica del mismo, con lo cual logran progresar a tumores macroscópicos [2]. Estos mecanismos de evasión serán analizados en profundidad en la siguiente sección.

## 1.2 El cáncer y el sistema inmune

En esta sección, se describirá la compleja relación existente entre las células tumorales y las células del SI, y los mecanismos que emplea el tumor para evadir el ataque del SI y ser capaz de progresar. Se hará especial énfasis en el papel que desempeñan las células T en la inmunidad antitumoral, y en cómo estas células pueden ser inhibidas por el tumor a través de distintos mecanismos. Uno de ellos es la explotación de vías de inhibición de células T, siendo de particular importancia la señalización a través del receptor PD-1.

### 1.2.1 El rol dual del sistema inmune sobre el cáncer

En las últimas décadas ha habido un gran avance en el esclarecimiento de la relación entre el SI y el cáncer, aunque todavía quedan muchos interrogantes por dilucidar. La relación compleja entre el SI y el cáncer puede explicarse si se tienen en cuenta las diversas funciones del SI: por un lado, la detección y eliminación de agentes extraños o células infectadas, y por otro, la cicatrización de heridas y eliminación de células muertas y restos celulares. Algunas células del SII son las encargadas de realizar esta última función (macrófagos, neutrófilos y otros progenitores mieloides), mediante la fagocitosis y la secreción de factores pro-angiogénicos, factores de crecimiento y enzimas remodeladoras de la matriz extracelular. Sin embargo, esos mismos componentes bajo condiciones de cronicidad también pueden favorecer la progresión tumoral [2]. Por lo tanto, por un lado, el SI puede prevenir la carcinogénesis y controlar la progresión tumoral, pero por otro, también puede fomentar el desarrollo del tumor.

El rol protector que cumple el SI frente a la carcinogénesis parece algo evidente en estos tiempos, si bien ha sido aceptado de forma relativamente reciente. La teoría de la inmunovigilancia del cáncer fue propuesta por primera vez a finales de la década de 1950, por los investigadores Burnet y Thomas. Ellos partieron de la hipótesis de que, en animales con esperanza de vida alta, la aparición de mutaciones a lo largo de las divisiones celulares tenía que ser un problema que pudiera llevar a la aparición de células malignizadas, y que, por lo tanto, evolutivamente debía existir un mecanismo que fuera capaz de eliminar dichas células. Propusieron que ese mecanismo debía estar relacionado con el SI, el cual de alguna manera era capaz de reconocer neo-antígenos de las células tumorales [16,17]. Sin embargo, en el pasado, se consideraba que el SI era incapaz de distinguir las células tumorales de las células normales, debido a que eran muy similares entre sí; de hecho, los antígenos tumorales eran vistos como proteínas normales que se sobre-expresaban [15].

La demostración de la teoría de la inmunovigilancia del cáncer demoró en llegar, pues no se contaba con el extenso conocimiento del SI que se posee actualmente, ni con las herramientas biotecnológicas adecuadas que se desarrollaron luego de la revolución de la Biología Molecular. Los primeros experimentos en ratones para demostrar el rol protector del SI frente a la carcinogénesis se basaron en la inmunosupresión de distintos componentes del SI o en ratones atímicos (ratones *nude*). Sin embargo, los resultados obtenidos en estas primeras etapas no fueron concluyentes y la teoría de la inmunovigilancia fue abandonada.

No fue hasta la década de los 90 cuando, a raíz del desarrollo de animales *knock-out* (KO), esta teoría fue retomada y comenzaron a aparecer trabajos en donde se demostraba que la eliminación de ciertos componentes del SI aumentaba la sensibilidad de los animales al desarrollo de tumores [18]. Por un lado, se demostró el importante papel que desempeña el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en la protección frente a la formación de tumores espontáneos o inducidos por 3'-Metilcolantreno (MCA), y también en la disminución del crecimiento de tumores trasplantados a individuos receptores, utilizando anticuerpos bloqueantes de IFN- $\gamma$  o modelos de ratones KO para el IFN- $\gamma$  o su receptor [19–21]. Además, se demostró el rol protector de la perforina, un componente de los gránulos citolíticos de las células NK (del inglés: *natural killer*) y células T citotóxicas [19,22,23], y del ligando TRAIL (del inglés: "*tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*") [24,25] frente al desarrollo de tumores.

Por otro lado, se desarrollaron ratones KO para los genes activadores de la recombinación 1 y 2 (RAG-1 y RAG-2), los cuales codifican para enzimas necesarias durante el proceso de recombinación V(D)J, es decir, para la formación de los receptores de células B y T. Por lo tanto, estos animales son deficientes en células B, T y NKT (del inglés: "*natural killer T*"), y a partir de ellos, fue posible demostrar la importancia de estas células en la protección frente a la carcinogénesis inducida por MCA y también frente a la aparición de carcinomas espontáneos [26].

Tras estas primeras demostraciones, se publicaron numerosos trabajos utilizando ratones KO para genes codificantes para distintos componentes del SI, que corroboraron y ampliaron los conocimientos respecto al rol protector del SI frente a la carcinogénesis. Se ha podido demostrar que ambas ramas del SI, tanto la innata como la adaptativa, se encuentran involucradas en la inmunovigilancia del cáncer [18,27]. Actualmente, el concepto de inmunovigilancia ha sido ampliado al de "inmunoedición", debido a que se ha demostrado que el SI también influye en las características inmunogénicas de los tumores. Este concepto será explicado en detalle en la sección 1.2.2.

Un amplio repertorio de células del SI puede encontrarse en el MAT, cumpliendo diferentes roles según las señales que reciben. Dentro de la rama de la inmunidad innata, se destacan: macrófagos, mastocitos, neutrófilos, células dendríticas (DCs) y células NK, entre otras. Constituyen la primera línea de defensa contra el cáncer,

iniciando potentes respuestas efectoras tras el reconocimiento de señales de estrés en las células transformadas. Las células NKT y las células T  $\gamma\delta$  también pueden participar en la inmunidad antitumoral, encontrándose en la interfase entre la inmunidad innata y la adaptativa [28].

Las DCs activadas en el MAT debido a señales de estrés o necrosis de células tumorales activarán respuestas adaptativas contra el tumor, conectando ambas ramas del SI. La respuesta adaptativa se desarrolla luego de varios días, y consiste tanto en células B secretoras de anticuerpos como en células T efectoras CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La actividad antitumoral de las células T efectoras implica la secreción de citoquinas y la actividad citotóxica. Dentro de las citoquinas, el IFN- $\gamma$  tiene un rol destacado en la inhibición de la progresión tumoral, con actividad citostática y en ocasiones citotóxica, y también son de gran importancia el IFN de tipo I y las interleuquinas 2, 15, 21, 12 y 18. La actividad citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup> (o CTLs, del inglés: “*cytotoxic T lymphocytes*”) está mediada por: 1) la expresión de ligandos para receptores de muerte celular, como puede ser TRAIL, un mecanismo compartido con otras células del SII, o 2) la vía de perforina-granzima. A través de estos mecanismos las CTLs logran eliminar a las células tumorales induciendo en ellas el programa de apoptosis [28].

Por otro lado, contra-intuitivamente se ha demostrado que el SI también puede desempeñar un papel totalmente opuesto: el de promover el desarrollo tumoral. De hecho, el tumor es capaz de promover un ambiente proinflamatorio que favorece su desarrollo. Las primeras evidencias de que la inflamación podría ser un factor determinante en la formación de tumores surgieron al relacionarse sitios de inflamación crónica con la aparición de tumores, y después de décadas de investigación se ha propuesto que los tumores (especialmente los carcinomas) utilizan el programa de reparación de tejidos y cicatrización, pero de manera exagerada y prolongada, lo cual favorece la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis [29]. La hipótesis de que los tumores son “heridas que no se curan” ha sido apoyada por diversos estudios experimentales, con datos a nivel celular y molecular [30].

Las células del SI se comunican con las células cancerígenas y las demás células del estroma tumoral; esta comunicación, junto con la abundancia y el estado de activación de las distintas células del SI, determinan si la inflamación que se genera en el MAT tendrá un efecto predominantemente antitumoral o pro-carcinogénico. Se ha propuesto que la inflamación pro-carcinogénica y la inmunidad antitumoral coexisten dentro del tumor durante las distintas etapas del desarrollo del mismo, pero que en tumores establecidos este balance se inclina hacia la acción pro-carcinogénica de la inflamación [31,32].

La acción pro-carcinogénica de la inflamación se debe a que algunas células, especialmente del SII, secretan en el MAT distintos agentes que favorecen la proliferación de las células tumorales y la remodelación del tejido: moléculas bioactivas (factores de crecimiento, factores de supervivencia, factores pro-angiogénicos),

enzimas modificadoras de la matriz extracelular (que promueven la angiogénesis, invasión y metástasis), y especies reactivas del oxígeno (que aceleran la adquisición de mutaciones en las células tumorales). Por ejemplo, los TAMs pueden ser importantes protagonistas en la progresión tumoral al diferenciarse a un fenotipo M2, caracterizado por su rol inmunosupresor y de reparación de tejidos [8,33].

### 1.2.2 Inmunoedición del cáncer

El concepto de inmunovigilancia del cáncer ha sido actualizado al de inmunoedición, por ser el que mejor se ajusta a las observaciones realizadas tanto en experimentos *in vivo* como en la clínica.

En el año 2001 se publicó un trabajo que generó una revisión de la teoría de la inmunovigilancia. En éste, los autores descubrieron que el SI era capaz no sólo de controlar la progresión tumoral sino también de influir en las características inmunogénicas del tumor. Se utilizaron ratones inmunodeficientes (KO para RAG-2) y ratones inmunocompetentes (*wild-type* o wt), y se los enfrentó al carcinógeno MCA. Concordante con resultados previos, se observó una mayor frecuencia y rapidez en el desarrollo de tumores en los ratones RAG-2<sup>-/-</sup>. Sin embargo, lo novedoso de este estudio fue la evaluación de los fenotipos inmunogénicos de los tumores formados en los distintos grupos de animales, a través de trasplantes de las células tumorales. Las células tumorales derivadas de los ratones wt fueron capaces de generar tumores en ambos grupos de ratones receptores (wt y RAG-2<sup>-/-</sup>). Por otra parte, las células tumorales derivadas de ratones inmunodeficientes fueron capaces de generar tumores en otros ratones RAG-2<sup>-/-</sup>, pero la mitad de estos cultivos celulares fueron rechazados en los ratones wt receptores siendo incapaces de generar tumores [26]. A partir de estos experimentos, se concluyó que los tumores desarrollados en ratones inmunodeficientes tienden a ser más inmunogénicos que los que se forman en ratones inmunocompetentes, por lo que el SI no solo tiene un efecto protector frente al desarrollo tumoral sino que también “edita” los tumores, influyendo en su inmunogenicidad [15].

A raíz de estos resultados el concepto de la inmunovigilancia del cáncer, por el cual el SI estaría implicado únicamente en las etapas iniciales de la formación de los tumores y cumpliendo un rol puramente protector, resultaba obsoleto. Fue propuesta entonces la teoría de la inmunoedición del cáncer, la cual reconoce el rol protector del SI frente al desarrollo de tumores así como su acción de edición de la inmunogenicidad del tumor [26]. En la teoría de la inmunoedición del cáncer se proponen tres fases: eliminación, equilibrio y escape (conocidas como “las tres Es”), representadas en la Fig. 1. También se propone que en algunos casos las células tumorales podrían ingresar en la etapa de equilibrio o de escape sin pasar por las fases anteriores [18].

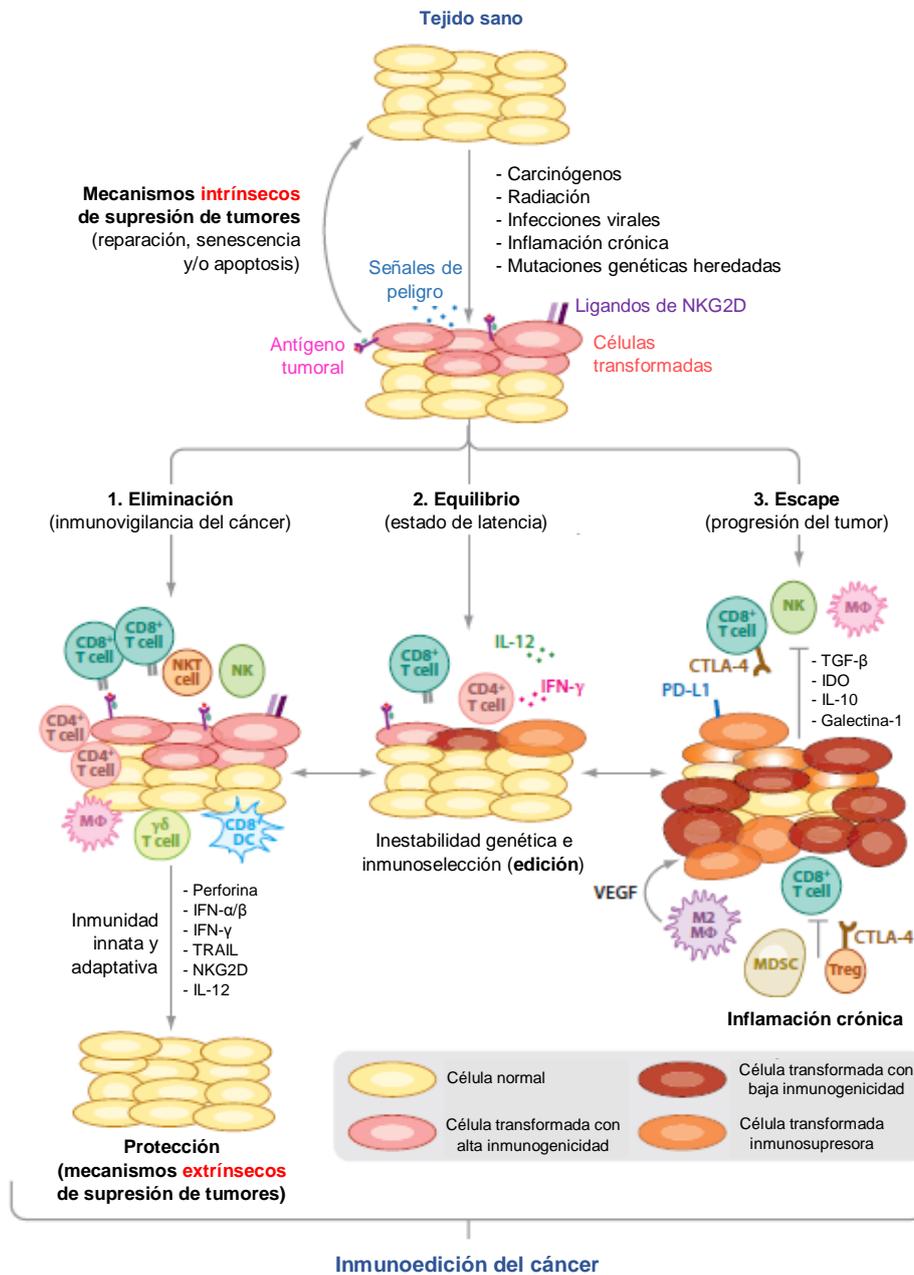
**Eliminación:** Esta fase se corresponde con el concepto original de inmunovigilancia del cáncer, en donde el SI innato y adaptativo trabajan en forma conjunta y balanceada para reconocer a las células cancerígenas y eliminarlas antes de que el tumor sea clínicamente evidente, devolviendo la homeostasis a los tejidos afectados. Durante esta

etapa la eliminación eficaz del tumor depende en gran medida de las características específicas del mismo (causa que lo originó, ubicación anatómica y tasa de crecimiento) [34].

**Equilibrio:** Las células que no han podido ser eliminadas en la etapa anterior pueden permanecer en esta fase en donde el SI es capaz de limitar el crecimiento del tumor, pero no logra erradicarlo completamente. Se ha demostrado que la inmunidad adaptativa es la encargada de mantener a las células tumorales en un estado de “latencia”, siendo imprescindibles para ello las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, el IFN- $\gamma$  y la IL-12. Teóricamente esta fase podría extenderse durante muchos años sin que exista evidencia clínica de enfermedad. Esta etapa puede tener dos resultados: 1) la eventual eliminación de todas las células tumorales por parte del SI, y el regreso a la homeostasis del tejido, o 2) el escape de las células tumorales al control del SI. Durante la etapa de equilibrio, la continua interacción entre el SI y el tumor edita el fenotipo de las células tumorales, lo cual se ve favorecido por la inestabilidad genómica de las mismas. La presión que ejerce el SI puede favorecer la selección de células tumorales menos inmunogénicas y con mayor probabilidad de alcanzar la fase de escape [34]. El fenotipo del tumor depende entonces de la presión que ejerce el SI, ocurriendo la mayor cantidad de alteraciones durante esta etapa [18].

**Escape:** En esta etapa, las células tumorales que no han podido ser eliminadas anteriormente por el SI pueden progresar hasta formar tumores macroscópicos y generar síntomas clínicos [34]. La progresión a esta fase puede ocurrir debido a la aparición de poblaciones celulares tumorales capaces de evadir el SI a través de distintos mecanismos, y/o a cambios en el SI del individuo (por ejemplo, el envejecimiento). Se han descrito numerosos mecanismos de evasión del SI empleados por las células tumorales, que se pueden clasificar en dos grupos: 1) modificaciones a nivel de la célula tumoral: reducción de su inmunogenicidad y aumento de la resistencia a los mecanismos de citotoxicidad, y 2) modificaciones en el MAT: expresión de ligandos y factores solubles con actividad inmunosupresora, y reclutamiento de células inmunosupresoras como las células T reguladoras (Tregs) o células supresoras de origen mieloide (MDSCs, del inglés: “*myeloid-derived suppressor cells*”) [27]. La utilización de vías de inmunosupresión en el MAT como mecanismo de evasión se describirá en detalle en la sección 1.2.5.

A medida que el conocimiento del proceso de inmunoección del cáncer avanza, surgen nuevas estrategias de inmunoterapia que buscan potenciar la acción del SI contra el tumor. Actualmente, las estrategias más desarrolladas son las basadas en la inhibición de mecanismos de escape tumorales, con el fin de promover la erradicación del tumor por parte del SI [27].



**Fig. 1. Las tres etapas de la inmunoección del cáncer.** La inmunoección del cáncer se divide en tres etapas que pueden funcionar de forma secuencial o independiente, y que determinan el fenotipo de las células tumorales. Las células normales pueden convertirse en células tumorales tras la adquisición de mutaciones y el fallo en los mecanismos supresores de tumores intrínsecos. El SI reconoce estas células y puede eliminarlas o controlar su crecimiento. En la etapa de eliminación, células del SII y del SIA reconocen y eliminan a las células tumorales, devolviendo la homeostasis al tejido. Si el SI es incapaz de eliminar todas las células transformadas, éstas pueden ingresar en la etapa de equilibrio, en donde su crecimiento es controlado por el SIA. Además, en esta etapa el SIA también ejerce una constante presión selectiva sobre las células tumorales, con lo que puede editar las características inmunogénicas del tumor. Eventualmente, algunas células cancerígenas pueden adquirir mutaciones que les confieren capacidad de evasión del SI, logrando ingresar en la etapa de escape y progresar hasta la formación de tumores clínicamente detectables. Figura adaptada de Vesely y col., 2011 [27]. Abreviaciones: Mφ: macrófago; NKG2D: receptores del grupo 2D de células NK; CTLA-4: antígeno 4 de linfocito T citotóxico; TGF-β: factor de crecimiento transformante beta; IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

### 1.2.3 Inmunosupresión en el MAT como mecanismo de evasión

Como se ha comentado previamente, las células tumorales pueden desarrollar distintos mecanismos que les confieren la capacidad de progresar hacia la etapa de escape, evadiendo el control del SI. Para ello, se establece en el MAT un equilibrio entre la estimulación de las células proinflamatorias con actividad de remodelación de tejidos y pro-angiogénica, necesarias para el avance del tumor, y la inhibición de las células con actividad citotóxica y antitumoral.

Para evitar el ataque de las células inmunes con actividad antitumoral, las células tumorales explotan las vías de inmunosupresión, que fisiológicamente son importantes en el mantenimiento de la autotolerancia durante la inflamación de los tejidos. El desequilibrio entre señales de estimulación y de inhibición en el MAT puede generar un ambiente en el que las células del SI se vuelven disfuncionales y son incapaces de erradicar el tumor [35].

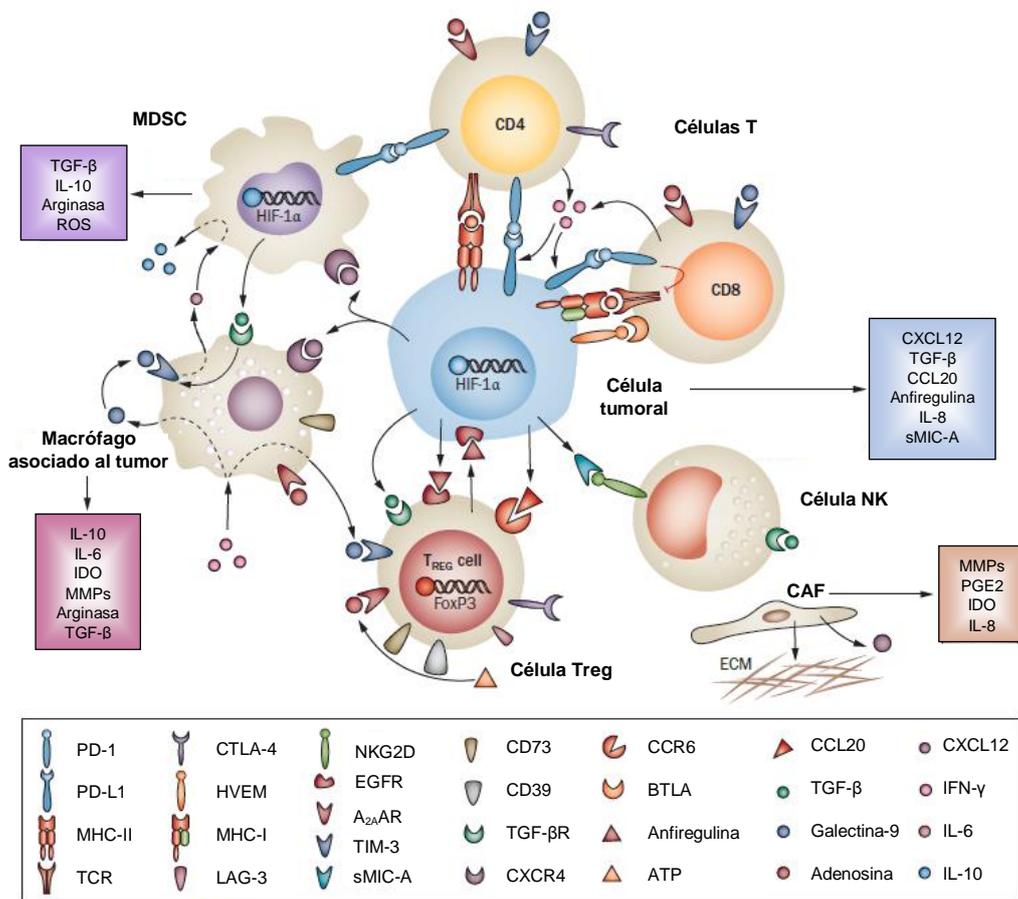
Las células tumorales pueden inhibir la función de las células del SI mediante la secreción de factores solubles o la expresión de ligandos en sus superficies (Fig. 2). Se han descrito numerosos factores solubles que pueden inhibir la función de células del SII y del SIA. Por ejemplo, las células cancerígenas pueden secretar citoquinas anti-inflamatorias: el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), que inhibe la activación de las DCs y las funciones efectoras de las células NK y células T [36], y la interleuquina 10, la cual inhibe las DCs y promueve respuestas de tipo Th2, que en general son menos efectivas en la erradicación del tumor [37]. También pueden secretar otros factores como el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), que además de promover la angiogénesis, inhibe las funciones de las DCs. Por otro lado, secretan factores que actúan de forma más selectiva, por ejemplo: la galectina, que inhibe la actividad de las células T y compromete su supervivencia [38], y la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que metaboliza el triptófano disminuyendo la supervivencia de las células T [39].

Además, las células tumorales pueden expresar en sus superficies ligandos para receptores de inhibición, los cuales están presentes en células del SI, especialmente en células T. La señalización a través de estos receptores regula la intensidad y la duración de las respuestas inmunes de estas células, siendo importantes en el mantenimiento de la autotolerancia en condiciones fisiológicas. Las células tumorales pueden explotar estas vías para disminuir la capacidad de las células del SI de erradicar el tumor [40] (este tema se describirá en profundidad en la sección 1.2.5).

Además de la acción directa de las células tumorales, el MAT inmunosupresor también es promovido por células inmunes reguladoras que son reclutadas por las células cancerígenas (Fig. 2). De particular importancia son las células Tregs y las MDSCs. Las células Tregs, que en condiciones fisiológicas son mediadoras claves de la tolerancia periférica, inhiben la función de las CTLs a través de distintos mecanismos: secreción de IL-10 y TGF- $\beta$ , expresión en la membrana celular de ligandos con funciones de

inmunosupresión (por ejemplo: PD-L1), y consumo de IL-2 [41]. Las MDSCs son un grupo heterogéneo de células progenitoras o inmaduras de origen mieloide, que inhiben la función de los linfocitos a través de distintos mecanismos: producción de TGF- $\beta$ , inducción de células Tregs, secuestro de aminoácidos (arginina y cisteína), e inhibición de la señalización a través del receptor de células T (TCR) [27].

Otros tipos celulares también son reclutados al MAT y cumplen un rol importante en el mantenimiento del ambiente inmunosupresor, por ejemplo: las DCs plasmacitoides y los TAMs (con fenotipo M2) [27].



**Fig. 2. Microambiente tumoral inmunosupresor generado como mecanismo de evasión al sistema inmune.** La secreción de IFN- $\gamma$  tras el reconocimiento del antígeno por las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> inducen la expresión de PD-L1 en distintas células del MAT, incluyendo las células tumorales. La señalización por PD-1, y por otros receptores de inhibición de células T (CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA), disminuye las funciones efectoras de las células T y la capacidad de erradicación del tumor. El IFN- $\gamma$  también promueve la producción de galectina-9 por parte de los TAMs, la cual se une a TIM-3 causando el aumento en la actividad de las células Tregs y la inhibición de las células T efectoras. Las células tumorales pueden secretar: ligandos de factores de crecimiento (como la anfiregulina) que actúan en forma autócina o sobre las células Tregs, quimioquinas que atraen células inmunosupresoras como las MDSCs, factores solubles inmunosupresores como TGF- $\beta$ , la molécula de estrés soluble MIC-A que se une al receptor NKG2D de las células NK, entre otras moléculas. La adenosina presente en el MAT inhibe las funciones efectoras de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y la activación de los macrófagos. Los TAMs se caracterizan por secretar una variedad de moléculas inmunosupresoras y enzimas remodeladoras de la matriz. Los fibroblastos (CAFs) contribuyen a la remodelación del tejido y al reclutamiento de otras células. Figura adaptada de Prieto y col., 2015 [42]. Abreviaciones: A<sub>2A</sub>AR: receptor de adenosina A2a; BTLA: atenuador de linfocitos B y T; CCR6: receptor de quimioquinas 6; CCL20: quimioquina ligando 20 con motivo C-C; CXCL12: factor  $\alpha$  derivado de células estromales; CXCR4: receptor de tipo 4 de quimioquinas C-X-C; ECM: matriz extracelular; EGFR: receptor de factor de crecimiento epidérmico; HIF-1 $\alpha$ : subunidad  $\alpha$  del factor 1 inducible

por hipoxia; HVEM: mediador de entrada de herpesvirus; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; LAG-3: gen 3 de activación de linfocitos; MMP: metaloproteasa de matriz; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; PGE2: prostaglandina E2; sMIC-A: secuencia A relacionada con el polipéptido de MHC de clase I soluble; TIM-3: proteína 3 con dominio de inmunoglobulina y mucina de célula T.

## 1.2.4 Inactivación de las células T por el tumor

Como se comentó anteriormente, las células T son de especial importancia en la inmunidad antitumoral, por lo tanto, muchos de los mecanismos de evasión desarrollados por las células tumorales afectan directamente la actividad antitumoral de las células T. Esto puede ocurrir a diferentes niveles:

- 1) Diferenciación disfuncional de las células T: La polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores hacia los diferentes fenotipos efectoros está regulada por señales en el microambiente al momento del reconocimiento del antígeno y la activación. Estas señales están mediadas principalmente por citoquinas: la diferenciación a un fenotipo Th1 (del inglés: “*T helper 1*”) se induce en presencia de IFN- $\gamma$  e IL-12, a Th2 por IL-4, y a Th17 por TGF- $\beta$  e IL-6 [35]. La evidencia experimental y clínica apunta a que una respuesta antitumoral eficiente es dependiente de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas y T CD4<sup>+</sup> Th1 [43–45]. El fenotipo Th1 es productor de IFN- $\gamma$ , el cual promueve el desarrollo de CTLs y la activación clásica de macrófagos con fenotipo M1, caracterizado por ser proinflamatorio [35]. En cambio, la polarización de la respuesta hacia un fenotipo Th2 está asociada a mal pronóstico de la enfermedad, principalmente debido a que se promueve la diferenciación de los macrófagos a un fenotipo M2 [46–48]. La polarización hacia un fenotipo Th17 tiene consecuencias que no están del todo elucidadas y que parecerían depender de la característica del tumor [49]. En cuanto a la presencia de las células Tregs en el MAT, en general están relacionadas con mal pronóstico en numerosos tipos de cáncer, sin embargo podrían tener efectos beneficiosos en casos particulares, como el cáncer colorrectal o algunas malignidades linfoides [50–52]. La conversión de células T CD4<sup>+</sup> a células Tregs inducidas (iTregs) en el MAT puede contribuir a la progresión tumoral, y está mediada por la presencia de TGF- $\beta$  y por la señalización a través de los receptores co-inhibidores CTLA-4 (del inglés: “*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*”) y PD-1, ambos mecanismos dependientes tanto de las células tumorales como de las DCs locales [35].
- 2) Inactivación funcional de las células T: La presencia de células T con una polarización adecuada para el combate de las células tumorales (CTLs y T CD4<sup>+</sup> Th1) no garantiza una eficiente actividad antitumoral debido a que las mismas pueden encontrarse funcionalmente inactivas. Este fenómeno fue observado inicialmente en infecciones virales crónicas y se denominó “*T cell exhaustion*” [53,54]. Posteriormente este estado también fue identificado en el contexto del cáncer, aunque presenta algunas diferencias con respecto al de infecciones crónicas. La inactivación funcional de las células T implica una pérdida

progresiva de las funciones efectoras y un aumento en la expresión de receptores inhibidores, tanto en cantidad como en variedad [55]. Este tema será abordado en profundidad en la sección 1.2.6.

- 3) Balance ATP/adenosina extracelular: Las purinas extracelulares participan en la regulación de las funciones de las células T. El ATP extracelular en general tiene efecto proinflamatorio mientras que la adenosina es un inmunosupresor pleiotrópico. El balance ATP/adenosina está regulado por la acción de ectonucleotidasas, enzimas que metabolizan secuencialmente el ATP a adenosina, expresadas en la superficie de células tumorales y células inmunes reguladoras (Tregs y MDSCs). En el contexto tumoral, la adenosina suele encontrarse elevada promoviendo la progresión tumoral a través de distintos efectos: inhibición de las CTLs, diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> a iTregs y Th2, y polarización de los macrófagos a fenotipo M2 [35].
- 4) Barreras químicas en el tumor: La hipoxia es una característica común en el MAT que condiciona distintos aspectos de la respuesta inmune. Por ejemplo, se disminuye la producción de óxido nítrico por la enzima óxido nítrico sintasa inducida (iNOS), el cual tiene efecto antitumoral. La hipoxia también puede generar la modificación del proteoma del MAT debido a que se produce peroxinitrito, un agente oxidante capaz de modificar distintos aminoácidos en las proteínas [35]. De hecho, el peroxinitrito es capaz de nitrar las tirosinas del complejo TCR/CD8, inhibiendo su fosforilación y por tanto la transducción de señales en las células T CD8<sup>+</sup>, lo cual induce su apoptosis [56].

### 1.2.5 Vías de co-inhibición de células T

En esta sección se describirá uno de los mecanismos que pueden utilizar las células tumorales para evitar ser eliminadas por las células T específicas del tumor: la señalización a través de las vías de co-inhibición. Una de estas vías es la de PD-1, de gran importancia en el contexto del cáncer.

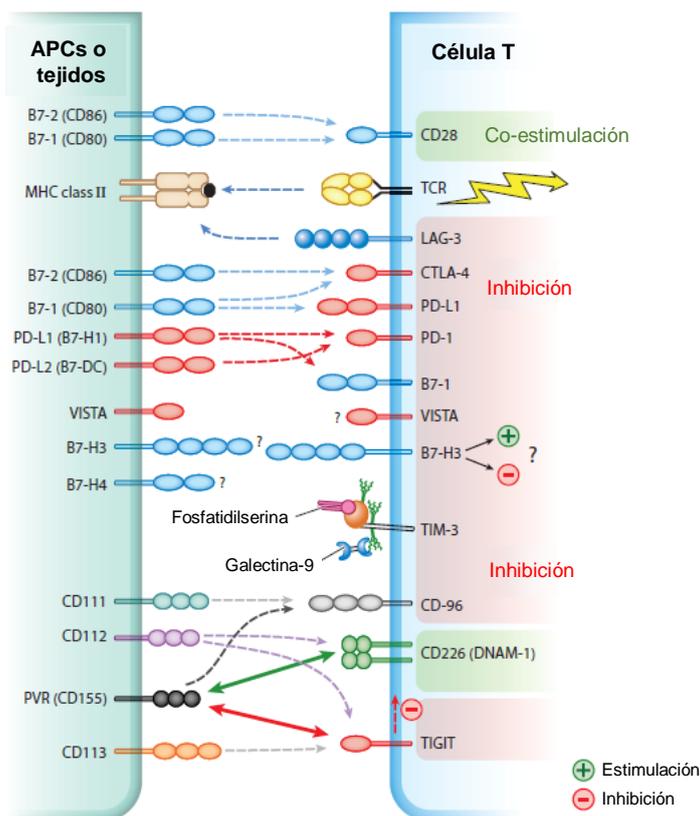
La activación de las células T es un proceso complejo regulado por distintas vías de señalización, que básicamente consiste en tres tipos de señales: 1) reconocimiento del complejo MHC-péptido expresado en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APCs, del inglés: “*antigen presenting cells*”), a través del TCR, 2) señales de co-estimulación, principalmente mediadas por la unión del CD80 de la APC al CD28 de la célula T, y 3) citoquinas producidas por la APC, que regulan la polarización de la célula T activada [57].

Las células T también reciben señales negativas durante la activación y la etapa efectora, las cuales evitan que las respuestas sean exacerbadas. La actividad de las células T está regulada por el balance entre las señales de co-estimulación y de co-inhibición que reciben a través de sus distintos receptores (Fig. 3). El prefijo “co-” hace referencia a que son señales secundarias que se integran y modifican la señal recibida

a través del TCR. La señalización a través de los receptores de co-inhibición (también conocidos como “*immune checkpoints*”) limitan la intensidad y la duración de la respuesta inmune, con lo que controlan el daño en los tejidos y promueven la resolución de los procesos inflamatorios, así como el mantenimiento de la tolerancia previniendo el desarrollo de autoinmunidad [40].

Las vías de co-inhibición pueden regular la actividad de las células T a través de distintos mecanismos: inhibiendo la activación inicial de las células T *naïve* auto-reactivas o de células T efectoras potencialmente auto-reactivas, y regulando la actividad y la diferenciación de las células Tregs. Se han identificado numerosas vías de co-inhibición, las cuales actúan a distintas etapas de la respuesta inmune o en diferentes tejidos. Por ejemplo, el receptor CTLA-4 es de suma importancia durante la activación inicial de las células T *naïve* en los tejidos linfoides, mientras que la señalización por PD-1 es importante en células efectoras en los sitios de inflamación [40].

Los ligandos de los receptores de co-inhibición pueden expresarse por numerosos tipos celulares, incluyendo las APCs y células no hematopoyéticas. Las células tumorales pueden explotar los mecanismos de mantenimiento de la autotolerancia del SI expresando en sus superficies ligandos para los receptores de co-inhibición, evitando así ser atacadas por el mismo. El bloqueo de estas vías utilizando anticuerpos monoclonales en distintos tipos de cáncer está demostrando ser una estrategia terapéutica efectiva [40].



**Fig. 3. Vías de co-inhibición de células T.** Luego de la activación de las células T, mediada por el reconocimiento del complejo MHC-péptido a través del TCR y la co-estimulación a través de la interacción B7/CD28, la célula T puede expresar diferentes receptores de co-inhibición que regulan su actividad. Algunos receptores también se expresan en otras células del SI (por ejemplo, en células NK), y algunos ligandos se expresan no solo en las APCs sino también en células no hematopoyéticas y células tumorales. Los ligandos y mecanismos de acción de ciertos receptores aún no se encuentran dilucidados. Figura adaptada de Baumeister y col., 2016.

### 1.2.6 Células T exhaustas

Dentro del MAT inmunosupresor descrito anteriormente, suelen encontrarse células T con funcionalidad disminuida y con alta expresión de receptores de co-inhibición, tanto en cantidad como en variedad. Este estado ha sido denominado "*T cell exhaustion*" (células T exhaustas), como se adelantó previamente.

Este estado de inactivación funcional se diferencia de la anergia y de la senescencia, y puede generarse durante la exposición prolongada de la célula T a su antígeno en condiciones de inmunosupresión, como es el caso de las infecciones virales crónicas o el cáncer. La pérdida de las funciones efectoras ocurre tanto en las células T CD8<sup>+</sup> como en las CD4<sup>+</sup>, aunque las primeras han sido las más estudiadas en este contexto [55].

Diversas señales presentes en el MAT son claves en el desarrollo del estado de inactivación funcional de las células T, destacándose dos tipos de señales: extrínsecas (citoquinas inmunosupresoras: IL-10 y TGF- $\beta$ ) e intrínsecas (receptores de co-inhibición: CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3, BTLA, etc.) [55].

Las células T exhaustas representan un estado de diferenciación único y molecularmente distinto del de la anergia. La diferencia más evidente entre ambos es que la anergia es inducida de forma rápida tras el primer contacto con el complejo MHC-péptido en condiciones de inhibición, mientras que el desarrollo de células T exhaustas es progresivo y se agrava con el paso del tiempo [58]. En distintos estudios se ha visto que el perfil transcripcional de las células T exhaustas muestra alteraciones con respecto al estado de anergia en la expresión de: receptores de co-inhibición, receptores de citoquinas y quimioquinas, moléculas de señalización, factores de transcripción, y genes involucrados en vías metabólicas [59].

Durante el proceso de inactivación funcional, la célula T CD8<sup>+</sup> pierde de forma progresiva y jerárquica sus funciones a medida que la cronicidad del estado avanza. En primer lugar, pierde la capacidad de producción de IL-2, disminuye su proliferación y su actividad citotóxica; más adelante pierde la capacidad de producción del factor de necrosis tumoral (TNF) e IFN- $\gamma$ , y en última instancia puede sufrir apoptosis [54,60]. El grado de inactivación de las células T CD8<sup>+</sup> se ve agravado por: altos niveles de carga antigénica, larga duración de la exposición al antígeno y pérdida de colaboración de las células T CD4<sup>+</sup> [55].

Quizás lo más interesante a nivel terapéutico es la posibilidad de revertir el estado de disfuncionalidad de las células T, lo que representa otra diferencia importante con respecto al estado de anergia. En este sentido, una de las primeras evidencias surgió utilizando un modelo murino de infección viral crónica, en el cual se logró la reactivación de las células T CD8<sup>+</sup> mediante el bloqueo de PD-1 con un anticuerpo monoclonal. La reactivación de las células T no fue total, pero se promovió su proliferación, secreción de citoquinas y su actividad citotóxica, disminuyendo la carga viral [61]. Durante esta

tesis, se plantea inhibir la vía de PD-1 para intentar potenciar la actividad de las células T, aunque utilizando un modelo tumoral.

Como ya se ha mencionado, la sobre-expresión sostenida de receptores co-inhibidores en las células T constituye un marcador de inactivación funcional [62]. A medida que la célula T avanza en su grado de disfuncionalidad, aumenta la expresión de receptores de co-inhibición en su superficie y también comienza a expresar una mayor variedad de ellos. Estos receptores no constituyen solamente marcadores de la disfuncionalidad, sino que participan activamente en el mantenimiento de este estado, demostrado por el hecho de que el bloqueo terapéutico de una o más de estas vías de señalización puede restaurar, al menos parcialmente, la actividad de las células T [63].

Además de CTLA-4 y PD-1, otros receptores de co-inhibición comienzan a sobre-expresarse a medida que la célula T avanza en la pérdida de su funcionalidad: LAG-3 (del inglés: “*lymphocyte activation gene 3*”), TIM-3 (del inglés: “*T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule 3*”), TIGIT (del inglés: “*T cell immunoglobulin and ITIM domain*”), VISTA (del inglés: “*V-domain Ig suppressor of T cell activation*”), entre otros (Fig. 3). Las terapias combinatorias de inhibición de más de una de estas vías han demostrado eficacia terapéutica en numerosos estudios [64], que se comentarán en la sección 1.4.3.

### 1.2.7 Receptores de co-inhibición en la inmunoterapia contra el cáncer

El bloqueo de los receptores co-inhibidores mediante el uso de anticuerpos monoclonales es una de las inmunoterapias contra el cáncer más intensamente exploradas en los últimos años. El propósito es la reactivación de las células T exhaustas específicas contra el tumor, devolviéndoles la capacidad de montar respuestas efectivas que pueden permitir la erradicación del mismo. Este tipo de terapias ha generado respuestas clínicas objetivas en una fracción de los pacientes tratados, consiguiéndose efectos duraderos en el tiempo. Además, ha representado un cambio de paradigma en la terapia contra el cáncer: en primer lugar, porque la terapia no está dirigida a la célula tumoral en sí, y en segundo lugar, porque no se intenta generar una respuesta inmune *de novo* contra el tumor, sino reactivar respuestas antitumorales ya desarrolladas que se encuentran inhibidas [65].

Actualmente, una serie de anticuerpos monoclonales bloqueantes de vías de co-inhibición poseen la aprobación de las agencias de control de medicamentos FDA (*Food and Drug Administration*) y EMA (*European Medicines Agency*), para su uso como tratamiento en distintos tipos de cáncer. El primero que recibió aprobación fue el anticuerpo ipilimumab, dirigido contra CTLA-4, y posteriormente se han desarrollado otros anticuerpos inhibidores de la vía PD-1/PD-L1.

CTLA-4 fue el primer receptor de co-inhibición explorado con fines terapéuticos. La expresión de CTLA-4 en las células T *naive* es inducida luego de su activación mediada por el reconocimiento del complejo MHC-péptido a través de su TCR, excepto en el caso de las células Tregs que lo expresan constitutivamente. CTLA-4 es un homólogo de CD28, y de hecho compite con éste por la unión a CD80/CD86. Luego de la activación de las células T, el CTLA-4 es reclutado a la sinapsis inmunológica donde se une con mayor afinidad que el CD28 a CD80/CD86, siendo capaz de atenuar la respuesta inmune de la célula T a través de distintos mecanismos [66]. CTLA-4 cumple un rol crítico en la regulación de las respuestas de las células T y en el control de las células T autorreactivas. Tal es el caso que ratones KO para este receptor mueren a corta edad por expansión masiva de células T autorreactivas en distintos órganos [67,68].

En modelos murinos de cáncer, el bloqueo de CTLA-4 utilizando anticuerpos monoclonales promueve el rechazo de los tumores, especialmente de aquellos más inmunogénicos, y aumenta la proporción de células T efectoras (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) con respecto a las células Tregs en los tumores [69–74]. Los anticuerpos contra CTLA-4, además de promover la activación de las células T, podrían promover la depleción de la población intratumoral de células Tregs (que expresan mayor cantidad de CTLA-4), a través del dominio Fc, por mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) [73].

En ensayos clínicos, el anticuerpo monoclonal contra CTLA-4, ipilimumab, ha generado regresiones de tumores en distintos tipos de cáncer (carcinoma de células renales, cáncer de ovario, carcinoma urotelial y cáncer de próstata) [75–78]. En ensayos clínicos en pacientes con melanoma metastásico, ipilimumab demostró mayor eficacia terapéutica que las terapias convencionales [79,80]. Esto significó un gran avance para el tratamiento de este tipo de cáncer, ya que la supervivencia de los pacientes con melanoma es muy baja (10-20% luego de dos años de diagnóstico), y las terapias convencionales son poco eficientes en lograr un aumento en la esperanza de vida de los pacientes.

En un ensayo clínico de fase III, se comparó el tratamiento con ipilimumab vs el tratamiento con la vacuna de glicoproteína 100 (gp100) en pacientes con melanoma metastásico. Se observó una mayor supervivencia media en el grupo tratado con ipilimumab solo (10,1 meses) o en combinación con gp100 (10,0 meses), en comparación con el grupo tratado solo con gp100 (6,4 meses). Se observaron algunas muertes relacionadas con el tratamiento (2,1%), y efectos adversos severos en 15% de los pacientes, aunque la mayoría fueron reversibles [79].

En otro ensayo clínico de fase III en pacientes con melanoma metastásico, se comparó la eficacia del tratamiento con ipilimumab vs con la quimioterapia basada en dacarbacina. La supervivencia media fue de 11,2 meses para los pacientes tratados con ipilimumab y dacarbacina, en comparación con 9,1 meses para los pacientes tratados con dacarbacina y placebo. Además, las respuestas objetivas a largo plazo fueron de

19,3 y 8,1 meses para cada grupo, respectivamente. Si bien los efectos adversos de grado 3 y 4 fueron mayores en el grupo tratado con ipilimumab y dacarbacina en comparación con el tratado con dacarbacina y placebo (56,3% vs 27,5%), no se registraron muertes relacionadas con el tratamiento [80]. A raíz de estos resultados, el ipilimumab fue aprobado en 2011 para el tratamiento del melanoma metastásico.

Por otro lado, anticuerpos inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 también han mostrado gran eficacia terapéutica en ensayos clínicos, por lo que han recibido aprobación para su uso en diversos tipos de cáncer. Este tema será abordado en la sección 1.4.2.

### 1.3 Vía de señalización PD-1/PD-L1

Como ya se adelantó previamente, la señalización por PD-1 constituye una de las principales vías de co-inhibición de las células T. En esta sección, se describirán las características del receptor PD-1 y de sus ligandos: sus estructuras, patrones de expresión, y los efectos de la señalización por esta vía. Se describirá la importancia de esta vía en la evasión del SI por parte del tumor, y los motivos por los cuales constituye un blanco terapéutico tan prometedor.

#### 1.3.1 Generalidades de PD-1 y sus ligandos

PD-1 (también conocido como CD279) es un receptor co-inhibidor de la familia de receptores de CD28/CTLA-4. Fue identificado en 1992, sobre-expresado en hibridomas de células T en apoptosis, motivo por el cual recibió su nombre (“receptor de muerte programada”) [81]. Sin embargo, posteriormente se descubrió que la señalización por PD-1 no activa directamente vías de muerte celular, sino que atenúa las señales derivadas de la señalización por el TCR, por lo cual su principal efecto es la disminución en la activación de las células T. En el contexto del cáncer, PD-1 está muy relacionado con el fenotipo de células T disfuncionales o exhaustas, por lo que constituye un blanco interesante a nivel terapéutico [40].

Los dos ligandos que se conocen para PD-1 fueron descritos alrededor del año 2000: PD-L1 (también conocido como B7-H1 o CD274) [82,83] y PD-L2 (B7-DC o CD273) [84,85], aunque los datos publicados en ese momento resultaban discordantes ya que algunos grupos le adjudicaron roles estimuladores y otros inhibidores. Sin embargo, la demostración de la importancia de la acción reguladora del receptor PD-1 dentro del SI no demoró en llegar: se generaron ratones KO para el gen de PD-1, los cuales desarrollaron espontáneamente patologías de origen autoinmune (síndrome similar al lupus en ratones de la cepa C57BL/6 y miocardiopatía dilatada autoinmune en ratones BALB/c) [86,87]. El fenotipo de estos ratones es, sin embargo, menos adverso en

comparación con el de los ratones KO para CTLA-4, lo cual es un primer indicio de que una terapia dirigida al bloqueo de la vía de PD-1 podría generar menos efectos secundarios que el bloqueo de CTLA-4 [40].

Más recientemente, el desarrollo de ratones KO para los ligandos de PD-1 también ha corroborado el rol crítico que cumple esta vía de señalización en la protección contra el desarrollo de autoinmunidad, tanto en el control de la producción de citoquinas proinflamatorias como en la inhibición de las células T autorreactivas (especialmente PD-L1) [88].

Por otra parte, se ha reportado que tanto PD-L1 como PD-L2 interactúan con otras moléculas además de PD-1. Por un lado, PD-L2 se une a RGMb (del inglés: “*repulsive guidance molecule b*”), y dicha interacción parecería ser importante en el mantenimiento de la tolerancia a nivel pulmonar [89]. Por su parte, PD-L1 se une a CD80 con una afinidad intermedia a las uniones de CD80/CTLA-4 y CD80/CD28, funcionando como otro mecanismo de inhibición de las células T: la interacción de PD-L1 en la célula con el CD80 de la célula T genera una inhibición en su activación y en la secreción de citoquinas, siendo imprescindible para el mantenimiento de la autotolerancia [90,91].

### 1.3.2 Características moleculares y estructurales de PD-1 y sus ligandos

PD-1 es un homólogo de la familia de receptores CD28/CTLA-4/ICOS, con los cuales comparte entre un 20 y 30% de identidad de secuencia aminoacídica del dominio extracelular [92]. PD-1 es una proteína transmembrana de tipo I de 288 aminoácidos y con un peso de 55 kDa, compuesta por: un dominio extracelular de inmunoglobulina de tipo variable (IgV), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática de aproximadamente 95 aminoácidos, que contiene dos motivos de inhibición de tirosina: uno ITIM (del inglés: “*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*”) y otro ITSM (del inglés: “*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*”) [93].

El gen que codifica para PD-1, *Pdcd1*, se encuentra en el cromosoma 1 en ratón y en el 2 en humano, y en ambas especies se conforma por 5 exones [99]. Se han identificado distintas variantes de *splicing* de PD-1 en células T humanas, todas inducidas tras su activación [94]. Una de ellas carece de región transmembrana por lo que se expresa en forma soluble; de hecho, se han reportado niveles elevados de PD-1 soluble en el suero y fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide [95].

A diferencia de los otros receptores de la familia, el PD-1 expresado en la superficie celular es monomérico, y posee una superficie de unión al ligando significativamente diferente [96]. Se desconoce si para la transducción de la señal requiere su dimerización [93].

La estructura cristalográfica del ectodominio de PD-1 se encuentra disponible, tanto para la variante humana como para la murina [96–98]. Las secuencias aminoacídicas de ambas variantes tienen una homología del 62%, con diferencias distribuidas uniformemente. La estructura secundaria del ectodominio es bastante similar entre ambos ortólogos, compuesta por dos hojas  $\beta$  que se unen mediante un puente disulfuro, típica de los dominios IgV. La estructura tridimensional de ambas variantes presenta algunas diferencias, y además, se observan cambios de ciertos aminoácidos en los sitios de unión al ligando, que generan divergencias entre ambas superficies de unión [99].

Los ligandos de PD-1 pertenecen a la familia de proteínas de B7 y también son proteínas transmembrana de tipo I. El ectodominio de los mismos está compuesto por dos dominios de tipo inmunoglobulina: uno de tipo IgV (en el extremo N-terminal, más alejado de la membrana celular) y otro de tipo constante (IgC), próximo a la membrana celular. La unión a PD-1 ocurre a través del dominio IgV [100]. La interacción de PD-L1 con PD-1 involucra cambios conformacionales complejos, mientras que la unión de PD-L2 es más simple y directa. Ambos ligandos compiten por la unión a PD-1, siendo PD-L2 el que interacciona con mayor afinidad (3-4 veces mayor afinidad que PD-L1) [101,102]. Sin embargo, la interacción de ambos ligandos con PD-1 es relativamente débil, con unas constantes de disociación ( $K_D$ ) del orden micromolar (alrededor de 8  $\mu$ M para la unión hPD-1/hPD-L1 y 2  $\mu$ M para hPD-1/hPD-L2). La interacción entre las variantes murinas es aún más débil [98].

PD-L1 está codificado por el gen *Cd274* ubicado en el cromosoma 19 en ratón y 9 en humano, formado por siete exones. Se ha identificado una variante de *splicing* de PD-L1 humano que carece de dominio IgV, aunque se desconoce su función. Para PD-L1 murino no se han reportado variantes de *splicing* [93].

PD-L2 está codificado por el gen *Pdcd1lg2*, ubicado adyacente al de PD-L1. Está compuesto por seis exones en ratón y siete en humano. Se han identificado tres variantes de *splicing* en humano, una de las cuales correspondería a la forma soluble del ligando [93].

PD-L1 está compuesto por 290 aminoácidos, y posee un dominio intracelular corto (30 aminoácidos aproximadamente), sin función conocida [93]. La homología de secuencias entre las variantes humana y murina de PD-L1 es de 77% [100]. Varias estructuras cristalográficas de PD-L1 humano han sido publicadas [100,103–105], sin embargo, la de la variante murina aún no se encuentra disponible. Todas las estructuras de PD-L1 realizadas a partir de ambos dominios de inmunoglobulinas extracelulares forman homodímeros, aunque se desconoce si esto es lo que ocurre en la superficie celular en condiciones fisiológicas [99].

Algunas estructuras de los complejos de PD-1 con sus ligandos también se encuentran disponibles [100,104,106], así como los complejos entre PD-1 o PD-L1 con anticuerpos

bloqueantes de la unión que se están utilizando en la clínica o que se encuentran en distintas etapas de ensayos pre-clínicos o clínicos (revisados en Zak y col., 2017) [99].

### 1.3.3 Patrones de expresión de PD-1 y sus ligandos

PD-1 se expresa en células T activadas, células B, células NK, monocitos/macrófagos y DCs. En células B y células NK, la señalización por PD-1 limita las funciones efectoras, según se ha visto en modelos murinos de infecciones virales y cáncer [107–109]. PD-1 también juega un rol central en las células Tregs, promoviendo la diferenciación a células iTregs y el mantenimiento de sus funciones inmunorreguladoras [110].

En células T efectoras, la expresión de PD-1 se induce transcurridas aproximadamente 24 horas de la activación, y se inhibe con la disminución de la presencia de antígeno. Los factores de transcripción NFATc1, Foxo1, Notch e IRF9 influyen positivamente en su expresión, mientras que T-bet la inhibe [40,92]. La exposición prolongada al antígeno (como ocurre en infecciones virales crónicas o cáncer), induce el mantenimiento de niveles de PD-1 elevados en las células T, lo cual a lo largo del tiempo genera cambios transcriptómicos y epigenéticos que pueden llevar a la diferenciación a células T exhaustas [40].

Los ligandos de PD-1 tienen distintos patrones de expresión: PD-L1 se expresa en un gran repertorio de células tanto de forma constitutiva como inducida, mientras que PD-L2 se expresa de forma inducida en algunas células del SI [92].

PD-L1 se expresa constitutivamente en células T y B, DCs, macrófagos, y células no hematopoyéticas como células endoteliales, células hepáticas no parenquimales, astrocitos, neuronas, queratinocitos, sincitiotrofoblastos de la placenta, entre otras. Además, la expresión de PD-L1 se ve inducida en diversos tipos celulares bajo distintas señales: citoquinas de cadena  $\gamma$  común (IL-2, IL-7 e IL-15) en células T, señalización por el receptor de células B (BCR), y citoquinas proinflamatorias (IFN de tipo I y II, TNF- $\alpha$ , VEGF) en una amplia variedad de células, incluidas células tumorales [92].

Por otro lado, el patrón de expresión de PD-L2 es bastante más restringido e involucra principalmente células del SI: DCs activadas, macrófagos (en particular del fenotipo M2), mastocitos derivados de médula ósea, entre otras [92], aunque también puede expresarse en otros tipos celulares en respuesta a estímulos del microambiente, por ejemplo en células endoteliales [111].

### 1.3.4 Efectos biológicos de la señalización por PD-1

La función de PD-1 se diferencia claramente de la de CTLA-4 debido a que no interfiere en la co-estimulación de las células T durante su activación, sino que actúa comprometiendo la señalización por el TCR en células T activadas. La expresión de PD-

1 se induce luego de la activación de las células T, de forma más tardía que la de CTLA-4, y sus ligandos se expresan en múltiples tipos celulares en la periferia, por lo que la vía de PD-1/PD-L1/2 cumple un rol importante en las etapas efectoras de las células T. Además del amplio patrón de expresión de PD-L1 en los tejidos, el hecho de que es inducido por señales proinflamatorias permite inferir que actúa como un mecanismo de *feedback* negativo que inhibe la actividad de las células T efectoras, protegiendo a los tejidos periféricos del daño que podrían causar respuestas inmunes exacerbadas y el ataque de células T autorreactivas [65,93].

La señalización a través de PD-1 afecta la actividad de la célula T de múltiples maneras, sin embargo, los mecanismos específicos de su acción no están del todo claros. Por un lado, tiene una acción directa disminuyendo la señalización a través del TCR y la co-estimulación de CD28 inactivando las quinasas ZAP70 (proteín-quinasa 70 asociada a la cadena zeta) y PI3K (fosoinositol 3-quinasa), respectivamente, lo cual inhibe las cascadas de señalización consecuentes: la vía de Ras/MEK/ERK y la vía de PI3K/AKT/mTOR (Fig. 4 A) [112,113]. La inactivación de ZAP70 y PI3K ocurre a través de las fosfatasa que recluta PD-1 a su cola citoplasmática. Está reportado que PD-1 es capaz de reclutar las fosfatasa SHP-1 y 2 (del inglés: “*Src homology region 2 domain-containing phosphatase*”) a sus motivos ITIM e ITSM fosforilados, aunque la SHP-2 parecería ser la principal mediadora de las funciones inhibitoras de PD-1 [114]. Si bien la unión del TCR al complejo MHC-péptido es suficiente para el reclutamiento de SHP-2 a PD-1, los efectos supresores sólo ocurren si éste se une a uno de sus ligandos. Además, la evidencia sugiere que la proximidad de PD-1 a la sinapsis inmunológica es necesaria para que sea capaz de ejercer sus funciones de inhibición [115].

La señalización por PD-1 también puede inhibir la vía de PI3K/AKT de forma indirecta, ya que genera la disminución de la expresión (o de la activación) de CK2 (quinasa de caseína 2). Esta quinasa es necesaria para el mantenimiento de la fosfatasa PTEN (del inglés: “*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*”) en un estado inactivo. Por lo tanto, al reducirse la actividad de CK2 tras la señalización por PD-1, se activa PTEN y promueve la desfosforilación del fosfatidil-inositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>), inhibiendo la vía de PI3K/AKT (Fig. 4 B) [112].

Las vías de señalización de AKT (proteín-quinasa B) y ERK (del inglés: “*extracellular signal-regulated kinases*”) afectan directamente al metabolismo celular, es decir, los programas de proliferación y diferenciación de las células T [92,110,116,117]. La inhibición de AKT y ERK lleva al arresto de la célula en la fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, impidiendo su división [57].

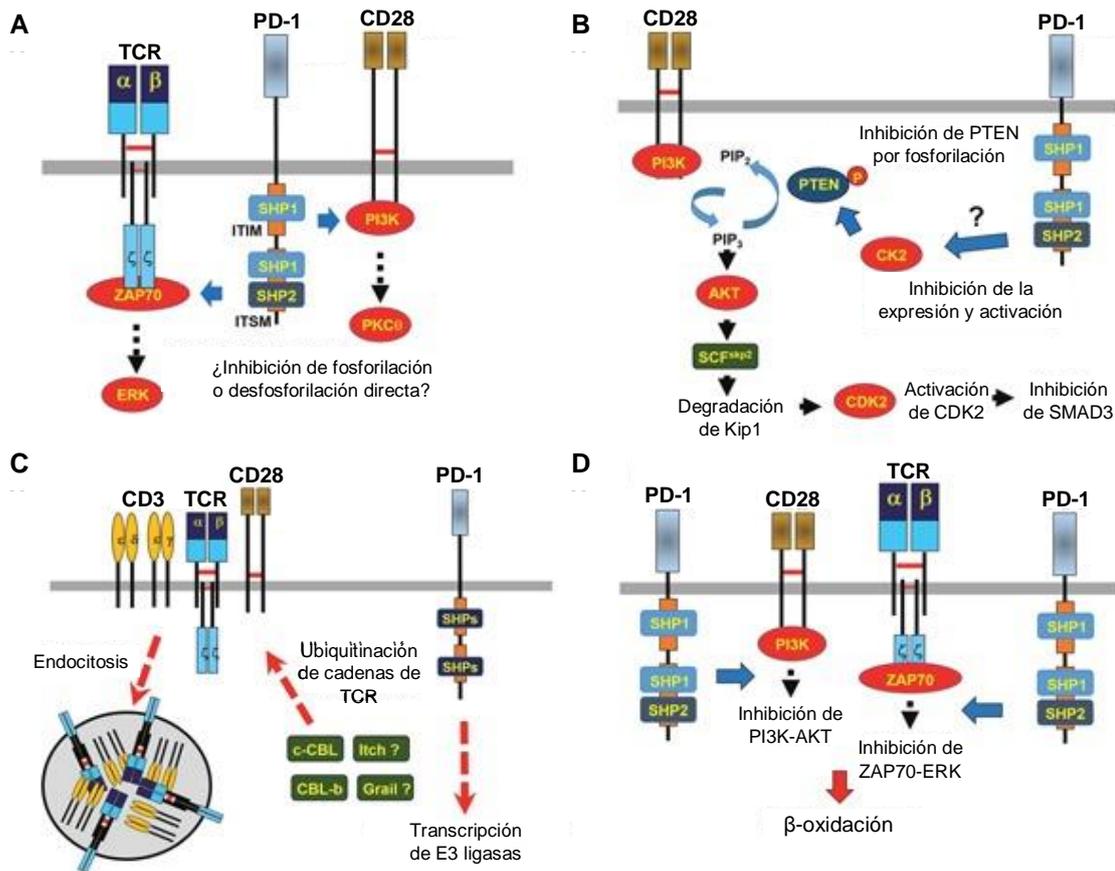
Otro efecto de la señalización por PD-1 es la disminución de la expresión del TCR en la superficie de las células. PD-1 promueve la sobreexpresión de ubiquitin-ligasas, las cuales actúan sobre las cadenas del TCR y sobre PI3K. La ubiquitinación del TCR promueve su internalización, probablemente por endocitosis, disminuyendo los niveles

sobre la célula y por lo tanto incapacitándola para responder a la estimulación por su antígeno (Fig. 4 C) [118].

Durante la activación de las células T, se da un cambio en el metabolismo de fosforilación oxidativa a la glicólisis (denominado efecto Warburg), necesario para posibilitar el rápido crecimiento y expansión de las células T efectoras activadas [92]. Sin embargo, la señalización por PD-1 disminuye la glicólisis y la glutaminólisis, y aumenta el catabolismo de ácidos grasos, lo cual está relacionado con la diferenciación a células T de memoria (Fig. 4 D). Esto podría explicar la longevidad de las células T que reciben señales a través de PD-1 en el MAT, a pesar de encontrarse disfuncionales [119].

Además de afectar el metabolismo, la señalización por PD-1 puede influir en el comportamiento de la célula T de diversas maneras: estimular la expresión de proteínas que inhiben la proliferación y/o producción de citoquinas, reducir la expresión de factores anti-apoptóticos y aumentar la de factores pro-apoptóticos, disminuir la expresión de moléculas citotóxicas, y alterar la motilidad. Por ejemplo, la inactivación de AKT conlleva a una reducción en la expresión de factores de transcripción importantes durante la actividad efectora de las células T como GATA-3, T-bet y Eomes [40], y la inducción de la diferenciación de células T *naive*, y en algunos casos de células T efectoras, a células iTregs [110,120].

En algunos casos, la señalización por la vía de PD-1 puede ser inhibida por otras señales. Por ejemplo, la inhibición de la vía de ERK puede ser revertida mediante la señalización por citoquinas de cadena y común, mientras que en ciertos casos la co-estimulación a través de CD28 puede superar a la inhibición por PD-1, conservándose las funciones efectoras de las células T [92].



**Fig. 4. Principales mecanismos efectores de PD-1.** (A) Mecanismo directo de inactivación del complejo TCR/CD3 y CD28, a través de las fosfatasa SHP-1 y SHP-2 reclutadas por la cola citoplasmática de PD-1. Las fosfatasa inactivan ZAP70 y PI3K, y en consecuencia, la cascada de señalización de cada una. (B) Mecanismo indirecto de inactivación de las señales del TCR: la disminución de la expresión y actividad de la CK2 por la señalización de PD-1 resulta en la activación de PTEN, que elimina PIP<sub>3</sub> apagando la activación de AKT. (C) Disminución de la expresión del TCR en la superficie celular: PD-1 promueve la expresión de ubiquitin-ligasas que actúan sobre las cadenas del TCR, induciendo la remoción del mismo de la superficie celular. (D) Regulación del metabolismo de las células T: la señalización por PD-1 altera el metabolismo debido a que actúa sobre las vías de ERK y PI3K/AKT, inhibiendo la glicólisis y promoviendo la β-oxidación de ácidos grasos. Figura adaptada de Arasanz y col., 2017 [57].

### 1.3.5 Importancia de la vía PD-1/PD-L1/2 en el cáncer

En el MAT, distintos tipos celulares pueden expresar PD-L1 (y en menor medida PD-L2), en respuesta a citoquinas proinflamatorias secretadas por las células del SI. Además de las células tumorales, las células estromales (DCs, TAMs, MDSCs, CAFs, células Tregs, células endoteliales, etc.) también pueden expresar PD-L1 o PD-L2 [121]. Por su parte, las células T en el MAT pueden expresar niveles elevados de PD-1 y de otros receptores de co-inhibición [122]. Como ya se explicó, la señalización por PD-1 inhibe las funciones efectoras y la proliferación de las células T, e induce la diferenciación a células iTregs, contribuyendo al establecimiento de un ambiente tolerogénico que impide la eliminación del tumor.

Numerosos tipos de cáncer humano son capaces de expresar PD-L1 (y en menor medida PD-L2): ovario, mama, cervical, colon, páncreas, gástrico, urotelial, melanoma, glioblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), hematológicos, etc. [123]. En las células tumorales, la expresión de PD-L1/2 puede darse a través de dos mecanismos: 1) intrínsecos: mutaciones oncogénicas [124] o amplificación del locus 9p24 (que aloja los genes de ambos ligandos) [125], y 2) extrínsecos, como respuesta a las señales proinflamatorias del MAT (mecanismo conocido como “resistencia inmune adaptativa”) [126].

Diversos estudios correlacionan la expresión de PD-L1 en las células tumorales (evaluada por inmunohistoquímica) con peor pronóstico en distintos tipos de cáncer en humanos [127–134]. Además, se ha descrito que la presencia de PD-L1 en el MAT (tanto en las células tumorales como en las células estromales) correlaciona con una mejor respuesta clínica al tratamiento con inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 en algunos tipos de cáncer, aunque no en todos [135]. Esto podría explicarse en parte tomando en cuenta la heterogeneidad intratumoral de la expresión de PD-L1, la variación de la expresión de PD-L1 a lo largo del tiempo en respuesta a la presión ejercida por el SI y por las terapias antitumorales utilizadas, y la variabilidad de las técnicas de inmunohistoquímica empleadas para la cuantificación de las células positivas para PD-L1. Por otro lado, el nivel de PD-1 en las células T intratumorales parece tener menor poder predictivo que el de PD-L1 para identificar pacientes respondedores al tratamiento con inhibidores de PD-1/PD-L1 [136].

## 1.4 Bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 en la inmunoterapia del cáncer

### 1.4.1 Estudios preclínicos

Numerosos estudios preclínicos apoyan la hipótesis de que el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1/2 potencia los mecanismos efectoras de las células T, aumentando su actividad antitumoral.

En primer lugar, la revigorización de las funciones efectoras de las células T CD8<sup>+</sup> se ha corroborado *in vitro* utilizando células de distintos tipos de tumores humanos y CTLs específicos de tumor [137,138].

Además, el bloqueo de PD-1 o PD-L1 mediante anticuerpos específicos otorga beneficios terapéuticos en distintos modelos murinos de cáncer, principalmente a través de mecanismos dependientes de las células T. En diversos estudios, el bloqueo de PD-1 o PD-L1 promueve el aumento de CTLs específicos de tumor en el MAT de tumores establecidos, disminuye la densidad de células Tregs infiltrantes de tumor, y también restaura parcialmente las funciones efectoras de las células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor [139–143]. Además, ratones KO para PD-1 son menos sensibles al desarrollo de

metástasis que los ratones *wild-type*, lo cual está relacionado directamente con la actividad de las células T: se observa un mayor infiltrado de estas células en los tumores de ratones KO y una mayor actividad y proliferación de las mismas [144].

Un trabajo reciente destaca específicamente el rol de PD-L1 en la inhibición de la inmunidad antitumoral, demostrando que, en un modelo tumoral murino de carcinoma colorrectal (derivado de la línea celular MC38), PD-L1 es suficiente para inhibir la actividad antitumoral de las células T. Además, la protección que confiere PD-L1 está limitada a cada célula tumoral individual, es decir, las células negativas para PD-L1 pueden ser eliminadas por las células T [143].

El bloqueo de PD-1/PD-L1/2 no solo ha demostrado ser una terapia prometedora como tratamiento aislado, sino que se han reportado interesantes efectos sinérgicos en modelos *in vivo* combinando el bloqueo de esta vía con otras estrategias terapéuticas como quimioterapia [140,145], el bloqueo simultáneo de CTLA-4 [146] (u otros receptores de co-inhibición de células T, como se comentará más adelante en esta sección), la activación de receptores de co-estimulación de células T mediante anticuerpos agonistas (4-1BB [147,148], GITR [149,150], OX40 [151,152]), entre otras. De hecho, esta es una rama de investigación muy activa actualmente, y algunas de las observaciones recogidas a partir de los modelos preclínicos ya están siendo trasladadas a la clínica.

#### 1.4.2 Ensayos clínicos y anticuerpos aprobados

El bloqueo de la señalización por PD-1 es considerado una de las estrategias terapéuticas más prometedoras para potenciar la respuesta del SI frente al tumor. De hecho, los ensayos clínicos en los cuales se evaluaron anticuerpos monoclonales contra PD-1 y PD-L1 en distintos tipos de cáncer han tenido tanto éxito que en 2013 fueron designados como la “droga del año” por el *European Journal of Cancer* [153].

Pembrolizumab (Keytruda, Merck) y nivolumab (Opdivo, Bristol-Myer Squibb) fueron los primeros anticuerpos monoclonales aprobados para el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1, ambos dirigidos contra PD-1 y aprobados por la FDA en el año 2014 para el tratamiento de segunda línea de melanoma metastásico ([www.fda.gov](http://www.fda.gov), números de referencia: 3828413 y 3877032). Más recientemente, ambos anticuerpos han conseguido la aprobación de la FDA y de la EMA para su utilización en diversos tipos de tumores. En el caso de nivolumab, actualmente está aprobado por la FDA para el tratamiento de: cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de células renales, linfoma de Hodgkin, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), carcinoma urotelial, cáncer colorrectal (CRC) y carcinoma hepatocelular (HCC). Pembrolizumab también ha sido aprobado para su uso en diversos tipos de cáncer (NSCLC, HNSCC, linfoma de Hodgkin, carcinoma urotelial y cáncer gástrico o gastroesofágico), e interesantemente en 2017 fue aprobado para el tratamiento de cualquier

tumor sólido (metastásico o inoperable) que presente los siguientes marcadores de inestabilidad genómica: alta inestabilidad de microsatélites o deficiencia en la reparación de bases desapareadas. Esta aprobación constituye un gran progreso ya que es independiente de la localización original del tumor.

Pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 que no se une a receptores de Fc, por lo que no media más acciones efectoras que la neutralización de PD-1. En melanoma, las tasas de respuestas objetivas están cerca del 40% [154].

Por su parte, nivolumab es un anticuerpo monoclonal humano IgG4, con mínima actividad de citotoxicidad celular (ADCC) y por complemento (CDC). En los ensayos clínicos realizados con este anticuerpo, se obtuvieron respuestas objetivas en 28%, 27% y 18% de los pacientes con melanoma, cáncer de células renales y NSCLC, respectivamente, alcanzándose respuestas de larga duración y también algunas remisiones completas [155]. Además, también se ha demostrado que el tratamiento de primera línea con nivolumab es más efectivo que la quimioterapia estándar en pacientes con melanoma [156].

Los efectos adversos de los tratamientos con anticuerpos contra PD-1 incluyen síntomas generales como dolor de cabeza, diarrea, fatiga, prurito, fiebre y náuseas, y también efectos adversos de origen inmunológico: neumonitis, colitis, hepatitis, nefritis, tiroiditis, etc., si bien la mayoría son leves (grados 1 y 2) y manejables [121]. Los efectos adversos graves de carácter inmunológico (grados 3 y 4) ocurren en un 10% de los pacientes tratados, en comparación con 15-30% de los tratados con ipilimumab (anticuerpo contra CTLA-4) [40]. Si bien en algunos casos resulta necesario la discontinuación del tratamiento debido a los efectos adversos graves [157,158], cabe destacar que el tratamiento con anticuerpos inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 genera una menor incidencia de efectos adversos en comparación con los pacientes que reciben quimioterapias convencionales, lográndose de esta manera una mejora en la calidad de vida de los pacientes [159–165].

Por otra parte, la utilización de vectores de terapia génica que codifiquen para los anticuerpos inhibidores de las vías de co-inhibición puede ser una buena alternativa para disminuir la aparición de efectos adversos de origen autoinmune, debido a que sería posible promover la expresión localizada del agente terapéutico en el sitio tumoral, evitándose así la administración sistémica de altas concentraciones de anticuerpo (esta estrategia se describirá en la sección 1.6).

El bloqueo de PD-L1 también resulta interesante desde el punto de vista terapéutico, pues no sólo se inhibe su unión a PD-1 sino también a CD80. En 2016 la FDA aprobó el primer anticuerpo contra PD-L1, atezolizumab (Tecentriq, Genentech), y actualmente está indicado para el tratamiento de carcinoma urotelial, NSCLC y cáncer de vejiga. En 2017 otros dos anticuerpos contra PD-L1 fueron aprobados: avelumab (Bavencio, EMD Serono) para el tratamiento del carcinoma urotelial y el carcinoma de células de Merkel,

y durvalumab (Imfinzi, AstraZeneca) para el tratamiento del cáncer de vejiga ([www.fda.gov](http://www.fda.gov), números de referencia: 4000525, 4074145 y 4091527).

A partir de los ensayos clínicos realizados hasta el momento, se pueden extraer algunas conclusiones generales de la terapia con anticuerpos contra PD-1 o PD-L1: 1) tiene efectos sobre un amplio rango de tipos tumorales; 2) en algunos tipos tumorales, la presencia de PD-L1 en el MAT es un biomarcador que correlaciona con la respuesta al tratamiento; 3) la eficacia de la terapia puede depender de distintos factores, por ejemplo: el perfil de células inmunes en el MAT y las terapias utilizadas previamente en el paciente; 4) en general la eficiencia de la terapia es mayor en tumores con alta carga mutacional; 5) la seguridad toxicológica de los anticuerpos es aceptable, aunque podría ser mejorada; 6) las respuestas pueden ser duraderas; 7) la combinación con otras estrategias terapéuticas puede mejorar las respuestas observadas [40,121].

Actualmente, diversos anticuerpos inhibidores de la vía PD-1/PD-L1/2 se están evaluando en diferentes fases de ensayos clínicos, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos [121].

### 1.4.3 Blancos emergentes y terapias de combinación

A pesar de los resultados prometedores que se han obtenido en distintos ensayos clínicos utilizando el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1/2 como monoterapia, un gran porcentaje de los pacientes no logra alcanzar respuestas objetivas, y cuando sí se alcanzan, las respuestas suelen ser incompletas. Numerosos estudios pre-clínicos sugieren que la combinación del bloqueo de PD-1/PD-L1/2 con otras terapias pueden generar efectos sinérgicos, aumentando la eficacia terapéutica [166]. Una gran variedad de terapias de combinación se encuentra en desarrollo actualmente.

El bloqueo simultáneo de dos vías de co-inhibición fue una de las primeras estrategias exploradas. CTLA-4 y PD-1 son dos vías de co-inhibición de células T no redundantes; mientras que CTLA-4 interviene durante la activación inicial de las células T en los órganos linfoides secundarios, PD-1 actúa de forma más tardía, especialmente en los tejidos periféricos. La evidencia sugiere que el bloqueo de CTLA-4 promueve el aumento en la cantidad de células T específicas de tumor en el MAT, donde incrementarían la secreción de IFN- $\gamma$ , el cual promueve la expresión de PD-L1 en las células tumorales y del estroma. Esto sugiere que el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1/2 podría ser más efectivo terapéuticamente si se combinara con el bloqueo de CTLA-4 [40].

En esta línea, el tratamiento con ipilimumab y nivolumab, en forma simultánea o secuencial, fue el primer ensayo clínico realizado en pacientes con melanoma avanzado. Demostró ser una terapia eficaz, con una tasa de respuestas objetivas de 53% en los pacientes tratados con el régimen simultáneo, pero al mismo tiempo se observó un incremento en los efectos adversos de origen inmunológico [167]. En otro ensayo clínico se comparó el tratamiento con ipilimumab solo o en combinación con

nivolumab en pacientes con melanoma sin tratamiento previo, y se demostró mayor eficacia para la terapia de combinación, con una tasa de respuestas objetivas de 50-60% vs 10% en el caso de la monoterapia con ipilimumab. Además, se observaron remisiones completas en 22% de los pacientes tratados con ipilimumab y nivolumab, mientras que la monoterapia con ipilimumab no generó ninguna respuesta completa [168]. Durante otro ensayo se comparó la eficacia de las monoterapias con nivolumab o ipilimumab, y de la terapia de combinación de ambos anticuerpos, en pacientes con melanoma sin tratamiento previo. En este caso, el tratamiento con nivolumab solo o combinado con ipilimumab resultó más efectivo que el ipilimumab solo, y la combinación de ambos anticuerpos generó beneficios más significativos en los pacientes con tumores negativos para PD-L1 [169], lo cual apoya la teoría comentada previamente.

Otros receptores de co-inhibición también son blancos interesantes en las terapias de combinación contra el cáncer, debido a que participan activamente en el mantenimiento de la disfuncionalidad de las células T exhaustas. Los datos obtenidos de los modelos preclínicos sugieren que el bloqueo simultáneo de PD-1 y otros receptores de co-inhibición (LAG-3, TIM-3, VISTA, TIGIT, etc.) puede aumentar la efectividad de los tratamientos.

LAG-3 es uno de los receptores de co-inhibición con gran potencial terapéutico, pues se expresa en células T CD8<sup>+</sup> disminuyendo su tasa de proliferación y producción de citoquinas, y en células Tregs aumentando su actividad inmunosupresora. Los ligandos descritos de LAG-3 son las moléculas de MHC II, L-selectina y galectina-3 [64]. En modelos murinos de cáncer o de infecciones virales crónicas, el bloqueo de LAG-3 mediante el uso de anticuerpos reactiva a las células T CD8<sup>+</sup> efectoras y disminuye la población de células Tregs, mientras que la terapia combinada de bloqueo de LAG-3 y PD-1 aumenta la eficacia del tratamiento [63,170,171]. Los primeros ensayos clínicos utilizando anticuerpos monoclonales contra LAG-3 solos o en combinación con nivolumab se están empezando a ejecutar ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), números de ensayos clínicos: NCT01968109, NCT02658981, NCT02996110, NCT03459222).

TIM-3 es otro receptor de co-inhibición cuya expresión se asocia al fenotipo de las células T exhaustas, pero también se encuentra en otras células del SI (APCs, células NK y NKT). Se han descrito numerosos ligandos para TIM-3, uno de los cuales es la ampliamente expresada galectina-9, que tras unirse a TIM-3 promueve la pérdida de funciones efectoras de las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> Th1, mientras que aumenta la capacidad de inmunosupresión de las células Tregs [64]. A pesar de que el bloqueo de TIM-3 no ha demostrado tener efectos antitumorales importantes en distintos modelos en ratón, la terapia combinada de inhibición de PD-1 y TIM-3 mostró mayor eficacia antitumoral que la monoterapia contra PD-1 [172–175]. Un anticuerpo monoclonal bloqueante de TIM-3 se encuentra en ensayo clínico, evaluándose en forma de monoterapia o en combinación con el bloqueo de PD-1 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), número de ensayo clínico: NCT02817633).

## 1.5 Nanobodies

Como se adelantó previamente, en esta tesis se buscará desarrollar un tipo particular de anticuerpos, denominados “nanobodies”, que sean capaces de bloquear la unión de PD-1 con PD-L1. Como se describirá en esta sección, los nanobodies se diferencian de los anticuerpos convencionales en muchos aspectos, lo cual les confiere propiedades únicas y la posibilidad de emplearlos de otras maneras. Además, cabe destacar que los únicos agentes que han sido aprobados hasta el momento para el bloqueo de la vía de PD-1/PD-L1 son anticuerpos convencionales, por lo que esta área de investigación es muy novedosa.

### 1.5.1 Características generales

Los nanobodies derivan de un tipo particular de anticuerpos que reciben el nombre de anticuerpos de cadena pesada (o “*heavy chain only antibodies*”), los cuales carecen de cadenas livianas y del dominio CH1 típicos de los anticuerpos convencionales. Los anticuerpos de cadena pesada se han identificado únicamente en camélidos y en algunos peces cartilagosos. Estos animales presentan una respuesta humoral compuesta tanto por anticuerpos de cadena pesada como por anticuerpos convencionales [176].

Al carecer de cadenas livianas, el sitio de unión al antígeno en los anticuerpos de cadena pesada está compuesto por un solo dominio (el extremo N-terminal de la cadena pesada), denominado VHH (o nanobody cuando se expresa de forma recombinante en el caso de los anticuerpos de camélidos) (Fig. 5). Al igual que los dominios VH convencionales, los VHHs poseen la estructura de un dominio de inmunoglobulina, compuesto por cuatro regiones estructurales o FRs (del inglés: “*framework regions*”), y tres regiones determinantes de complementariedad o CDRs (del inglés: “*complementary-determining regions*”), involucradas en el reconocimiento del antígeno [176]. Curiosamente, el CDR3 de los VHHs posee gran capacidad de formar extensiones convexas y también puede ser bastante más largo que el de los anticuerpos convencionales, lo cual les otorga una mayor capacidad de reconocer sitios antigénicos normalmente ocultos o de difícil acceso (por ejemplo: sitios activos de enzimas) [177].

Los VHHs presentan numerosas ventajas para su aplicación en biotecnología en comparación con los anticuerpos convencionales. Debido a su naturaleza monodominio, pueden generarse fácilmente bibliotecas de VHHs que permiten la selección de VHHs específicos para un antígeno de interés, por técnicas de muestreo (*display*) en fagos filamentosos, levaduras o ribosomas. En estos casos, las bibliotecas generadas retienen la diversidad total de la población de VHHs, debido a que la especificidad reposa en un único dominio y una vez clonado reproduce la especificidad original, a diferencia de las bibliotecas equivalentes derivadas de anticuerpos convencionales, en las que se deben generar los emparejamientos de las cadenas pesadas y livianas, lo cual da lugar a

nuevas especificidades [176]. Al ser posible alcanzar una alta representatividad de la diversidad original en las bibliotecas de VHHs, es común aislar nanobodies de alta afinidad con constantes de disociación ( $K_D$ ) del orden nanomolar (nM) o incluso picomolar (pM) [178]. Los principios de la generación de bibliotecas de nanobodies y su selección por la técnica de *display* en fagos (*phage display*) serán descritos más adelante (sección 1.5.3).

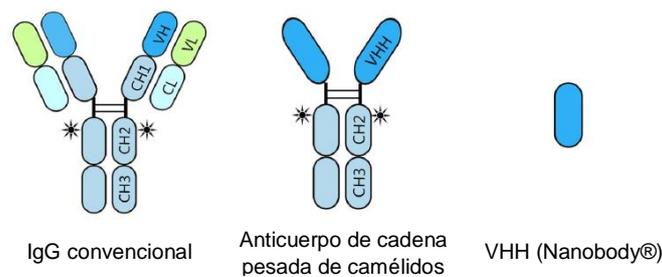
Otra ventaja que presentan los VHHs es que pueden ser producidos eficientemente en diferentes sistemas de expresión, tanto eucariotas como procariotas, a diferencia de los anticuerpos convencionales, que en general deben producirse en células de mamífero. La producción de nanobodies en *Escherichia coli* es generalmente muy buena en términos de rendimiento, lo que abarata el costo de producción y simplifica el procedimiento. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el nivel de producción depende de la secuencia de cada nanobody en particular, pudiendo variar sensiblemente de uno a otro [176]. La expresión de nanobodies en *E. coli* suele realizarse promoviendo la secreción de los mismos al periplasma, donde el ambiente oxidante permite la formación de puentes disulfuro y el correcto plegamiento, por lo que se obtienen VHHs funcionales [179]. Las construcciones compuestas por más de un nanobody también pueden ser producidas eficientemente en *E. coli* aunque con menor rendimiento [180–183].

Por otra parte, los nanobodies también pueden ser expresados en forma adecuada a partir de otros sistemas, incluyendo levaduras, hongos, células de insecto, células de mamífero y plantas [179]. Dentro de las células de mamífero, la línea de células CHO (del inglés: “*Chinese hamster ovary*”) ha demostrado ser muy eficiente para la producción estable y a gran escala de nanobodies fusionados a dominios Fc [184]. Otras construcciones quiméricas de nanobodies y regiones Fc han podido ser expresadas en líneas de células B de ratón [185,186]. En el contexto del laboratorio, otras líneas celulares son de preferencia para la producción transitoria de proteínas debido a la mayor sencillez de los procedimientos, en particular la línea HEK-293 (del inglés: “*Human embryonic kidney*”). Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes de expresión de nanobodies en estas células [179].

Una de las ventajas más notables de los nanobodies es su elevada estabilidad fisicoquímica y térmica y su gran solubilidad, debido al importante número de residuos hidrofílicos que poseen en sus secuencias aminoacídicas. Además, carecen de las regiones hidrofóbicas que los anticuerpos convencionales presentan en las interfases entre los dominios VL-VH y VH-CH1, las cuales promueven su agregado [176,187]. La elevada estabilidad permite además realizar formulaciones a altas concentraciones de los mismos sin que se produzcan agregados, lo cual es una ventaja importante en el área terapéutica ya que se podrían emplear volúmenes pequeños durante los tratamientos. Además, los datos actuales indican que los nanobodies podrían ser administrados a través de distintas rutas sin perder su eficacia terapéutica: intravenosa,

subcutánea, inhalatoria y oral (en caso de tratamientos a nivel del aparato digestivo) [188–191].

Debido a su pequeño tamaño y a su naturaleza monodominio, los nanobodies pueden ser manipulados genéticamente en forma sencilla, lo cual les confiere una gran flexibilidad en cuanto a los formatos que se pueden generar. Por ejemplo, es posible desarrollar multímeros de un nanobody (confiriéndole avidéz), biespecíficos (que reconozcan distintos blancos), o biparatópicos (que reconozcan distintos sitios del mismo blanco). Además, los nanobodies también pueden asociarse a distintas proteínas o dominios proteicos, así como a drogas u otros compuestos, por lo que pueden ser utilizados como herramientas de *delivery* [176].



**Fig. 5. Diagrama esquemático de las estructuras de un anticuerpo convencional, un anticuerpo de cadena pesada y un nanobody.** El anticuerpo convencional está formado por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, donde el sitio de unión al antígeno se encuentra formado por los dominios VH y VL de las cadenas pesada y liviana respectivamente. El anticuerpo de cadena pesada está compuesto únicamente por dos cadenas pesadas, cada una de las cuales posee un dominio variable (VHH) encargado del reconocimiento del antígeno. En el caso de los camélidos, este dominio expresado en forma recombinante ha sido registrado como “nanobody”. Los sitios de glicosilación de las regiones Fc de los anticuerpos se encuentran marcados con un asterisco. Figura adaptada de Liu y col., 2018 [179].

### 1.5.2 Los nanobodies como agentes terapéuticos

Los nanobodies son pequeñas pero poderosas herramientas biotecnológicas, y desde su descubrimiento en 1993 han sido extensamente evaluados para su aplicación en distintas áreas, desde el desarrollo de reactivos de laboratorio hasta su uso en la clínica. Sus aplicaciones terapéuticas son las que presentan un mayor desafío, y aunque numerosos nanobodies han sido evaluados en distintos modelos animales (incluyendo cáncer), pocos se encuentran en ensayos clínicos actualmente.

Debido a su pequeño tamaño (aproximadamente 15 kDa), los nanobodies son eliminados rápidamente por vía renal, alcanzando una vida media en suero de 2 horas. A pesar de que esto puede ser una desventaja a nivel terapéutico, el pequeño tamaño también les confiere la capacidad de rápida extravasación y buena penetración en los tejidos (incluyendo los tumores), a diferencia de los anticuerpos convencionales [192].

La corta vida media de los nanobodies en suero y su buena penetrabilidad en los tejidos los convierten en herramientas ideales para su aplicación en técnicas de imagen

molecular, donde ya han sido evaluados preclínicamente con éxito tanto en tomografía de emisión de positrones (PET) como en tomografía computada de emisión de fotón único (SPECT) [193]. De hecho, recientemente se han evaluado nanobodies específicos para PD-L1 en SPECT en ratones con tumores positivos para este ligando, logrando un marcaje adecuado de los tumores tras una hora de administración de los nanobodies [194].

Sin embargo, en el área de la terapéutica, la rápida eliminación de los nanobodies del suero puede ser una desventaja. Por lo tanto, se han desarrollado distintas estrategias para aumentar su vida media: fusión del nanobody con actividad terapéutica a otro nanobody dirigido a la albúmina [182,195] o al dominio Fc de IgG [181], PEGilación del nanobody [196], entre otras.

Al carecer de dominio Fc, los nanobodies no presentan funciones efectoras de ADCC o CDC. Si bien esto podría solucionarse asociándolos a regiones Fc, lo cual también aumentaría su vida media en suero, se perderían las ventajas inherentes al tamaño pequeño de los mismos. Por lo tanto, las investigaciones actuales se centran en explotar la actividad de neutralización de los nanobodies o su habilidad como agentes para el *delivery* de drogas o compuestos a las células blanco [197].

En el contexto del cáncer, numerosos nanobodies se han aislado contra diferentes blancos de interés, como factores de crecimiento o sus receptores, oncoproteínas, quimioquinas, etc. [192]. Una de las estrategias para su utilización es el formato de nanobodies “desnudos”, en sus diferentes versiones (monovalentes, bivalentes, biespecíficos, etc.), con el objetivo de inhibir la progresión tumoral bloqueando distintas vías cruciales. Por ejemplo, nanobodies contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) han sido evaluados con éxito en modelos murinos de cáncer como agentes monovalentes [183], en forma de biespecíficos [195] o biparatópicos [198].

Otra estrategia consiste en la conjugación de los nanobodies a toxinas para generar sistemas de *delivery* de drogas dirigidos a las células tumorales. Las toxinas se pueden conjugar directamente a los nanobodies o se pueden diseñar nanopartículas (liposomas, micelas o polímeros) recubiertas por nanobodies, aunque el aumento del tamaño en estos sistemas puede disminuir la penetrabilidad en el tumor [197]. Los nanobodies también pueden conjugarse genéticamente a enzimas con potencial actividad antitumoral, por ejemplo la  $\beta$ -lactamasa, que cataboliza una pro-droga de baja toxicidad en un agente citotóxico [199].

Un trabajo recientemente publicado fue el pionero en utilizar un nanobody contra un receptor de co-inhibición de células T en un modelo murino de melanoma. El nanobody, dirigido contra CTLA-4, demostró una actividad antitumoral similar al de un anticuerpo convencional contra dicho receptor utilizado como control, logrando una disminución en la tasa de crecimiento tumoral y prolongando la supervivencia de los animales en comparación con los controles que no recibieron tratamiento [200].

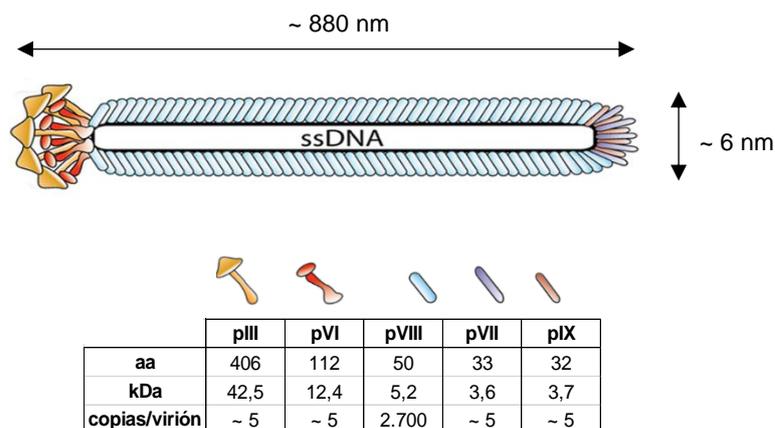
Por otro lado, cabe destacar que no se han detectado reacciones inmunes contra nanobodies tras múltiples administraciones de los mismos en ratones (lo cual ha sido evaluado a nivel de: aparición de anticuerpos específicos, proliferación de células T y aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias) [182,201]. Esto se debe a la gran homología de secuencias de los nanobodies con los dominios VH de los anticuerpos convencionales (más del 80%), y también a la alta estabilidad de los nanobodies, pues al no formar agregados resultan menos inmunogénicos [176]. Además, las respuestas de anticuerpos contra los dominios variables son en general menos frecuentes que contra los dominios constantes de otras especies [202]. Igualmente se han generado estrategias para humanizar los nanobodies y así minimizar posibles reacciones adversas en pacientes [203].

Los resultados de los primeros ensayos clínicos utilizando nanobodies también apoyan el concepto de la baja inmunogenicidad [191]. De hecho, se espera que la primera droga basada en nanobodies sea aprobada para su uso en la clínica durante 2018, para el tratamiento de una enfermedad rara de la coagulación [204]. Luego de esta primera aprobación, y tras la expiración de patentes claves que regulan el uso de VHHs, es posible que en el futuro próximo los nanobodies emerjan como agentes bioterapéuticos de gran importancia [205].

### 1.5.3 Principios de la técnica de *phage display*

Existen numerosos sistemas en los cuales se pueden generar bibliotecas de *display* (muestreo) de anticuerpos: virus, bacterias, levaduras y ribosomas [206]. El *display* en fagos filamentosos (*phage display*) es la técnica más ampliamente utilizada para la selección de nanobodies, y la empleada en esta tesis, por lo cual se describirá a continuación.

La técnica de *phage display*, descrita por primera vez en 1985 [207], se basa en la expresión de péptidos o proteínas foráneos fusionados a proteínas de la cápside de un virus bacteriófago. El más utilizado para estos fines es el bacteriófago M13, un miembro de la familia de fagos filamentosos, los cuales reciben su nombre por su estructura de filamento de aproximadamente 880 nm de largo por 6,5 nm de ancho. El fago M13 infecta cepas de *E. coli* que contienen el plásmido conjugativo F, uniéndose al extremo del pilus de la bacteria y translocando el ADN viral al interior de la bacteria. El genoma *wild-type* del fago M13 es de ADN simple hebra y tiene un tamaño de 6,4 kb. Codifica para 11 proteínas: 5 son estructurales y 6 participan en la replicación viral. La cápside está formada por aproximadamente 2700 copias de la proteína pVIII, y 5 copias de cada una de las proteínas estructurales restantes (pIII, pVI, pVII y pIX), ubicadas en los extremos de la partícula del fago (Fig. 6). pIII es la proteína que se une al pilus de *E. coli* durante la infección [208,209].



**Fig. 6. Representación esquemática de la estructura del fago M13 *wild-type*.** La cápside tiene una morfología cilíndrica y está formada mayoritariamente por la proteína pVIII, que recubre el genoma viral. En uno de los extremos de la cápside se encuentran las proteínas pIII y pVI, y en el otro extremo pVII y pIX (3-5 copias de cada una por partícula viral). Figura adaptada de Løset y col., 2011 [210].

Para la generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos, se suele partir de camélidos inmunizados con la(s) proteína(s) de interés. Las inmunizaciones se realizan por vía subcutánea generalmente durante 6-8 semanas a intervalos regulares, utilizando 0,1-1 mg de antígeno purificado por dosis. Luego de la inmunización, se purifican las células mononucleares de sangre periférica (donde se encuentran los linfocitos B), se extrae el ARN mensajero (ARNm) de estas células y se sintetiza el ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa. Se amplifican los genes de la región variable de la cadena pesada del repertorio total de anticuerpos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se clonan en un vector fagémido que permita su expresión de forma fusionada a una proteína de la cápside del bacteriófago (Fig. 7 A) [209].

Los vectores fagémidos contienen el gen de la proteína de la cápside viral utilizada para el *display* (en general, pIII o pVIII), con un sitio de clonado en su extremo 5' que permite la introducción de la población de ADNc de interés (en este caso de nanobodies), de forma que se expresen fusionados al extremo N-terminal de la proteína de la cápside. Además, estos vectores contienen un origen de replicación (f1) que permite la replicación del ADN simple hebra y su empaquetamiento en las partículas virales generadas [211]. Sin embargo, al carecer de los genes implicados en la replicación y empaquetamiento, y del resto de las proteínas estructurales, se requiere de la presencia de un fago auxiliar (*helper*) para la producción de partículas virales. El fago *helper* codifica para todas las proteínas necesarias para el ensamblaje de partículas virales, sin embargo, presenta mutaciones que hacen que la replicación y encapsidación de su propio genoma sea ineficiente. De esta manera se evita el empaquetamiento del genoma del fago *helper* en las partículas virales generadas, favoreciéndose el empaquetamiento del vector fagémido. Además, es importante destacar que se generan partículas virales híbridas, es decir, que presentan tanto la versión nativa de la proteína

de cápside utilizada para el *display* (codificada por el fago *helper*), como la versión fusionada a la proteína de interés (codificada por el vector fagémido). En el caso de pIII, esto es muy importante para el mantenimiento de la capacidad infectiva de la partícula viral generada [212].

Para el *display* de proteínas recombinantes grandes o fragmentos de anticuerpos se utiliza la proteína pIII, que al ser la última proteína incorporada durante el ensamblaje de la cápside viral no afecta la estructura de la misma [213]. En esta tesis se utilizó el vector fagémido pComb3X (Fig. 7 B), desarrollado y cedido por el Dr. Barbas [208]. Este vector permite el clonaje de los nanobodies en el extremo 5' de una versión truncada de pIII, carente de los dominios N-terminales necesarios para la infección de *E. coli*. La variante truncada de pIII optimiza la producción de las partículas virales, ya que la expresión de pIII *wild-type* dentro de la bacteria la protege de la sobreinfección por otros fagos, con lo cual se dificultaría la infección con el fago *helper*. El vector pComb3X posee además un péptido señal (OmpA) que dirige al nanobody hacia el periplasma bacteriano, donde el ambiente es favorable para su correcto plegamiento y la formación de puentes disulfuro [209].

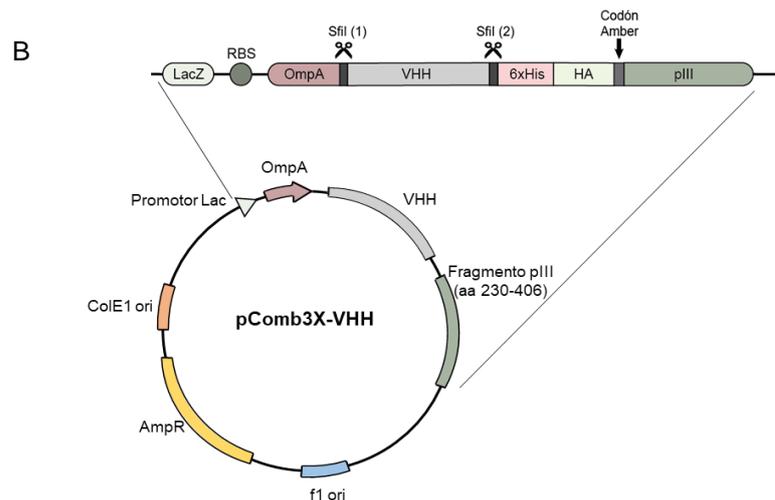
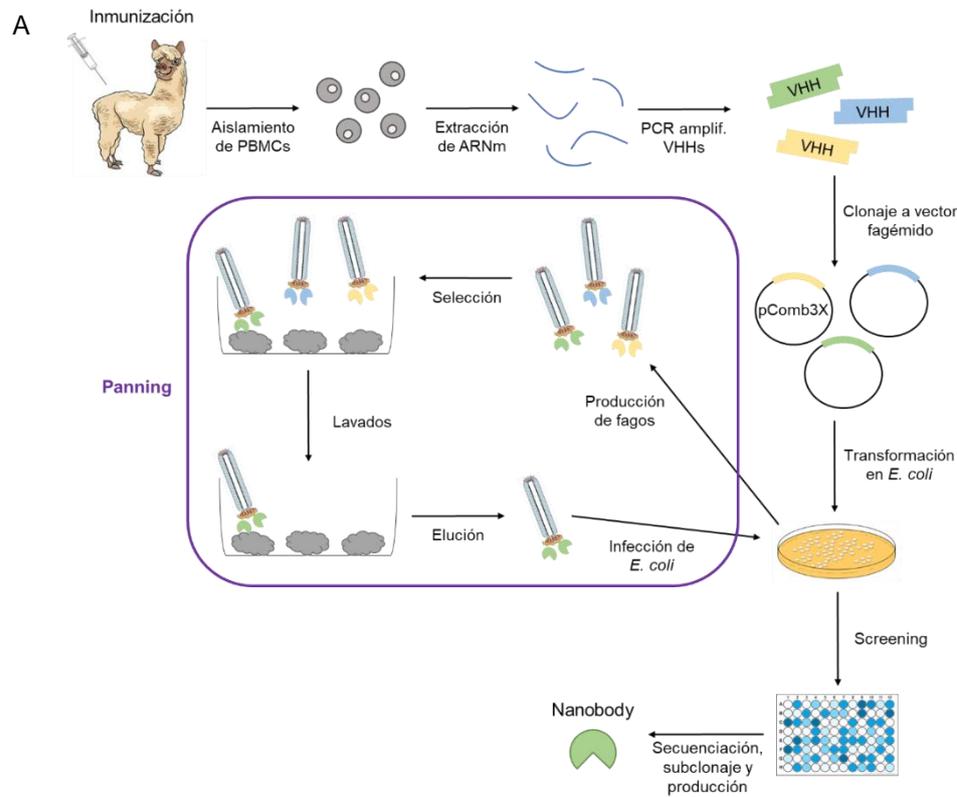
Para el clonaje de los nanobodies en este vector se emplea la enzima de restricción SfiI, cuyo sitio de reconocimiento es GGCCNNNN/NGGCC, donde N puede corresponder a cualquiera de las 4 bases del ADN. La barra indica el sitio de corte, que como se puede observar puede o no ser palindrómico. El vector pComb3X posee dos sitios de corte SfiI diferentes en su sitio de clonaje, exponiendo extremos cohesivos no complementarios entre sí al ser digeridos con SfiI, permitiendo el clonaje de los nanobodies de forma dirigida. El sitio de corte 5' es: GGCCAG/CGGCC (sitio 1), mientras que el sitio de corte 3' es: GGCCAGGC/CGGCC (sitio 2). Al amplificar los nanobodies por PCR se incorpora la secuencia del sitio 1 al cebador directo, y la secuencia 2 al cebador reverso, por lo tanto, al digerir con SfiI los nanobodies amplificados se podrán clonar de forma dirigida en pComb3X.

El repertorio de secuencias de nanobodies clonadas en el vector fagémido es transformado en bacterias *E. coli*, a partir de las cuales se realiza la producción de los fagos mediante la infección con un fago *helper*. En el proceso de electroporación cada célula bacteriana recibe un solo plásmido pComb3X (es decir, una sola secuencia de nanobody), por lo tanto, cada bacteria producirá partículas virales que expresarán un único clon de nanobody fusionado a pIII y contendrán la información genética correspondiente al mismo en su interior. Se obtienen entonces partículas virales con algunas copias de pIII fusionadas al nanobody, y en cuyo interior se encapsida el vector fagémido codificante para el nanobody expresado sobre la superficie del fago. Esta relación fenotipo-genotipo permite llevar a cabo el aislamiento de nanobodies específicos contra un antígeno de interés y su fácil identificación a través de su secuencia nucleotídica [209].

Para el aislamiento de nanobodies específicos para un antígeno, se realizan rondas de selección sucesivas enfrentando las partículas virales producidas al antígeno de interés (Fig. 7 A). Este proceso se conoce como “*panning*”, y puede realizarse con el antígeno inmovilizado sobre placas de microtitulación, partículas magnéticas o células. Tras la incubación de los fagos con el antígeno, se realizan lavados exhaustivos y se eluyen los fagos que permanecen unidos al antígeno. La fracción de fagos eluída, denominada “*output*”, es utilizada para infectar bacterias *E. coli* y repetir el proceso. Generalmente se realizan unas tres rondas de selección debido a que no es un proceso completamente eficiente, sino que se enriquece paulatinamente el porcentaje de fagos que presentan nanobodies específicos contra el antígeno del *panning* [214].

Las colonias de *E. coli* obtenidas tras la infección con el *output* de la última ronda de selección son utilizadas para producir nanobody (en ausencia de fagos) y monitorear la presencia de clones específicos para el antígeno (*screening*). Esto es posible ya que el nanobody se encuentra bajo control del promotor del operón *lac*, y por lo tanto su expresión puede ser inducida mediante algunos compuestos como el IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). En cepas de *E. coli* no supresoras para el codón stop *amber* (TAG), ubicado entre el nanobody y pIII (Fig. 7 B), es posible la producción del nanobody sin fusionar a pIII. En esta tesis se utilizó la cepa *E. coli* ER2738, que es supresora parcial y por lo tanto se obtiene una fracción del nanobody sin fusionar a pIII en el sobrenadante de cultivo, como fue demostrado previamente en nuestro laboratorio [215]. Si bien los niveles de expresión de proteína que se logran a partir de este vector son bajos, suelen ser suficientes para realizar pruebas de reactividad de los nanobodies en ELISA o en citometría de flujo.

Existen diversas estrategias de *panning* y *screening*. En esta tesis se utilizó el antígeno recombinante adsorbido en pocillos de placa de microtitulación, y el antígeno expresado sobre la superficie de células eucariotas (línea HEK-293).



**Fig. 7. Estrategia general para la construcción de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos y la selección de nanobodies específicos para un antígeno.** (A) Para la construcción de la biblioteca, se inmuniza un camélido con el/los antígenos de interés. Terminado el proceso de inmunización, se aísla el ARNm de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) del animal, se amplifican los genes de VHHs por PCR y se clonan en un vector fagémido (en esta tesis se utilizó el vector pComb3X). El repertorio de nanobodies clonado en pComb3X se transforma en bacterias *E. coli*, a partir de las que se realiza la producción de fagos en presencia de fago *helper*. Las partículas virales producidas presentan algunas copias de la proteína de cápside pIII fusionada a un nanobody, cuya secuencia estará codificada por la información genética contenida en el vector pComb3X encapsidado en esa partícula viral. Estos fagos son utilizados en rondas de selección consecutivas (*panning*), tras lo cual se realiza el *screening* (monitoreo) de clones específicos para el antígeno (clones “positivos”). Los clones positivos identificados son secuenciados, y pueden ser subclonados a otros vectores de expresión fuerte en *E. coli* para su producción recombinante. En general, el *panning* es realizado en pocillos de placa de microtitulación tapizados con el antígeno, aunque en esta tesis también se utilizaron células que expresaban el antígeno en su superficie.

El *screening* de clones positivos se realiza en ELISA y/o por otras técnicas como citometría de flujo. (B) Mapa del vector pComb3X, el cual permite la expresión del nanobody fusionado a un fragmento de la proteína de cápside pIII, así como a un péptido señal de secreción al periplasma (OmpA) y dos tags (cola de 6 histidinas y epítipo HA). Entre el epítipo HA y pIII se encuentra un codón *amber* que permite la expresión del VHH en forma libre (sin fusionar a pIII) en cepas de *E. coli* no supresoras. Adaptado de "*Phage Display: a laboratory manual*" [209].

## 1.6 Terapia génica

La terapia génica consiste en la introducción de material genético dentro de una célula blanco para obtener un beneficio terapéutico, el cual puede ser de diversos tipos. La estrategia más utilizada es la de la introducción de un gen terapéutico funcional que reemplace al gen mutado en la célula blanco. Para la introducción de la información genética dentro de las células blanco se utilizan distintos tipos de vectores.

La mayoría de los avances alcanzados en el área de la terapia génica están focalizados en enfermedades causadas por el defecto de un único gen, lo cual no es el caso del cáncer. Sin embargo, el primer producto de terapia génica aprobado para su uso en humanos fue en China en el año 2003, y consistió en un adenovirus recombinante para el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Gendicine) [216]. Por lo tanto, la terapia génica en una enfermedad tan compleja genéticamente como es el cáncer podría ser aplicable. Además, cabe destacar que en este trabajo no se propone la corrección de un gen propio de las células blanco, sino la introducción de material genético que codifica para una proteína foránea capaz de inhibir una vía de señalización que podría resultar en un beneficio terapéutico en el contexto del cáncer.

### 1.6.1 Generalidades y vectores de terapia génica

Hasta la fecha, se han realizado más de 2000 ensayos clínicos relacionados con terapia génica en diversas patologías, incluyendo enfermedades monogénicas, cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Más del 60% de los ensayos clínicos se han realizado en el área del cáncer [217].

El éxito de la terapia génica depende tanto de la secuencia de ADN como del vector que se utiliza para hacer llegar la información genética a las células blanco. Los vectores para la introducción del material genético a las células pueden ser virales o no virales. Los vectores no virales incluyen: liposomas, exosomas, nanopartículas de polímeros, etc., y se caracterizan por ser fáciles de producir a gran escala y de modificar químicamente, pero pueden presentar baja eficiencia en introducir el material genético en las células blanco y también citotoxicidad. Los vectores virales son la estrategia más utilizada en ensayos clínicos (casi el 70% del total), aprovechándose las características intrínsecas de los virus para introducir el material genético en la célula blanco. Dentro de los vectores virales más utilizados se encuentran: adenovirus, retrovirus, virus

vaccinia, virus del herpes y virus adeno-asociados (AAV, del inglés: “*adeno-associated virus*”) [217].

El ciclo de vida de un virus puede dividirse en dos fases temporalmente distintas: la infección, durante la cual se introduce el genoma viral en la célula y comienza una etapa temprana de expresión de los genes virales reguladores, y la replicación, en la cual se expresan genes estructurales y se ensamblan las nuevas partículas virales. En los vectores de terapia génica, las partículas virales contienen en su interior un genoma viral modificado, que contiene la construcción génica terapéutica, pudiendo o no contener el genoma viral. Los más utilizados actualmente son los vectores virales no replicativos, debido a que son más seguros biológicamente [218].

Para generar un vector viral, los genes virales codificantes y las secuencias reguladoras (necesarias para la expresión génica) se separan en distintas moléculas de ADN para prevenir la recombinación homóloga y la aparición de partículas virales productivas. Por lo tanto, las secuencias virales codificantes actúan en *trans* (expresadas por plásmidos o incorporadas en el genoma de las células productoras de las partículas virales). Las secuencias terapéuticas y las secuencias reguladoras se encuentran en *cis*, y en conjunto con las secuencias virales codificantes dentro de la célula productora, se pueden generar partículas virales recombinantes no replicativas que contengan en su interior las secuencias terapéuticas y reguladoras. Dichas partículas podrán transducir a las células blanco, es decir, generar una infección abortiva (carente de fase replicativa) que introduzca la información genética funcional a las mismas. La separación de las secuencias reguladoras y las secuencias virales codificantes durante la producción de las partículas virales recombinantes es un aspecto importante que contribuye a la seguridad del vector viral [218].

## 1.6.2 Virus adeno-asociados

Los vectores de AAVs para terapia génica resultan muy prometedores para su utilización en la clínica debido a que: 1) son virus naturalmente no patogénicos, 2) infectan diferentes tipos celulares, tanto quiescentes como en división, 3) son fácilmente manipulables y su producción es sencilla, 4) el ADN viral puede persistir en la célula en formas episomales (y en muy pequeña proporción como ADN integrado), permitiendo la expresión prolongada del transgén [219].

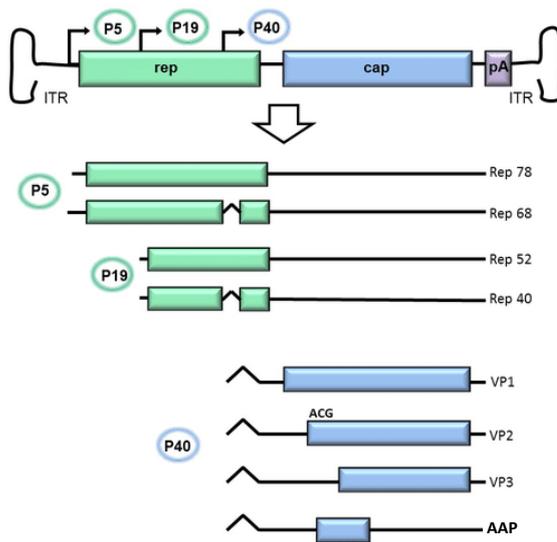
Los AAVs son virus sin envoltura, de ADN simple hebra, pequeños y de simetría icosaédrica, con un diámetro de 18-26 nm y un peso molecular de 5,5-6,2 millones de Daltons. Pertenecen a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*, lo que indica que para que ocurra una infección productiva requieren de la co-infección con un virus *helper* o auxiliar, que puede ser: adenovirus, virus herpes o vaccinia virus [219].

El genoma viral está compuesto por una hebra de ADN monocatenaria de 4,7 kb, que puede ser de polaridad positiva o negativa. Posee tres marcos abiertos de lectura (*rep*,

*cap* y *aap*), flanqueados por dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de 145 nucleótidos. Los tres genes dan lugar a al menos ocho proteínas a partir de tres promotores distintos. Los transcritos generados por el uso de un mismo promotor se procesan por *splicing* alternativo dando lugar a diferentes proteínas, cuya secuencia se solapa en un gran porcentaje de aminoácidos. El gen *rep* codifica para cuatro proteínas que participan en la replicación del genoma viral y el empaquetamiento, el gen *cap* codifica para las tres proteínas estructurales que conforman la cápside viral, y el gen *aap* da lugar a una proteína activadora del ensamblaje de las partículas virales (Fig. 8) [220,221]. Los ITRs forman una estructura secundaria de tipo horquilla, por apareamiento de bases, y son muy importantes en distintos procesos: replicación del genoma viral en la célula hospedadora, encapsidación del ADN viral, integración del ADN viral en el genoma celular y generación de episomas concatémicos [222].

Se han descrito numerosos serotipos de AAVs, que presentan diferencias en las proteínas de la cápside viral. Estas diferencias generan cambios sutiles en las preferencias de unión a los carbohidratos de las superficies celulares (ácido siálico, galactosa y sulfato de heparina), y a los receptores que utilizan para ser internalizados por la célula. Como resultado, los distintos serotipos tienen diferente tropismo e infectan preferentemente algunos tipos celulares sobre otros. El serotipo de AAV2 fue el primero en ser identificado y caracterizado, y actualmente la mayoría de los vectores que han sido generados corresponden a este serotipo, que tiene un tropismo amplio. El AAV8 es otro serotipo utilizado frecuentemente, el cual presenta tropismo por el hígado, músculo esquelético, corazón y páncreas [220].

El ciclo de vida del AAV comienza con la unión de la partícula viral a la superficie de la célula, a través de distintos carbohidratos y receptores, y su internalización por endocitosis. La partícula de AAV es transportada al interior del núcleo y allí se desensambla y se libera el genoma viral. En ausencia de virus auxiliar, el virus continúa la vía lisogénica, en donde el genoma viral se integra en el genoma de la célula hospedadora en una región de aproximadamente 2 kb localizada en el brazo largo del cromosoma 19 en humanos, sitio denominado *AAVS1*. En este caso la expresión génica viral está auto-reprimida, y la integración asegura la replicación del genoma viral durante la división celular. Para la integración son necesarios los ITRs y las proteínas rep68 o rep78. En presencia de virus auxiliar, el programa de expresión génica del AAV se activa y el provirus es rescatado del cromosoma celular, replicado y empaquetado en las partículas virales. Finalmente, se liberan las partículas de AAV tras la lisis celular inducida por el virus auxiliar (vía lítica). Si se produce la co-infección simultánea de ambos virus, el genoma del AAV no se integra en el genoma celular sino que se activa la vía lítica directamente [223].



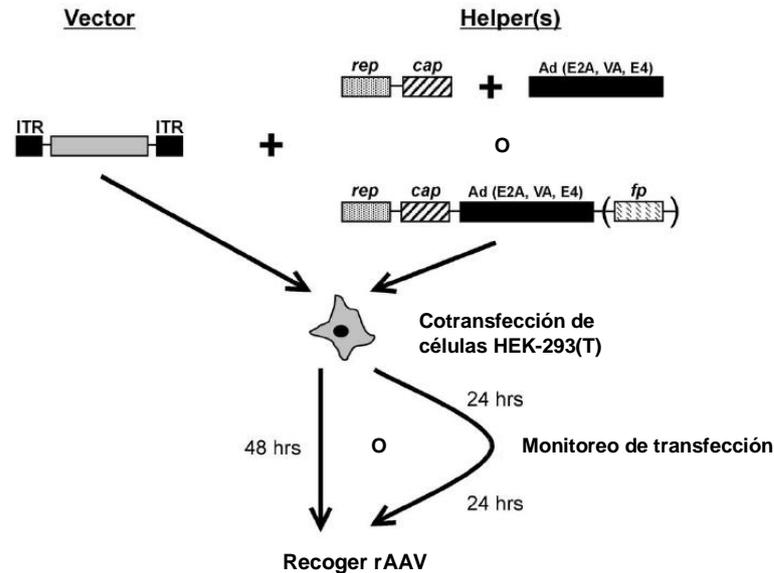
**Fig. 8. Representación del genoma de AAV *wild-type*.** Entre los ITRs se encuentran los dos marcos abiertos de lectura (*rep* y *cap*), tres promotores (P5, P19 y P40) y el sitio de poliadenilación (pA). El gen *rep* codifica para cuatro proteínas no estructurales a partir de dos promotores. El gen *cap* codifica para las tres proteínas estructurales, generándose a partir de un único promotor. Un marco abierto de lectura alternativo codifica para la proteína AAP. Figura adaptada de Saraiva y col., 2016 [224].

### 1.6.3 AAVs recombinantes

Para la generación de vectores virales basados en AAVs, las secuencias codificantes del genoma viral normalmente son sustituidas por la construcción terapéutica, conservándose los ITRs. La construcción resultante se conoce como genoma recombinante de AAV. Las secuencias codificantes del genoma de AAV son administradas en *trans* para la producción de las partículas virales recombinantes (es decir, partículas de AAV que contengan en su interior el genoma recombinante). El tamaño del genoma recombinante debe ser menor a 5 kb, lo cual limita la longitud de las construcciones que se pueden utilizar. Las secuencias incluidas entre los ITRs normalmente incluyen: un promotor de mamífero, el gen de interés y un terminador [220].

Una de las ventajas más importantes de los AAVs para su utilización como vector de terapia génica es su muy baja patogenicidad en comparación con otros virus. Aun así, las proteínas de la cápside pueden inducir respuestas del SIA, tanto humorales como celulares, lo cual puede disminuir la eficacia terapéutica de estos vectores. Además, esto se ve potenciado por exposición previa a AAVs, algo que ocurre en la mayoría de la población. La inmunidad preexistente contra el AAV es el principal desafío en los ensayos clínicos, y puede ser superado cambiando el serotipo a ser empleado o modificando la vía de administración. Además, se deben tener en cuenta otras complicaciones: silenciamiento de la expresión del transgén, o generación de una respuesta del SIA contra el producto del transgén (si es reconocido como una secuencia extraña), lo cual puede llevar a la eliminación de las células transducidas que lo están expresando [220].

Los métodos de producción de AAVs recombinantes (rAAVs) han evolucionado a lo largo del tiempo. Originalmente requerían la co-transfección de células HEK-293 con dos plásmidos: uno codificante para *rep* y *cap*, y el otro con el genoma recombinante de AAV, y luego se infectaban las células con un adenovirus *helper* no replicativo de primera generación para activar la replicación del genoma recombinante de AAV. Sin embargo, este protocolo tiene el inconveniente de que pueden presentarse contaminaciones con el virus *helper* tras la purificación [219]. Para solucionar esto, se modificó la producción a una co-transfección de las células HEK-293 (que expresan los genes E1a y E1b de adenovirus en forma constitutiva, necesarios para la producción de las partículas de AAV), con tres plásmidos: uno codificante para *rep* y *cap*, otro con el genoma recombinante de AAV, y un plásmido “auxiliar” que codifica para los genes de adenovirus necesarios para la replicación y producción de las partículas de AAV [222]. Actualmente, la producción de las partículas de rAAV se puede realizar a partir de un sistema de dos plásmidos: el codificante para el genoma recombinante de AAV, y otro plásmido que contiene tanto los genes *rep* y *cap* como los genes del virus *helper* necesarios, co-transfectando células HEK-293 (Fig. 9) [225]. Los métodos de purificación de las partículas virales recombinantes producidas están centrados en el empleo de ultracentrifugaciones en gradientes de cloruro de cesio o iodixanol. También se han desarrollado distintas técnicas cromatográficas con este fin [219].



**Fig. 9. Estrategias para la producción de rAAVs.** Las células HEK-293(T) son co-transfectadas con dos o tres plásmidos, dependiendo del sistema utilizado: uno conteniendo el genoma recombinante de AAV (es decir, el cassette de expresión del gen de interés flanqueado por los ITRs), y uno o dos plásmidos que aporten las proteínas necesarias para la replicación del genoma y la generación de las partículas de rAAVs (*rep* y *cap* de AAV, y E2A, VA y E4 de adenovirus). Además, en el sistema de dos plásmidos, se puede incluir un gen codificante para una proteína fluorescente (*fp*), para facilitar el monitoreo de la eficiencia de transfección de las células a las 24 horas. Luego de 48 horas de la transfección, los rAAVs producidos pueden ser recogidos. Figura adaptada de Grimm y col., 2002 [222].

El genoma recombinante de AAV puede persistir durante largos períodos de tiempo en algunos órganos luego de la transducción, como el hígado o el músculo esquelético, por lo que se puede lograr una expresión estable y a largo plazo de una gran variedad de transgenes. Sin embargo, al carecer de los genes virales (en particular el gen rep), el genoma del AAV recombinante no puede integrarse en el genoma celular, y por lo tanto su estabilidad en las células no se debe a este proceso. Se ha descrito que la presencia del ADN simple hebra del rAAV en la célula transducida es muy transitoria, ya sea porque es eliminado por nucleasas o porque se convierte rápidamente a ADN de doble hebra tras la desencapsidación de la partícula viral [226]. La formación de ADN de doble hebra es un paso decisivo para la conversión del ADN de rAAV hacia un estado transcripcionalmente activo, y existen dos maneras en que esto puede ocurrir: la síntesis *de novo* de la cadena complementaria de un genoma recombinante a partir del extremo 3' del genoma, en el ITR, o el apareamiento inter-molecular de dos genomas de polaridades opuestas (esto es posible ya que ambas polaridades del genoma se empaquetan correctamente) [223].

Posteriormente, estos ADN doble hebra pueden generar formas circulares de ADN (episomas) a través de la recombinación intramolecular de sus ITRs, o concatémeros lineales a partir de la recombinación intermolecular de los ITRs. Los episomas también pueden generar concatémeros de alto peso molecular a lo largo del tiempo [227,228]. Estas formas de ADN extracromosómico constituyen moldes de ADN transcripcionalmente activos, y son los responsables de la expresión sostenida del transgén. Además, en el hígado también puede encontrarse una pequeña parte del genoma recombinante del AAV integrado en el ADN cromosómico (un porcentaje menor al 10% del total) [229]. Sin embargo, esta integración es un proceso pasivo dependiente de la preexistencia de rupturas cromosómicas y de enzimas de la célula encargadas de la reparación de estos daños en el ADN mediante la unión de extremos no homólogos. La integración en el genoma celular es una desventaja porque puede generar la inactivación de genes necesarios para la célula o la desregulación de genes supresores de tumores. Sin embargo, los potenciales problemas relacionados con la integración del genoma del rAAV, al ser dependientes de los procesos que ocurren en la célula, son menores que los que ocurren con la integración autónoma de los retrovirus, lo que les da mayor seguridad para su uso en la terapia [223].

En la clínica, se encuentra aprobado por la EMA el tratamiento con un rAAV para la deficiencia de la lipoprotein-lipasa (Glybera®), y recientemente la FDA aprobó el tratamiento con un rAAV en pacientes con distrofia retinal debido a mutación bialélica del gen *RPE65* (Luxturna). Además, muchos otros rAAVs con potencial terapéutico se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos [220].

En esta tesis se propone utilizar un vector de AAV para lograr la expresión de un nanobody inhibidor de la unión PD-1/PD-L1 en las células del propio individuo. Esto puede conferir dos ventajas principales con respecto a la administración sistémica del mismo nanobody en forma de proteína recombinante: 1) se podría concentrar la

expresión del nanobody en el sitio de interés disminuyendo significativamente sus niveles en suero, lo que puede conferir protección frente al desarrollo de efectos adversos a nivel sistémico (como es el caso de los anticuerpos convencionales que se administran por vía intravenosa), y 2) se puede lograr una expresión prolongada del nanobody sin necesidad de administrar repetidas dosis del agente terapéutico.

Además, otra ventaja que confieren los vectores de terapia génica es que otorgan cierta libertad para su modificación, según los objetivos que se deseen alcanzar o los problemas que se deban resolver. En este aspecto, el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra (Pamplona, España) posee amplia experiencia en el desarrollo de distintas variantes de rAAVs que presentan diferentes propiedades en cuanto a su biodistribución y la expresión del transgén. Algunas de las modificaciones que se podrían plantear a futuro para el mejoramiento del tratamiento con rAAVs codificantes para nanobodies son: 1) modificar el tropismo natural del vector viral evaluando distintos serotipos de rAAVs, para promover la transducción de las células del entorno tumoral [230], 2) explorar diferentes rutas de administración de los vectores virales para favorecer la transducción de células en el sitio de interés [231,232], 3) utilizar promotores específicos de las células del órgano afectado, permitiendo la expresión del nanobody únicamente en el sitio tumoral [233,234], y 4) generar sistemas de expresión inducibles a partir de promotores que se activen en presencia de una molécula inductora, permitiendo la regulación de la expresión del nanobody en caso de que se presenten efectos adversos o de que se logre la eliminación completa del tumor [235].

## 1.7 Objetivo general

Generar nanobodies bloqueantes de la unión PD-1/PD-L1 que posean potencial actividad antitumoral, y evaluar su eficacia terapéutica en un modelo murino de cáncer, promoviendo la expresión localizada de estos nanobodies en el sitio tumoral a través de un vector viral de terapia génica.

### 1.7.1 Objetivos específicos

- 1)** Seleccionar nanobodies específicos contra PD-1 y PD-L1 (variantes de humano y de ratón), mediante la técnica de *phage display*, a partir de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos obtenidas de llamas inmunizadas.
- 2)** Evaluar la capacidad de los nanobodies seleccionados en el punto 1 de bloquear la unión PD-1/PD-L1 en ensayos *in vitro*.
- 3)** Generar plásmidos que contengan el genoma recombinante de AAV y que codifiquen para los nanobodies bloqueantes de la unión PD-1/PD-L1 de ratón, y verificar la correcta expresión de los nanobodies a partir de estos vectores en células de mamífero *in vitro*.
- 4)** Evaluar la eficacia antitumoral de los nanobodies inhibidores de la unión PD-1/PD-L1 en un modelo murino de cáncer, administrándolos en forma sistémica como proteína recombinante o codificados a partir de vectores de AAV.

## 2. Materiales y métodos

---

### 2.1 Producción de ectodominios recombinantes de PD-1 y PD-L1

Los plásmidos para la expresión de los ectodominios de hPD-1, mPD-1 y hPD-L1 fueron cedidos por el Dr. Steven Almo (Albert Einstein College of Medicine, Nueva York, EE.UU.), cuyo grupo ha trabajado en la generación de las estructuras cristalográficas de dichas proteínas [96]. Se realizó la producción de los ectodominios recombinantes siguiendo el protocolo descrito por Zhang y col., 2002 [236], que se comentará a continuación, incluyendo algunas modificaciones.

Los vectores pET3a (Novagen, #69418) conteniendo el ADNc de los ectodominios mencionados anteriormente fueron transformados en células BL21(DE3) (Novagen, #69450) para la producción de las proteínas recombinantes. Las bacterias transformadas fueron crecidas a 37°C con agitación en medio LB (ver Tabla VIII) suplementado con ampicilina (Sigma-Aldrich, #A9518) hasta una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) de 0,5-0,7 UA, tras lo cual fueron inducidas con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma-Aldrich, #I5502) a una concentración final de 1 mM, para promover la expresión de las proteínas recombinantes. Posteriormente, el cultivo bacteriano se incubó durante 3 hs bajo las mismas condiciones, tras lo cual se centrifugó (5.000  $\times$  g, 20 min, 4°C). El precipitado celular fue resuspendido con buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 25% sacarosa, 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 10 mM ditioneitol (DTT), pH 8,0), y posteriormente sonificado manteniendo las bacterias en frío, durante 15 min (amplitud 60%, ciclos de 10 s pulso/10 s pausa).

Los ectodominios recombinantes se expresan en cuerpos de inclusión, por lo tanto, tras la lisis de las bacterias se centrifugó (10.000  $\times$  g, 15 min, 4°C) y el precipitado, conteniendo los cuerpos de inclusión, fue lavado 3 veces con buffer A (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 8,0), y un último lavado con el mismo buffer sin Triton X-100. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron con buffer B (10 mM acetato de sodio, 6 M clorhidrato de guanidina, 5 mM EDTA y 1 mM DTT, pH 4,6). Posteriormente, se centrifugó (15.000  $\times$  g, 15 min, 4°C) y el sobrenadante se filtró por 0,45  $\mu$ m (Millipore, #SLHV033R).

La concentración proteica total obtenida en el sobrenadante se estimó midiendo la absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción teórico de 16.500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Luego, las proteínas fueron renaturalizadas por el método de dilución: 16 mg de proteína se diluyeron en 16 mL de buffer C (10 mM acetato de sodio, 6 M clorhidrato de guanidina, 5 mM EDTA, pH 4,6), y pequeñas alícuotas de esta dilución se adicionaron mediante goteo (a un flujo de 0,5 mL/hora) a 1 L de buffer de renaturalización (100 mM Tris-HCl, 0,4 M arginina-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM cisteamina, 0,5 mM cistamina, pH 8,5), a 4°C con agitación, hasta completar los 16 mL.

El grado de pureza de los ectodominios fue determinado por SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie (ver Tabla VII). Se concentraron las muestras de proteína utilizando una columna de AMICON (Millipore, #UFC905008), y se dializaron (membrana de diálisis de Sigma-Aldrich, #D9277) contra buffer Tris (10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,0). Las alícuotas de cada proteína recombinante, a una concentración aproximada de 2 mg/mL, fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

## 2.2. Biotinilación química de los ectodominios de PD-1 y PD-L1

La biotinilación química de los ectodominios recombinantes de PD-1 (humano y murino) y hPD-L1, producidos en el punto 2.1, fue realizada utilizando el reactivo comercial Sulfo-NHS-biotina (Thermo Scientific, #21217).

Se utilizaron dos condiciones diferentes de biotinilación: con exceso de 4 o de 20 veces del reactivo Sulfo-NHS-biotina con respecto a los moles de los ectodominios recombinantes utilizados. Antes de comenzar la reacción de biotinilación, los ectodominios recombinantes purificados fueron dializados contra buffer fosfato salino (PBS).

Para la reacción de biotinilación, se preparó una solución del reactivo Sulfo-NHS-biotina a 10 mM en PBS e inmediatamente se agregó el volumen necesario de la misma a los ectodominios recombinantes en PBS, según los moles necesarios calculados. Se incubó durante 2 hs en hielo y luego la mezcla se dializó contra PBS para eliminar el exceso del reactivo comercial.

Para evaluar la incorporación de las moléculas de biotina a las proteínas, se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando el equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics, Billerica, MS, EE.UU.), con láser de nitrógeno de 337 nm, en modo positivo lineal. La calibración se realizó con mezcla de proteínas estándar comercial (Bruker Daltonics). En el momento del análisis se mezcló 1 µL de cada muestra con 1 µL de solución de matriz (ácido sinapínico 10 mg/mL, en 1:1 acetonitrilo:agua 0,1% ácido trifluoroacético). La muestra y la solución de matriz se mezclaron en placa de 96 spots para MALDI (Bruker Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente (T amb) durante 15 min. El láser se disparó en cinco zonas diferentes del spot correspondiente a cada muestra realizando 100 shots individuales, acumulando 500 shots por muestra, con 50% de intensidad del láser.

## 2.3. Mantenimiento de líneas celulares

A lo largo de esta tesis se utilizaron distintas líneas celulares de mamífero, manteniéndose en condiciones estándares de cultivo (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), y utilizando los medios de cultivo adecuados según la línea celular (ver Tabla I).

Todas las líneas celulares empleadas son comerciales excepto la línea HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup>, la cual expresa en su superficie hPD-L1 de forma estable. Esta línea fue provista por el CIMA, donde fue generada a partir de la infección de células HEK-293 con un vector lentiviral de segunda generación codificante para el ADNc completo de hPD-L1, y la posterior selección de clones que expresaran hPD-L1 en forma estable (aislados por dilución límite), mediante cultivo en presencia del agente de selección correspondiente (neomicina). En concreto, la línea proviene del crecimiento y expansión de uno de dichos clones.

Todas las líneas celulares utilizadas son adherentes y tienden a formar monocapas. Para el mantenimiento de las células en cultivo durante varios días o para su expansión, se crecieron las mismas hasta que éstas alcanzaran cierta confluencia (entre 60 y 90%, dependiendo de la línea celular), y luego se procedió a realizar los pasajes de las mismas. Para ello se utilizó una solución de tripsina 0,05%-EDTA 0,5 mM en PBS, la cual se incubó durante un par de minutos hasta observar el desprendimiento de la monocapa de células. A continuación, se inactivó la tripsina mediante el agregado de medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco, #10437028) al 10%. Las líneas celulares más susceptibles a la tripsina (CT26, MC-38, HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup>) se centrifugaron para eliminar el medio conteniendo esta enzima, mientras que el resto se dividieron diluyendo la tripsina con medio de cultivo (HEK-293, HuH7, BHK-21). Las células se diluyeron en un volumen final de 3 a 10 veces el inicial para luego dividir las en frascos de cultivo. Para la congelación de las células se utilizó una mezcla de SFB con dimetil-sulfóxido (DMSO) al 10%.

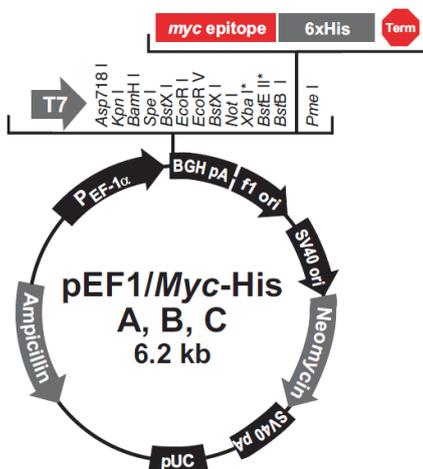
**Tabla I. Líneas celulares utilizadas y medios de cultivo para su mantenimiento.** Las concentraciones de los distintos suplementos son: L-glutamina 2 mM, P/S (mix penicilina/estreptomicina) al 1%, neomicina 50 µg/mL, HEPES 20 mM, TPB (caldo triptosa fosfato) al 10%, 2-mercaptoetanol 0,1 mM. Los medios de cultivo utilizados, así como los distintos suplementos, pertenecen a Gibco (Thermo Scientific).

Línea celular	Origen	Tipo de célula	Medio de cultivo	Suplementos
HEK-293(T) (ATCC, #CRL-1573 o #CRL-11268)	Línea embrionaria de riñón humano	Epitelial	DMEM	SFB 10%, L-glutamina, P/S
HEK-293/hPD-L1 <sup>E</sup>	Línea embrionaria de riñón humano, transfectada en forma estable	Epitelial	DMEM	SFB 10%, L-glutamina, P/S, Neomicina
CT26 (ATCC, #CRL-2638)	Carcinoma de colon murino (cepa BALB/c)	Fibroblasto	RPMI-1640	SFB 10%, P/S
BHK-21 (ATCC, #CCL-10)	Riñón de hámster sirio ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	Fibroblasto	GMEM	SFB 5%, L-glutamina, P/S, HEPES, TPB
HuH7 (Sigma-Aldrich, #01042712)	Carcinoma de hepatocitos humano	Epitelial	DMEM	SFB 10%, L-glutamina, P/S
MC-38 (Kerafast, #ENH204)	Carcinoma de colon murina (cepa C57BL/6)	Epitelial	RPMI-1640	SFB 10%, L-glutamina, P/S, HEPES, 2-mercaptoetanol

## 2.4. Transfecciones transitorias de células HEK-293 con PD-1 y PD-L1

Las transfecciones transitorias de las células HEK-293 con PD-1 y PD-L1 se realizaron utilizando un plásmido para expresión en células de mamífero: pEF1/Myc-His versión C (Thermo Scientific, #V92120), en el cual se clonaron los ADNc completos de las proteínas que se querían expresar en las células. Este plásmido contiene el promotor humano EF-1 $\alpha$  (factor de elongación 1 $\alpha$ ), el cual es de expresión fuerte y permite la sobre-expresión del gen que se encuentra bajo su control (Fig. 10). Además, el plásmido codifica para el gen de resistencia a la ampicilina (que permite la amplificación del plásmido en bacterias) y a la neomicina (para la selección de las células transfectadas).

Los ADNc completos (incluyendo cola citoplasmática, región transmembrana y dominio extracelular) de PD-1 y PD-L1 (humano y murino) fueron subclonados en el vector pEF1/Myc-His. Dichos ADNc fueron sintetizados por la empresa IDT (*Integrated DNA technologies*), según los datos recabados en el GenBank (números de acceso a secuencias: NM\_005018, X67914, NM\_014143.3 y NM\_021893.3 para hPD-1, mPD-1, hPD-L1 y mPD-L1, respectivamente). Cada ADNc se adquirió clonado en un plásmido proporcionado por la empresa citada. En el caso de hPD-L1, el ADNc fue obtenido a partir de la línea HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup>, mediante extracción de ARN con el reactivo Trizol (Invitrogen, #15596026), generación de ADNc utilizando oligonucleótidos de timidina (oligo dT primer, Invitrogen, #18418012) y posterior amplificación del ADNc de hPD-L1 con cebadores específicos. Estos resultados son parte de la tesina de licenciatura en Bioquímica (Facultad de Ciencias-Universidad de la República) de Diego Pérez Escanda, que fue realizada en nuestro laboratorio y culminada en 2016.



**Fig. 10. Mapa del vector pEF1/Myc-His utilizado para la expresión de PD-1 y PD-L1 en células HEK-293.** Para el subclonaje de PD-1 (humano y murino) se utilizaron las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, y para PD-L1 las enzimas EcoRI y NotI.

Los subclonajes de cada ADNc se realizaron de la siguiente manera: en el caso de PD-1, los ADNc de las variantes humana y murina fueron amplificados a partir de los plásmidos adquiridos utilizando un cebador directo con un sitio para la enzima BamHI y uno reverso con el sitio EcoRI, y en el caso de PD-L1, se utilizaron cebadores con los

sitios de restricción para EcoRI (cebador directo) y NotI (cebador reverso). Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla II.

Tras amplificar los genes por PCR, se purificaron utilizando un kit comercial (Thermo Scientific, #K0701). Posteriormente se realizaron las digestiones con las correspondientes enzimas de restricción a partir de 10-15 µg de ADN purificado.

Las reacciones de digestión se llevaron a cabo de forma individual debido a que no eran compatibles. Cada digestión se realizó durante al menos 4 hs a 37°C, con un exceso de unidades de enzima de 5 veces con respecto a la cantidad de ADN. En el caso del ADNc de PD-1 (humano y murino), primero se digirió con EcoRI (NEB, #R0101), y luego de purificar mediante kit, se realizó la digestión con BamHI (NEB, #R0136). El producto final de estas digestiones fue corrido en un gel de agarosa 1% y se purificó la banda de ADN utilizando un kit comercial (Thermo Scientific, #K0691). En el caso del ADNc de PD-L1 el proceso fue similar: primero se realizó la digestión con EcoRI y luego con NotI (NEB, #R0189).

Para la preparación del vector pEF1/Myc-His para los clonajes, se digirieron 30 µg de vector con EcoRI a 37°C durante toda la noche (O/N, del inglés: “*overnight*”), se purificó el ADN obtenido y posteriormente se realizó la digestión con BamHI o con NotI, durante 6 hs a 37°C. Los productos de las dos digestiones dobles fueron purificados con kit comercial tras ser corridos en un gel de agarosa 1%. Por último, las dos versiones del vector fueron tratadas con la desfosforilasa rSAP (NEB, #M0371) para disminuir la religación del vector, según las instrucciones de la casa comercial.

**Tabla II. Cebadores utilizados para la amplificación de los ADNc de PD-1 y PD-L1 para su subclonaje en el vector pEF1/Myc-His.** Los sitios de corte de las enzimas de restricción empleadas se encuentran subrayados.

Cebador	Secuencia (5' - 3')
hPD-1 directo (BamHI)	<u>GGATCC</u> ATGCAGATCCCACAGGCGCC
hPD-1 reverso (EcoRI)	<u>GAATTC</u> TCAGAGGGGCAAGAGCAGTG
mPD-1 directo (BamHI)	<u>GGATCC</u> ATGTGGGTCCGGCAGGTA
mPD-1 reverso (EcoRI)	<u>GAATTC</u> TCAAAGAGGCAAGAACAATGTCC
hPD-L1 directo (EcoRI)	<u>GAATTC</u> ATGAGGATATTTGCTGTCTTTATATTCATGACC
hPD-L1 reverso (NotI)	<u>GCGGCCG</u> CTTACGTCTCCTCAAATGTGTATCAC
mPD-L1 directo (EcoRI)	<u>GAATTC</u> ATGAGGATATTTGCTGGCATTATATTCACAG
mPD-L1 reverso (NotI)	<u>GCGGCCG</u> CTTACGTCTCCTCGAATTGTGTATCATTTCCGG

Las ligaciones del vector con los insertos se realizaron con 200 ng de vector y con una relación inserto:vector de 3:1, en 10 µL finales de reacción utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Invitrogen, #15224). Las ligaciones fueron realizadas a 22°C durante 1 hora, y luego se inactivó la enzima incubando la mezcla a 65°C durante 10 min. A continuación, se utilizó 1 µL de la ligación para transformar bacterias competentes BL21(DE3).

Se seleccionaron 12 colonias de cada ligación para chequear la presencia de inserto por PCR. Se hicieron maxipreps a partir de una de las colonias positivas obtenidas y los subclonajes en el nuevo plásmido se verificaron por digestión con las enzimas de restricción utilizadas durante el proceso.

Para la puesta a punto de las transfecciones de las células HEK-293, se utilizó un plásmido conteniendo el ADNc de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor de citomegalovirus (CMV). Esto permite estimar fácilmente la eficiencia de transfección mediante la observación directa de las células en un microscopio de fluorescencia, o analizando la fluorescencia de las mismas por citometría de flujo. Las transfecciones se pusieron a punto tanto en placas de cultivo de 6 pocillos (Greiner, #657185) como en placas circulares de 15 cm de diámetro (p150, Sigma-Aldrich, #CLS430599), variando para cada caso la cantidad de células plaqueadas, la concentración final agente de transfección y la cantidad ADN (plásmido codificante para GFP). El agente de transfección utilizado en este caso fue el polímero catiónico lineal polietilenimina (PEI) de 25 kDa (Polysciences, #23966). También se realizó un seguimiento de la expresión de GFP durante los tres días siguientes a la transfección a través de la observación de las células en el microscopio de fluorescencia, para establecer el pico de expresión de la proteína.

Las condiciones óptimas de transfección a pequeña escala realizadas en placas de 6 pocillos se utilizaron para generar transfectantes para las rondas de *panning* sobre células (sección 2.6). Para el *screening* de clones positivos (sección 2.7), se generaron stocks de células transfectadas con alta expresión de la proteína de interés, mediante transfección de 4-6 placas p150, y posterior congelación de las mismas a -80°C en SFB con 10% de DMSO, hasta el momento de su utilización en ensayos de citometría de flujo.

## 2.5. Inmunización de llamas y generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos

**I. Inmunizaciones:** Durante este proyecto se generaron tres bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos a partir de tres llamas (*Lama glama*) hembras adultas inmunizadas con distintos antígenos. De aquí en más, se denominará a cada biblioteca según el orden cronológico en el que fueron generadas (ver Tabla III).

El protocolo de inmunización de las llamas fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales del Parque Lecocq - IMM (protocolo denominado: "Inmunización de llamas (*Lama Glama*) para la preparación de bibliotecas de anticuerpos"). La manipulación de los animales fue llevada a cabo por veterinarios del Parque Lecocq. Las inmunizaciones se realizaron por vía subcutánea.

El cronograma de inmunización cuando se utilizaron las proteínas recombinantes (bibliotecas 1 y 2) constó de 4 dosis, separadas entre sí por 3 semanas, con

aproximadamente 600 µg de proteína por dosis en adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, # F5506). Una semana luego de la última dosis se recolectaron 150-200 mL de sangre del animal inmediatamente adicionada con un volumen de anticoagulante (citrato de sodio al 3,8%) cada 4 volúmenes de sangre, para generar la biblioteca.

En el caso de la biblioteca 3, el cronograma de inmunización fue diferente: se administraron 3 dosis de las células en suero fisiológico, las primeras dos con las células HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup> (60 millones de células/dosis), y la última con una combinación de células HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup> y CT26 (50 millones de células de cada línea celular). La línea celular CT26 proviene de carcinoma de colon murino y expresa constitutivamente mPD-L1 [237]. Al igual que para las bibliotecas previas, se recolectó sangre de la llama para generar la biblioteca luego de una semana de la última dosis.

**Tabla III. Cronograma de inmunización de las llamas para la generación de las distintas bibliotecas de nanobodies empleadas en esta tesis.**

Biblioteca	Antígeno de inmunización	Dosis administradas	Cantidad de antígeno/dosis
1	Ectodominio recombinante de PD-1 humano	4	600 µg
2	Ectodominios recombinantes de PD-1 murino y PD-L1 humano	4	600 µg de cada antígeno
3	Línea celular HEK-293/hPD-L1 <sup>E</sup>	3	5 x10 <sup>7</sup> - 6x10 <sup>7</sup> células
	Línea celular CT26	1	5x10 <sup>7</sup> células

Las respuestas de las llamas a los antígenos se evaluaron a lo largo del proceso de inmunización mediante ELISA, midiendo el título de anticuerpos totales contra el antígeno que se usó en la inmunización, empleando un anticuerpo policlonal de conejo contra IgG de llama.

En el caso de la llama inmunizada con las líneas celulares, se realizó una extracción de las proteínas de las células utilizadas utilizando el detergente no-iónico Triton X-100, el cual es capaz de solubilizar las proteínas de membrana. La extracción de las proteínas se realizó incubando las células (aproximadamente 2x10<sup>7</sup> de cada línea celular) con 1 mL de Triton X-100 1% en PBS durante 30 min a T amb, y luego sonicándolas en frío durante 5 min (amplitud 40%, ciclos de 5 s pulsos/5 s pausa). Posteriormente se centrifugó a 20.000 × g (20 min, 4°C), y el sobrenadante (conteniendo la fracción proteica) se separó y se guardó para utilizar en el tapizado de los pocillos de la placa de microtitulación. De esta manera se analizó el título de anticuerpos de la llama contra las fracciones proteicas totales obtenidas de ambas líneas celulares.

**II. Generación de bibliotecas:** Para la generación de las bibliotecas, los leucocitos mononucleares de sangre periférica fueron purificados mediante separación por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, #10771), a partir de la sangre recolectada al final de las inmunizaciones. La extracción de ARN total de dichos

leucocitos se llevó a cabo empleando el reactivo Trizol (Ambion, #15596-026) a partir de  $4 \times 10^7$  células según las instrucciones del fabricante. El ADNc fue sintetizado empleando un kit de RT-PCR (Invitrogen, #18080-051) y el cebador reverso JH (Tabla IV). Los fragmentos de ADN que codifican para los VHHs fueron amplificados por PCR usando un mix de 3 cebadores directos (VH1, VH3 y VH4) y el cebador reverso genérico JH (ver Tabla IV). Tanto los cebadores directos como el reverso contienen sitios de restricción para la enzima Sfil, que al ser digeridos generan extremos cohesivos no complementarios entre sí, permitiendo el clonaje de los nanobodies de forma dirigida como se explicó previamente (sección 1.5.3).

**Tabla IV. Cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias de los nanobodies.** Se utilizó un mix de cebadores directos que amplifica para las distintas familias de nanobodies (VH1, VH3 y VH4) y un cebador reverso genérico (JH). Todos los cebadores contienen un sitio de restricción para Sfil (subrayado).

Cebador	Secuencia (5' - 3')
VH1	CATGCCATGACTCGC <u>GGCCCAGGCGGCC</u> CATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG TCTGG
VH3	CATGCCATGACTCGC <u>GGCCCAGGCGGCC</u> CATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAG TCTGG
VH4	CATGCCATGACTCGC <u>GGCCCAGGCGGCC</u> CATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG TCGGG
JH	CCACGATTCT <u>GGCCGGCCTGGCCT</u> GAGGAGACRGTGACCTGGGTCC

Los ADNc de los nanobodies obtenidos mediante la amplificación con los distintos cebadores fueron clonados en el vector fagémido pComb3X (Creative Biogene, #VPT4012), cedido gentilmente por el Dr. Barbas (The Scripps Research Institute, La Jolla, EE.UU), tras su digestión con Sfil (NEB, #R01235).

Para la ligación de los nanobodies con el vector pComb3X se utilizó gran cantidad de ADN (12 µg de vector y 4 µg de insertos), y se realizó a 22°C O/N, tras lo cual se inactivó la enzima T4 ligasa (Invitrogen, #15224). La mezcla de ligación fue precipitada utilizando 300 mM de acetato de sodio, 10 µg de glicógeno y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó O/N a -80°C, y al día siguiente la mezcla se descongeló y centrifugó a 20.000 x g (20 min, 4°C). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó cuidadosamente con etanol absoluto, se centrifugó nuevamente descartando el sobrenadante, y el precipitado final de ADN se secó y resuspendió en 20 µL de agua.

El vector ligado con los genes de los nanobodies fue electroporado en células electrocompetentes de elevada eficiencia *E. coli* ER2738 (Lucigen, #60522). Las células transformadas fueron inmediatamente resuspendidas en medio SOC (ver Tabla VIII) alcanzando un volumen final de 10 mL, y se incubaron a 37°C con agitación. Al cabo de 1 hora se tomó una alícuota del cultivo para titular el número de colonias transformadas y evaluar así la diversidad de la biblioteca obtenida.

El resto del cultivo de bacterias transformadas se utilizó para la producción de fagos, empleando el fago *helper* M13KO7 (Invitrogen, #18311019). Para ello, el cultivo se diluyó a 50 mL finales de medio SB (ver Tabla VIII) adicionado con ampicilina a 33 µg/mL, se dividió en 4 matraces pequeños (de 50 mL) y se incubó a 37°C con agitación durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se agregó el resto de la ampicilina hasta obtener una concentración final de 100 µg/mL, y se incubó otra hora en las mismas condiciones. Luego, se transfirió el contenido de los matraces a un matraz grande (de 2 L), se agregaron 350 mL de SB-ampicilina 100 µg/mL y  $10^{12}$  partículas de fago *helper* M13KO7. El cultivo se incubó durante 2 hs a 37°C con agitación, tras lo cual se adicionó el antibiótico kanamicina (Sigma-Aldrich, #60615) a una concentración final de 70 µg/mL, para la selección de las bacterias infectadas con el fago *helper*. Se incubó a 37°C con agitación O/N, y al día siguiente se realizó la precipitación de los fagos producidos.

Para la precipitación, primero se centrifugó el cultivo 2 veces consecutivas (6.000 × g, 15 min cada centrifugación, 4°C), separando el sobrenadante en ambos casos y descartando los precipitados. Luego de la segunda centrifugación, el sobrenadante se incubó con 0,2 volúmenes de una solución de polietilen-glicol 8.000 (PEG-8000, Sigma-Aldrich, #1546605) al 20% y NaCl 2,5 M, durante 1 hora en hielo. Posteriormente se centrifugó a 12.000 × g (20 min, 4°C). El precipitado (conteniendo los fagos) se resuspendió en 100 mL de PBS y se repitió el proceso de precipitación una vez más, resuspendiendo el producto final con 15 mL de una solución de seroalbúmina bovina (PBS, Sigma-Aldrich, #A2153) al 3% en PBS. Se filtró por 0,22 µm (Millipore, #SLGV033R) para eliminar restos bacterianos, y la biblioteca de fagos resultante fue almacenada a -80°C tras adicionar inhibidor de proteasas (Roche, #13744100).

## 2.6. Selección de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1

Para aislar nanobodies específicos contra los ectodominios de PD-1 y PD-L1 a partir de las bibliotecas generadas, se realizaron rondas de selección sucesivas (*panning*), como se explicó en la sección 1.5.3. A lo largo del proyecto se utilizaron dos estrategias de selección, que consistieron en la incubación de la biblioteca con: 1) los ectodominios recombinantes de PD-1 o PD-L1, adsorbidos en pocillos de placas de microtitulación, o 2) las células HEK-293 transfectadas transitoriamente con los ADNc de PD-1 o PD-L1.

**I. *Panning* sobre ectodominios recombinantes:** Los pocillos de la placa de microtitulación (Greiner, #655081) se sensibilizaron con los ectodominios de PD-1 o PD-L1 producidos en el laboratorio (sección 2.1), O/N a 4°C. El número de pocillos sensibilizados y la concentración de proteína utilizada variaron según el *panning*. Luego de la sensibilización, los pocillos se bloquearon con 300 µL de BSA 1% en PBS durante 1 hora a T amb. Después de lavar con PBS-Tween 0,05% (PBS-T), los pocillos se incubaron durante 1 hora a T amb con agitación con 100 µL de la biblioteca (en la primera ronda de *panning*), o con 100 µL del *output* amplificado de la ronda de *panning*

anterior (en las rondas sucesivas). Luego de la incubación con los fagos, se realizaron 3 tandas de 8 lavados cada una con PBS-T, separadas por 5 min de incubación con agitación a T amb, para eliminar los fagos sin especificidad por la proteína utilizada en el *panning*. Posteriormente se eluyeron aquellos fagos específicos incubando cada pocillo con 100  $\mu$ L de tripsina (Sigma-Aldrich, #T4799) a 10 mg/mL en buffer Tris-salino (TBS, ver Tabla VII) durante 30 min a 37°C. Luego de pipetear 20 veces vigorosamente el contenido de los pocillos, se separó el eluido y se le adicionó 10  $\mu$ L de inhibidor de tripsina (Sigma-Aldrich, #T9253) a 100 mg/mL en TBS. El *output* obtenido se utilizó para su amplificación, cuantificación o *screening* de clones específicos para la proteína de interés. Los procedimientos para la amplificación y la cuantificación de los *outputs* se explicarán más adelante en esta misma sección (puntos III y IV). Las estrategias para el *screening* de clones positivos se explicarán en la sección 2.7.

**II. Panning sobre células HEK-293 transfectadas:** En este caso los *pannings* se realizaron en microtubos, en donde se incubaron los fagos en presencia de las células. Para estos *pannings* se utilizaron tanto células HEK-293 transfectadas con PD-1 o PD-L1 (que se denominarán células HEK-293 “positivas”), como células HEK-293 sin transfectar. Previo a comenzar el *panning*, las células se recogieron de la placa de cultivo y se lavaron con PBS. Se resuspendieron a  $10^7$  células/mL en buffer de citometría frío (FCB, ver Tabla VII)

En primer lugar, la biblioteca o el *output* amplificado de la ronda de selección anterior, se pre-incubó con células HEK-293 sin transfectar, de manera de eliminar los fagos que se unen a componentes propios de la célula. Tras 1 hora de incubación a T amb con rotación, se centrifugó a  $500 \times g$  por 5 min y el sobrenadante (conteniendo los fagos que no se unieron a las células HEK-293) se separó y se incubó con las células HEK-293 positivas para el antígeno, durante 1 hora en las mismas condiciones. Posteriormente, se centrifugaron las células y se realizaron 4 lavados con 1 mL de FCB en cada uno. Por último, el precipitado de células se resuspendió con 150  $\mu$ L de tripsina a 10 mg/mL en TBS, y se incubó 30 min a 37°C con agitación. Se adicionaron 15  $\mu$ L de inhibidor de tripsina a 100 mg/mL en TBS, se centrifugó a  $20.000 \times g$  por 1 min y se separó el sobrenadante conteniendo los fagos eluidos.

**III. Amplificación de los *outputs*:** Previo a comenzar con la amplificación, se separó una alícuota de cada *output* para su titulación, como se describe en el punto IV. La amplificación se realizó de forma similar a la descrita para la producción de fagos durante la construcción de la biblioteca (sección 2.5, punto II).

Para amplificar el *output* de una ronda de *panning* y utilizarla en la siguiente, se incubó 150-300  $\mu$ L del *output* con 2 mL de *E. coli* ER2738 (previamente crecidas en SB hasta una  $OD_{600nm}$  de 0,8-1 UA), a 37°C durante 30 min sin agitación, permitiendo así la infección de las bacterias por las partículas virales. Posteriormente el cultivo se diluyó hasta un volumen de 12 mL finales con SB-ampicilina a 33  $\mu$ g/mL y se incubó a 37°C con agitación (250-300 rpm) durante 1 hora, para luego adicionar ampicilina hasta una

concentración final de 100 µg/mL e incubar 1 hora más en las mismas condiciones. Posteriormente se agregaron  $5 \times 10^{10}$  partículas de fago *helper* M13KO7, y se incubó 2 hs en iguales condiciones. Por último, se agregó kanamicina hasta una concentración final de 70 µg/mL, y se incubó a 37°C con agitación O/N. Al día siguiente el cultivo se centrifugó a  $20.000 \times g$  (20 min, 4°C), obteniendo las bacterias en el precipitado y los fagos amplificados en el sobrenadante. Este último se incubó durante 1 hora en hielo con 0,2 volúmenes de una solución de PEG-8000 al 20% y NaCl 2,5 M para precipitar los fagos, y tras su centrifugación ( $20.000 \times g$ , 20 min, 4°C), el precipitado de partículas virales se resuspendió en 1 mL de PBS-BSA 3%. Para evitar posibles contaminaciones con células bacterianas remanentes, la preparación se filtró por 0,22 µm, y se añadió inhibidor de proteasas (Roche, #13744100).

**IV. Titulación de fagos:** Para la cuantificación de los *outputs* y de sus correspondientes amplificados se infectaron alícuotas de 100 µL de bacterias *E. coli* ER2738 crecidas en SB hasta una  $OD_{600nm}$  de 0,8-1,0 UA, con diluciones seriadas de los fagos correspondientes. La infección se realizó agregando 10 µL de la dilución de fagos a 100 µL de células e incubando durante 30 min a 37°C sin agitación. El volumen total de células infectadas fue sembrado en placas de LB agar-ampicilina, que se incubaron a 37°C O/N. Al día siguiente se contabilizaron las colonias obtenidas, y se calculó la cantidad total de fagos infectivos por mL de solución considerando el factor de dilución correspondiente. El título de fagos se expresó como unidades formadoras de colonias por cada 1 mL de solución de fagos (ufc/mL).

## 2.7. *Screening* de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1

En general, la búsqueda de nanobodies que reconocieran el antígeno de interés (“clones positivos”) se realizó tras la tercera ronda de selección de los distintos *pannings*. El *screening* se realizó tanto en ELISA como en citometría de flujo, como se describe más adelante.

**I. Producción de nanobodies:** A partir de las placas de agar de las titulaciones de la última ronda de selección de cada *panning*, se seleccionaron colonias al azar para hacer producción de los nanobodies a pequeña escala. Las producciones se realizaron en bloques de cultivo de 96 pocillos (en 500 µL de cultivo) o en tubos estériles de 10 mL (en 2 mL de cultivo).

Las bacterias fueron crecidas a 37°C O/N con agitación en LB-ampicilina. En los bloques de cultivo, se dejaron de 2 a 4 pocillos sin inocular para controlar la contaminación entre pocillos. Al día siguiente, se hizo una dilución 1/100 de los cultivos a otro bloque o tubo, dependiendo el caso, y se dejaron crecer las bacterias hasta una  $OD_{600nm}$  de 0,5-0,8 UA, tras lo cual se indujo la producción de los nanobodies con IPTG 1 mM. El cultivo se incubó O/N a 37°C con agitación para maximizar la cantidad de nanobody en el sobrenadante, ya que el vector pComb3X no es un buen sistema para la producción de

grandes cantidades de proteína. Al día siguiente, los cultivos fueron centrifugados a  $3.500 \times g$  (15 min, 4°C), y los sobrenadantes fueron separados para el *screening* de clones positivos en ELISA y citometría de flujo.

**II. Screening en ELISA:** Para los *screenings* en ELISA, se sensibilizaron placas de microtitulación (Greiner, #655081) con los ectodominios recombinantes de PD-1 (humano o murino), o PD-L1 humano producidos en el laboratorio. Los ectodominios se adsorbieron directamente en la placa o se utilizaron sus versiones biotiniladas capturadas por avidina (Pierce, #21121). También se incluyeron pocillos tapizados solo con avidina o con BSA, para verificar la especificidad de los nanobodies evaluados.

El tapizado se realizó O/N a 4°C con 100 µL/pocillo de una solución del ectodominio recombinante o de avidina a 1 µg/mL en PBS. Al día siguiente, los pocillos se bloquearon con 300 µL/pocillo de BSA 1% en PBS durante 1 hora a T amb, sensibilizándose también los pocillos controles solo con BSA. En los casos correspondientes, se capturó el ectodominio recombinante biotinilado en los pocillos sensibilizados con avidina, durante 1 hora a T amb, utilizando 100 µL/pocillo de una solución a 1 µg/mL en solución diluyente (PBS-BSA 0,2%-Tween 0,05%). Los sobrenadantes conteniendo los nanobodies se utilizaron a una dilución 1/4 en solución diluyente, incubándose 1 hora a T amb con agitación (100 µL/pocillo). Por último, se incubó con un anticuerpo secundario contra el epítotope HA asociado a la peroxidasa de rábano o HRP (Roche, #12013819001), 1 hora a T amb, y se reveló con el sustrato TMB (ver Tabla VII). La reacción de revelado se incubó un máximo de 20 min y se detuvo con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N (50 µL/pocillo).

**III. Screening en citometría:** En una primera instancia se chequeó la reactividad de los clones contra las células HEK-293 positivas para la proteína de interés. Los clones positivos obtenidos durante esta etapa (aquellos que reconocieron a las células HEK-293 transfectadas), fueron posteriormente enfrentados en paralelo a las células HEK-293 positivas para la proteína de interés y a las células HEK-293 sin transfectar como control de especificidad de los clones.

Para la citometría, las células se recogieron de la placa de cultivo o se descongelaron con medio atemperado, se centrifugaron, se lavaron con 10 mL de FCB, y se resuspendieron en FCB a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL. Se utilizaron placas con fondo en V (Deltalab, #900012), sembrándose 50 µL de células/pocillo (250.000 células/pocillo). Se evaluaron los sobrenadantes de los clones en forma individual, agregando 50 µL/pocillo del sobrenadante correspondiente e incubando durante 1 hora en hielo. Posteriormente se realizaron 3 lavados con 180 µL/pocillo de FCB. Luego se incubó con un anticuerpo secundario anti-HA marcado con el fluoróforo ficoeritrina (Abcam, #ab72564), (dilución 1/300), durante 1 hora en hielo y cubierto de la luz. Por último, se realizaron 4 lavados como se describió anteriormente y las células fueron analizadas en un citómetro de flujo (BD FACSCalibur). Como control negativo se incluyó en todos los *screenings* un nanobody con especificidad irrelevante, y también se analizaron las células marcadas solamente con el anticuerpo secundario del

experimento. Todos los datos de citometría de flujo fueron analizados con el programa FlowJo 7.6.5 (FlowJo LLC, Ashland, EE.UU.).

## 2.8. Subclonaje de nanobodies a vector de expresión procariota

Los nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1 seleccionados en la sección anterior, fueron subclonados desde el vector pComb3X a un vector que permitiera mayores niveles de expresión en sistemas procariotas.

Se utilizó un vector derivado del sistema de expresión de los vectores pET, en donde la expresión del gen clonado se encuentra regulada por el promotor de la ARN polimerasa T7. El plásmido se transforma en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), que contiene el gen de la ARN polimerasa T7 inserto en el genoma bacteriano, cuya expresión está regulada por el promotor del operón lac. Además, la expresión del gen blanco a partir del promotor de la ARN polimerasa T7 también está regulado por el promotor del operón lac, lo cual asegura que el mismo no sea transcrito en caso de que se exprese una pequeña cantidad de ARN polimerasa T7 de forma espontánea. En presencia de un inductor del promotor del operón lac, como el IPTG, se induce la expresión de la ARN polimerasa T7 y la subsecuente expresión del gen blanco. Este sistema permite una expresión elevada del transgén de forma muy regulada.

Los nanobodies se clonaron en el vector pINQ-OmpA (Fig. 11), el cual fue generado en nuestro laboratorio a partir del vector pET28a(+) (Novagen, #69864-3). Contiene una la secuencia señal de localización periplasmática OmpA en dirección 5' del nanobody, y dos *tags* en dirección 3' del nanobody, útiles para la purificación y la detección del mismo una vez expresado (una cola de seis histidinas y un epítotope de HA).



**Fig. 11. Diagrama esquemático del cassette de expresión del vector pINQ-OmpA.** El VHH clonado entre los sitios de corte no homólogos de SfiI se expresa en forma soluble en el periplasma debido a la secuencia señal OmpA, y asociado a una cola de seis histidinas (6xHis) y a un epítotope HA. La expresión del VHH está regulada por un promotor T7 inducible por IPTG.

Para el subclonaje de los distintos nanobodies, se realizaron minipreps de ADN plasmídico a partir de las colonias aisladas utilizando un kit comercial (Thermo Scientific, #K0503). Luego se amplificaron los genes de los nanobodies por PCR utilizando cebadores genéricos para la amplificación de los nanobodies independientemente de sus secuencias, los cuales hibridan en los sitios de restricción de la enzima SfiI (ver Tabla V).

El producto de la PCR fue purificado con un kit comercial (Thermo Scientific, #K0701). Se tomaron 2,5 µg de ADN de cada clon y se digirieron con la enzima Sfil durante 8 hs a 50°C. El producto de la digestión fue corrido en un gel de agarosa 1%, a partir del cual se purificaron las bandas de ADN de los nanobodies utilizando un kit comercial (Thermo Scientific, #K0691).

El vector pINQ-OmpA fue preparado para la ligación con los nanobodies digiriéndolo con la enzima Sfil, purificando el vector linealizado a partir de su banda en un gel de agarosa 1% con un kit comercial (Thermo Scientific, #K0691), y desfosforilando el vector purificado con la enzima rSAP (NEB, #M0371).

Las ligaciones se realizaron utilizando 100 ng de vector y 25 ng de nanobody (relación inserto:vector 3:1) y la enzima T4 ADN ligasa (Invitrogen, #15224025), durante 1 hora a 22°C. Posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* BL21(DE3) con 1 µL de cada ligación y los cultivos se plaquearon en placas de LB agar-kanamicina, debido a que el vector pINQ-OmpA codifica para el gen de resistencia a dicho antibiótico.

Para corroborar la identidad de los clones, se seleccionaron tres colonias al azar obtenidas a partir de cada ligación y se realizaron producciones a pequeña escala de los nanobodies (como se describió en la sección 2.7), y luego los sobrenadantes obtenidos se evaluaron en ELISA o citometría de flujo. Tras comprobar que las colonias seleccionadas mantenían la reactividad contra su antígeno, se realizaron minipreps a partir de las mismas para obtener las secuencias nucleotídicas de los nanobodies, y se generaron respaldos de cada cultivo bacteriano adicionando glicerol al 20%, los cuales fueron almacenados a -80°C.

**Tabla V. Cebadores genéricos utilizados para amplificar los genes de los nanobodies.** Hibridan en el vector y en los sitios de restricción de la enzima Sfil (subrayado), que contienen todos los nanobodies por la forma en que fueron amplificados inicialmente.

Cebador	Secuencia (5' - 3')
Directo	GTTACTCGC <u>GGCC</u> CAGGCGGCCATG
Reverso	CCACGATTCT <u>GGCC</u> GGCCTGGCCTGAG

## 2.9. Producción de nanobodies recombinantes a gran escala

**I. Expresión de nanobodies en *E. coli*:** Se realizaron producciones a gran escala de distintos nanobodies a partir del vector pINQ-OmpA. Para ello, se creció un cultivo del nanobody en *E. coli* BL21(DE3) desde el día anterior, a 37°C con agitación, en 10 mL de LB-Kanamicina 40 µg/mL. Al día siguiente, los cultivos fueron llevados a 500 mL finales de LB-kanamicina en un matraz de 2 L, realizando una dilución 1/100 o 1/200 del cultivo inicial. Se incubó cultivo a 37°C con agitación hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0,6-0,8 UA, tras lo cual se indujo la expresión del nanobody con IPTG a una concentración final de

3  $\mu$ M, y se incubó durante 4 hs en las mismas condiciones permitiendo la expresión del nanobody. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 6.000  $\times$  g (15 min, 4°C). El precipitado se resuspendió en PBS y se sonicó en frío durante 15 min (amplitud 60%, ciclos de 10 s pulsos/10 s pausa), separando luego los restos celulares por centrifugación (3.500  $\times$  g, 20 min, 4°C). El sobrenadante obtenido, en el cual se encuentra el nanobody expresado de forma soluble, se filtró por 0,22  $\mu$ m y se purificó mediante cromatografía de afinidad como se explica a continuación.

**II. Purificación de nanobodies:** Los sobrenadantes obtenidos de las producciones de nanobodies a gran escala fueron adicionados con imidazol y NaCl a concentraciones finales de 20 mM y 300 mM respectivamente. Se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando una columna de Níquel-NTA (GE Healthcare, #17-5248-01) y el equipo *ÄKTA purification system* (GE Healthcare).

Para la purificación por afinidad, primero se equilibró la columna a utilizar con buffer A (20 mM imidazol, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8) y luego se cargó la muestra. La fracción de la misma que no quedó retenida en la columna se eluyó tras lavar con 5 volúmenes de columna de buffer A (5 mL). Posteriormente, para eluir los componentes retenidos mediante interacciones débiles, se procedió a lavar la columna con un gradiente de imidazol creciente utilizando distintas cantidades de buffer B (500 mM imidazol, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8) en buffer A. Esto consistió en los siguientes lavados: 1) 5 mL de 4% de buffer B (lo que corresponde a una concentración final de 40 mM de imidazol), y 2) 5 mL de 6% de buffer B (50 mM de imidazol). Tras dichos lavados se procedió a la elución del nanobody, que se realizó utilizando 100% de buffer B. El proceso se monitoreó mediante espectrofotometría a 280 nm y el pico de absorbancia obtenido durante la elución con 100% de buffer B, que corresponde a la fracción proteica enriquecida en nanobody, se separó y se dializó contra PBS 1X durante 24 hs con cambios del buffer cada 6-8 hs, utilizando una membrana de diálisis de 14 kDa de tamaño de poro (Sigma-Aldrich, #D9277). Luego el nanobody se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific). Los volúmenes finales de las eluciones tras la diálisis variaron según el clon purificado (entre 3 y 8 mL).

Las distintas fracciones obtenidas durante la purificación se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) teñidos con azul de Coomassie. A partir de estos geles se evaluó el nivel de pureza de las fracciones correspondientes a los picos de elución de los nanobodies.

## 2.10. Ensayos de ELISA de inhibición de la unión PD-1/PD-L1

**I. Ensayo de inhibición para las variantes humanas:** En este ensayo, se utilizó el ectodominio recombinante comercial de hPD-1 fusionado al dominio Fc de IgG1 humana (R&D Systems, #1086-PD) para tapizar la placa de microtitulación (Invitrogen,

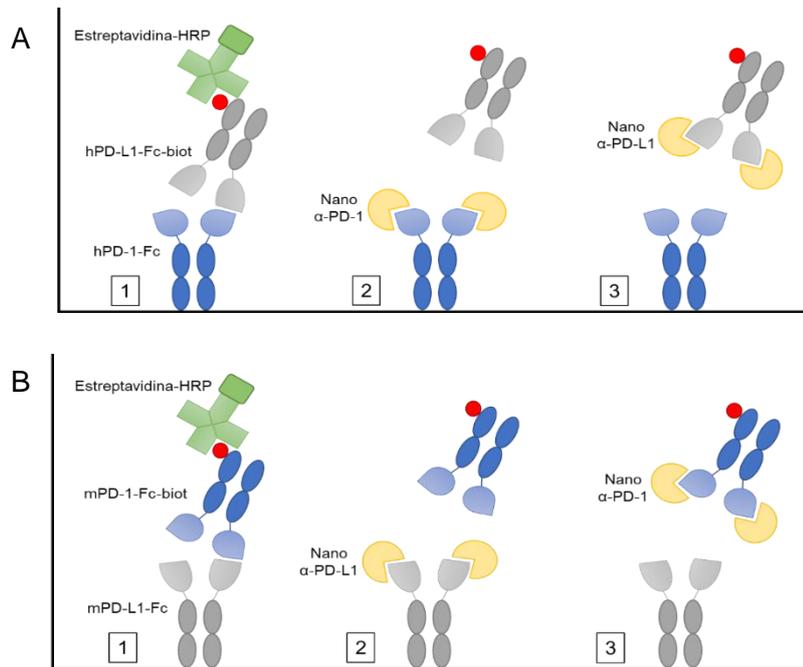
#44240421), a una concentración de 1 µg/mL en PBS O/N a 4°C (100 µL/pocillo). El bloqueo de la placa se realizó con PBS-BSA 0,5%-Tween 0,05%, durante 1,5 hs a T amb, y luego se incubó con 100 µL/pocillo de hPD-L1-Fc biotinilado (BPS Bioscience, #71105) a 0,2 µg/mL diluido en solución diluyente (PBS-BSA 0,2%-Tween 0,05%), durante 1,5 hs a T amb. Para revelar, se utilizó estreptavidina-HRP (Thermo Scientific, #N100) en solución diluyente, a la cual se la incubó durante 1 hora a T amb, y por último se reveló con una solución de TMB (BD Biosciences, #555214) durante aproximadamente 15 min. La reacción de revelado se detuvo con 50 µL/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N, y la absorbancia de la placa se midió en un espectrofotómetro a 450 nm (Fig. 12 A, esquema 1).

Para evaluar la capacidad de inhibición de los distintos nanobodies o de los controles de inhibición, se preincubaron los mismos junto con su antígeno. Es decir, al evaluarse un nanobody contra hPD-1, se adicionó el mismo en el pocillo previo al paso de incubación con el hPD-L1. Para esto, se prepararon diluciones del nanobody al doble de la concentración final, y se incubó 50 µL/pocillo de esas diluciones durante 30 min a T amb en el pocillo de ELISA tapizado con hPD-1-Fc. Posteriormente, sin descartar el nanobody, se adicionó el hPD-L1-Fc biotinilado (50 µL/pocillo al doble de la concentración final), y se incubó durante 1,5 hs a T amb. Luego de lavar los pocillos, se incubó con la estreptavidina-HRP y se reveló el ensayo de la forma descrita anteriormente (Fig. 12 A, esquema 2).

Para evaluar nanobodies contra hPD-L1, se preincubaron con el hPD-L1-Fc biotinilado durante 30 min a T amb en microtubos, mientras la placa se encontraba en el paso de bloqueo. En este caso, se preparó volumen en exceso para luego poder transferir 100 µL de la mezcla a cada pocillo de la placa, tras lo cual se incubó por 1,5 hs a T amb, para luego continuar con el ensayo de forma descrita anteriormente (Fig. 12 A, esquema 3).

**II. Ensayo de inhibición para las variantes murinas:** El protocolo de este ensayo es muy similar al anterior, pero en este caso el tapizado de los pocillos se realizó con el ligando. Las placas de microtitulación se sensibilizaron con 100 µL/pocillo de mPD-L1-Fc (R&D Systems, #1019-B7) a 1 µg/mL en PBS O/N a 4°C. Se bloqueó como se describió en el ensayo anterior, y luego se incubó con 100 µL/pocillo de mPD-1-Fc biotinilado (BPS Bioscience, #71119) a 0,5 µg/mL en solución diluyente durante 1,5 hs. En este ensayo también se utilizó estreptavidina-HRP para el revelado y TMB como sustrato (Fig. 12 B, esquema 1).

De forma similar al ensayo anterior, se realizaron las preincubaciones de los nanobodies o los anticuerpos controles con sus correspondientes antígenos. En este caso, los nanobodies contra mPD-L1 se preincubaron en los pocillos de la placa (Fig. 12 B, esquema 2), mientras que los nanobodies anti-mPD-1 se preincubaron en microtubos con su antígeno antes de ser transferidos al pocillo de la placa (Fig. 12 B, esquema 3).



**Fig. 12. Representación esquemática de los ensayos de ELISA de inhibición de la unión PD-1/PD-L1 realizados.** Se utilizaron los ectodominios recombinantes comerciales de las variantes humanas (A) y murinas (B). En cada ensayo, uno de los ectodominios fue utilizado en su versión biotinilada, lo que permitió la detección de la unión PD-1/PD-L1 mediante estreptavidina conjugada a HRP (A y B, esquema 1). Se evaluaron nanobodies contra PD-1 y PD-L1, así como controles de inhibición, preincubando los mismos con sus correspondientes antígenos. Los nanobodies capaces de inhibir la unión PD-1/PD-L1 al unirse a su antígeno generarán una disminución en la señal del ensayo, al desplazar el PD-1 o PD-L1 biotinilado (A y B, esquemas 2 y 3).

### 2.11. Reactivación de células T de ratón *in vitro* utilizando nanobodies

En este experimento se purificaron células T de ratón a partir del bazo y se activaron *in vitro* con anticuerpos agonistas de CD3 y CD28. Se utilizó mPD-L1-Fc comercial (R&D Systems, #1019-B7) como estímulo inhibitorio durante la activación de las células. Se evaluó la capacidad de los nanobodies específicos para PD-1 o PD-L1 de ratón de neutralizar la inhibición de las células T mediada por mPD-L1-Fc.

Los nanobodies utilizados fueron tratados previamente con una resina para la eliminación de endotoxinas bacterianas (Thermo Scientific, #88274), luego de ser purificados por cromatografía de afinidad.

**I. Purificación de células T:** Se sacrificaron ratones de la cepa C57BL/6 para extraer los bazos en condiciones de esterilidad, y se sumergieron en PBS (10 mL/bazo). Posteriormente se machacaron los bazos sobre un filtro de 70  $\mu$ M para separar las células. Las células se centrifugaron (150 x g, 5 min, 4°C) y se resuspendieron con 2 mL de buffer de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15 M,  $\text{KHCO}_3$  10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4). Se incubó 2 min a T amb, agitando levemente, para lisar los glóbulos rojos. Tras un lavado con PBS, las células fueron resuspendidas en PBS a la concentración recomendada para la purificación ( $10^7$  células en 40  $\mu$ L).

La purificación de las células T se realizó utilizando un kit comercial (Miltenyi Biotec, #130-095-130), que permite el aislamiento de las mismas por selección negativa evitando su activación durante el proceso. Brevemente, se adicionó el mix de anticuerpos biotinilados específicos para marcadores de distintas células, excepto de células T (70  $\mu\text{L}$ /bazo), incubándose en hielo por 5 min. Luego se agregó PBS (210  $\mu\text{L}$ /bazo) y partículas magnéticas conjugadas a un anticuerpo monoclonal anti-biotina (140  $\mu\text{L}$ /bazo), y se incubó en hielo por 10 min. Luego del marcaje, las células se lavaron con unos 10 mL de PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en buffer AutoMacs (PBS adicionado con: SFB 0,5%, EDTA 2 mM y antibióticos P/S 1%), en un volumen de 500  $\mu\text{L}$ /bazo.

Para la separación de las células marcadas, se empleó el equipo *autoMACS Pro Separator* utilizando el programa recomendado por el kit comercial. Luego de la purificación, se obtuvieron dos tubos: el primero, enriquecido en células no marcadas por los anticuerpos (es decir, las no retenidas por el equipo, donde se encontrarán las células T), y el segundo conteniendo las células marcadas por los distintos anticuerpos del mix.

Tras recoger la fracción de células T, las células se centrifugaron y resuspendieron en 2 mL de medio RPMI-1640 completo (adicionado con: SFB 10%, HEPES 20 mM, L-glutamina 2 mM y antibióticos 1%). Se contaron, obteniendo alrededor de  $2 \times 10^7$  células/bazo. A continuación, las células fueron activadas como se describe en el siguiente punto.

**II. Activación de células T:** Para la activación de las células T aisladas se utilizaron anticuerpos agonistas de mCD3 (eBioscience, #16-0032-82) y de mCD28 (eBioscience, #16-0281-82). Se preparó la placa de cultivo de 96 pocillos con fondo en U (Thermo Scientific, #163320) el día anterior al ensayo, sensibilizándola con 100  $\mu\text{L}$ /pocillo del anticuerpo anti-mCD3 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y con 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de mPD-L1-Fc (R&D Systems, #1019-B7) también a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en PBS estéril a 4°C O/N. Al día siguiente, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS estéril, y se incubaron con los nanobodies o el anticuerpo control diluidos en 100  $\mu\text{L}$  de RPMI-1640 completo a una concentración 2,5X de la final (ya que el volumen final por pocillo será de 250  $\mu\text{L}$ ), durante 30 min en incubador (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Mientras tanto, se prepararon las células a una concentración de  $10^6$  células/mL, de manera de sembrar  $10^5$  células/pocillo. Por último, se adicionó el anticuerpo anti-mCD28 soluble en RPMI-1640 a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (50  $\mu\text{L}$ /pocillo a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Las células se incubaron durante 72 hs (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ), tras lo cual se recogieron los sobrenadantes y se guardaron a -20°C hasta su análisis.

**III. Cuantificación de marcadores de activación:** Los sobrenadantes de cultivo recogidos tras 72 hs de incubación fueron analizados por ELISA para medir la concentración de dos marcadores de activación: la interleuquina 2 (IL-2) y el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Para ello, se utilizaron kits de ELISA comerciales de la empresa BD

Biosciences (mIL-2 ELISA Set: #555148, y mIFN- $\gamma$  ELISA Set: #555138), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.12. Subclonaje de nanobodies a pAAVs

Los nanobodies bloqueantes de la unión PD-1/PD-L1 de ratón aislados y caracterizados en las secciones anteriores, se subclonaron en plásmidos que contienen el genoma recombinante del virus adeno-asociado para su expresión en células eucariotas (Fig. 13). De aquí en más se denominará a este tipo de vector "pAAV".

Los pAAVs fueron generados previamente por el grupo colaborador del CIMA, y se diferencian entre sí en los promotores bajo los cuales se encuentra el transgén. Uno de los promotores es de origen humano, el EF1 $\alpha$  (factor de elongación 1 $\alpha$ ), mientras que el resto es de origen viral: SFFV (del inglés: "*Spleen Focus-Forming Virus*"), CMV (Citomegalovirus humano) o CAG. Este último es un promotor sintético, compuesto por el promotor de la  $\beta$ -actina de pollo modificado y una secuencia potenciadora temprana de CMV [238].

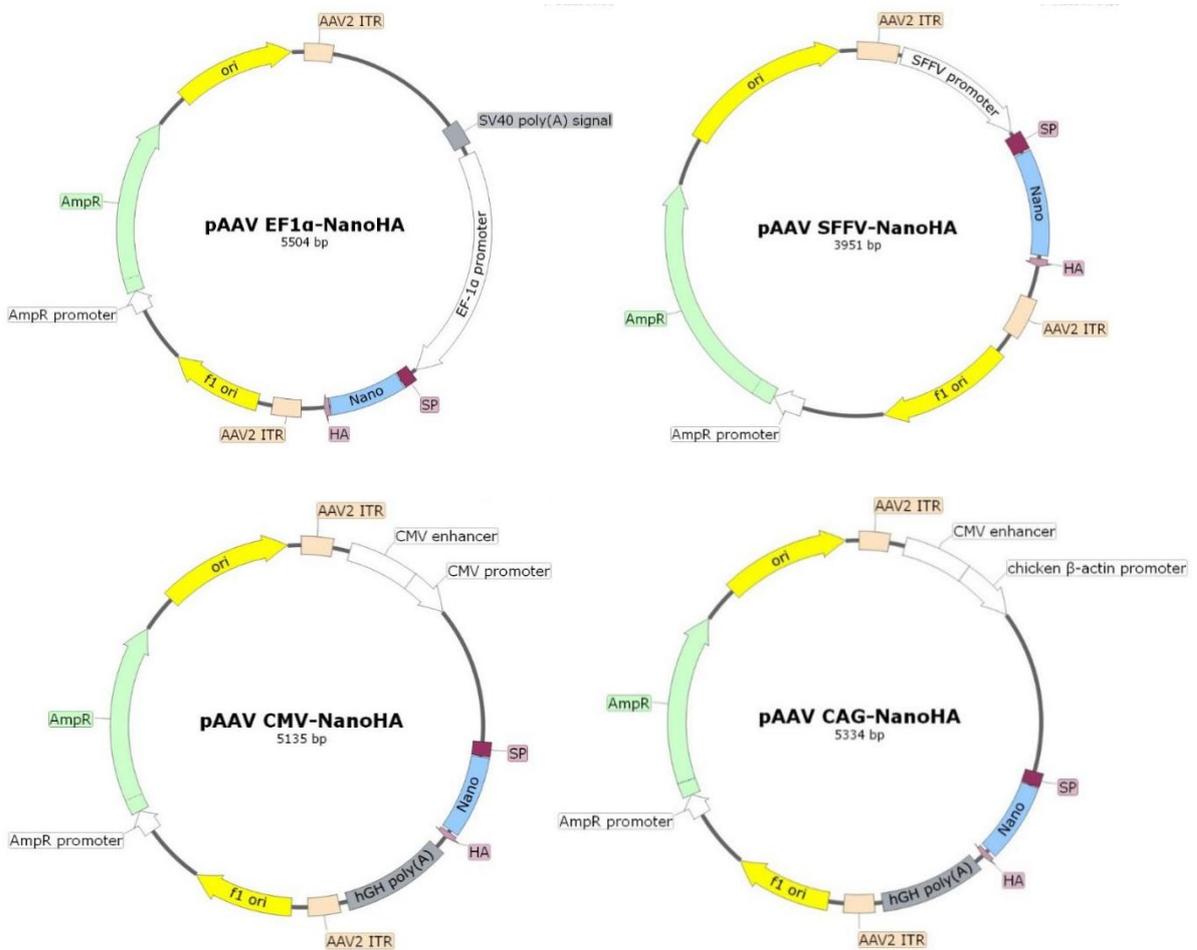
Cada pAAV contiene el gen de resistencia a la ampicilina, un origen de replicación para la amplificación del plásmido en bacterias y los ITRs de AAV2.

Los nanobodies fueron subclonados con un péptido señal (SP) de exportación al medio extracelular en el extremo 5' con secuencia aminoacídica: MNWGLKLVFFVLILKGVQC. Este SP corresponde al de la cadena pesada de una IgG de hámster armenio (secuencia obtenida en el CIMA, datos sin publicar). También se incluyó un epítipo de HA para la detección del nanobody en el extremo 3'.

La secuencia de uno de los nanobodies a ser clonados en estos vectores, junto con la secuencia Kozak (para la optimización de la expresión en células eucariotas), el SP y el epítipo HA fueron sintetizados por la empresa IDT. Se incluyeron sitios de corte de distintas enzimas de restricción que se utilizaron durante el subclonaje (Fig. 14): sitios para Sall en ambos extremos de la secuencia y para Ndel en el extremo 3', que fueron empleados para clonar el cassette completo a los pAAVs. En los pAAVs con promotores CAG y CMV el subclonaje se realizó utilizando la enzima Sall, mientras que en los pAAVs con los promotores EF1 $\alpha$  y SFFV fue posible realizar un clonaje dirigido empleando las enzimas Sall y Ndel.

Para el subclonaje del cassette de expresión del nanobody, se amplificó por PCR la construcción completa utilizando cebadores específicos para el cassette completo (Tabla VI). Luego, se realizaron las digestiones con Sall y Ndel o con Sall solamente, y se purificó el producto de digestión a partir de un gel de agarosa 1%. Se realizaron las ligaciones con los correspondientes pAAVs, a 16°C O/N, utilizando una relación inserto:vector de 5:1. Se electroporaron las ligaciones en células DH5 $\alpha$  (Thermo Scientific, #18265017), y las colonias obtenidas fueron chequeadas por PCR de colonia

y por digestión de las minipreps. Luego se secuenciaron unas 3-4 minipreps de cada construcción y por último se realizaron maxipreps.



**Fig. 13. Mapas de los plásmidos generados, codificantes para el genoma recombinante de AAV2 y los nanobodies.** Los plásmidos contienen los ITRs del serotipo 2 de AAV, y se diferencian entre sí en los promotores a partir de los cuales se expresan los nanobodies. Los nanobodies están asociados a un péptido señal (SP) que promueve su secreción al espacio extracelular, y a un epítipo de hemaglutinina (HA) que permite su detección utilizando un anticuerpo comercial.

Tras obtener estas primeras 4 construcciones, los demás nanobodies a ser clonados en los pAAVs se introdujeron directamente sin necesidad de incluir cebadores con el SP o con el tag HA. Para ello, sus secuencias se amplificaron por PCR a partir de las minipreps originales en el plásmido pINQ-OmpA, utilizando cebadores con los sitios de restricción para SpeI en el extremo 5' y para KpnI o XbaI en el extremo 3' (Tabla VI). En los pAAVs con los promotores EF1 $\alpha$  y SFFV se utilizaron las enzimas SpeI (NEB, #R0133) y XbaI (NEB, #R0145) para el clonaje de los nanobodies, mientras que en los pAAVs con los promotores CAG y CMV se utilizó el par SpeI/KpnI (NEB, #R0142). Los productos de PCR se purificaron con un kit comercial (Qiagen, #28104), y luego se digirieron con las correspondientes enzimas de restricción. Se corrieron en un gel de agarosa 1% y se purificaron con un kit comercial (Qiagen, #28704). Los insertos

purificados fueron ligados con los pAAVs previamente preparados para los clonajes (mediante digestión con las correspondientes enzimas de restricción, purificación por gel de agarosa y desfosforilación con la enzima rSAP). Se transformaron bacterias *E. coli* Dh5 $\alpha$  con alícuotas de las ligaciones, y se seleccionaron colonias al azar para realizar PCR de colonias y chequear la presencia de inserto. Luego, se realizaron minipreps (Qiagen, #27104) de las colonias positivas para el inserto y, en el caso del clonaje con el par *SpeI*/*XbaI*, se verificó la correcta dirección del mismo digiriendo los plásmidos con las enzimas de restricción utilizadas para el clonaje. Las minipreps seleccionadas luego de estas pruebas se secuenciaron para comparar con las secuencias originales de los nanobodies en pINQ-OmpA. Luego de comprobar las secuencias, se realizaron maxipreps (Macherey-Nagel, #740414) de los pAAVs codificantes para los nanobodies.



**Fig. 14. Diagrama del cassette de expresión de los nanobodies en pAAVs.** Está compuesto de 5' a 3' por: secuencia Kozak, péptido señal (SP) para la secreción fuera de la célula, secuencia del nanobody, y epítipo de HA. El cassette contiene sitios para distintas enzimas de restricción para el clonaje de los nanobodies en los pAAVs: *Sall* y *NdeI* en los extremos externos del cassette, y *SpeI* y el par *KpnI*/*XbaI* flanqueando el gen del nanobody.

**Tabla VI. Cebadores empleados para el subclonaje de nanobodies a los pAAVs.** Los sitios de restricción correspondientes a las distintas enzimas se encuentran subrayados.

Cebador	Secuencia (5' - 3')
Directo cassette- <i>Sall</i>	GTAGT <u>CGAC</u> GCCACCATGAACTGGG
Reverso cassette- <i>Sall</i> - <i>NdeI</i>	GTAGT <u>CGACATATG</u> TCAGGAGGCGTAGTCGG
Directo C11- <i>SpeI</i>	GTA <u>ACTAGT</u> GCCCAGGTGCAGCTGGTG
Directo 6p- <i>SpeI</i>	GTA <u>ACTAGT</u> GCCCAGGTGCAGCTGGTG
Reverso- <i>XbaI</i>	GTA <u>TCTAGAT</u> GAGGAGACAGTGACCTGGGTCC
Reverso- <i>KpnI</i>	GTAGG <u>TACCT</u> GAGGAGACAGTGACCTGGGTCC

### 2.13. Expresión de nanobodies en células eucariotas *in vitro*

Para evaluar la expresión de los nanobodies en células eucariotas se realizaron transfecciones utilizando las construcciones de los pAAVs codificantes para los nanobodies generados en la sección anterior.

Las transfecciones se realizaron en placas de cultivo de 6 pocillos, utilizando dos líneas celulares: BHK y HuH7. Se trabajó con una cantidad fija de ADN por pocillo de 2  $\mu$ g.

**I. Transfecciones:** La cantidad de células a sembrar fue optimizada en  $2 \times 10^5$  células/pocillo para las BHK y  $4,5 \times 10^5$  células/pocillo para las HuH7, para obtener una confluencia de 70-80% al día siguiente. Se utilizaron los correspondientes medios de cultivo (ver Tabla I), y las placas se incubaron O/N a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ .

Para las transfecciones, se prepararon los complejos de ADN-lípidos en microtubos utilizando medio Opti-MEM (Gibco, #31985070). Para ello, primero se realizó una dilución de la maxiprep del pAAV codificante para el nanobody para obtener una solución a  $0,5 \mu\text{g/mL}$ , a partir de la cual se tomaron  $4 \mu\text{L}$  ( $2 \mu\text{g}$ ) por cada pocillo a ser transfectado con ese plásmido, diluidos en  $100 \mu\text{L}$  finales/pocillo. Luego, se preparó la cantidad necesaria del agente de transfección Lipofectamina-2000 (Invitrogen, #11668). Se utilizaron  $5 \mu\text{L}$  de lipofectamina diluidos en un volumen de  $100 \mu\text{L}$  para cada pocillo.

Se mezcló el ADN con la lipofectamina, homogeneizando con agitación suave, y se incubó la mezcla durante 15 min. a T amb. Mientras tanto, se prepararon las células para la transfección, descartando el medio y lavando cuidadosamente con PBS. Las células fueron mantenidas en incubador hasta el momento de la transfección, con 1 mL/pocillo de medio Opti-MEM.

Luego de la incubación para la formación de los complejos ADN-lípidos, se diluyó la mezcla hasta 1 mL/pocillo, se descartó el medio de las células y se transfectaron. Las células transfectadas se mantuvieron en el incubador durante 2 hs. Por último, se retiró el medio que contenía la mezcla de transfección y se adicionó 2 mL/pocillo de medio CHO (Sigma-Aldrich, #14361C), tras lo cual las células se mantuvieron durante 48 hs en incubador. Luego de ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes y las células para el análisis de la expresión de los nanobodies utilizando distintas técnicas.

**II. Inmunofluorescencia:** Se realizaron inmunofluorescencias para evaluar la eficiencia de transfección de las células y normalizar la expresión de los nanobodies según la misma.

Previo a la siembra de las células en la placa de cultivo para las transfecciones, se colocó un cubreobjetos en cada pocillo. Al día siguiente, las células se transfectaron como se describió anteriormente. Luego de 48 hs, se recogió el sobrenadante (para analizar por ELISA y Western blot), y la placa conteniendo las células adheridas a los cubreobjetos se colocó sobre hielo. Las células se lavaron con 2 mL/pocillo de PBS frío adicionado con calcio y magnesio (Gibco, #14040133) 2 veces, y luego se incubaron con 1 mL/pocillo de metanol absoluto durante al menos 10 min a  $-20^\circ\text{C}$  para su fijación. Posteriormente, se descartó el metanol y se realizaron 3 lavados con 2 mL/pocillo de PBS a T amb. Los cubreobjetos se bloquearon con 1 mL/pocillo de solución A (PBS-BSA 0,25%-gelatina 0,5%) durante 1 hora a T amb. Luego, se incubaron con el anticuerpo primario anti-HA (BioLegend, #901501), diluido en solución A. Se utilizaron  $60 \mu\text{L}$  de la solución de anticuerpo para cada inmunofluorescencia, colocados sobre un parafilm, sobre el cual se ubicó el cubreobjetos (permitiendo el contacto directo entre las células fijadas y el anticuerpo). Se incubó 1 hora a T amb en cámara húmeda, y luego

se devolvieron los cubreobjetos a los pocillos de la placa para realizar 3 lavados con 2 mL/pocillo de solución B (PBS-BSA 0,25%). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific, #A28175), diluido en solución A, 1 hora a T amb en cámara húmeda cubierto de la luz (de la misma forma que se realizó la incubación con el anticuerpo primario). Se realizaron 3 lavados con PBS y un último lavado con H<sub>2</sub>O MilliQ, tras lo cual los cubreobjetos se dejaron secar sobre papel absorbente, cubiertos de la luz. Por último, los preparados fueron montados sobre portaobjetos, utilizando una gota de medio de montaje con DAPI (Vector labs, #H-1200). Las preparaciones se visualizaron en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800.

**III. ELISA:** Se evaluaron los sobrenadantes y los lisados celulares luego de 48 hs de realizadas las transfecciones, a través de ensayos de ELISA específicos utilizando el correspondiente antígeno de cada nanobody.

Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos en microtubos y centrifugados a 6000 × g (10 min, 4°C), para separar los restos celulares. Se separaron los sobrenadantes a nuevos tubos y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Para generar el lisado celular, se lavó el pocillo con las células adheridas con PBS frío, y luego se añadieron 300 µL/pocillo de buffer de lisis NP-40 (NaCl 150 mM, NP-40 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) con inhibidor de proteasas (Roche, #11697498001). Se incubó 10 min en frío y posteriormente se despegaron y recogieron las células pipeteando vigorosamente. Se centrifugaron a 6000 × g (10 min, 4°C), tras lo cual se recuperó el sobrenadante (conteniendo las proteínas), para almacenarlo a -80°C hasta su utilización.

Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con el ectodominio recombinante comercial asociado a Fc de PD-1 (R&D Systems, #1086-PD) o PD-L1 (R&D Systems, #1019-B7), según el nanobody que se fuera a analizar, utilizando 100 µL/pocillo de una solución a 1 µg/mL en PBS, O/N a 4°C. Los pocillos se bloquearon con 300 µL/pocillo de PBS-BSA 0,5% durante 1 hora a T amb, tras lo cual se incubó con los sobrenadantes del cultivo o los lisados celulares, evaluándose distintas diluciones en solución diluyente (PBS-BSA 0,2%-Tween 0,05%), durante 1,5 hs a T amb. También se realizaron curvas estándar utilizando el nanobody recombinante purificado (obtenido como se explicó en la sección 2.9). Se utilizó el anticuerpo anti-HA (BioLegend, #901501) como anticuerpo primario y un anticuerpo contra IgG de ratón asociado a la peroxidasa (Thermo Scientific, #31430) como anticuerpo secundario (ambos se incubaron durante 1 hora a T amb, diluidos en solución diluyente). Se reveló con una solución de TMB (BD Biosciences, #555214) durante aproximadamente 15 min, y se midió la placa en un espectrofotómetro a 450 nm.

**IV. Western blot:** Los sobrenadantes y lisados celulares también fueron evaluados por Western blot. Para ello, se corrieron en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes, a 120 V durante 1,5 hs aproximadamente. Luego, se realizó la transferencia de las proteínas separadas en el gel a una membrana de nitrocelulosa

mediante transferencia húmeda, durante 2 hs a 150 mA en cámara fría. Tras la transferencia, se recogieron las membranas, se las enjuagó con PBS y se bloquearon con PBS-leche 5%-Tween 0,05%, durante 1 hora a T amb. Se utilizaron los mismos anticuerpos primario y secundario que durante el ELISA descrito en el punto anterior, ambos diluidos en solución de bloqueo (5 mL/membrana), incubándose 1 hora a T amb cada uno. Luego de incubar con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados (10 min cada uno con agitación, con 20 mL/lavado de PBS-T), y tras la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron 4 lavados. Por último, se enjuagaron las membranas con PBS, y se revelaron utilizando un reactivo quimioluminiscente (Perkin-Elmer, #NEL103E001EA), un cassette de revelado (Advansta, #L-07019-001) y películas autoradiográficas (GE Healthcare, #28906836). El tiempo de revelado fue dependiente de cada experimento, realizándose distintas exposiciones en cada caso. Las membranas expuestas se revelaron en máquina de revelado en sala oscura.

**V. Inmunoprecipitación:** En este experimento se evaluó la capacidad de unión de un nanobody a su antígeno, tras ser expresado a partir de la línea celular BHK.

Para este ensayo se utilizaron microesferas magnéticas cubiertas con proteína G (Life Technologies, #10004D), a las cuales se les asoció el antígeno de interés (mPD-1-Fc, R&D Systems, #1019-B7) a través de la región Fc de IgG1 humana. Se utilizaron 20  $\mu$ L de microesferas y 1  $\mu$ g de mPD-1-Fc por reacción, y para permitir la unión del antígeno a las microesferas se incubaron durante 1 hora a T amb con rotación. Luego de lavar con 1 mL de PBS-T, las microesferas asociadas a mPD-1-Fc se enfrentaron al nanobody anti-PD1 en exceso, producido por células BHK transfectadas con un pAAV codificante para el mismo. Tras 1 hora de incubación a T amb, se separó el sobrenadante (fracción “no retenida”), se lavaron las microesferas con PBS-T y se eluyó la fracción “retenida” incubando las microesferas con buffer de carga 1X para SDS-PAGE (ver Tabla VII). Las distintas fracciones obtenidas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15% y se analizaron por Western blot, de forma similar a lo descrito en el punto anterior.

#### 2.14. Comparación de la expresión de los nanobodies a partir de los distintos promotores de pAAVs *in vitro*

Se realizaron co-transfecciones utilizando los pAAVs (con diferentes promotores) codificantes para los nanobodies y un pAAV codificante para GFP bajo el promotor CMV, para normalizar el nivel de expresión de los nanobodies con respecto a la eficiencia de transfección de las células. La comparación de los niveles de expresión de los nanobodies a partir de los distintos pAAVs, normalizada con respecto a la expresión de GFP, se realizó mediante PCR cuantitativa asociada a transcripción reversa (RT-qPCR), cuantificando ARNm de los nanobodies y de GFP en las células luego de 48 hs de la transfección.

**I. Transfecciones:** Las co-transfecciones se realizaron de la misma manera que la descrita anteriormente (sección 2.13), utilizando la línea de células BHK. Se emplearon 2 µg/pocillo del pAAV codificante para el nanobody y 200 ng/pocillo del pAAV codificante para GFP. Cada co-transfección se realizó por triplicado.

Luego de 48 hs, se retiró el sobrenadante y se lavaron las células, tras lo cual se despegaron y se realizó la extracción de ARN.

**II. Extracción de ARN:** Las extracciones de ARN a partir de las células co-transfectadas se realizaron utilizando un kit comercial (Promega, #AS1280) y el equipo *Maxwell 16 Instrument*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las eluciones del ARN purificado se realizaron en 30 µL de H<sub>2</sub>O, y se midió la concentración del ARN obtenido mediante la absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

**III. Transcripción reversa:** Para la síntesis de ADNc se partió de 1 µg de ARN/reacción (purificado en la etapa anterior), en un volumen final de 20 µL en H<sub>2</sub>O. Luego se agregó el mix de reacción compuesto por: 2 µL de DTT 0,1 M, 4 µL de cebadores Random (Invitrogen, #48190011), 4 µL de dNTPs 5 mM, 1 µL de enzima transcriptasa reversa (Invitrogen, #28025) y 8 µL del buffer correspondiente. La mezcla de ARN y los demás reactivos fue incubada durante 5 min a T amb, a 37°C por 1 hora y a 70°C por 15 min.

**IV. PCR cuantitativa:** Se realizaron PCRs cuantitativas (qPCR) utilizando cebadores para la amplificación de GFP o de los nanobodies (los empleados para el subclonaje de los mismos a los pAAVs, Tabla VI). Cada muestra se analizó por triplicado. El mix para cada reacción se realizó en 20 µL, conteniendo: 10 µL de iQ SYBR Green Supermix (Bio Rad, #1708880), 2 µL de cada cebador (a 10 ng/µL cada uno), 4 µL de H<sub>2</sub>O y 2 µL de ADNc sintetizado en la etapa anterior.

Se utilizó el equipo CFX96 de Bio Rad para la amplificación de los fragmentos de ADN. El análisis de los resultados se realizó a partir de los valores de CT (del inglés: “*threshold cycle*”) obtenidos para cada muestra, empleando métodos de análisis convencionales [239].

## 2.15. Producción de AAVs recombinantes codificantes para el nanobody C11

**I. Amplificación de células HEK-293T:** Se amplificó esta línea celular hasta obtener un mínimo de 12 frascos de cultivo confluentes de 175 cm<sup>2</sup> de superficie (T175, Sigma-Aldrich, #CLS431080). Se sembraron en placas circulares de 15 cm de diámetro (p150, Sigma-Aldrich, #CLS430599) con medio DMEM suplementado (SFB al 10%), calculando una botella T175 confluyente para 2,5 placas p150. Por cada producción de rAAV, se utilizaron 26 placas p150, y una extra como control de transfección.

**II. Transfecciones:** Al día siguiente de sembrar las células en las placas p150, se retiró el medio y se les añadió 10 mL/placa de DMEM suplementado (SFB al 2%). Las células

se mantuvieron en incubador durante la preparación de las mezclas de las transfecciones. El protocolo para las transfecciones fue basado en desarrollos anteriores [240].

Por un lado, se preparó la cantidad de ADN necesaria para las transfecciones: 20 µg de pAAV y 55 µg de plásmido comercial pDP8.ape (Plasmid Factory, #PF478) por placa, en un volumen de 1 mL en suero fisiológico. El plásmido pDP8.ape codifica para los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV8, además de incluir los genes de adenovirus necesarios para la replicación de los rAAVs.

Por otro lado, se preparó el agente de transfección polietilenimina (PEI, Polysciences, #23966) a una concentración final de 10 mM en suero fisiológico (calculando 1 mL/placa). Se preparó la mezcla para 27 placas (incluyendo la placa de control de transfección).

Luego de preparar las soluciones, se realizaron las mezclas del ADN y el agente de transfección para que se formen los complejos. Se adicionó la solución de PEI sobre la de ADN (mismo volumen de cada una), tras lo cual se vortexeó durante 20 segundos y se incubó a T amb por 45 min.

Para el control de transfección, se realizó el mix de ADN con 20 µg de pAAV-GFP y 55 µg de pDP8.ape, en un volumen final de 1 mL en suero fisiológico. Luego, se agregó 1 mL de la solución de PEI 10 mM, se vortexeó y se incubó 45 min a T amb.

Pasado ese tiempo, se transfectaron las células utilizando 2 mL de la mezcla por placa, distribuyendo ese volumen homogéneamente sobre toda la superficie. Las placas transfectadas se mantuvieron en incubador por 6 hs, tras lo cual se les adicionó 6 mL/placa de DMEM suplementado (SFB al 2%). Las células fueron mantenidas por 72 hs en incubador y luego se recolectaron las partículas virales.

**III. Recolección de las partículas virales:** Pasadas las 72 hs de las transfecciones, se comprobó que la transfección fuera adecuada observando la placa control de GFP en el microscopio de fluorescencia.

Luego, se recogieron 2/3 partes del volumen de sobrenadante de cada placa en una botella de vidrio. Con el resto del medio en la placa, se despegaron las células utilizando un *scraper*, y se transfirieron a tubos cónicos de 50 mL. Las células recogidas se centrifugaron (2500 rpm, 10 min, 4°C). El sobrenadante obtenido se transfirió a la botella de vidrio con el resto del medio de cultivo, y los precipitados celulares se resuspendieron con buffer de lisis (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100) hasta un volumen final de 12 mL. Las células se guardaron a -80°C.

El medio de cultivo separado en la botella se incubó con PEG-8000 (Applichem, #A2204) a una concentración final de 8%, durante 48-72 hs a 4°C, para promover la precipitación de las partículas virales. Pasado ese tiempo, se centrifugó el sobrenadante en 4 tubos cónicos de 50 mL (2.000 × g, 15 min, 4°C), realizando varias rondas de centrifugación

reutilizando los mismos tubos y descartando los sobrenadantes obtenidos tras las centrifugaciones. Los precipitados obtenidos, conteniendo las partículas virales, se resuspendieron con un total de 2 mL de buffer de lisis, y se transfirieron al tubo conteniendo la fracción celular, previamente descongelada. Se realizaron 3 ciclos de congelado y descongelado de este tubo (conteniendo las partículas virales precipitadas del medio de cultivo y las presentes en la fracción celular), utilizando hielo seco y un baño de agua a 37°C. Luego de la última ronda, se guardó el tubo a -80°C hasta la purificación de las partículas virales.

**IV. Purificación de las partículas virales:** El tubo conteniendo las partículas virales se descongeló en un baño de agua a 37°C y se centrifugó (2.000 × g, 15 min, 4°C) para separar los restos celulares. Se recogió el sobrenadante y se le añadió ARNasa I y ADNasa I (Invitrogen, #AM2295 y #18047019), empleando un total de 2,6 mg de cada una, y se incubó 1 hora en baño de agua a 37°C. Luego, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, y el sobrenadante obtenido se separó para la purificación.

La purificación de las partículas virales se realizó mediante un gradiente de iodixanol (ATOM, #50900), según se ha descrito previamente [241]. Para generar el gradiente, se prepararon soluciones a distintas concentraciones (v/v) de este reactivo: 15%, 25%, 40% y 57%. Luego, se formó el gradiente en un tubo (#Beckman, 344326), cargando, en primera instancia, el sobrenadante con las partículas virales (aproximadamente 17 mL), luego 9 mL de la solución de iodixanol al 15%, 6 mL de la de 25%, 5 mL de la de 40% y 5 mL de la de 57%. Los tubos se ultra-centrifugaron a 69.000 rpm durante 2 hs a 16°C utilizando el rotor 70 Ti (Beckman).

Tras la ultra-centrifugación, se recogió la fracción conteniendo las partículas virales perforando desde debajo de la banda de interés con una jeringa de 10 mL. Luego de la recolección, se retiró la jeringa y el volumen recogido (3-5 mL) se colocó en un tubo cónico y se llevó a 14 mL con PBS-sacarosa 5%. Este volumen se cargó en una columna de AMICON (Millipore, #UFC910008), y se centrifugó a 3.000 × g por 35 min a 16°C. El eluido de la columna se descartó, y se cargó nuevamente PBS-sacarosa 5% sobre el AMICON (el mismo volumen que eluyó) para realizar otro lavado. Se centrifugó bajo las mismas condiciones, y se repitió este proceso hasta haber lavado las partículas virales con un mínimo de 45 mL de PBS-sacarosa.

Por último, el volumen remanente en el AMICON tras la última centrifugación (aproximadamente 1 mL) se recogió y se alicuotó en viales que se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido, y posteriormente se guardaron a -80°C. También se separó una alícuota de 20 µL para la titulación de las partículas virales producidas.

**V. Titulación de las producciones:** En primer lugar, se realizó la extracción de ADN viral a partir de la alícuota de 20 µL que se separó en la etapa anterior, utilizando un kit comercial (Roche, #11858874001). La elución del ADN viral se realizó con 50 µL de H<sub>2</sub>O.

Se realizó la cuantificación absoluta de las partículas virales mediante PCR cuantitativa, incluyendo una curva estándar generada a partir del plásmido de AAV utilizado para las transfecciones durante la producción de las partículas (la curva abarcó de  $10^4$  a  $10^9$  copias del plásmido). El ADN extraído a partir de la alícuota de la producción de las partículas virales se analizó sin diluir y a 3 diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000).

El mix de la reacción se realizó en 10  $\mu\text{L}$  finales, donde 2  $\mu\text{L}$  correspondieron a la muestra de ADN y el volumen restante al mix de la reacción (5  $\mu\text{L}$  de SYBR Green Mastermix, 0,4  $\mu\text{L}$  de cada cebador a 15  $\mu\text{M}$ , y 2,2  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ).

El análisis de los resultados se realizó a partir de los datos de CT obtenidos. Se generó la curva estándar (CT vs copias genómicas) y se interpolaron los datos de CT obtenidos para las muestras de las producciones de las partículas virales, tomando en cuenta los factores de dilución correspondientes. Los títulos de las partículas virales recombinantes producidas se expresaron en número de copias genómicas por mL.

## 2.16. Expresión de nanobody C11 a largo plazo a partir del sistema AAV *in vivo*

Los experimentos en animales realizados durante esta tesis fueron aprobados por el comité de ética para la experimentación en animales de la Universidad de Navarra. La manipulación de los animales fue realizada de acuerdo con la directiva 2010/63/EU, la cual regula la utilización de animales con fines científicos dentro de la Unión Europea.

Se trabajó con 12 ratones hembras de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas de edad adquiridos de los Laboratorios Harlan (Barcelona, España). Se inocularon por vía intraocular con los rAAVs codificantes para el nanobody anti-PD-1 C11 producidos ( $10^{11}$  copias genómicas/ratón).

Al tratarse de un experimento inicial en donde sólo se quería verificar que el nanobody se expresara correctamente *in vivo*, se usaron grupos pequeños de animales (3 ratones/grupo). Los ratones se dividieron en 3 grupos, cada uno de los cuales fue inoculado con uno de los rAAVs producidos, además de otro grupo control negativo que fue inoculado con suero fisiológico.

Se tomaron muestras de sangre de los animales previo a la administración de las partículas virales, y luego de la inoculación a las semanas 1, 2, 4, 8 y 12. Las muestras de sangre fueron incubadas a  $T_{amb}$  unos minutos hasta su coagulación, y luego fueron centrifugadas ( $16.000 \times g$ , 10 min,  $T_{amb}$ ) para separar el suero. Los niveles de nanobody en suero fueron medidos por ELISA, incluyéndose una curva estándar con el nanobody recombinante purificado (proveniente de *E. coli*), y realizándose distintas diluciones de las muestras de suero. El protocolo del ensayo de ELISA para la titulación del nanobody C11 en suero es similar al descrito anteriormente para la cuantificación de nanobody producido por las líneas celulares transfectadas *in vitro* (sección 2.13, punto

III), con la diferencia de que en este caso las placas fueron sensibilizadas con 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de hPD-1-Fc comercial (R&D Systems, #1086-PD) a 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS, O/N a 4°C.

Los animales fueron anestesiados con isofluorano (Baxter, #1001936040) administrado en una mezcla de  $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$  por medio de un equipo de anestesia, tanto para la administración de los rAAVs como para la recolección de muestras de sangre.

## 2.17. Evaluación de la eficacia antitumoral del nanobody C11

Se evaluó la actividad antitumoral del nanobody C11 en un modelo de cáncer utilizando ratones de la cepa C57BL/6 y la línea singénica MC38.

**I. Preparación de células MC38:** Se amplificaron estas células en medio apropiado (ver Tabla I) hasta obtener una cantidad de células suficiente. Se recogieron en tubos cónicos con medio RPMI-1640 suplementado, se lavaron dos veces con suero fisiológico y se resuspendieron a una concentración de  $10^7$  células/mL de suero fisiológico, manteniéndose en frío hasta la inoculación de los animales.

**II. Inoculación de células MC38 en ratones C57BL/6:** Se utilizaron 40 ratones hembras de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas de edad (Laboratorios Harlan, Barcelona, España). Los ratones anestesiados con isofluorano fueron inoculados con células de la línea MC38 ( $5 \times 10^5$  células/ratón), por vía subcutánea en el flanco derecho, previamente rasurado.

Se monitoreó el crecimiento de los tumores utilizando un calibre durante los días siguientes y se clasificaron los animales según los tamaños tumorales que presentaban al día de comenzar el tratamiento. De esta manera se dividieron los animales formando grupos que presentaran promedios de tamaños tumorales similares entre sí.

**III. Tratamiento de los animales:** Los animales que desarrollaron tumor se separaron en 5 grupos y se administraron los siguientes tratamientos: 1) rAAV8-CAG-C11 por vía intratumoral; 2) rAAV8-CMV-C11 por vía intratumoral; 3) rAAV8-CAG-C11 por vía sistémica; 4) C11 recombinante por vía intraperitoneal; y 5) control sin tratamiento. Para comenzar el tratamiento se esperó a que los tumores midieran aproximadamente 5 mm x 5 mm, aunque suelen crecer de forma heterogénea entre los distintos animales.

Los animales tratados con rAAVs recibieron un título de  $2 \times 10^{11}$  copias genómicas por ratón, tanto en el tratamiento intratumoral (en 50  $\mu\text{L}$  de suero fisiológico) como en el sistémico que se administró por vía intraocular (en 150  $\mu\text{L}$  de suero fisiológico). Para la administración de los rAAVs los animales fueron previamente anestesiados.

El tratamiento con C11 recombinante consistió en inyecciones intraperitoneales conteniendo 35  $\mu\text{g}$  del nanobody recombinante por ratón, en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de suero fisiológico. Esta dosis se repitió cada 24 hs durante 10 días consecutivos. El

nanobody recombinante utilizado fue purificado por cromatografía de afinidad y luego tratado con columnas para eliminación de endotoxinas bacterianas (Thermo Scientific, #88274).

**IV. Recolección de muestras y punto final:** El punto final del experimento se estableció cuando: 1) los tumores alcanzaron un tamaño de 15 mm x 15 mm; o 2) los tumores desarrollaron úlceras. Los animales fueron anestesiados con isoflurano y luego sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub>.

Se recogieron muestras de sangre de los animales al día 15 luego de iniciado el tratamiento (en el caso de los ratones que fueron sacrificados antes, la muestra se tomó el día del sacrificio). En el caso del grupo tratado con C11 recombinante, las muestras se recogieron tras 1,5 hs de la primera dosis, y luego de 24 hs de la última dosis. A partir de las muestras de suero se midieron los niveles de C11 mediante ensayo de ELISA específico contra hPD-1 (de igual forma que en el experimento *in vivo* de expresión a largo plazo de C11, sección 2.16).

Además de las muestras de sangre, se recogieron los tumores luego de sacrificar a los animales. Los tumores extraídos se colocaron en viales y se congelaron inmediatamente en hielo seco, y luego se conservaron a -80°C hasta su uso. A partir de una fracción de los tumores (aproximadamente 100 µg de tejido) se realizó la extracción de ARN utilizando un kit comercial (Promega, #AS1280), homogeneizando mecánicamente la muestra previo a comenzar la extracción. A partir del ARN extraído, se realizó una RT-qPCR para analizar la presencia de ARNm de C11, utilizando cebadores específicos para dicho nanobody (como se describió anteriormente en la sección 2.14). Los datos obtenidos se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de referencia de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

## 2.18. Evaluación de la capacidad de protección del nanobody C11 frente al desarrollo tumoral

Se utilizaron los animales del experimento de expresión a largo plazo de C11 (sección 2.16), los cuales fueron enfrentados a la línea celular MC38 luego de 13 semanas de haber sido inoculados sistémicamente con los 3 rAAVs codificantes para C11. Las células fueron preparadas e inoculadas como se describió anteriormente (sección 2.17), aunque en este experimento se utilizó un número ligeramente mayor de células (6x10<sup>5</sup> células/ratón). Además de los 3 ratones que se tenían como controles sin tratar, se incluyeron otros 4 ratones hembras aproximadamente de la misma edad que tampoco habían recibido ningún tratamiento.

Luego de la administración de las células, se monitoreó el crecimiento de los tumores realizando mediciones con calibre cada 2-3 días. Los ratones fueron sacrificados según los criterios de punto final descritos en la sección anterior.

## 2.19. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., EE.UU.).

En los casos en que se compararon dos grupos de datos entre sí se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. En experimentos donde se compararon más de dos grupos de datos entre sí se utilizó el análisis de varianza de un solo factor (one-way ANOVA), excepto cuando se especifica lo contrario.

Para el análisis de las curvas de supervivencia se utilizó el test log-rank (Mantel-Cox).

En todos los casos, un valor de p menor a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

## 2.20. Soluciones amortiguadoras y reactivos de uso corriente

**Tabla VII. Soluciones y buffers de uso corriente utilizados y su composición.**

Buffer/Solución	Composición	pH
Buffer fosfato salino (PBS) 10x	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en H <sub>2</sub> O MilliQ	7,4
Buffer Tris-acetato para electroforesis (TAE) 50x	2 M Tris base, 50 mM EDTA disódica y 5,7 % ácido acético glaciado en H <sub>2</sub> O MilliQ	8,0
Buffer Tris-salino (TBS) 10x	0,5 M Tris-Cl y 1,5 M NaCl en H <sub>2</sub> O MilliQ	7,6
Buffer de carga 6x para geles de agarosa	30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol y 0,25% xileno cianol FF en H <sub>2</sub> O MilliQ	-
Buffer de corrida 10x para SDS-PAGE	2,5 M Tris base, 19,2 M Glicina y 10 % dodecil sulfato de sodio (SDS) en H <sub>2</sub> O MilliQ	-
Buffer de carga 6x para SDS-PAGE	0,35 M Tris-Cl, 10% SDS, 30% glicerol, 0,175 mM azul de bromofenol y 0,1 M ditioneitol (DTT) en H <sub>2</sub> O MilliQ	-
Solución colorante con azul de Coomassie	0,1% m/v azul de Coomassie, 10% v/v ácido acético y 40% v/v metanol en H <sub>2</sub> O MilliQ	-
Solución decolorante	7,5% v/v ácido acético y 5% v/v metanol en H <sub>2</sub> O MilliQ	-
Buffer de transferencia 1X para Western blot	25 mM Tris base, 190 mM Glicina y 20% metanol en H <sub>2</sub> O MilliQ	-
Buffer de citometría (FCB)	1% BSA (seroalbúmina bovina), 0,05% azida de sodio y 25 mM HEPES en PBS 1X	7,4
Sustrato de revelado para la enzima peroxidasa (HRP)	200 µL de solución 6 mg/mL de TMB (Sigma-Aldrich, #T2885) en dimetilsulfóxido (DMSO), 50 µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1% y 12,5 mL de buffer acetato 0,1 M pH 5,5	-

**Tabla VIII. Medios de cultivo bacterianos utilizados y su composición.**

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Composición</b>	<b>pH</b>
<b>LB</b> (Luria-Bertani)	10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, en H <sub>2</sub> O c.s.p. 1 L. Autoclavado.	7
<b>LB-agar</b> (Luria-Bertani agar)	10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, 20 g agar, en H <sub>2</sub> O c.s.p. 1 L. Autoclavado.	7
<b>SB</b> ( <i>Super broth</i> )	30 g triptona, 20 g extracto de levadura, 10 g MOPS, en H <sub>2</sub> O c.s.p. 1 L. Autoclavado.	7
<b>SOC</b> ( <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> )	20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 0,5 g NaCl, en H <sub>2</sub> O c.s.p. 1 L. Autoclavado y luego adicionado con 10 mL de MgCl <sub>2</sub> 1 M y 20 mL de glucosa 1 M previamente filtrados por 0,22 µm.	7

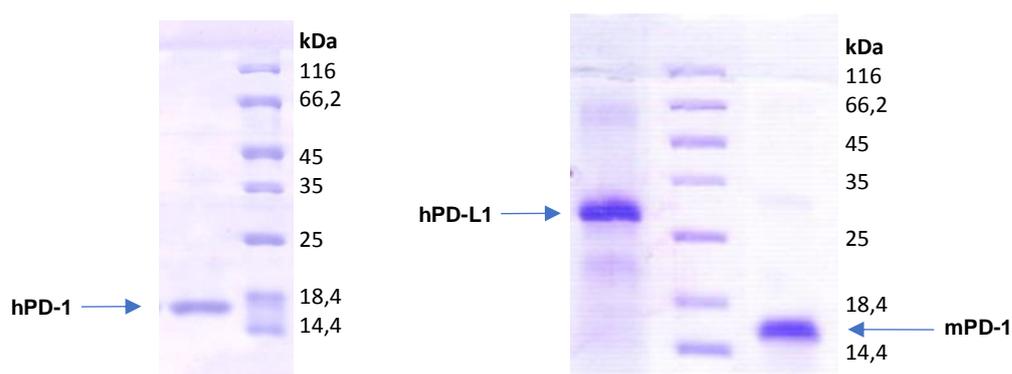
### 3. Resultados

#### 3.1. Producción de ectodominios recombinantes de PD-1 y PD-L1

Para seleccionar nanobodies contra PD-1 y PD-L1 (el primer objetivo de esta tesis), se produjeron los ectodominios recombinantes de estas proteínas para realizar la inmunización de llamas. Los plásmidos para la expresión de hPD-1, mPD-1 y hPD-L1 fueron cedidos por el Dr. Almo (Albert Einstein College of Medicine, NY, EE.UU.), cuyo grupo ha desarrollado las estructuras cristalográficas. Se realizó la producción de los ectodominios recombinantes de PD-1 y PD-L1 siguiendo el protocolo descrito [236]. Si bien estos ectodominios fueron producidos en un sistema procarionota, los autores demostraron que mantienen su funcionalidad y capacidad de unión receptor-ligando [96].

Se lograron obtener los ectodominios recombinantes de hPD-1, mPD-1 y hPD-L1 en buenas cantidades y con una pureza adecuada según los resultados observados en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Fig. 15). Los pesos moleculares obtenidos según el gel se correspondieron con los esperados: 17,9 kDa para PD-1 y 26,5 kDa para PD-L1.

En todos los casos se obtuvieron buenas cantidades de proteína, suficientes para realizar las inmunizaciones, rondas de selección y monitoreo de clones positivos.



**Fig. 15. SDS-PAGE de los ectodominios recombinantes de PD-1 y PD-L1 producidos en el laboratorio.** Tinción con azul de Coomassie.

La biotilación de los ectodominios recombinantes producidos se realizó según se describió anteriormente (sección 2.2), y el número de moléculas de biotina por molécula de ectodominio recombinante se evaluó por MALDI-TOF. En una de las condiciones utilizada para la biotilación (relación de moles proteína-biotina 1:4), se obtuvieron resultados adecuados, observándose solamente un 20% de proteína sin biotilar, y el resto de la proteína conjugada a una (~50%) o a dos (~30%) moléculas de biotina (resultados no mostrados).

### 3.2. Generación de células HEK-293 PD-1<sup>+</sup> o PD-L1<sup>+</sup> mediante transfección transitoria

En esta tesis fue necesario generar células que expresaran transitoriamente el ADNc completo de PD-1 o PD-L1 humano y murino con el fin de poseer una fuente confiable de dichas proteínas en su conformación nativa, expresada a partir de células eucariotas. Las células PD-1<sup>+</sup> o PD-L1<sup>+</sup> fueron generadas por transfección transitoria, utilizando un plásmido de expresión eucariota codificante para los ADNc completos de las proteínas. Se utilizó la línea celular HEK-293 por ser fácilmente transfectable y por constituir un buen sistema de expresión.

Para lograr la expresión de PD-1 y PD-L1 en la superficie de las células HEK-293, se subclonaron los ADNc completos de estas proteínas al plásmido de expresión eucariota pEF1-Myc-His (ver sección 2.4).

La optimización de las condiciones de transfección de células HEK-293 se realizó en primer lugar utilizando un plásmido codificante para GFP bajo el promotor CMV, debido a que la eficiencia de transfección en este caso es fácilmente observable en un microscopio de fluorescencia o por citometría de flujo. Para la optimización de las transfecciones se ensayaron distintas condiciones de: número de células sembradas, cantidad de ADN y del agente de transfección polietilenimina (PEI) utilizados. La puesta a punto se realizó en placas de 6 pocillos y en placas circulares grandes de 15 cm de diámetro (p150), ya que ambos tipos de transfección eran de utilidad: las transfecciones a pequeña escala se utilizaron para la realización de las distintas rondas de selección de nanobodies sobre las células positivas para PD-1 o PD-L1, y las transfecciones a gran escala se realizaron para generar stocks de células que pudieran ser utilizadas durante el monitoreo de clones positivos luego de las rondas de *panning*.

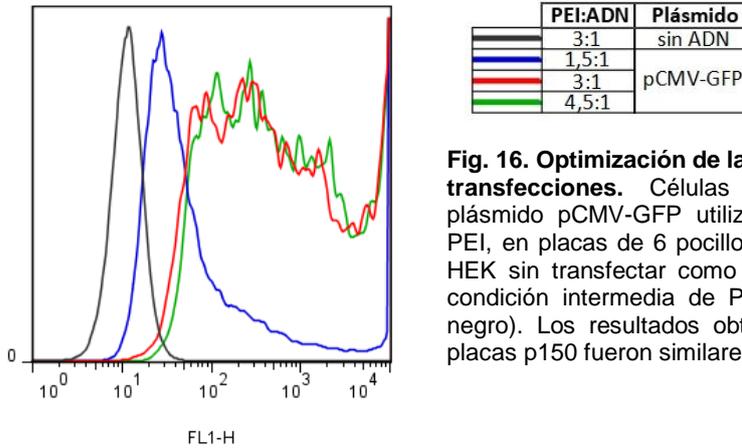
El número de células a ser sembradas el día anterior se estableció de forma de obtener una confluencia de 70-80% al momento de la transfección. Esto fue logrado en nuestro caso sembrando  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo de placa de 6 pocillos, y  $8,5 \times 10^6$  células/p150.

Para establecer la cantidad de ADN a ser utilizada se realizaron transfecciones con tres cantidades distintas de ADN (plásmido codificante para GFP), utilizando una condición fija de PEI. Las condiciones en las que se obtuvieron mejores niveles de expresión de GFP fueron cuando se emplearon 2,5 µg de ADN para las placas de 6 pocillos y 30 µg de ADN para las placas p150 (resultados no mostrados).

Luego de haber establecido la cantidad de ADN a ser utilizada, se probaron cuatro cantidades distintas de agente de transfección, establecidas según lo observado en la bibliografía. Se utilizó un exceso de µg de PEI con respecto al de ADN de 1.5, 3, 4.5 y 6 veces.

La condición en la que se empleó mayor cantidad de PEI (relación PEI:ADN de 6:1) fue descartada por presentar alta citotoxicidad. Las eficiencias de transfección más elevadas se obtuvieron utilizando concentraciones intermedias de PEI (excesos de 3 y

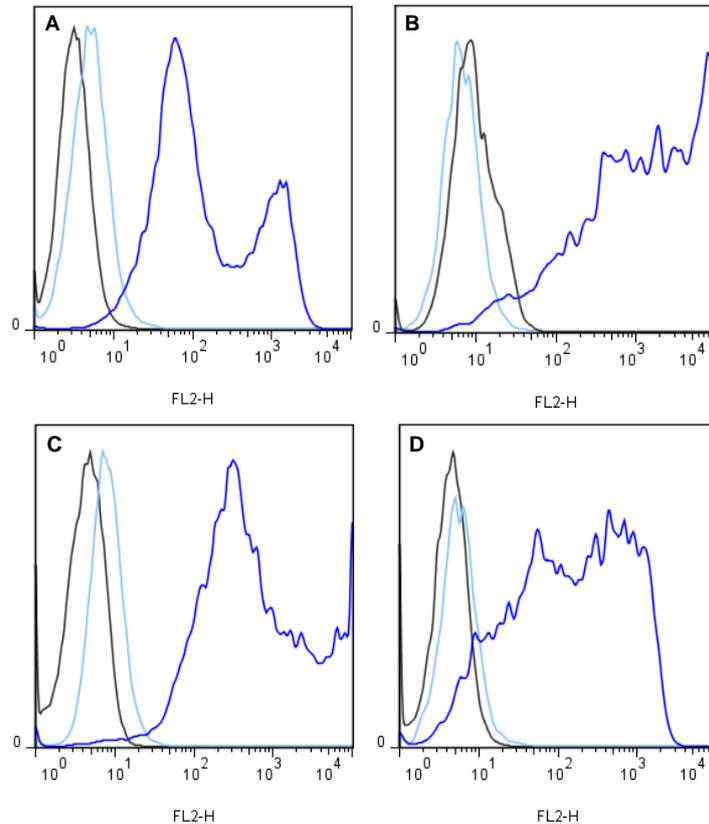
4,5 veces del agente de transfección), entre las cuales no se observaron grandes diferencias (Fig. 16). Esto ocurrió tanto para las transfecciones en placas de 6 pocillos como para las transfecciones en placas p150.



**Fig. 16. Optimización de la cantidad de PEI utilizado para las transfecciones.** Células HEK-293 transfectadas con el plásmido pCMV-GFP utilizando distintas concentraciones de PEI, en placas de 6 pocillos. Se muestran también las células HEK sin transfectar como control negativo, expuestas a una condición intermedia de PEI pero en ausencia de ADN (en negro). Los resultados obtenidos para las transfecciones en placas p150 fueron similares.

Luego de haber establecido las condiciones para la transfección de las células HEK-293 con el plásmido codificante para GFP, se realizaron las transfecciones utilizando los plásmidos codificantes para PD-1 y PD-L1 generados. Se utilizó una relación PEI:ADN de 4,5:1, y la cantidad de ADN determinada previamente. Las células transfectadas se evaluaron por citometría tras 48 hs de la transfección (tiempo en el que se observó el pico de expresión para las transfecciones con pCMV-GFP), utilizando anticuerpos comerciales específicos contra las proteínas de interés asociados al fluoróforo ficoeritrina (PE).

Como se puede observar en la Fig. 17, se logró obtener una buena expresión de las cuatro proteínas sobre la superficie de las células HEK-293. Las células transfectadas con PD-1 o PD-L1 se utilizaron para distintos experimentos en el momento de la recogida (48 hs luego de la transfección) o se congelaron para su utilización posterior. Los niveles de PD-1 o PD-L1 en la superficie celular fueron reevaluados tras la descongelación de las células.



**Fig. 17. Células HEK-293 transfectadas transitoriamente con plásmidos codificantes para: (A) hPD-1, (B) mPD-1, (C) hPD-L1 y (D) mPD-L1.** En azul: células transfectadas marcadas con el anticuerpo comercial control positivo, específico para la proteína de cada transfección; en celeste: células HEK-293 transfectadas incubadas con el control isotópico correspondiente en cada caso; en negro: células HEK-293 sin transfectar, incubadas con el anticuerpo comercial control positivo de cada transfección. La medición de los niveles de las proteínas se realizó tras 48 hs de realizadas las transfecciones.

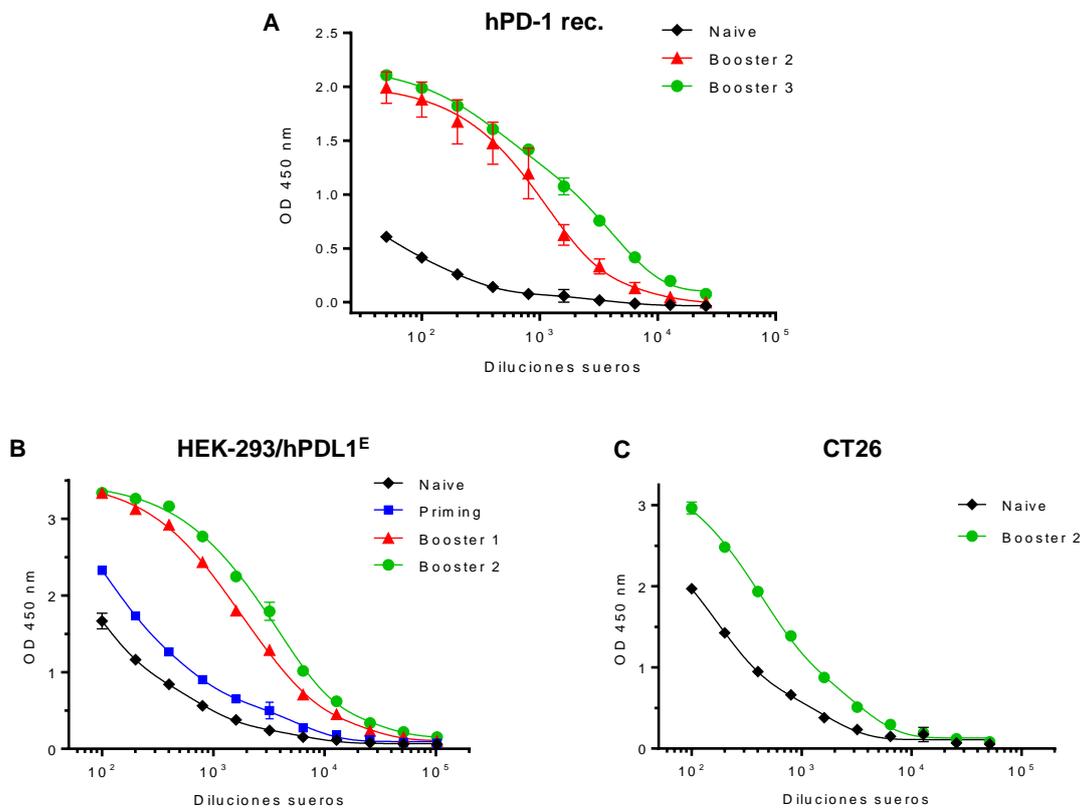
### 3.3. Generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos

Durante este proyecto se inmunizaron tres llamas hembras adultas del Parque Lecocq. Dos llamas fueron inmunizadas con los ectodominios recombinantes de hPD-1, mPD-1 y hPD-L1, mientras que el tercer animal fue inmunizado con líneas celulares que expresan constitutivamente PD-L1 humano y murino (ver sección 2.5, Tabla III).

A lo largo del proceso de inmunización se recogieron muestras de sangre para analizar el título de anticuerpos totales de la llama contra el antígeno de la inmunización. De esta manera, se corrobora que el animal genera una respuesta de anticuerpos contra el antígeno y además se evalúa si los títulos aumentan de una dosis a la siguiente. Los títulos de los anticuerpos totales en suero se evalúan por ELISA, sensibilizando los pocillos con el antígeno de la inmunización. En la Fig. 18 A se muestra la titulación de los anticuerpos contra el ectodominio recombinante de hPD-1 de la llama utilizada para la generación de la biblioteca 1, siendo estas curvas representativas para lo observado en el caso de los títulos de la llama inmunizada con mPD-1 y hPD-L1 (biblioteca 2).

En el caso de la biblioteca 3, las células utilizadas para la inmunización expresaban en su superficie hPD-L1 (línea HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup>) o mPD-L1 (línea CT26). Para la primera dosis (*priming*) y el primer refuerzo (*booster*) se inmunizó con la línea HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup>, y en el segundo *booster* se administraron ambas líneas celulares, con el fin de favorecer el desarrollo de anticuerpos con reactividad cruzada por PD-L1 de ambas especies. En este caso, los títulos de anticuerpos se evaluaron utilizando los extractos proteicos de las membranas de las células utilizadas para la inmunización, y se consideró que el aumento en los títulos contra la célula en su totalidad era proporcional al aumento en la respuesta contra el antígeno de interés, expresado en la membrana para ambas variantes.

Para estas titulaciones, primero se realizó un ensayo en donde se probaron diferentes diluciones del extracto proteico de las células para la sensibilización de los pocillos de la placa, y diluciones seriadas de las muestras de suero. Se estableció de esta manera la dilución del extracto proteico a utilizar durante la titulación de los anticuerpos totales de la llama, para obtener curvas representativas para todas las muestras de suero (Fig. 18, B y C).



**Fig. 18. Titulación de los anticuerpos totales de llama en suero contra los antígenos utilizados durante las inmunizaciones. (A)** Anticuerpos totales de la llama inmunizada con hPD-1 (biblioteca 1), titulados en ELISA contra el ectodominio recombinante de hPD-1. **(B)** y **(C)** Anticuerpos totales de la llama inmunizada con las líneas celulares (biblioteca 3), titulados en ELISA contra los extractos proteicos de HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup> y CT26 respectivamente.

Luego de completar las rondas de inmunización, se recolectó sangre suficiente de las llamas para la generación de las bibliotecas, como se describió en la sección 2.5. Tras realizar las ligaciones de los genes de los nanobodies con el vector pComb3X, se electroporó el producto de las ligaciones en células competentes comerciales de manera de optimizar la diversidad de las bibliotecas al aumentar la eficiencia de las transformaciones. Se plaquearon diluciones de las bacterias transformadas en placas de LB agar-ampicilina, para evaluar la diversidad obtenida de las bibliotecas. Los valores de las mismas fueron de entre  $10^8$  y  $10^9$  ufc, y teniendo en cuenta que se partió de  $10^7$  células B circulantes, se puede asumir que se logró obtener el repertorio completo de anticuerpos de la llama en ese momento, con cada anticuerpo representado entre 10 y 100 veces. El resto del cultivo bacteriano se utilizó para la producción de los fagos filamentosos que expresan los nanobodies en sus superficies (como se describió en la sección 2.5, punto II). Los fagos obtenidos luego de la amplificación y purificación conforman la biblioteca de nanobodies, que se utilizó para la selección de clones específicos para las proteínas de interés. Los títulos obtenidos para las tres bibliotecas fueron aceptables según lo esperado (Tabla IX).

**Tabla IX. Títulos de las bibliotecas generadas (en ufc/mL).**

Biblioteca	Antígeno de inmunización	Título (ufc/mL)
1	Ectodominio de hPD-1	$1,1 \times 10^{12}$
2	Ectodominios de mPD-1 y hPD-L1	$9,5 \times 10^{11}$
3	HEK-293/hPD-L1 <sup>E</sup> + CT26	$1,5 \times 10^{12}$

### 3.4. Selección de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1

#### 3.4.1. PD-1

Se realizaron *pannings* contra PD-1 humano (a partir de la biblioteca 1) y PD-1 murino (a partir de la biblioteca 2). Los primeros *pannings* realizados fueron en pocillos de ELISA sensibilizados con los ectodominios recombinantes de PD-1. Se realizaron tres rondas de selección en cada *panning*, y el tercer *output* fue utilizado para el monitoreo de clones específicos para las proteínas de interés.

Para el *screening* de clones positivos, se seleccionaron colonias al azar obtenidas a partir del plaqueo del último *output* en placas de LB agar-ampicilina, y se produjeron los nanobodies como se explica en la sección 2.7. Los sobrenadantes de los clones fueron evaluados en ELISA contra los ectodominios recombinantes de PD-1 humano o murino, y en citometría de flujo utilizando células HEK-293 positivas para mPD-1 o hPD-1.

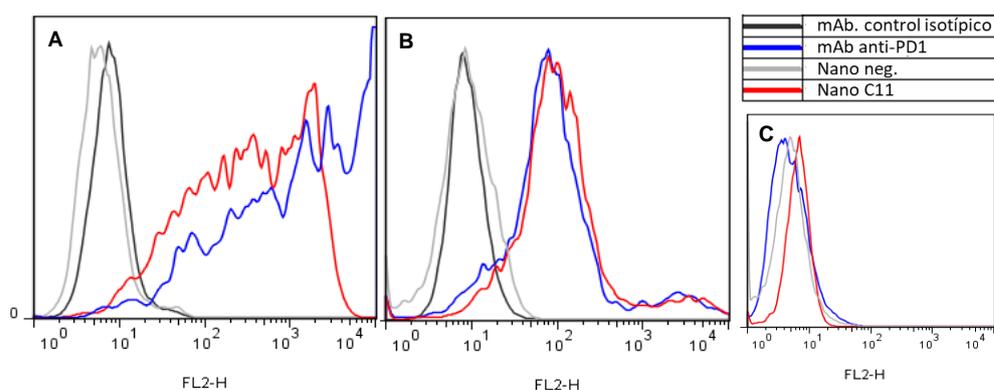
En los *screenings* por ELISA, se obtuvieron clones con reactividad por el ectodominio recombinante de PD-1 (humano o murino, según el caso), y sin reactividad contra la BSA. Sin embargo, no se logró obtener ningún clon positivo en citometría de flujo. Los

nanobodies que presentaron reactividad en ELISA contra los ectodominios recombinantes de PD-1 no reconocieron el PD-1 expresado en la superficie de las células (resultados no mostrados).

Por lo tanto, la selección de clones a partir del ectodominio recombinante adsorbido directamente en el pocillo de ELISA parecería favorecer la selección de clones dirigidos contra epítopes no nativos de la proteína, debido a que ninguno fue capaz de reconocer a la proteína expresada sobre la superficie celular. A raíz de estos resultados, se modificó la estrategia de *panning*, utilizando como sustrato a las células HEK-293 transfectadas con PD-1. Se realizaron tres rondas de *panning* para cada variante y luego se monitoreó la presencia de clones positivos por citometría de flujo sobre las mismas células utilizadas durante la selección. En ambos casos se ensayaron aproximadamente 92 clones (un bloque de cultivo). Los resultados obtenidos se explican a continuación para cada variante.

**Selección de nanobodies contra mPD-1 (biblioteca 2):** En el caso de mPD-1, se obtuvieron sólo dos clones positivos contra las células HEK-293/mPD-1<sup>+</sup>. Tras la secuenciación del ADN se comprobó que en realidad se trataba del mismo clon, que se nombrará C11 de aquí en adelante (secuencia aminoacídica en Fig. 26).

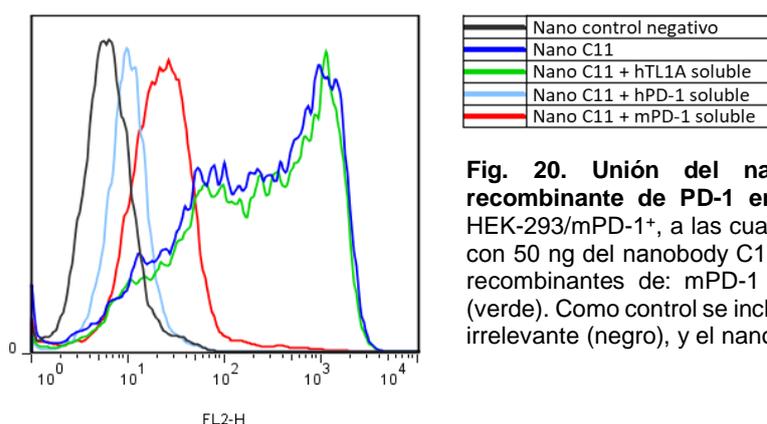
Este clon presentó reactividad cruzada por la variante humana de PD-1 al ser evaluado sobre células HEK-293/hPD-1<sup>+</sup> en citometría de flujo (Fig. 19). También se evaluó su reactividad en ELISA contra los ectodominios recombinantes de PD-1 de humano y de ratón. Se obtuvieron resultados negativos para ambas variantes, tanto adsorbiendo directamente los ectodominios recombinantes a los pocillos, como utilizando las proteínas biotiniladas capturadas por avidina a la placa. Estos resultados apoyan nuestra teoría de que la inmovilización del ectodominio de PD-1 en la placa de ELISA genera su desnaturalización, y también parecerían indicar que la biotinilación de PD-1 puede afectar su estructura o al menos al sitio de unión del nanobody seleccionado. Cabe destacar que también se evaluó la reactividad de C11 en ELISA contra el ectodominio recombinante de mPD-1 producido y cedido amablemente por el grupo del Dr. Almo, obteniéndose igualmente resultados negativos.



**Fig. 19. Reactividad del nanobody C11 en citometría de flujo.** Se evaluó la reactividad de C11 contra: (A) células HEK-293/mPD-1<sup>+</sup>, (B) Células HEK-293/hPD-1<sup>+</sup> y (C) células HEK-293 wt. Se incluyeron los

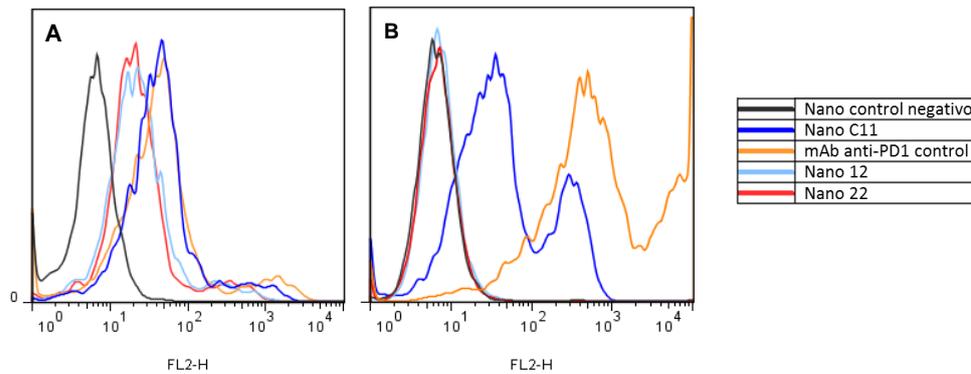
siguientes controles: anticuerpo comercial contra PD-1 humano o murino (en azul), el anticuerpo control isotípico correspondiente para cada caso (en negro), y un nanobody con especificidad irrelevante (en gris).

Para evaluar si el nanobody C11 era capaz de unirse a los ectodominios recombinantes producidos en nuestro laboratorio sin ser adsorbidos en placa de microtitulación, se realizó un ensayo de competencia utilizando las células HEK-293/mPD-1<sup>+</sup> y los ectodominios recombinantes de PD-1 de ambas especies. Se incubó el nanobody con las células, en presencia de un exceso del ectodominio recombinante de PD-1 en solución. Se observó una disminución en la unión del nanobody a las células, lo cual indica que éste reconoce los ectodominios solubles y por lo tanto disminuye su unión al PD-1 de las superficies celulares. Esto no ocurre si se utiliza el ectodominio recombinante de otra proteína irrelevante, el TL1A humano (del inglés: “*TNF-like ligand 1A*”), demostrando que la disminución en el marcaje de las células por C11 se debe al reconocimiento específico de los ectodominios recombinantes de PD-1 (Fig. 20). Estos resultados apoyan nuestra teoría de que los ectodominios de PD-1 pierden su estructura nativa al adsorberse en placa de ELISA, probablemente debido a su bajo peso molecular y/o características estructurales particulares. Además, como se describirá más adelante (sección 3.6), el nanobody C11 es capaz de reconocer el ectodominio recombinante comercial de PD-1 (de ambas especies) fusionado a la región Fc de IgG1 humana en ELISA.



**Fig. 20. Unión del nanobody C11 al ectodominio recombinante de PD-1 en solución.** Se utilizaron células HEK-293/mPD-1<sup>+</sup>, a las cuales se las incubó simultáneamente con 50 ng del nanobody C11 y con 10 µg de los ectodominios recombinantes de: mPD-1 (rojo), hPD-1 (celeste), o hTL1A (verde). Como control se incluyó un nanobody con especificidad irrelevante (negro), y el nanobody C11 solo (azul).

**Selección de nanobodies contra hPD-1 (biblioteca 1):** A partir del *panning* realizado sobre células HEK-293/hPD-1<sup>+</sup>, se obtuvieron dos clones positivos contra hPD-1 en citometría de flujo, ninguno de los cuales presentó reactividad cruzada por la variante murina al ser evaluados sobre células HEK-293/mPD-1<sup>+</sup> (Fig. 21). Estos clones, denominados 12 y 22, tampoco reconocieron los ectodominios recombinantes de PD-1 en ELISA (secuencias aminoacídicas en Fig. 26).



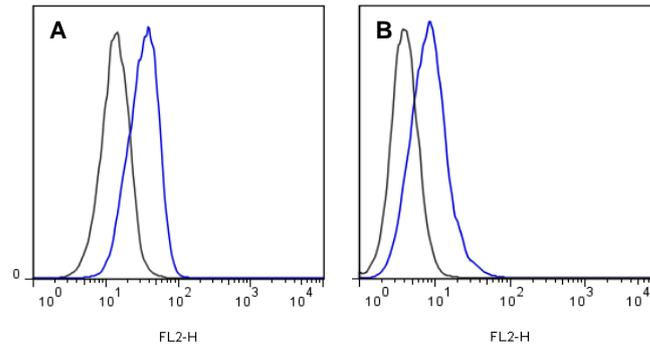
**Fig. 21. Nanobodies aislados durante el *panning* sobre células HEK-293/hPD-1<sup>+</sup>.** Se muestran las células (A) HEK-293/hPD-1<sup>+</sup> y (B) HEK-293/mPD-1<sup>+</sup> marcadas con los dos nanobodies aislados durante este *panning*: clon 12 (celestes) y clon 22 (rojo). Se incluyeron los correspondientes controles: anticuerpos comerciales contra PD-1 (anaranjado), nanobody C11 anti-PD-1 (azul) y nanobody con especificidad irrelevante (negro).

### 3.4.2. PD-L1

**Selección de nanobodies contra hPD-L1:** En el caso de hPD-L1, se generaron dos bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos: la primera, a partir de una llama inmunizada con el ectodominio recombinante producido en el laboratorio, y la segunda, de una llama inmunizada con las líneas celulares HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup> y CT26.

A partir de la experiencia obtenida durante la selección de nanobodies contra PD-1, quedó en evidencia la importancia de la conformación de la proteína durante el *panning*, y quizás también durante la inmunización, para obtener nanobodies que reconozcan al antígeno en su conformación nativa. Esto es de suma importancia ya que constituye una condición necesaria para que los nanobodies sean capaces de bloquear la interacción PD-1/PD-L1. Por lo tanto, se propuso cambiar de estrategia para la selección de clones contra PD-L1, utilizando la biblioteca obtenida a partir de la inmunización con las líneas celulares que expresaban en sus superficies PD-L1 en su forma nativa.

Durante la inmunización desconocíamos los niveles de expresión de PD-L1 de las líneas estables porque no contábamos con los anticuerpos comerciales para el marcaje para citometría de flujo. Estas células fueron cedidas por nuestros colaboradores del CIMA, que reportaron altos niveles de expresión de hPD-L1 en la línea de células HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup>. Sin embargo, tras el transporte a Uruguay y los sucesivos pasajes de las células, se comprobó que el nivel de expresión de hPD-L1 disminuyó significativamente, observándose una expresión baja (Fig. 22 A). Desafortunadamente, se tuvo conocimiento de este hecho cuando el protocolo de inmunización estaba muy avanzado y no pudo ser modificado. Por esta razón, para las estrategias de *panning* y *screening* se utilizaron células transfectadas de forma transitoria, las cuales sobre-expresan la proteína de interés en sus membranas con niveles mucho mayores a los que presentan las líneas estables.



**Fig. 22. Niveles de expresión de PD-L1 en las líneas estables (A) HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup> y (B) CT26.** En azul: células marcadas con los anticuerpos comerciales contra PD-L1 (humano o murino, respectivamente), y en negro: células marcadas con los controles isotípicos correspondientes.

Se comenzó realizando la selección de nanobodies contra hPD-L1 utilizando para el *panning* las células HEK-293 transfectadas transitoriamente, y el ectodominio de hDP-L1 comercial fusionado a la región Fc de IgG1 humana (R&D Systems, #156-B7), adquirido durante esta etapa para maximizar la selección de clones contra epítopes nativos. Se realizaron simultáneamente tres *pannings* distintos: 1) tres rondas de selección sobre células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup>, 2) una ronda sobre células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup> y la segunda sobre hPD-L1-Fc comercial en pocillos de ELISA, y 3) dos rondas sobre células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup> y una última ronda sobre hPD-L1-Fc comercial en pocillos de ELISA.

Sin embargo, ninguna de estas estrategias fue efectiva para la selección de nanobodies contra hPD-L1. Para la primera estrategia de *panning*, en la cual se utilizó como sustrato para la selección únicamente a las células, no se obtuvo ningún clon positivo en citometría contra las células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup>. Por otra parte, cuando se utilizó la proteína recombinante comercial durante la estrategia de selección (estrategias 2 y 3), los títulos de los *outputs* de fagos obtenidos fueron demasiado bajos, indicando la ausencia de fagos específicos para la proteína de interés.

Estos resultados parecerían indicar que la inmunización con las líneas celulares no generó una respuesta eficiente de anticuerpos de cadena pesada contra hPD-L1. Por lo tanto, se decidió regresar a la estrategia pensada originalmente, para lo cual se utilizó la biblioteca generada a partir del animal inmunizado con el ectodominio recombinante de hPD-L1 (biblioteca 2).

Con el fin de conservar la estructura nativa del ectodominio durante el *panning*, se utilizó el ectodominio recombinante de hPD-L1 biotinilado para la selección de nanobodies, a partir de dos estrategias levemente diferentes:

- *Panning* “en placa” (P): se preparó el pocillo de la placa con el hPD-L1 biotinilado capturado por la avidina, y posteriormente se incubó con los fagos (de la biblioteca o del *output* de la ronda previa, según el caso).

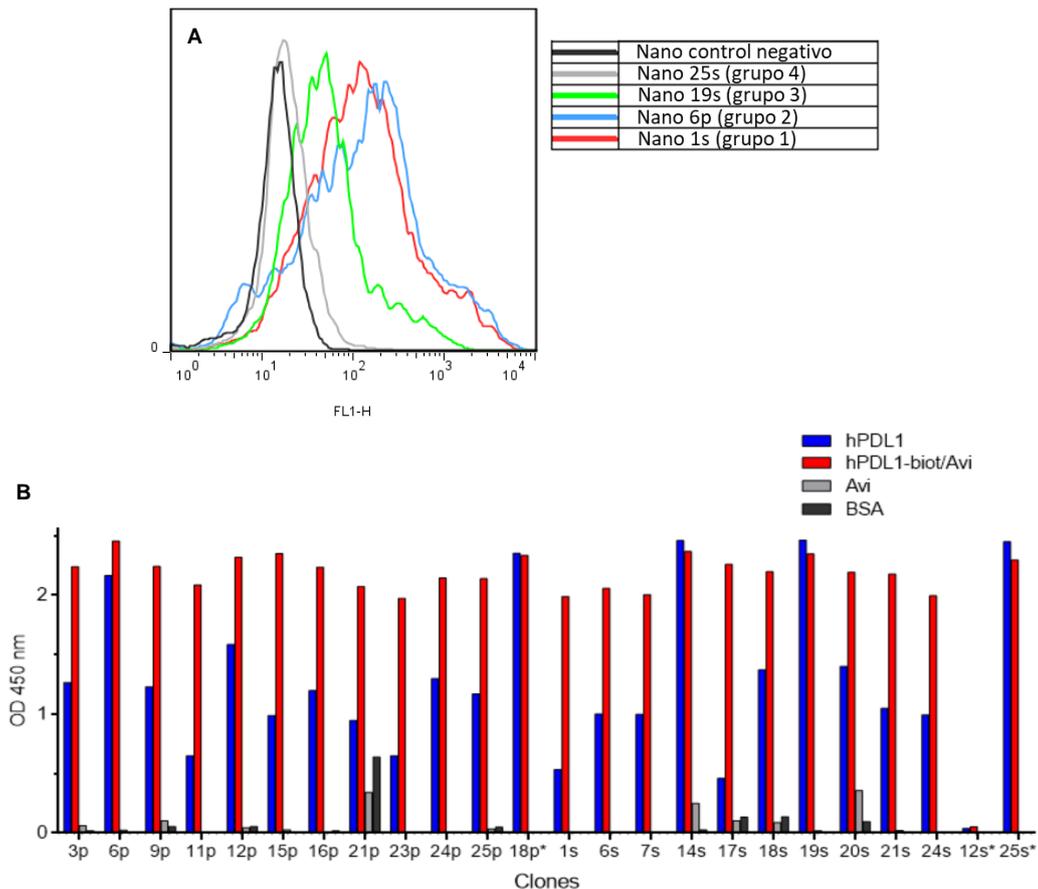
- *Panning* “en solución” (S): se preincubaron los fagos (de la biblioteca o del *output* de la ronda previa) con hPD-L1 biotinilado en un microtubo durante 1 hora, y luego se transfirió la mezcla a la placa de microtitulación previamente sensibilizada con avidina y bloqueada con BSA. Por lo tanto, en este caso se permite la unión de los fagos a hPD-L1 antes de que éste sea capturado por la avidina, a diferencia de la estrategia anterior.

Luego de realizar 3 rondas de selección utilizando cada una de las estrategias, se realizó el monitoreo de clones positivos. Se evaluaron 25 clones de cada *panning* en ELISA contra el ectodominio recombinante de hPD-L1 y en citometría de flujo sobre células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup>.

Los resultados de estas estrategias de *panning* fueron buenos, obteniéndose numerosos clones positivos tanto en ELISA como en citometría de flujo. La primera prueba de reactividad se realizó en citometría sobre las células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup>, obteniéndose 21 y 16 clones positivos de los 25 evaluados para los *pannings* P y S respectivamente (Fig. 23 A). Se evaluó la reactividad de los clones positivos obtenidos contra las células HEK-293 wt y HEK-293/mPD-L1<sup>+</sup>, obteniéndose para todos los casos resultados negativos. Se seleccionaron 12 clones de cada *panning* y se evaluaron en ELISA contra el ectodominio recombinante de hPD-L1, obteniéndose en la mayoría de los casos resultados positivos (Fig. 23 B).

Los clones positivos obtenidos fueron clasificados en cuatro grupos de acuerdo con su comportamiento en ELISA y citometría de flujo:

- Grupo 1: clones positivos en citometría de flujo y en ELISA. En ELISA, presentan mayor señal para la versión biotinilada de hPD-L1 capturada por avidina, que para la versión adsorbida directamente en la placa. En este grupo se incluyen la mayoría de los clones seleccionados.
- Grupo 2: clones positivos en citometría de flujo y en ELISA. En ELISA, presentan señales similares para el hPD-L1 adsorbido directamente y para su versión biotinilada y capturada por la avidina. En este grupo se incluyen los clones: 6p y 14s.
- Grupo 3: clones positivos en citometría de flujo, aunque con menor señal en comparación con los grupos 1 y 2, y positivos en ELISA, con señales similares para ambos formatos. Dentro de este grupo se clasifica el clon 19s.
- Grupo 4: clones negativos en citometría de flujo, y positivos en ELISA, con señales similares para ambos formatos. Los clones pertenecientes a este grupo fueron descartados para estudios posteriores, ya que no reconocerían la forma nativa de hPD-L1 expresado en las membranas celulares (clones 18p y 25s).



**Fig. 23. Resultados del *screening* a partir del *panning* sobre hPD-L1 recombinante biotinilado, utilizando la biblioteca 2. (A)** Reactividad de un clon representativo de cada grupo en citometría de flujo contra las células HEK-293 transfectadas transitoriamente con hPD-L1. **(B)** Reactividad de los clones en ELISA contra el ectodominio recombinante de hPD-L1 adsorbido directamente en la placa de ELISA (en azul) o biotinilado y capturado por la avidina (en rojo), y contra los controles negativos: avidina (en gris) y BSA (en negro). Los clones marcados con asterisco (18p, 12s y 25s) son negativos en citometría de flujo sobre células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup>.

**Selección de nanobodies contra mPD-L1:** Se comenzó realizando la selección de nanobodies específicos para PD-L1 murino sobre las células HEK-293 transfectadas transitoriamente con el ADNc de esta proteína, utilizando la biblioteca 3 (correspondiente a la inmunización con las líneas celulares). Se llevaron a cabo dos rondas de selección sobre estas células, y a partir del segundo *output* se realizó un monitoreo de clones positivos en citometría de flujo sobre las mismas células utilizadas durante el *panning*, evaluando 92 clones seleccionados al azar.

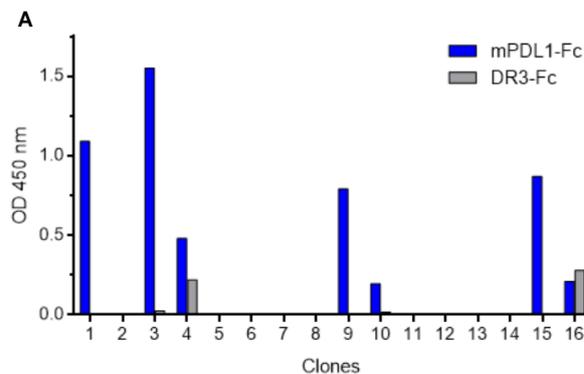
Aunque durante el *panning* se realizó la pre-adsorción de los fagos sobre las células HEK-293 wt para evitar la selección de clones contra componentes de la célula, en este caso se identificaron tres clones que reconocieron a las células HEK-293 wt (así como a las células HEK-293/mPD-L1<sup>+</sup>).

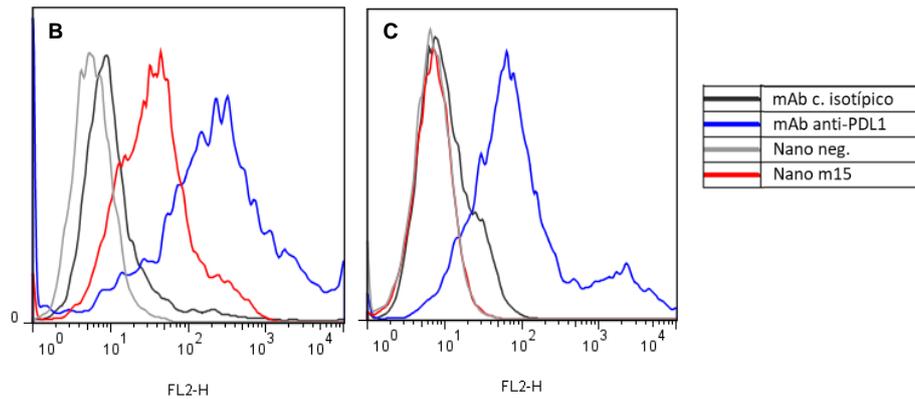
Luego de este intento, y de las dificultades experimentadas en la selección de clones positivos contra PD-L1, se decidió dejar de lado a la biblioteca 3 a pesar de que se trataba de la única biblioteca que había sido inmunizada con mPD-L1. Se utilizó

entonces la biblioteca 2, proveniente de la llama inmunizada con el ectodominio recombinante de hPD-L1, con la esperanza de aislar nanobodies con reactividad cruzada por la variante murina. Para optimizar el aislamiento de clones específicos para el antígeno de interés, se adquirió el ectodominio recombinante comercial de mPD-L1 fusionado a la región Fc de IgG1 humana (R&D Systems, #1019-B7). Como control de especificidad de los clones aislados, se utilizó el ectodominio recombinante de DR3 (del inglés: “*Death Receptor 3*”), fusionado a la misma región Fc (R&D Systems, #943-D3).

En una primera instancia, se partió del primer *output* amplificado de la biblioteca 2 tras una ronda de selección sobre hPD-L1 biotinilado capturado por la avidina (estrategia a partir de la cual tuvimos éxito en aislar nanobodies contra hPD-L1). Durante el primer *panning* realizado, la mayoría de los clones aislados reconocieron la región Fc, pues eran capaces de reconocer tanto mPD-L1 como DR3, ambos fusionados al Fc de la IgG1 humana. Solamente uno de los 16 clones evaluados mostró reactividad por el ectodominio recombinante de hPD-L1, pero no reconoció mPD-L1-Fc ni DR3-Fc. Este nanobody, denominado clon 11, fue aislado para su secuenciación y posteriormente se evaluó su capacidad de inhibición de la unión PD-1/PD-L1 por ELISA (sección 3.6).

Luego de esta experiencia, se realizó el *panning* contra mPD-L1-Fc incluyendo durante la incubación de los fagos suero humano normal al 10%, para minimizar la selección de fagos que reconocieran la región Fc de la proteína comercial. Tras la primera ronda de selección sobre mPD-L1-Fc, se realizó un monitoreo de clones positivos en ELISA, evaluándose 16 clones seleccionados aleatoriamente contra mPD-L1-Fc y DR3-Fc (Fig. 24 A). No se obtuvieron clones reactivos contra DR3-Fc, indicando que el uso de suero durante el *panning* fue efectivo para evitar la selección de clones contra la región Fc. En este *screening* se obtuvieron cuatro clones positivos contra mPD-L1-Fc, los cuales fueron posteriormente evaluados en citometría de flujo sobre células HEK-293/mPD-L1<sup>+</sup> y HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup>. Contra-intuitivamente, los cuatro clones reconocieron la variante humana de PD-L1 en citometría, pero no la variante murina (Fig. 24 B y C).



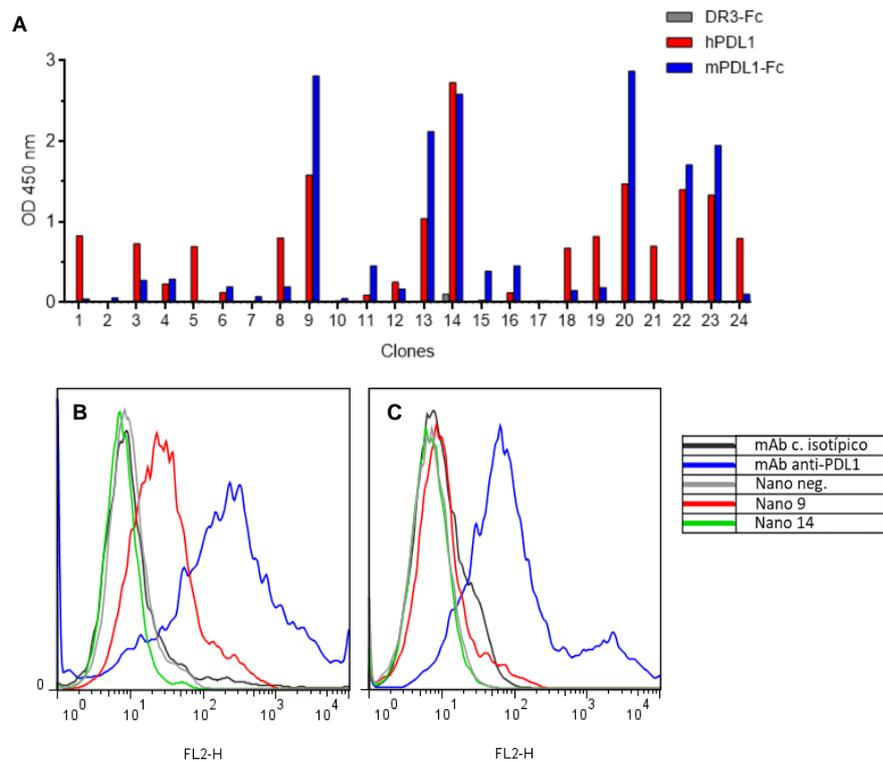


**Fig. 24. Screening de clones positivos a partir del segundo *output* del *panning* contra mPD-L1-Fc.** (A) *Screening* en ELISA contra el ectodominio recombinante comercial de mPD-L1 fusionado a Fc (en azul), y contra DR3-Fc como control negativo (en gris). Los cuatro clones positivos en ELISA (1, 3, 9 y 15) fueron evaluados en citometría de flujo, observándose resultados similares para todos ellos. Se muestran los resultados representativos de uno de los clones (denominado m15) sobre (B) células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup> y (C) células HEK-293/mPD-L1<sup>+</sup>.

Se realizó otra ronda de selección a partir del *output* anterior sobre mPD-L1-Fc, para aumentar la proporción de clones positivos por el antígeno de interés. Se evaluaron 24 clones al azar del *output* obtenido. En ELISA, seis clones presentaron reactividad por mPD-L1-Fc, y en igual o menor medida por hPD-L1. Otros clones también presentaron reactividad contra hPD-L1, pero no contra la variante murina (Fig. 25 A).

Los seis clones positivos para mPD-L1-Fc en ELISA fueron evaluados en citometría de flujo, donde solamente tres de ellos mostraron reactividad por las células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup>, pero ninguno reconoció las células HEK-293/mPD-L1<sup>+</sup> (Fig. 25 B y C). Por lo tanto, la segunda ronda de selección sobre mPD-L1-Fc no fue efectiva para aumentar la proporción de clones específicos para PD-L1 murino con respecto al anterior *output* evaluado.

Un hecho difícil de explicar es que los clones reactivos contra mPD-L1-Fc en ELISA fueran negativos en citometría de flujo sobre las células HEK-293/mPD-L1<sup>+</sup> y positivos sobre las células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup>. Podría ocurrir que las células transfectadas con el ADNc de mPD-L1 presentan alguna mutación o modificación en esta proteína, que impide que sea reconocida por los nanobodies seleccionados, aunque es reconocida por el anticuerpo comercial. Los sobrenadantes de los nanobodies también fueron evaluados sobre las células CT26 sin observarse marcaje. Sin embargo, los sobrenadantes sin purificar de los nanobodies (al encontrarse a baja concentración), son incapaces de marcar células con tan baja expresión del antígeno en sus membranas, como es el caso de los niveles de mPD-L1 en la línea CT26. Este hecho fue observado al evaluar los sobrenadantes de clones específicos para hPD-L1 sobre la línea HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup>, sobre la cual no se observó marcaje, a pesar de que los mismos sobrenadantes eran capaces de marcar las células HEK-293 transfectadas transitoriamente con el ADNc de hPD-L1 (resultados no mostrados).



**Fig. 25. Screening de clones positivos a partir del tercer output del panning contra mPD-L1-Fc. (A) Screening en ELISA contra mPD-L1-Fc y hPD-L1. Los seis clones positivos obtenidos en esta etapa contra mPD-L1-Fc fueron evaluados en citometría de flujo. Se muestran los resultados obtenidos para dos de esos clones (9 y 14) sobre las células HEK-293 transfectadas transitoriamente con (B) hPD-L1 y (C) mPD-L1.**

A modo de resumen de los resultados obtenidos durante esta sección, destacamos los siguientes puntos:

- Se seleccionó un nanobody contra mPD-1 a partir de un *panning* sobre células HEK-293 que sobre-expresaban dicho receptor. Este nanobody presentó reactividad cruzada por la variante humana de PD-1, siendo positivo en citometría de flujo sobre células HEK-293 transfectadas transitoriamente con ambas variantes, y negativo en ELISA sobre los ectodominios recombinantes de PD-1 producidos durante esta tesis, a los cuales, sin embargo, reconoce cuando se encuentran en solución.
- Se seleccionaron dos nanobodies contra hPD-1 a partir de un *panning* sobre células HEK-293 que sobre-expresaban dicho receptor. Estos nanobodies reconocen el hPD-1 expresado sobre células HEK-293 transfectadas transitoriamente en citometría de flujo, pero no reconocen el ectodominio recombinante de hPD-1 producido en el laboratorio adsorbido en placa de ELISA. No presentaron reactividad cruzada por la variante murina de PD-1.
- A partir de un *panning* en placa de ELISA utilizando el ectodominio recombinante de hPD-L1, se seleccionaron numerosos clones positivos contra esta proteína en ELISA y en citometría de flujo sobre las células HEK-293 transfectadas

transitoriamente con hPD-L1. Ninguno de estos clones presentó reactividad cruzada por mPD-L1 en células HEK-293 transfectadas transitoriamente.

- A pesar de que se pudieron seleccionar clones positivos contra mPD-L1-Fc en ELISA a partir de un *panning* realizado sobre esa proteína en placa, ninguno fue capaz de reconocer a las células HEK-293/mPD-L1<sup>+</sup> en citometría de flujo. Sin embargo, algunos de estos clones presentaron reactividad por el PD-L1 humano en ELISA, sobre el ectodominio recombinante, y en citometría, sobre las células HEK-293/hPD-L1<sup>+</sup>.

**Tabla X. Resumen de los nanobodies aislados durante esta etapa, incluyendo las estrategias que se utilizaron para su selección y la reactividad que presentaron.**

Nanobody	Biblioteca a partir de la que fue aislado	Estrategia de <i>panning</i> utilizada	Reactividad del clon
C11	2 (ectodominio de mPD-1)	Células HEK-293 transfectadas con mPD-1	mPD-1 y hPD-1 sobre células HEK-293 transfectadas
12; 22	1 (ectodominio de hPD-1)	Células HEK-293 transfectadas con hPD-1	hPD-1 sobre células HEK-293 transfectadas
1s; 14s; 20s; 25s	2 (ectodominio de hPD-L1)	Ectodominio recombinante de hPD-L1 biotinilado en pocillos de ELISA ( <i>panning</i> "en solución")	hPD-L1 sobre células HEK-293 transfectadas y ectodominio rec. de hPD-L1 en placa de ELISA
6p; 9p; 15p; 21p; 25p	2 (ectodominio de hPD-L1)	Ectodominio recombinante de hPD-L1 biotinilado en pocillos de ELISA ( <i>panning</i> "en placa")	hPD-L1 sobre células HEK-293 transfectadas y ectodominio rec. de hPD-L1 en placa de ELISA
18p	2 (ectodominio de hPD-L1)	Ectodominio recombinante de hPD-L1 biotinilado en pocillos de ELISA ( <i>panning</i> "en placa")	Ectodominio rec. de hPD-L1 en placa de ELISA
11	2 (ectodominio de hPD-L1)	Ectodominio recombinante de hPD-L1 biotinilado en pocillos de ELISA y mPD-L1-Fc comercial en pocillos de ELISA	hPD-L1 sobre células HEK-293 transfectadas y ectodominio rec. de hPD-L1 en placa de ELISA
m15	2 (ectodominio de hPD-L1)	Ectodominio recombinante de hPD-L1 biotinilado en pocillos de ELISA y mPD-L1-Fc comercial en pocillos de ELISA (con SHN)	hPD-L1 sobre células HEK-293 transfectadas y ectodominio rec. de hPD-L1 y mPD-L1-Fc en placa de ELISA

```

      1      10      20      30      40      50      60
      |*****|*****|*****|***|***|*|*****|*****|*****|***
1s  EVQLVESGG-GLVQPGGSLRLSCAAS GFNFSYD MYWLRQAPGKGLEWVSS IRYNGSDT
6p  EVQLVESGG-GLVQAGGSLRLSAAA GRSFNSNA MGWVRQAPGKEREIVAV ISATGSYT
15p EVQLVESGG-GLVQAGGSLRLSAAA GRIFNSNA MGWFRQAPGKEREIVAV ISASGSYT
20s QVQLVQSGG-GLVQAGGSLRLSCAAS TRSFLIYE MGWIRQAPGNEREFVAG INWSGSIT
m15 QVQLVQSGG-GLVQAGGSLRLSCAAS GIDIRPYH MGWYRQAPEKARELVAI AG-TGGIT
18p QVQLQESGG-GLVRAGGSLRLSCAAS GSKIRING LGWYRQGPQKQRELVAT IT-TGGST

C11 QVQLVQSGG-GSVQAGDSLRLSCAVS GHPDSSYS MAWFRQAPGKERELVAL ISWSGAI
12  QVQLQESGG-GLVQPGGSLRLSCAAS GFTLDSYA IGWFRQAPGKEREGVSC ISSVDGKT
22  QVQLVQSGG-GLVQPGGSLRLSCAAS GTFSSYY MTWVRQAPGKGLEWVSS IWSDGNS
<----- FR1 -----> < CDR1 > <----- FR2 -----> < CDR2 >

      70      80      90      100     110      120
      ****|*****|*****|*****|***|*****|*12344321***** **|*****
1s  HYADSVK-GRFTISRDNARNTLYLQMSLKSSEDVAVYIC AKDP-----GGFS WGQGTQIVVSS
6p  YYEDSVK-GRFTISRDNASKNTVSLQMSLSESDVAVYIC AGSRTAALT----TIMILFNY WGQGTQIVVSS
15p YYPDSVK-GRFTISRDNASKNTVYLQMSLISESDVAVYIC AGARVAGLT----TIMSLFDY WGQGTQIVVSS
20s EYSDSVK-GRFTISRDNAKNTVYLQMSLKPEDTAVYIC AGRIGAVV-----TIGPYNW WGQGTQIVVSS
m15 NYVDSVK-GRFTISRHDKNTIYLQMSLKPDDTAVYIC NLRS-----STIY WGPQTQIVVSS
18p NYADSVR-GRFAISRDNAKNTVYLQMSLKPDDTGVYIC NQEIWTAS-----SGTTYTYN WGQGTQIVVSS

C11 HYSDSVK-DRFTISRDNAKNEMYLQMSLKPEDTAVYFC QADDPT-----SELNQY WGQGTQIVVSS
12  WYADSVK-GRFTISRDNAKNTVYLQMSLKPEDTAVYIC ATDVQCYE-----STSLHAY WGQGTQIVVSS
22  DYADSVK-GRFTIARDNAKNTLSLQMSLKSSEDVAVYIC AAKDRGV-----PGVMYTY WGQGTQIVVSS
<----- FR3 -----> <----- CDR3 -----> <-- FR4 -->

```

**Fig. 26. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los nanobodies seleccionados durante esta etapa.** Se muestran las secuencias de los nanobodies anti-PD-L1 (en negro) y anti-PD-1 (en azul). Se cuenta con secuencias parciales de algunos clones específicos para hPD-L1 aislados que están en proceso de ser secuenciados.

### 3.5. Producción de nanobodies a gran escala en sistema procarionta

Luego de haber seleccionado nanobodies contra las proteínas de interés, se realizó la producción de los mismos a gran escala en *E. coli*, para poder evaluarlos en ensayos de inhibición de la unión PD-1/PD-L1 *in vitro*.

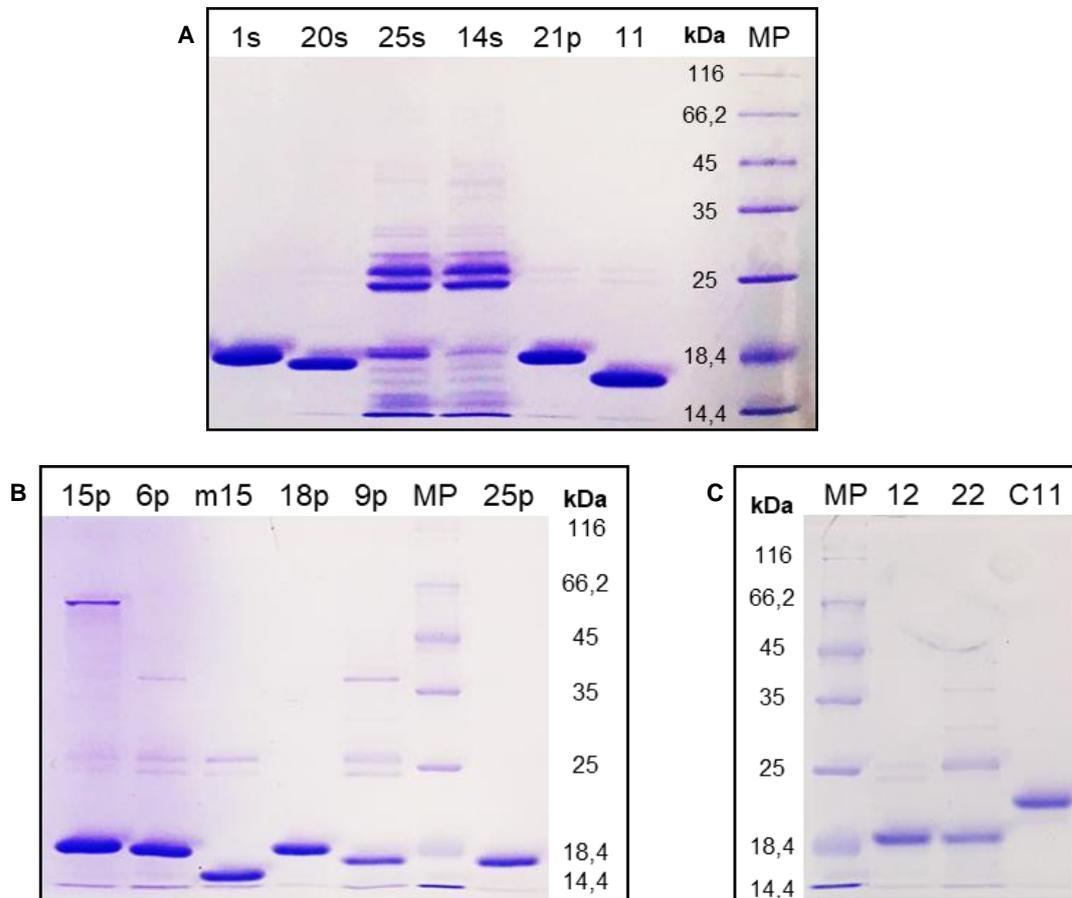
El vector pComb3X no es adecuado para la producción de grandes cantidades de proteína, por lo tanto, se subclonaron los nanobodies seleccionados anteriormente en un vector de expresión procarionta derivado del plásmido pET28. Este vector, denominado pINQ-OmpA, fue generado en nuestro laboratorio y permite la expresión de grandes cantidades de proteína en *E. coli* (como se explicó en la sección 2.8).

El clonaje en este vector también se realizó con la enzima de restricción SfiI de forma dirigida. Hacia el 5' el nanobody contará con un péptido señal de exportación al

periplasma bacteriano (OmpA), y hacia el 3' estará asociado a una cola de 6 histidinas y a un epítoto de HA.

Luego del subclonaje de los nanobodies a este vector, se realizaron las producciones a gran escala de los mismos y se purificaron por cromatografía de afinidad como se describió en la sección 2.9. Los picos de proteína obtenidos durante la purificación (identificados por el aumento de la absorbancia a 280 nm), fueron dializados contra PBS. Posteriormente se determinó su concentración (según la absorbancia a 280 nm) y se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE (Fig. 27).

Luego de la purificación, fue evidente que algunos clones no se producían en forma adecuada, obteniéndose bajas concentraciones según las medidas de absorbancia a 280 nm, y con bajo porcentaje de pureza (nanobodies 14s y 25s, Fig. 27 A). Estos clones fueron descartados para su utilización en futuros experimentos.



**Fig. 27. Geles de SDS-PAGE de los nanobodies producidos y purificados por cromatografía de afinidad. (A) y (B):** Fracciones correspondientes a los picos de elución de los nanobodies aislados contra hPD-L1. **(C)** Fracciones de los picos de elución de los nanobodies específicos para PD-1. Tinción con azul de Coomassie.

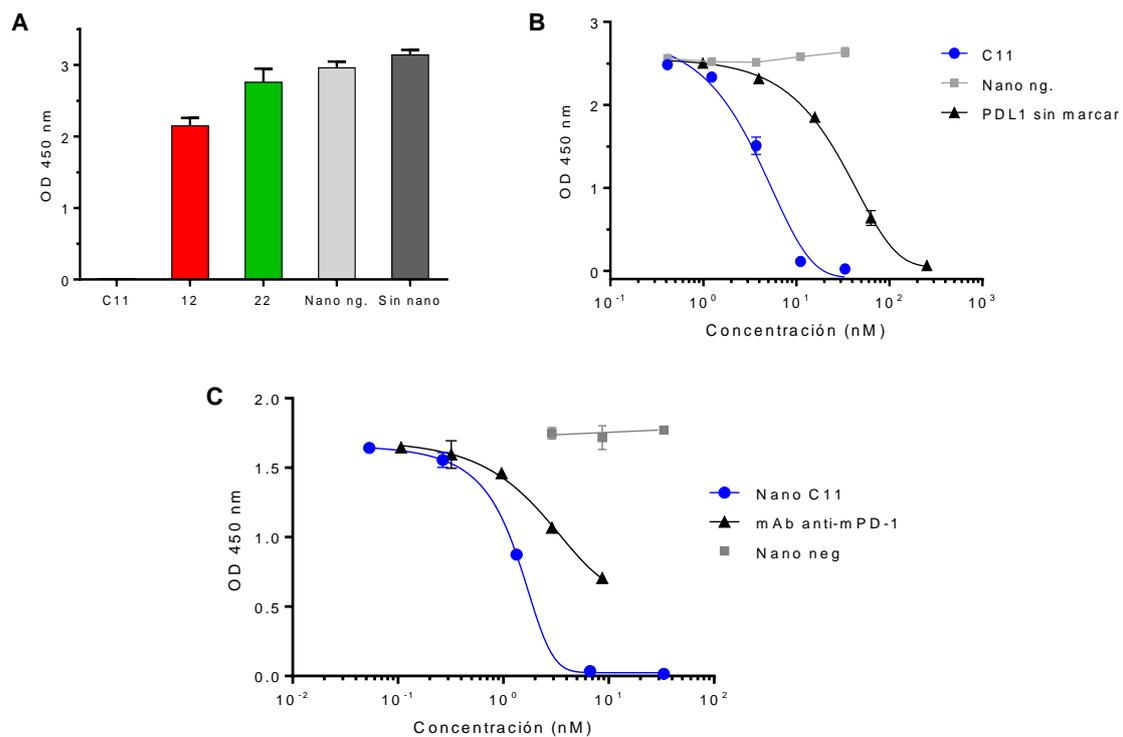
### 3.6. Ensayos de inhibición de la unión PD-1/PD-L1 por ELISA

Luego de haber producido los nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1 seleccionados, se evaluó su capacidad de inhibir la unión de PD-1 con su ligando PD-L1 en ELISA. Para este ensayo se debieron utilizar los ectodominios recombinantes comerciales quiméricos, fusionados a Fc, ya que a partir de los ectodominios recombinantes producidos en el laboratorio no fue posible evidenciar la unión de PD-1 con PD-L1. Si bien este hecho fue una desventaja a la hora de realizar los experimentos, no nos generó gran desconcierto debido a que concordaba con la experiencia previa de que la inmovilización de PD-1 a la placa de ELISA o su biotinylación generaba cambios conformacionales que la diferenciaba de la proteína nativa expresada en las superficies de las células HEK-293 transfectadas. Por lo tanto, es lógico que no haya sido posible poner a punto un ensayo de ELISA de unión en ninguno de los siguientes formatos: 1) empleando el PD-1 como proteína de sensibilización, debido a su aparente desnaturación, y 2) utilizando el PD-1 biotinylado en solución, debido a que la biotinylación podría afectar la estructura de PD-1 o modificar el sitio de unión al ligando o sitios circundantes a él que lo afecten en último término.

Los ensayos de ELISA de inhibición con los ectodominios comerciales fueron puestos a punto por el grupo colaborador del CIMA. La capacidad de inhibición de la unión PD-1/PD-L1 de los nanobodies fue evaluada durante una pasantía realizada en dicho laboratorio en el marco de esta tesis. El formato del ELISA y el protocolo de cada ensayo para las variantes humanas y murinas se describen en la sección 2.10.

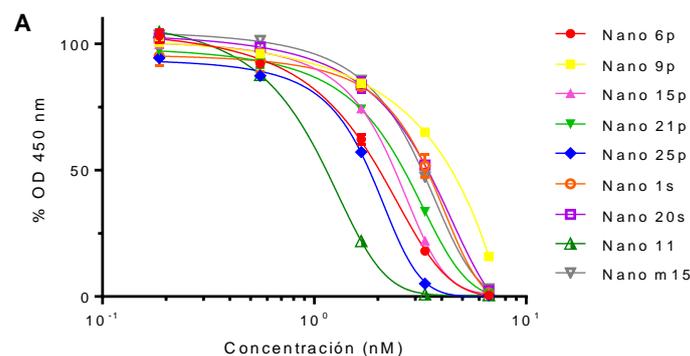
Los nanobodies específicos para PD-1 fueron evaluados en primer lugar en el ensayo de las variantes humanas. En este caso, se contaba con tres nanobodies, y en principio fueron evaluados a una concentración elevada fija de 4 µg/mL. A partir de esta prueba, se pudo determinar que solamente C11 era capaz de inhibir la unión hPD-1/hPD-L1 (Fig. 28 A).

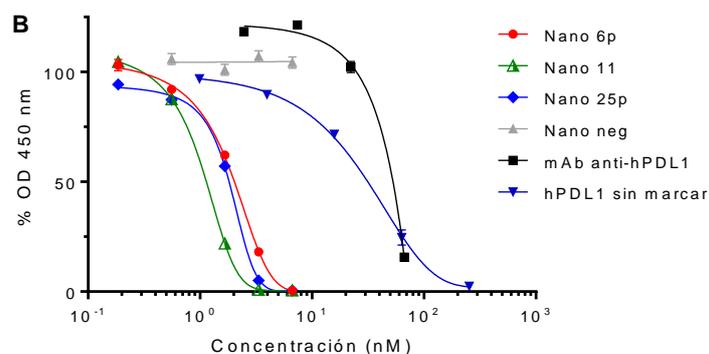
Como ya se había demostrado previamente, el nanobody C11 presenta reactividad cruzada por la variante humana y por la murina, por lo tanto, se realizaron ambas curvas de inhibición para este nanobody (Fig. 28 B y C). C11 fue capaz de inhibir la unión entre los ectodominios de ambas especies, sin embargo, no se contaba con un anticuerpo comercial contra PD-1 como control de inhibición para poder compararlo. En el caso del ensayo de las variantes humanas, se utilizó como control de inhibición el ectodominio de hPD-L1 fusionado a Fc sin marcar en solución (R&D Systems, #156-B7), mientras que en el ensayo de las variantes murinas se empleó el sobrenadante sin purificar de un anticuerpo monoclonal anti-mPD-1 (que fue clonado por el grupo del CIMA a partir de la patente n° US20100028330A1). La concentración máxima del sobrenadante de este anticuerpo no permitió generar una curva de inhibición completa, aunque se puede estimar que C11 posee mayor capacidad de inhibición debido a que su concentración inhibitoria máxima media (IC50) parece ser menor (Fig. 28 C).



**Fig. 28. Inhibición de la unión PD-1/PD-L1 en ELISA utilizando los nanobodies específicos para PD-1 aislados.** (A) Evaluación de la capacidad de inhibición de la unión de las variantes humanas de los tres nanobodies contra hPD-1 seleccionados anteriormente (C11, 12 y 22). C11 fue el único en demostrar capacidad de inhibición. Las curvas de inhibición de la unión PD-1/PD-L1 para C11 se realizaron para (B) las variantes humanas y (C) las variantes murinas. Se incluyó como control negativo un nanobody con especificidad irrelevante (Nano neg., en gris) y controles positivos para cada ensayo (en negro).

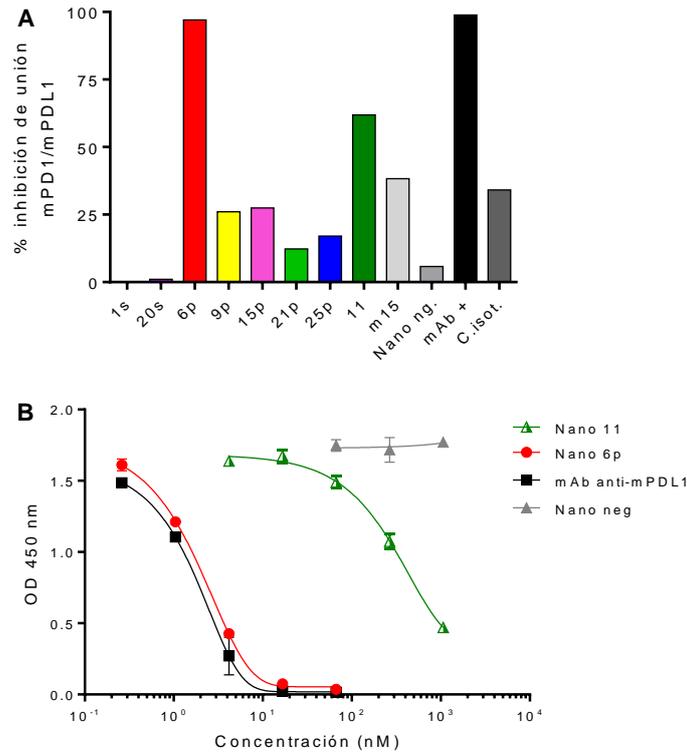
Por otra parte, se realizaron las curvas de inhibición de los nanobodies aislados contra PD-L1 humano, incluyéndose como control un anticuerpo policlonal comercial específico para hPD-L1 (R&D Systems, #AF156). Como se puede observar en la Fig. 29 A, los nueve clones aislados contra PD-L1 fueron capaces de inhibir la unión entre el ligando y el receptor en ELISA, aunque algunos presentaron mayor capacidad de inhibición que otros. Todos los nanobodies presentaron mayor capacidad de inhibición que el anticuerpo policlonal control. Las curvas de inhibición de los tres mejores clones (11, 25p y 6p), es decir, aquellos que presentaron menores IC50, son comparadas con las de los controles de inhibición en la Fig. 29 B: el anticuerpo policlonal contra hPD-L1 y el ectodominio comercial de hPD-L1 fusionado a Fc sin marcar.





**Fig. 29. Inhibición de la unión hPD-1/hPD-L1 en ELISA utilizando los nanobodies específicos para hPD-L1 aislados.** (A) Curvas de inhibición de los nueve nanobodies específicos para hPD-L1 seleccionados y producidos en las secciones anteriores. (B) Comparación de las curvas de inhibición de los tres mejores nanobodies con el anticuerpo comercial contra hPD-L1 (en negro) y el ectodominio comercial de hPD-L1-Fc sin marcar (en azul). Se incluye como control negativo un nanobody con especificidad irrelevante (Nano neg., en gris).

A pesar de que ninguno de los nanobodies específicos para hPD-L1 demostró reactividad cruzada por la variante murina en citometría cuando se evaluaron sobre las células HEK-293/mPD-L1<sup>+</sup>, se realizó una prueba para evaluar la capacidad de inhibición de estos nanobodies de la unión de las variantes murinas de PD-1/PD-L1. Para ello, se probaron los distintos nanobodies a una concentración elevada fija de 4 µg/mL. A pesar de que la mayoría no mostró capacidad de inhibición de la unión de las variantes murinas, dos clones fueron capaces de inhibir la unión en más de un 50% (Fig. 30 A). De hecho, uno de los nanobodies (6p), demostró una capacidad de inhibición casi completa, al igual que el anticuerpo convencional contra mPD-L1 utilizado como control de inhibición. Este anticuerpo proviene de un hibridoma de hámster armenio inmunizado con mPD-L1 generado por Dong y col., 2002 [242], y que ha sido modificado por el grupo del CIMA para poder ser utilizado en estudios *in vivo* en ratón (pues se observó que era inmunogénico), sustituyendo las regiones constantes de las cadenas pesada y liviana de hámster por las de IgG2a y lambda de ratón. El grupo del CIMA ha demostrado que este anticuerpo presenta actividad antitumoral en el modelo de tumores trasplantables a partir de la línea celular MC38, como se discutirá más adelante (resultados no publicados). A partir de las curvas de inhibición de la unión de mPD-1/mPD-L1, se puede observar que 6p tiene un IC<sub>50</sub> similar al del anticuerpo monoclonal anti-mPD-L1 (Fig. 30 B).



**Fig. 30. Inhibición de la unión mPD-1/mPD-L1 en ELISA utilizando los nanobodies específicos para hPD-L1 aislados. (A)** Porcentaje de inhibición de la unión mPD-1/mPD-L1 para los distintos nanobodies aislados contra PD-L1 humano. Nano ng.: nanobody control con especificidad irrelevante; mAb+: anticuerpo convencional contra mPD-L1; C. isot.: anticuerpo control isotópico. **(B)** Curvas de inhibición de la unión mPD-1/mPD-L1 utilizando los dos nanobodies con mayor capacidad de inhibición según los resultados obtenidos en (A), comparándolos con el anticuerpo convencional contra mPD-L1 (en negro). Se incluyó un nanobody con especificidad irrelevante como control negativo (en gris).

### 3.7. Reactivación de células T de ratón *in vitro*

Según lo descrito en la introducción, uno de los objetivos que se buscan durante el bloqueo de la unión PD-1/PD-L1 es la reactivación de células T exhaustas. Una aproximación *in vitro* para evaluar el efecto biológico del bloqueo de esta unión puede ser utilizar un cultivo primario de células T *naive* de bazo de ratón activadas de forma antígeno independiente con anticuerpos agonistas de CD3 y CD28, en presencia o ausencia de mPD-L1. En presencia de mPD-L1, se espera que los marcadores de activación y proliferación disminuyan con respecto a la condición en ausencia de este ligando. Mediante la incubación con anticuerpos inhibidores de la unión PD-1/PD-L1 se busca restaurar la activación de las células T expuestas a mPD-L1, lo cual se evidencia midiendo los niveles en el sobrenadante de cultivo de marcadores de proliferación (IL-2) y de activación (el IFN- $\gamma$  es un marcador de activación de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> Th1).

En este experimento se evaluó la capacidad de los nanobodies inhibidores de la unión mPD-1/mPD-L1 de reactivar células T de ratón expuestas a mPD-L1 *in vitro*. Se utilizaron los nanobodies C11 y 6p, específicos para PD-1 y PD-L1 respectivamente.

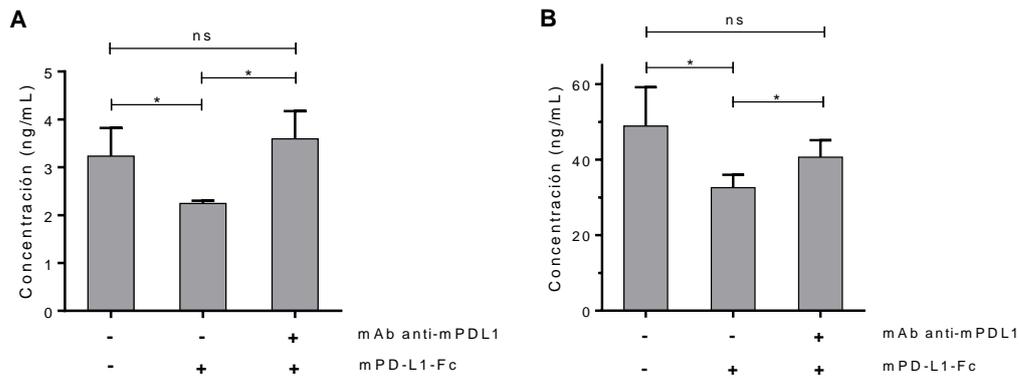
En un primer ensayo, para lograr una fuerte activación de las células T *naïve* aisladas de bazo de ratón, se utilizaron microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpos agonistas contra CD3 y CD28 (Thermo, #11456D). Sin embargo, no se consiguió activar las células de forma eficiente, lo cual quedó en evidencia al cuantificar los niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$  en el sobrenadante del cultivo, que resultaron muy bajos.

Posteriormente, las células T fueron incubadas directamente con anticuerpos agonistas de CD3 y CD28, lo que permitió una activación eficiente de dichas células. Para ello los pocillos de la placa de cultivo se tapizaron con el anticuerpo anti-mCD3 con el fin de generar un mayor efecto por entrecruzamiento de TCRs, y el anticuerpo anti-mCD28 fue administrado en solución. Las células T fueron incubadas en presencia o ausencia de mPD-L1-Fc en estas condiciones durante 72 hs. Asimismo, se incluyeron pocillos en los que además se añadió el anticuerpo monoclonal anti-mPD-L1 como control (el mismo que se utilizó durante los ensayos de ELISA de inhibición). Se recogió el sobrenadante tras 72 hs (a partir del cual se determinó la concentración de IL-2 e IFN- $\gamma$  mediante kits de ELISA comerciales), y las células fueron incubadas O/N en medio de cultivo que contenía timidina tritiada, para medir los niveles de proliferación al día siguiente.

Se realizaron algunas pruebas para establecer las mejores condiciones de activación de las células, partiendo de los datos publicados en trabajos previos [82,83,243]. Se evaluó la utilización de concentraciones de anticuerpos altas (anticuerpo anti-CD3 inmovilizado en la placa a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y anticuerpo anti-CD28 en solución a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o bajas (anticuerpo anti-CD3 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y anticuerpo anti-CD28 a 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El mPD-L1-Fc fue utilizado inmovilizado en los pocillos de la placa a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se utilizó una concentración de anticuerpo monoclonal anti-mPD-L1 elevada, establecida en 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La puesta a punto del ensayo fue difícil. A bajas concentraciones de anticuerpos agonistas, se observó poca activación de las células (especialmente en cuanto a los niveles de IL-2 en sobrenadante), y una inhibición muy marcada en presencia de mPD-L1-Fc, que no pudo ser revertida en presencia del anticuerpo monoclonal. En cambio, utilizando altas concentraciones de anticuerpos agonistas la activación fue adecuada pero la inhibición lograda por mPD-L1-Fc fue menos marcada. Aun así, se seleccionó esta condición de activación para continuar con la evaluación de los nanobodies, debido a que se lograba una activación adecuada de las células y una inhibición sutil aunque consistente en presencia de mPD-L1, además de un restablecimiento de los niveles de citoquinas en presencia del anticuerpo anti-mPD-L1 (Fig. 31).

Los datos de proliferación obtenidos durante la puesta a punto del ensayo presentaron una gran variabilidad, y por ende, la comparación entre los distintos grupos no aportó datos concluyentes. Este ensayo fue por tanto descartado para la siguiente etapa en donde se evaluaron los nanobodies.



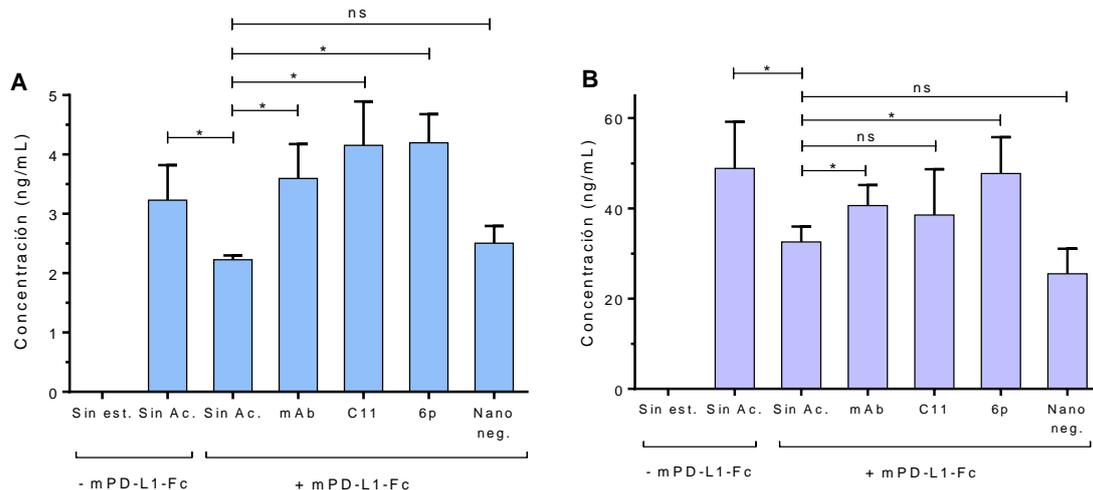
**Fig. 31. Puesta a punto de las condiciones de activación del cultivo primario de células T de ratón.** Se representa la concentración (como media  $\pm$  desviación estándar (SD)) de (A) IL-2 y (B) IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de las células en cultivo tras 72 hs de activación. Se muestran los resultados obtenidos para la activación con altas concentraciones de anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28, en presencia o ausencia de mPD-L1-Fc. Se utilizó un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-mPD-L1 para contrarrestar la inhibición causada por mPD-L1. \* $P < 0,05$ , ns: no significativo.

Tras establecer las condiciones óptimas para este ensayo, se evaluaron los dos nanobodies inhibidores de la unión mPD-1/mPD-L1 a una concentración de 8  $\mu\text{g/mL}$  (correspondiente a una concentración molar similar a la del anticuerpo convencional anti-mPD-L1 utilizado como control). Tras 72 hs de activación de las células los niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$  en el sobrenadante fueron cuantificados por ELISA.

Ambos nanobodies fueron capaces de generar un aumento en los niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$  con respecto a la condición en ausencia de anticuerpo, al igual que el anticuerpo monoclonal anti-mPD-L1. Este aumento fue estadísticamente significativo en el caso de la IL-2 para ambos nanobodies (Fig. 32 A), y en el caso del IFN- $\gamma$  sólo para 6p (Fig. 32 B). Esto no ocurrió cuando se utilizó un nanobody con especificidad irrelevante como control negativo, indicando que la reactivación de las células T ocurre específicamente en presencia de los nanobodies inhibidores de la vía de PD-1, y no por interacciones inespecíficas o por contaminación de restos bacterianos provenientes del proceso de producción de los nanobodies.

Por lo tanto, ambos nanobodies, C11 y 6p, presentaron un efecto biológico en la reactivación de las células T inhibidas por mPD-L1. Este ensayo constituye una primera prueba del efecto biológico que podrían presentar los nanobodies *in vivo*, potenciando las funciones efectoras de las células T.

Este ensayo tiene la desventaja de que posee poco margen de error, debido a que las diferencias entre los distintos grupos fueron muy bajas y la dispersión de los datos de un mismo grupo dificultó el análisis estadístico. Como perspectiva a futuro, se podría intentar mejorar las condiciones de este ensayo para poder observar mayor diferencia entre los grupos.



**Fig. 32. Evaluación de la actividad biológica de los nanobodies C11 y 6p *in vitro*.** Se determinó la concentración (representada como la media  $\pm$  SD), en el sobrenadante de cultivo primario de células T de ratón de: **(A)** IL-2 y **(B)** IFN- $\gamma$ . La activación de las células se realizó utilizando las condiciones establecidas durante los ensayos de puesta a punto descritos, y se evaluó la capacidad de los nanobodies C11 y 6p de reestablecer la activación de las células T inhibidas por mPD-L1-Fc, a través de la cuantificación de estos biomarcadores. Sin est.: células sin estimular, es decir, en ausencia de anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28. Sin Ac.: células estimuladas en ausencia del anticuerpo convencional o de nanobodies. mAb: células estimuladas en presencia del anticuerpo convencional anti-mPD-L1 utilizado como control de inhibición. Las últimas tres columnas de cada gráfico corresponden a las células estimuladas en presencia de los nanobodies inhibidores de la vía de PD-1 (C11 y 6p), y un nanobody con especificidad irrelevante como control negativo (Nano neg.). El experimento se realizó en dos ocasiones independientes y realizando cuadruplicados de cada grupo, obteniéndose resultados similares en ambos casos. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Mann-Whitney. \* $P < 0,05$ .

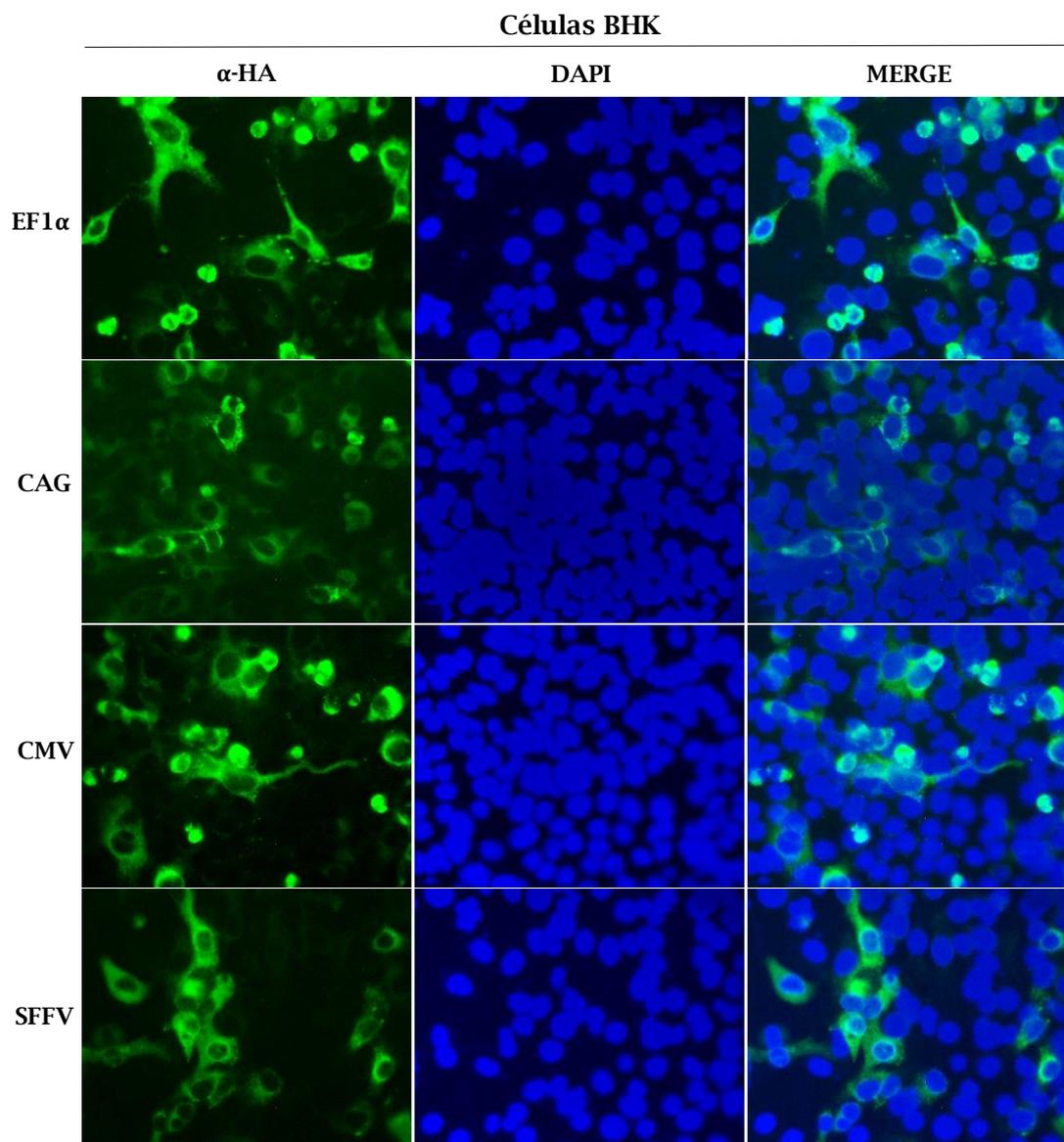
### 3.8. Expresión de nanobodies en células eucariotas a partir de pAAVs

Tras confirmar que los nanobodies C11 y 6p presentaban actividad biológica en un ensayo *in vitro*, éstos fueron clonados en vectores de AAV con objeto de expresarlos *in vivo*. Para ello se generaron para cada nanobody cuatro plásmidos que contenían la secuencia del nanobody bajo el control de cuatro promotores diferentes, como se describió en la sección 2.12. También se clonó un nanobody control negativo con especificidad irrelevante. Tras los clonajes, los plásmidos generados fueron comprobadas por secuenciación.

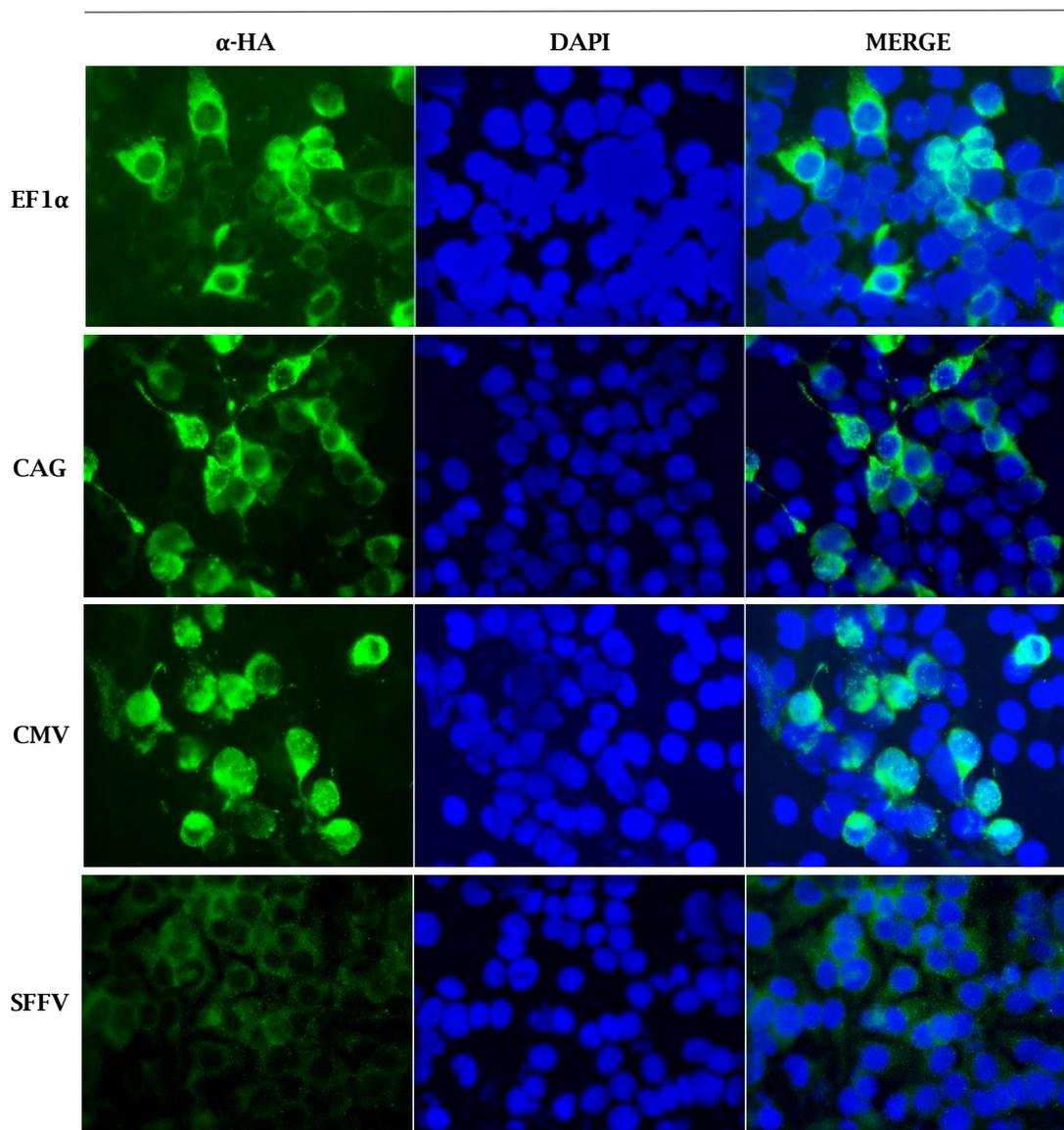
Para comprobar la correcta expresión de los nanobodies en células eucariotas a partir de los vectores generados, se realizaron transfecciones con cada uno de los plásmidos en dos líneas celulares de mamífero: BHK y HuH7. Las transfecciones fueron realizadas como se describió en la sección 2.13. Tras 48 hs, las células se fijaron y se analizaron mediante inmunofluorescencia (IF) con un anticuerpo específico contra el epítipo de HA. Asimismo se recogieron muestras de sobrenadantes y de extractos celulares para su evaluación por ELISA y Western blot.

A partir de las IF, se observó una correcta expresión de los nanobodies en ambas líneas celulares, aunque la eficiencia de transfección fue diferente según el vector utilizado (Fig. 33). Las transfecciones utilizando los vectores conteniendo el promotor SFFV

presentaron menor cantidad de células positivas en IF, lo cual es indicativo de un menor porcentaje de células transfectadas o de una expresión ineficiente del transgén en algunas células.



## Células HuH7



**Fig. 33. Evaluación de la expresión de C11 por IF en células BHK y HuH7 transfectadas transitoriamente con los pAAVs generados.** La expresión de C11 se visualizó utilizando un anticuerpo anti-HA conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488. Se evaluó la expresión del nanobody a partir de los pAAVs con los promotores indicados a la izquierda. Aumento 400x.

### I. Cuantificación por ELISA

Los sobrenadantes y lisados de las células transfectadas fueron analizados mediante un ELISA de unión específico a PD-1 o PD-L1 para cuantificar el nanobody presente en los mismos, y para verificar que conservaban la unión específica a su antígeno. Para ello, los pocillos de ELISA se tapizaron con los ectodominios comerciales de PD-1 o PD-L1 recombinantes fusionados a Fc, según el nanobody analizado.

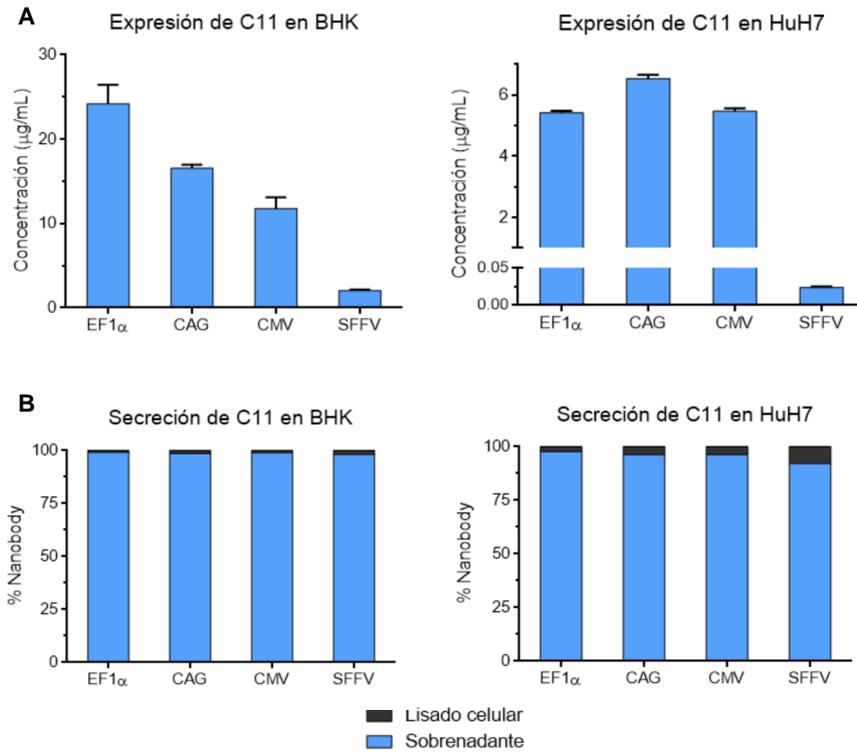
Tanto C11 como 6p demostraron expresarse y secretarse en forma adecuada en ambas líneas celulares, siendo los niveles de nanobody en sobrenadantes mayores a partir de las células BHK en comparación con la línea HuH7 (Figs. 34 y 35). La línea BHK es

ampliamente utilizada para expresar proteínas recombinantes, incluso a nivel industrial, debido a su alta capacidad de expresión. En nuestro caso, tres de los cuatro vectores evaluados generaron muy buenos niveles de producción, siendo los promotores EF1 $\alpha$  y CAG los que lograron mayor expresión de ambos nanobodies (entre 15 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el sobrenadante de las células BHK). A partir del promotor CMV también se obtuvieron buenos niveles de producción (alrededor de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sin embargo, el promotor SFFV fue en todos los casos el que dio lugar a menor expresión de nanobody (obteniéndose entre 5 y 10 veces menor concentración). En el caso de las células HuH7 esta diferencia fue mayor, obteniéndose alrededor de 200 veces menor cantidad de nanobody en comparación con el resto de las construcciones. Esto es concordante con los datos obtenidos en IF, donde la tinción de las células transfectadas con los pAAV-SFFV era muy baja.

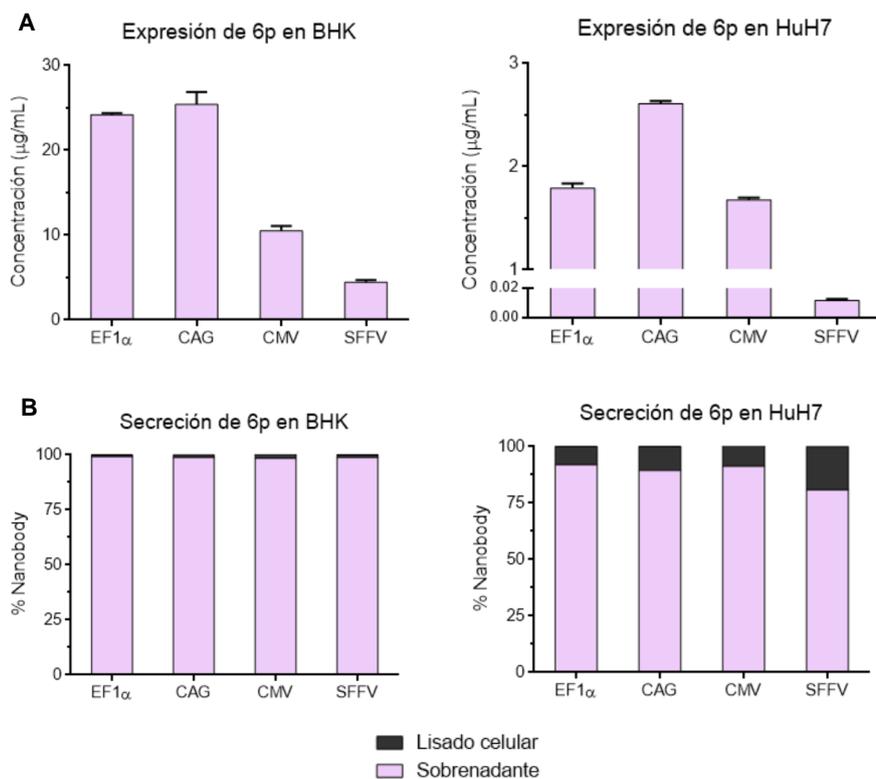
Los niveles de producción de los nanobodies a partir de los tres mejores promotores fueron unas 100 veces mayores que los que ha obtenido el grupo del CIMA al expresar el anticuerpo monoclonal anti-mPD-L1 a partir de un vector similar de AAV con el promotor EF1 $\alpha$  (datos no publicados). Los elevados niveles de expresión *in vitro* de nuestros nanobodies constituyen un buen indicio de que es posible que estas moléculas se produzcan eficientemente *in vivo* a partir de los vectores de AAV generados.

Por otra parte, la secreción de los nanobodies a partir de las células transfectadas fue muy eficiente, observándose que en la mayoría de los casos prácticamente la totalidad del nanobody se encontraba en el sobrenadante (Figs. 34 B y 35 B). En la línea HuH7 se observó una mayor retención del nanobody en la célula, especialmente para el clon 6p, aunque de todas formas en este caso se secretó entre un 80 y un 90% del nanobody expresado, dependiendo del promotor utilizado. En nuestro caso, lograr una secreción óptima del nanobody a partir de la célula que lo expresa es esencial, ya que esta molécula debe encontrarse en el espacio extracelular para ser capaz de bloquear la unión de PD-1 con PD-L1.

Durante cada transfección se incluyeron controles de células sin transfectar y transfectadas con un pAAV codificante para un nanobody con especificidad irrelevante, asociado al mismo epítipo de HA para su detección. Los sobrenadantes y lisados de estos controles también fueron analizados con todas las técnicas descritas. En los ensayos de ELISA, las muestras de estos controles fueron negativas cuando se las enfrentó a PD-1 o PD-L1, como era de esperar (resultados no mostrados).



**Fig. 34. Expresión del nanobody C11 en células transfectadas con vectores de pAAV. (A)** Concentración de C11 (representada como media  $\pm$  SD) en sobrenadantes de células BHK (izquierda) y HuH7 (derecha), transfectadas con los pAAVs codificantes para este nanobody a partir de los promotores que se indican bajo cada figura. **(B)** Proporción de C11 en el sobrenadante (celeste) y en el lisado celular (negro) de las distintas transfecciones realizadas. Las transfecciones fueron realizadas por triplicado en cada caso.



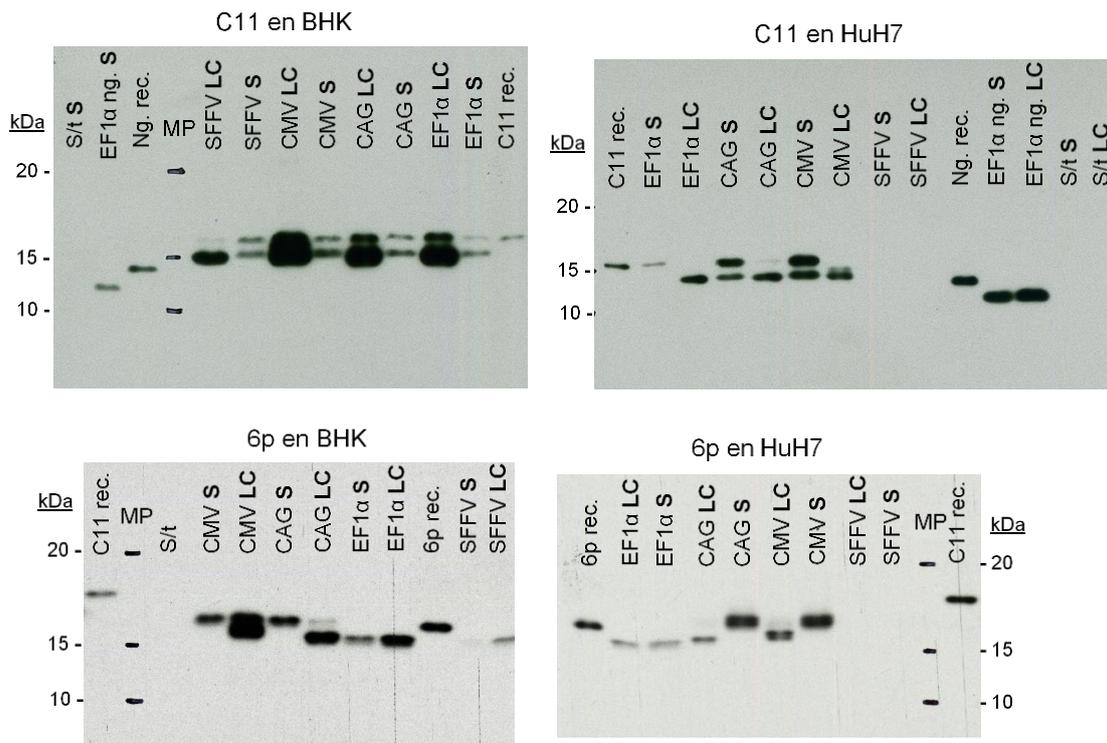
**Fig. 35. Expresión del nanobody 6p en células transfectadas con vectores de pAAV.** (A) Concentración de 6p (representada como media  $\pm$  SD) en sobrenadantes de células BHK (izquierda) y HuH7 (derecha), transfectadas con los pAAVs codificantes para este nanobody a partir de los promotores que se indican bajo cada figura. (B) Proporción de 6p en el sobrenadante (rosado) y en el lisado celular (negro) de las distintas transfecciones realizadas. Las transfecciones fueron realizadas por triplicado en cada caso.

## II. Análisis por Western blot

Con objeto de confirmar que los nanobodies expresados tenían el tamaño esperado, las muestras de sobrenadantes y lisados de células transfectadas con los pAAVs codificantes para C11 y 6p fueron analizadas por Western blot (ver sección 2.13), en condiciones reductoras y utilizando un anticuerpo contra el epítipo HA para la detección de los nanobodies. En todos los casos se compararon las bandas correspondientes a los nanobodies generados por las células transfectadas con los producidos en forma recombinante en *E. coli*. Estos últimos llevan una cola de seis histidinas que no está presente en los expresados a partir de los pAAVs. Por otro lado, los nanobodies producidos por las células eucariotas llevan un péptido señal que podría encontrarse en el nanobody intracelular pero que no se esperaría encontrar en la fracción secretada, debido a que este péptido se elimina por una proteasa celular antes de la secreción al medio extracelular. El tamaño esperado para los nanobodies es de aproximadamente 15 kDa, siendo levemente menor el tamaño calculado para los nanobodies expresados a partir de los pAAVs (diferencia de aproximadamente 1 kDa).

Como se puede observar en la Fig. 36, los nanobodies expresados a partir de las células eucariotas tienden a presentar dos bandas de diferente peso molecular, especialmente

en el caso del clon C11. En las células BHK, estas dos bandas se observan claramente tanto en el sobrenadante como en los lisados celulares de los cuatro pAAVs utilizados. Dado que el nanobody producido en *E. coli* tiene una cola de histidinas que incrementa su tamaño en 1 kDa aproximadamente, proponemos que la banda de menor peso molecular obtenida a partir de las células eucariotas corresponde al nanobody sin modificaciones, y que la banda de mayor peso molecular puede corresponder a una versión modificada del nanobody, posiblemente por glicosilación. Esta modificación postraduccional parecería ser dependiente de la secuencia del nanobody. Por ejemplo, el nanobody control negativo producido a partir de la construcción pAAV-EF1 $\alpha$  no sufre esta modificación pues sólo se observa una única banda de menor peso molecular que la del mismo nanobody producido en *E. coli*.



**Fig. 36. Análisis por Western blot de los sobrenadantes y lisados de las células transfectadas con pAAVs codificantes para nanobodies.** Arriba: sobrenadantes (S) y lisados celulares (LC) de las líneas celulares BHK (izquierda) y HuH7 (derecha) transfectadas con los pAAVs codificantes para C11 con los promotores indicados. Se incluyeron como controles: células sin transfectar (S/t), y células transfectadas con un pAAV codificante para un nanobody control negativo bajo el promotor EF1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$  ng.). También se incluyeron ambos nanobodies recombinantes producidos en *E. coli* (C11 rec. y Ng. rec.). Abajo: resultados obtenidos a partir de las transfecciones de la línea BHK (izquierda) y HuH7 (derecha) con los cuatro pAAVs codificantes para 6p, en el sobrenadante (S) y lisado celular (LC). Se incluyeron también los nanobodies 6p y C11 recombinantes producidos en *E. coli*. Las cantidades de proteína cargadas de sobrenadantes y lisados no son comparables.

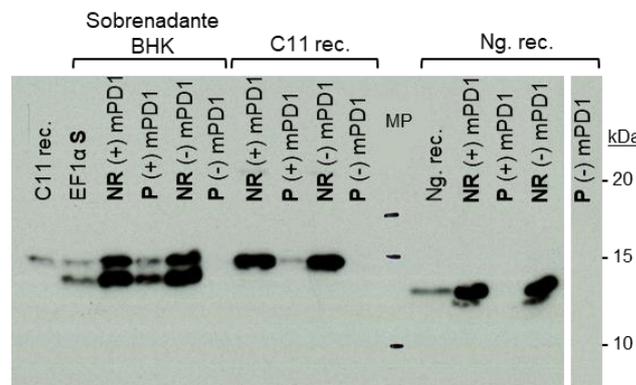
En el caso de 6p parece que la modificación postraduccional no se produce de igual forma que para C11. Así el 6p expresado a partir de los promotores CAG y CMV, se encuentra en el interior celular mayoritariamente como nanobody sin modificar (es decir,

con un menor peso molecular), mientras que la forma secretada es modificada completamente, observándose una sola banda de alto peso molecular. Esto no ocurre en el caso del de los promotores EF1 $\alpha$  y SFFV, en donde el 6p se observa como una sola banda de menor peso molecular tanto para el sobrenadante como para el lisado, aunque en las células Huh7 la expresión con este promotor fue demasiado baja y no se lograron observar bandas claras en el Western blot.

Dado que en algunos casos observamos para cada nanobody dos formas secretadas de diferente tamaño, se analizó si ambas versiones eran capaces de unirse a su antígeno realizando una inmunoprecipitación (IP) con microesferas con proteína G recubiertas con mPD-1-Fc. Se trabajó solamente con una de las muestras (sobrenadante de células BHK transfectadas con pAAV-EF1 $\alpha$ -C11), asumiendo que la modificación del nanobody era la misma para los diferentes casos. La muestra se incubó con las microesferas recubiertas con mPD-1 o sin recubrir. Como controles se incluyeron los nanobodies recombinantes C11 y el control negativo producidos en *E. coli*.

Tras realizar la IP, las fracciones obtenidas fueron analizadas por Western blot. Como se puede observar en la Fig. 37, las dos bandas de diferente tamaño de C11 producido por las células BHK precipitan junto con las microesferas recubiertas de mPD-1-Fc (carril 4). Por lo tanto, ambas versiones del nanobody son capaces de unirse a su antígeno, aunque a partir de este experimento no se puede concluir si una presenta mayor afinidad que la otra por mPD-1. Al haber utilizado cantidades en exceso de los nanobodies, también se observa una gran proporción de C11 en la fracción no retenida (carril 3).

En cuanto a los controles del experimento, no se observaron uniones inespecíficas de ningún tipo. El nanobody C11 solamente precipita con las microesferas recubiertas con mPD-1 y no cuando se lo enfrenta a las microesferas sin recubrir. El nanobody control negativo no precipita al incubarse con las microesferas recubiertas con mPD-1.



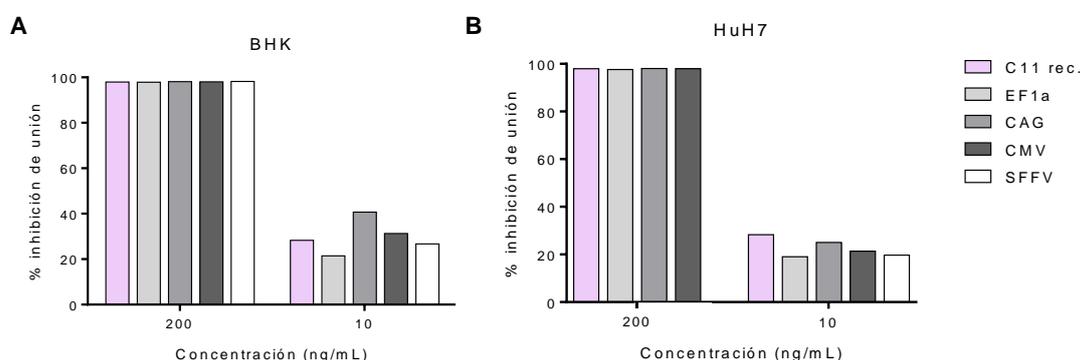
**Fig. 37. Análisis de la inmunoprecipitación del nanobody C11 producido en células BHK, utilizando microesferas magnéticas asociadas a mPD-1.** La IP se realizó utilizando el sobrenadante de células BHK transfectadas con pAAV-EF1 $\alpha$ -C11, y como control se empleó el nanobody C11 y un nanobody control negativo, ambos producidos en *E. coli* (C11 rec. y Ng. rec., respectivamente). En todos los casos, las muestras fueron enfrentadas a microesferas magnéticas recubiertas con mPD-1-Fc (+) o sin recubrir (-). El Western blot se realizó de la misma manera que en la Fig. 36. En el gel se cargó tanto la fracción que precipitó con las microesferas magnéticas (fracción P), como la fracción no retenida (NR), es decir, la que

no se unió a las microesferas. También se cargaron en el gel las muestras originales sin inmunoprecipitar, tanto de los nanobodies recombinantes como del sobrenadante de las células BHK transfectadas (Sbn).

### III. Ensayo de ELISA de inhibición

Por otra parte, se evaluó la capacidad del nanobody C11 producido a partir de las células BHK y HuH7 con los diferentes promotores de inhibir la unión mPD-1/mPD-L1 en ELISA. Los ensayos de inhibición se realizaron como se describió previamente (sección 2.10), evaluando el nanobody a dos concentraciones diferentes (200 y 10 ng/mL), tomando en cuenta las concentraciones determinadas por el ELISA en los sobrenadantes (punto I de esta sección). Se comparó la capacidad de inhibición del C11 presente en los sobrenadantes con el C11 recombinante purificado de *E. coli*. En todos los casos, se observó un nivel de inhibición de la unión mPD-1/mPD-L1 adecuado a partir de los sobrenadantes de las células transfectadas, que fue proporcional a la concentración de nanobody utilizada. Se observó inhibición completa de la unión utilizando los sobrenadantes a 200 ng/mL de C11, como era de esperar, y una inhibición parcial de alrededor del 25% utilizando la concentración menor (10 ng/mL), que se correspondió adecuadamente con la inhibición obtenida a partir de la misma concentración de C11 recombinante (Fig. 38).

A partir del experimento de IP y de este ELISA de inhibición se puede inferir que la modificación postraducciona que se genera en C11 al ser expresado a partir de las líneas de células eucariotas utilizadas no altera, al menos de forma significativa, el reconocimiento de su antígeno ni su capacidad de inhibición de la unión de PD-1 con su ligando.



**Fig. 38. Inhibición de la unión mPD-1/mPD-L1 en ELISA a partir del nanobody C11 producido en células eucariotas.** Se representa el porcentaje de inhibición de la unión mPD-1/mPD-L1 utilizando una concentración alta (200 ng/mL) o baja (10 ng/mL) de C11 producido en *E. coli* (C11 rec.) o en células eucariotas transfectadas con los plásmidos de AAVs codificantes para este nanobody a partir de los promotores que se indican. Se analizaron los sobrenadantes obtenidos a partir de la línea celular (A) BHK o (B) HuH7. El nanobody obtenido a partir de células HuH7 transfectadas con la construcción pAAV-SFFV-C11 pudo ser evaluado únicamente a 10 ng/mL debido a la baja concentración de C11 en este sobrenadante.

### 3.9. Comparación de promotores para la expresión *in vitro* de nanobodies a partir de pAAVs

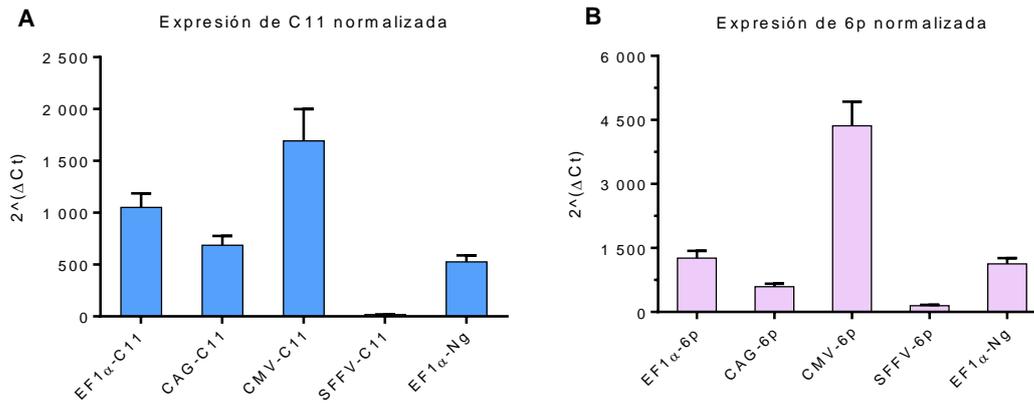
De acuerdo con los datos de IF, es difícil concluir qué promotor es el más eficiente para la expresión de los nanobodies *in vitro*, debido a las importantes diferencias observadas en el porcentaje de células positivas y también en las diferencias de intensidad del marcaje de las células. Por otro lado, la normalización de los niveles de expresión del nanobody en el sobrenadante con respecto al número de células positivas en cada transfección podría generar un error importante en los datos, en particular para el caso del promotor SFFV, donde se observaron muy pocas células positivas en IF.

Para solucionar este problema y poder normalizar la expresión de los nanobodies con respecto a la eficiencia de transfección de las células de una forma más precisa, se co-transfectaron células BHK con cada uno de los pAAVs codificantes para los nanobodies C11 o 6p, y con un plásmido que lleva el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor CMV (pCMV-GFP). Las co-transfecciones se realizaron utilizando la misma cantidad de ADN de los pAAVs-nanobodies que se utilizó en la sección 3.8 (2 µg/pocillo), y 10 veces menos de pCMV-GFP (200 ng/pocillo).

Tras 48 hs de las transfecciones, las células se lavaron con PBS para eliminar el exceso de ADN en el sobrenadante, y se recogieron para la posterior extracción de ARN. A partir del ARN obtenido de cada co-transfección, se sintetizó el ADNc y se realizó una PCR semi-cuantitativa utilizando cebadores para la amplificación de los nanobodies y de GFP. Los niveles de ARNm de cada nanobody se normalizaron con respecto a los de GFP, asumiendo que la transfección de los pAAVs codificantes para los nanobodies y del pCMV-GFP ocurre con igual eficiencia en cada línea celular co-transfectada, algo que ha sido demostrado en numerosos estudios. Por lo tanto, una mayor expresión de GFP indicaría mayor nivel de transfección general en una determinada línea celular, y viceversa.

Los resultados obtenidos luego de la normalización fueron similares para ambos nanobodies, siendo el promotor CMV el que generó mayor expresión (Fig. 39). En este caso se observó menor expresión de GFP en comparación con el resto de las construcciones, lo que indicaría que la eficiencia de transfección fue menor, aunque la expresión de nanobody fue elevada. Los promotores EF1 $\alpha$  y CAG se comportaron de forma similar, con muy buenos niveles de expresión del nanobody pero también buena expresión de GFP, es decir, buena eficiencia de transfección.

A partir de la construcción con el promotor SFFV no se observó buena expresión de los nanobodies a pesar de que la expresión de GFP fue similar a la obtenida para las co-transfecciones con las construcciones pAAV-EF1 $\alpha$  y pAAV-CAG. Por lo tanto, la baja expresión de nuestros nanobodies a partir de las construcciones de pAAV-SFFV *in vitro* no se debe a un problema en la eficiencia de transfección de las células, sino que sería un problema a nivel del vector. Estas construcciones fueron descartadas para su utilización en los experimentos *in vivo*.



**Fig. 39. Niveles relativos de expresión de nanobodies a partir de los vectores de pAAV.** Células BHK se co-transfectaron con los vectores de pAAV que expresan los nanobodies (A) C11 y (B) 6p, bajo los promotores indicados, y con el plásmido pCMV-GFP. Los niveles de expresión de cada nanobody se determinaron mediante RT-iqPCR y fueron normalizados con respecto a los datos de expresión de GFP en las mismas células. Como control se usó un pAAV codificante para un nanobody control bajo el promotor EF1α (EF1α-Ng).

### 3.10. Producción de AAVs recombinantes codificantes para el nanobody C11

Con objeto de ensayar los vectores de AAV que expresan nanobodies *in vivo* se escogió el nanobody C11, capaz de reconocer a la molécula PD-1. En primer lugar, se generaron partículas virales recombinantes codificantes para este nanobody, utilizando las construcciones de AAV con los tres promotores que habían mostrado mejor expresión de C11 *in vitro* (EF1α, CMV y CAG). A pesar de que los ITRs que contienen los genomas recombinantes en nuestro caso son del serotipo 2 de AAV, las partículas virales recombinantes producidas corresponden al serotipo 8. Este serotipo se produce con altos rendimientos y transduce con mucha eficiencia el hígado (por lo tanto, al administrarse sistémicamente se podría conseguir una buena expresión del transgén a partir de este órgano), aunque también es capaz de transducir otros tipos celulares como por ejemplo las células musculares.

La producción de los AAVs recombinantes (rAAVs) y su purificación se realizó según el protocolo descrito en la sección 2.15. De cada producción se obtuvo aproximadamente 1 mL de rAAVs purificados en PBS-sacarosa 5%. Se utilizaron 20 μL de la producción para su titulación, para lo cual se extrajo el ADN de la muestra y se realizó una PCR cuantitativa incluyéndose una curva estándar realizada a partir del plásmido pAAV-C11 correspondiente para cada caso. El título de las producciones se expresó como copias genómicas virales por mL (cg/mL), valor que no necesariamente se corresponde con el número de partículas virales presentes debido a que podrían encapsidarse más de una copia genómica por partícula viral recombinante (dado el pequeño tamaño de los plásmidos). En nuestro caso, los títulos obtenidos a partir de las producciones fueron superiores a  $3 \times 10^{12}$  cg/mL, lo que nos permitió proceder con los experimentos *in vivo* (Tabla XI).

**Tabla XI. Títulos de las producciones de las partículas de AAVs recombinantes codificantes para el nanobody C11.** Se expresan en copias genómicas por mL.

Partícula viral	Título (cg/mL)
rAAV8-EF1 $\alpha$ -C11	4,03x10 <sup>12</sup>
rAAV8-CAG-C11	3,60x10 <sup>13</sup>
rAAV8-CMV-C11	3,16x10 <sup>12</sup>

### 3.11. Expresión *in vivo* a largo plazo del nanobody C11 a partir de rAAVs

En este primer experimento *in vivo* se estudió la expresión a largo plazo del nanobody C11 a partir de los tres rAAVs producidos en la sección anterior. Se incluyeron solamente tres ratones por grupo debido a que nuestro objetivo era comprobar que el nanobody se expresara correctamente durante un período prolongado, y que no tuviera efecto tóxico sobre los animales. Como control negativo se incluyeron tres ratones que no recibieron rAAV.

Los rAAVs fueron inoculados por vía intraocular a una dosis de 10<sup>11</sup> cg/ratón (aproximadamente 5x10<sup>9</sup> cg/g). Al administrarse sistémicamente, el tropismo natural de estas partículas virales hará que se transduzca principalmente el hígado. La producción de C11 a partir de las células transducidas se puede evaluar midiendo los niveles de este nanobody en muestras de suero mediante un ELISA de unión a PD-1.

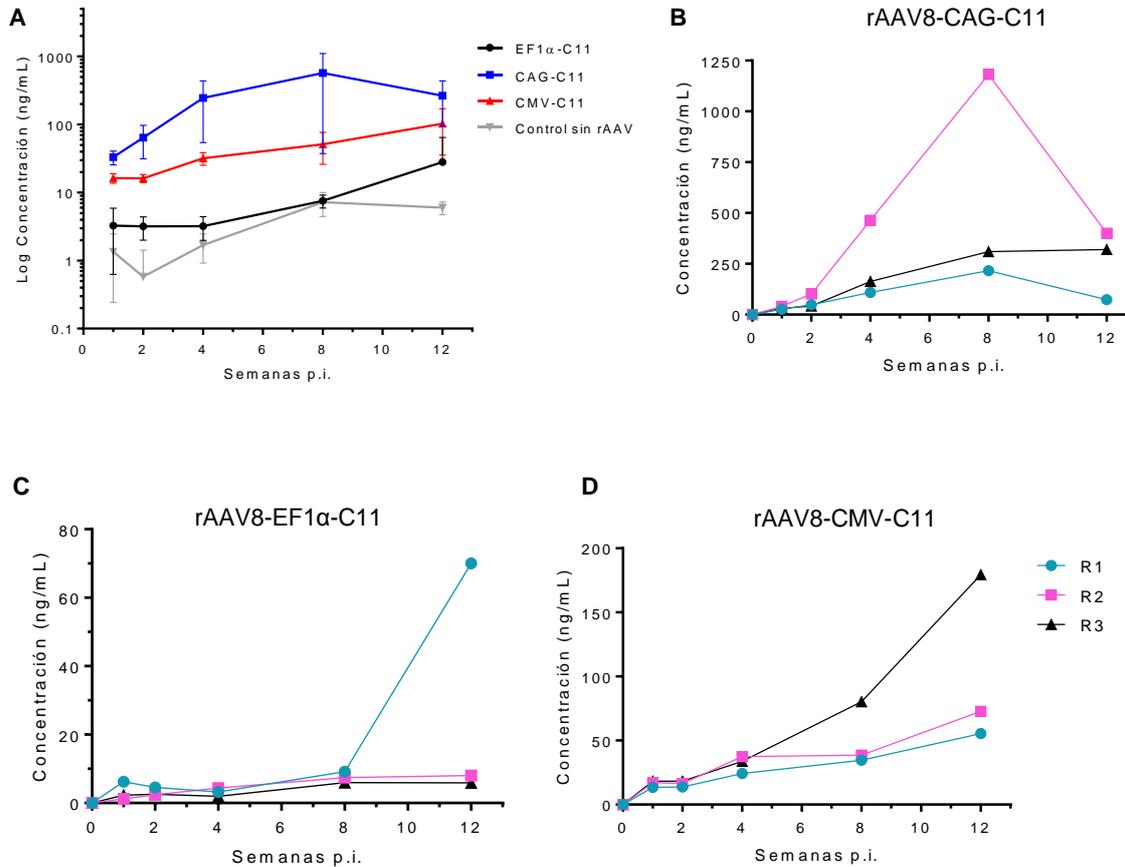
Se tomaron muestras de suero basales (previo a la inoculación de los rAAVs), y a las semanas 1, 2, 4, 8 y 12 luego de la inoculación de los rAAVs.

El nanobody C11 pudo detectarse en el suero de todos los ratones que recibieron los rAAVs, con niveles que fueron aumentando a lo largo del tiempo, alcanzándose un máximo entre la semana 8 y 12 (Fig. 40 A). Sin embargo, la expresión durante las primeras dos semanas fue muy baja, lo que podría ser una desventaja para su uso en tratamientos antitumorales. La expresión *in vivo* de C11 fue diferente a partir de los rAAVs con distintos promotores. El vector rAAV8-CAG fue el que logró un mayor nivel de expresión de C11 en los tres animales. El pico de expresión de C11 a partir de este vector ocurre a la semana 8, obteniéndose concentraciones de 569  $\pm$  532 ng/mL (promedio  $\pm$  SD), y hacia la semana 12 la concentración de C11 tiende a disminuir (Fig. 40 B).

El vector de rAAV8 con el promotor CMV expresó niveles de C11 en suero intermedios, que fueron menores que los de rAAV8-CAG pero que continuaron aumentando hasta la semana 12 (Fig. 40 D), donde se registró una concentración promedio de 103  $\pm$  67 ng/mL. Finalmente, en claro contraste con lo observado *in vitro*, el vector rAAV8 con el promotor EF1 $\alpha$  fue el que expresó niveles más bajos (Fig. 40 C), siendo en dos de los animales casi nulo, y con el pico máximo de expresión registrado en la semana 12 (28  $\pm$  36 ng/mL).

Estos datos permiten concluir que, aunque el nanobody C11 puede ser expresado *in vivo* a partir de los rAAVs administrados en forma sistémica, presenta una cinética de expresión lenta, requiriéndose al menos ocho semanas para alcanzar niveles elevados y sostenidos.

Por otro lado, cabe destacar que la expresión de C11 no generó toxicidad evidente en los animales, en los que no se observó pérdida de peso ni cambios en el comportamiento habitual.



**Fig. 40. Niveles séricos de C11 en ratones inoculados sistémicamente con rAAV8.** (A) Representación de la concentración promedio de C11 ( $\pm$  SD) en los grupos de ratones inoculados con los vectores de rAAV8 que expresan C11 bajo el control de los promotores indicados, incluyendo los animales control que no recibieron rAAV. La concentración de C11 se midió hasta la semana 12 post-inoculación (p.i.) de los rAAVs. (B-D) Concentración de C11 para cada animal individual inoculado con: (B) rAAV8-CAG-C11, (C) rAAV8-EF1 $\alpha$ -C11 y (D) rAAV8-CMV-C11. R1-R3, ratones 1-3 en cada grupo.

### 3.12. Evaluación de la eficacia antitumoral del nanobody C11 expresado a partir de rAAV8

Para evaluar la actividad antitumoral del nanobody C11, se utilizó un modelo tumoral basado en la inoculación subcutánea de células de la línea MC38 en ratones singénicos C57BL/6. La inyección de las células tumorales por vía subcutánea es el modelo de preferencia durante las primeras etapas de evaluación de agentes terapéuticos debido

a la simplicidad en el seguimiento del crecimiento tumoral. La línea celular MC38 fue elegida principalmente debido a dos razones: 1) es una línea derivada de adenocarcinoma colorrectal, uno de los tipos de cáncer más prevalentes en el mundo, para el cual escasean tratamientos efectivos, y 2) se ha demostrado que la vía de PD-1/PD-L1 es de importancia central en la capacidad de evasión del sistema inmune en esta línea de células cancerígenas, como se comentó en la introducción [143].

Cada animal fue inoculado con  $5 \times 10^5$  células MC38 por vía subcutánea en el flanco derecho. Se monitorizó el crecimiento tumoral durante los días siguientes hasta que la mayoría de los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 5 mm x 5 mm, momento en el cual se realizó la administración de las distintas terapias. Debido a que los tumores no crecen homogéneamente en los diferentes animales, el día que se administraron los tratamientos se midieron todos los tumores y los animales fueron divididos en grupos lo más equitativos posibles.

De los 40 animales inoculados con células tumorales, solamente 28 desarrollaron tumores. Estos 28 animales se dividieron en 5 grupos que recibieron los siguientes tratamientos: 1) rAAV8-CAG-C11 por vía sistémica, 2) rAAV8-CAG-C11 por vía intratumoral, 3) rAAV-CMV-C11 por vía intratumoral, 4) C11 recombinante por vía intraperitoneal, y 5) grupo control tratado con suero salino.

La dosis de los rAAVs fue de  $2 \times 10^{11}$  cg/ratón (el doble de la dosis utilizada en el experimento de expresión a largo plazo de C11), para ambas vías de administración. Los animales que no recibieron tratamiento fueron inoculados con suero fisiológico por vía intratumoral, como control del efecto de la inyección en el tumor. Por último, el grupo tratado con el nanobody recombinante recibió una dosis de 35 µg de C11 al día durante 10 días consecutivos. Se utilizó esta pauta teniendo en cuenta la corta vida media que presentan los nanobodies en suero [192].

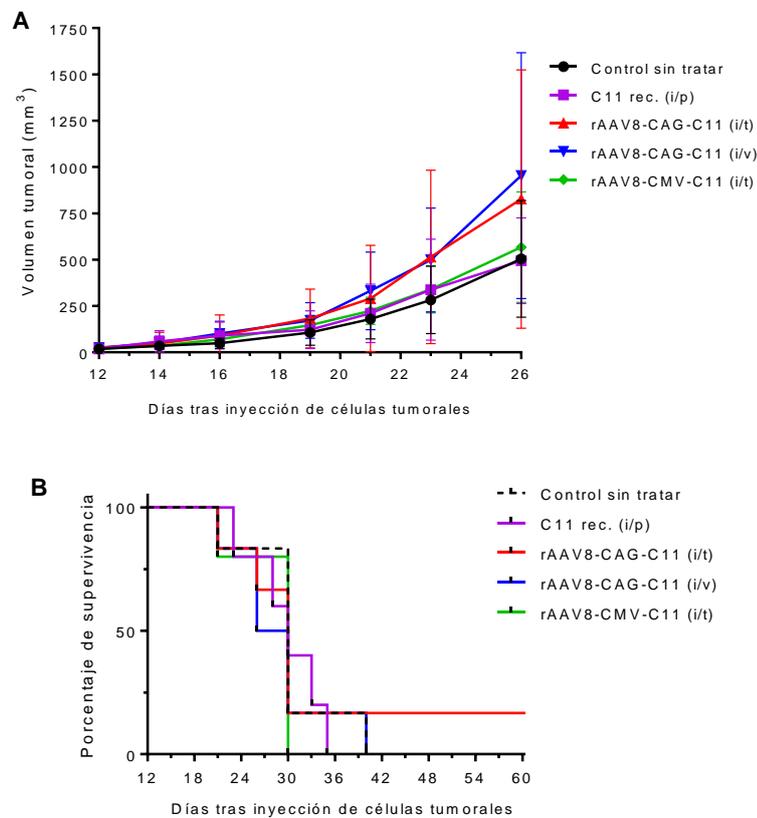
En este experimento no se observaron diferencias significativas en la evolución de los tumores o en la supervivencia entre los grupos de animales tratados y el grupo control (Fig. 41). Además, las variaciones en los tamaños tumorales dentro de los grupos fueron muy grandes, lo cual contribuyó a la dificultad en el análisis de los datos.

Uno de los ratones tratados con rAAV8-CAG-C11 por vía intratumoral presentó una remisión completa del tumor, aunque dada la discordancia de este hecho con el resto de ratones del grupo, no se puede asegurar que esto haya ocurrido por el tratamiento recibido.

El hecho de no haber sido capaces de observar actividad antitumoral por parte del nanobody C11 en este modelo tumoral no significa que no presente efecto en otras condiciones experimentales. Como habíamos notado en el estudio de expresión de C11 a largo plazo a partir de los rAAV8s administrados sistémicamente, la cinética de expresión era lenta y los niveles en suero fueron muy bajos durante al menos el primer mes. En este modelo, los tumores son de crecimiento rápido, por lo que la baja expresión

de nanobody durante las primeras dos semanas de tratamiento representan una desventaja.

Más significativo parece el hecho de que el tratamiento con el C11 recombinante administrado sistémicamente durante 10 días no haya demostrado efecto antitumoral, aunque esto también podría deberse a una administración insuficiente de nanobody.



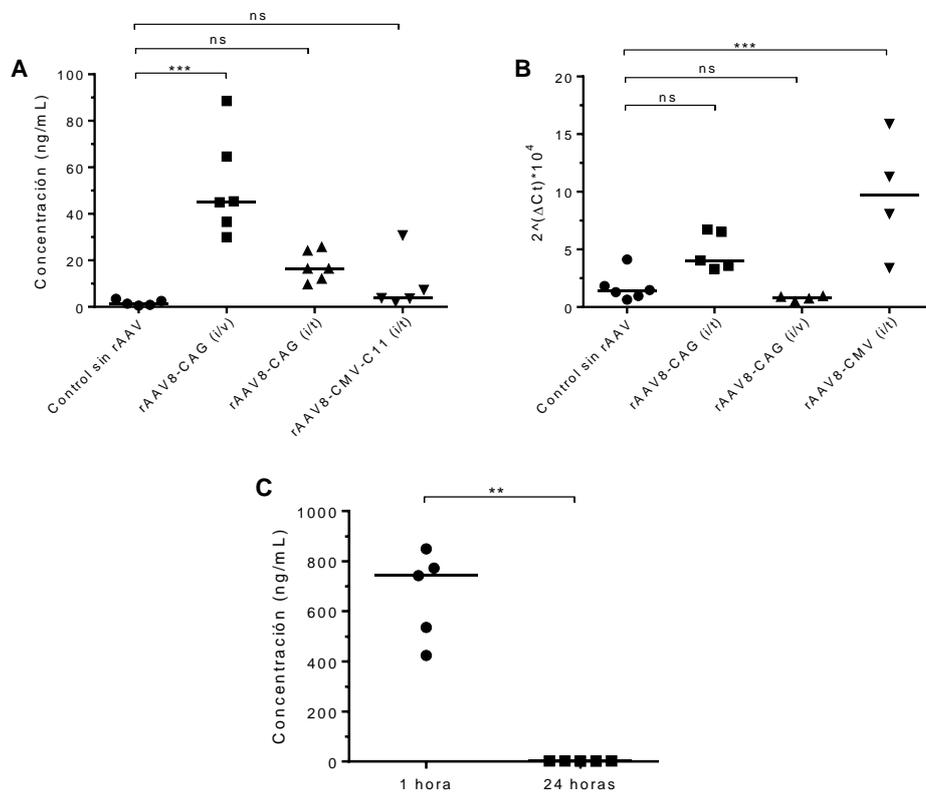
**Fig. 41. Evaluación de la actividad antitumoral del nanobody C11 en animales portadores de tumores MC38. (A)** Evolución a lo largo del tiempo del tamaño tumoral de grupos de ratones tratados con los vectores indicados. El día 12 corresponde al día en que se administraron los tratamientos. Los animales tratados con C11 recombinante recibieron una dosis por día entre los días 12 y 21. Se representan las medias de volúmenes tumorales  $\pm$  SD. **(B)** Curvas de supervivencia para los diferentes grupos de animales. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre los distintos grupos. El número de animales por grupo fue de 5 (para los grupos tratados con C11 rec. y rAAV8-CMV-C11 i/t) o 6 (en el resto de los casos).

Los niveles de C11 en suero fueron evaluados a las dos semanas de haber administrado los rAAVs codificantes para este nanobody (o el día del sacrificio de los animales, en los casos en los que se debieron sacrificar antes). Los niveles de C11 en suero de los ratones tratados con el rAAV8-CAG-C11 de forma sistémica fueron más elevados en comparación con los animales que recibieron los rAAVs por vía intratumoral (Fig. 42 A).

También se evaluó la expresión de C11 a partir de los tumores recolectados. Para ello, se extrajo el ARN de una sección de los tumores, se sintetizó el ADNc y se realizó una PCR semicuantitativa utilizando cebadores específicos para C11, normalizándose los

datos con respecto a la expresión del gen constitutivo GAPDH. Como era de esperar, la expresión de C11 pudo observarse únicamente en las muestras correspondientes a los animales tratados con los rAAVs por vía intratumoral, si bien los niveles fueron bajos (Fig. 42 B). Sin embargo, se debe tener en cuenta que el tumor es heterogéneo y que en este experimento solamente se analizó una pequeña proporción del mismo, por lo cual los datos podrían no ser representativos de la totalidad del tumor.

En el caso de los ratones a los cuales se les administró C11 recombinante por vía i/p, los niveles de nanobody en suero se midieron una hora después de la primera dosis, y tras 24 hs de la última dosis. Como se puede observar en la Fig. 42 C, los niveles son elevados en suero tras una hora de administrar el nanobody, mientras que a las 24 hs de la última dosis sus niveles son indetectables, como es de esperar debido a su baja vida media en suero. Aunque los niveles son elevados tras una hora de la administración del nanobody, constituyen sólo una pequeña proporción del total administrado a los animales. Además de haberse filtrado una fracción en los riñones, esto podría indicar que buena parte del nanobody administrado se encuentra retenido en los tejidos.

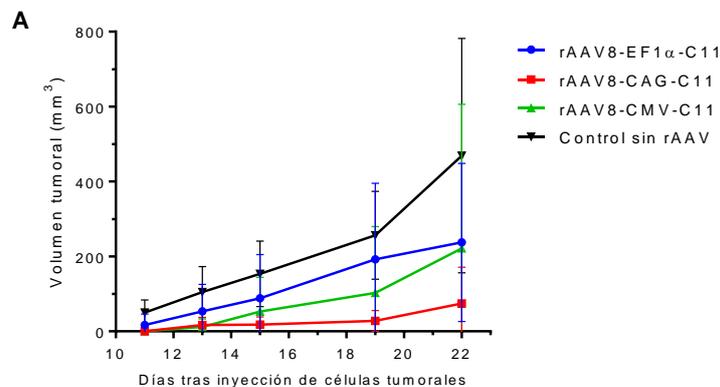


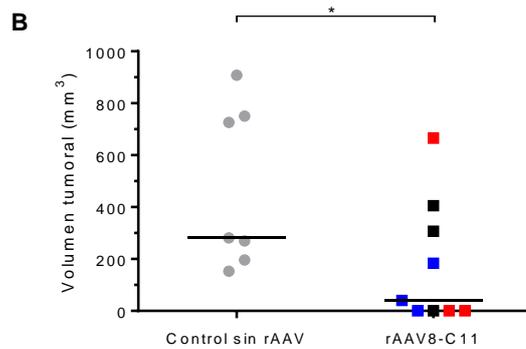
**Fig. 42. Evaluación de la expresión de C11 en animales tratados con rAAVs o con el nanobody recombinante.** (A) Niveles séricos de C11 en animales tratados con los rAAVs codificantes para C11, tras dos semanas del tratamiento. (B) Evaluación de la expresión intratumoral de C11 por RT-qPCR (tumores recogidos durante el sacrificio de los animales). (C) Niveles séricos de C11 en animales tratados con el nanobody recombinante, administrado por vía i/p. Los niveles fueron medidos una hora después de la administración de la primera dosis, y tras 24 hs de la última dosis. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001.

### 3.13. Evaluación de la capacidad de protección del nanobody C11 frente al desarrollo tumoral

La falta de eficacia antitumoral en el experimento anterior podría atribuirse a la lenta cinética de expresión del nanobody C11 a partir de los rAAVs *in vivo*. Para evaluar si los niveles que se alcanzan en etapas más tardías podrían ser terapéuticos, se realizó un experimento de protección frente al crecimiento tumoral, utilizando los animales del experimento de expresión a largo plazo de C11 (sección 3.11). Estos ratones fueron inoculados por vía subcutánea con células de la línea MC38, luego de 13 semanas de haber recibido los rAAVs codificantes para C11, es decir, cuando los niveles de C11 en suero eran elevados. En este experimento se usaron 7 ratones *naive*, que no habían recibido rAAV, como control del crecimiento tumoral en ausencia de nanobody C11.

Se monitorizó el crecimiento tumoral hasta el día 22 tras la implantación del tumor, momento en el cual se debieron sacrificar algunos animales. Como puede observarse en la Fig. 43 A, los ratones que habían recibido el AAV que expresaba C11 experimentaron un crecimiento tumoral más lento que los animales control, lo que demuestra la actividad antitumoral de este nanobody. Este efecto fue mayor en aquellos grupos en los que la expresión del nanobody era más elevada, siendo el grupo de rAAV8-CAG-C11 el que presentó menor crecimiento tumoral seguido del grupo rAAV8-CMV-C11 y de rAAV8-EF1 $\alpha$ -C11, en el que se observó el menor efecto. Debido a que el número de animales en los grupos de ratones inoculados con rAAVs-C11 es muy pequeño para hacer comparaciones con valor estadístico, se agruparon todos los ratones que expresaban el nanobody C11 en un solo grupo de animales "tratados". De esta forma a día 22 se pueden observar diferencias significativas entre los tamaños tumorales del grupo de ratones no tratados y de los ratones tratados con los rAAVs codificantes para C11 (Fig. 43 B). Además, en ese momento cuatro animales del grupo de ratones tratados no habían desarrollado tumor (~45%), mientras que en el grupo de animales sin tratar el 100% de los ratones desarrolló tumor.

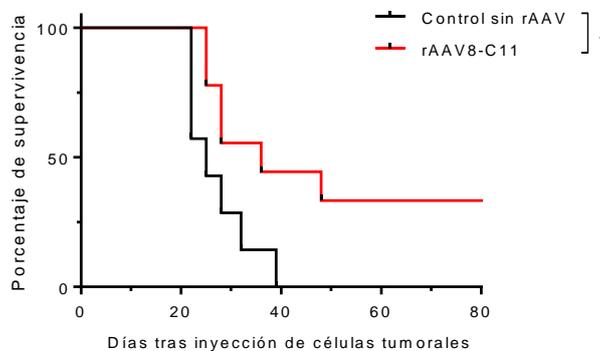




**Fig. 43. Tamaños tumorales en el experimento de protección de desarrollo tumoral.** (A) Evolución del tamaño de los tumores a lo largo del tiempo de los distintos grupos de ratones tratados con los rAAVs codificantes para C11 y los ratones sin tratar. Se graficaron los promedios del volumen tumoral en los diferentes tiempos y la desviación estándar. Cada grupo tratado con rAAV8-C11 consta de 3 animales, mientras que el grupo control que no recibió tratamiento consta de 7 animales. (B) Comparación de los tamaños tumorales a día 22 luego de la inoculación de las células tumorales de los ratones sin tratar o tratados con rAAVs codificantes para C11. Se diferencian los datos para los diferentes grupos de ratones tratados: rAAV8-CAG-C11 (azul), rAAV8-CMV-C11 (rojo) y rAAV8-EF1 $\alpha$ -C11 (negro). \*P<0,05.

La expresión de C11 en el grupo de ratones que recibieron rAAVs retrasó el crecimiento tumoral y prolongó el tiempo de supervivencia de los animales, en comparación con los ratones que no recibieron tratamiento. Además, el 30% de los animales que expresaban C11 (3 de 9) continuaron libres de tumor tras tres meses de seguimiento, mientras que la totalidad de los ratones sin tratar desarrollaron tumores y murieron antes de los 40 días tras la inoculación de las células tumorales (Fig. 44).

Este experimento piloto sirve como prueba de concepto de que el nanobody C11 presenta un efecto protector frente al desarrollo de tumores derivados de la línea MC38 en ratones C57BL/6.



**Fig. 44. Curvas de supervivencia de los ratones del experimento de protección de desarrollo tumoral.** En negro: animales que no recibieron tratamiento; en rojo: animales a los que se les administró sistémicamente los rAAVs codificantes para C11 a partir de distintos promotores (EF1 $\alpha$ , CAG y CMV), 13 semanas previo a la inoculación de las células tumorales. \*P<0,05.

## 4. Discusión

---

### 4.1. Selección de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1

Durante la selección de nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1 surgieron diversas dificultades que retrasaron el cumplimiento de esta primera etapa. A pesar de que nuestro laboratorio posee amplia experiencia en la generación de bibliotecas de nanobodies en fagos filamentosos y en la selección de nanobodies contra diferentes antígenos, durante esta tesis se incursionó en un ámbito novedoso: la selección de nanobodies contra proteínas expresadas en la superficie de células eucariotas con fines terapéuticos. Algo similar había sido abordado previamente por nuestro grupo de investigación, pero con el objetivo de identificar nanobodies contra proteínas en general presentes en la superficie de un tipo celular, y no contra un antígeno determinado [244].

Aunque actualmente existe literatura concreta en la que se describen estrategias efectivas para la inmunización y selección de nanobodies contra la conformación nativa de proteínas de membrana [245,246], es un área de investigación relativamente reciente. La evidencia obtenida en los últimos años sugiere que las estrategias empleadas para la inmunización y la selección de nanobodies son determinantes para los resultados obtenidos, es decir, que la calidad y las propiedades del antígeno utilizado determinan la especificidad de los nanobodies que se generarán [246–248]. Experiencias previas en nuestro laboratorio también son concordantes con estas observaciones [215].

Según la experiencia desarrollada en esta tesis, las estrategias a partir de las cuales se realizaron las rondas de *panning* determinaron directamente los resultados obtenidos, especialmente en el caso de PD-1. En este trabajo no fue posible la selección de clones con reactividad por la proteína expresada sobre células HEK-293 positivas para PD-1 (la cual se asume que se encuentra en su forma nativa) cuando se realizaron rondas de *panning* con el ectodominio recombinante de PD-1 producido en el laboratorio adsorbido en placas de microtitulación. En nuestra opinión, la adsorción directa de PD-1 en la placa genera la desnaturalización del ectodominio recombinante de una forma masiva, lo que impide la selección de nanobodies contra epítopes conformacionales. Esta pérdida de la estructura nativa podría estar determinada por el pequeño tamaño del ectodominio (15 kDa), y por características propias del mismo como su secuencia aminoacídica y estructura terciaria. La adsorción en los pocillos de las placas de poliestireno ocurre a través de zonas hidrofóbicas de la proteína, y en este caso, la exposición de estas zonas durante la adsorción podría generar una desnaturalización total.

La utilización del ectodominio recombinante de PD-1 biotinilado químicamente y capturado por la avidina a los pocillos de la placa tampoco permitió la selección de nanobodies con especificidad contra PD-1 expresado sobre células HEK-293. La biotinilación química puede modificar o enmascarar epítopes, así como modificar la

estructura de la proteína [246], lo cual podría afectar de forma más marcada a proteínas de bajo peso molecular como es el caso del ectodominio de PD-1.

A raíz de estas observaciones, se utilizaron las células HEK-293 positivas para PD-1 como sustrato durante el *panning*, de manera de promover la selección de nanobodies contra la forma nativa de la proteína. Sin embargo, esta estrategia fue poco efectiva en el marco de este trabajo ya que la mayoría de los clones evaluados durante los *screenings* fueron negativos. Se identificaron solamente tres nanobodies capaces de reconocer el PD-1 expresado sobre células HEK-293 (dos contra la variante humana y uno con reactividad cruzada por las variantes humana y murina).

La baja proporción de clones positivos aislados contra PD-1 podría indicar que la estrategia de inmunización de las llamas fue inadecuada para la generación de una respuesta de anticuerpos de cadena pesada contra epítopes conformacionales nativos. Las inmunizaciones se realizaron utilizando los ectodominios recombinantes en una solución con adyuvante incompleto de Freund, el cual podría inducir su desnaturalización y/o agregado, promoviendo respuestas de anticuerpos principalmente contra la forma desnaturalizada de la proteína. Si bien se observó un aumento en los títulos de anticuerpos totales a lo largo de las inmunizaciones, esto no implica necesariamente que se haya generado una respuesta adecuada de anticuerpos de cadena pesada contra la proteína nativa. Esto es debido a dos razones: primero, porque se mide el título de anticuerpos totales (tanto de cadena pesada como convencionales), y segundo, porque el seguimiento de los títulos de anticuerpos fue realizado mediante ELISA en placas tapizadas con los ectodominios recombinantes de PD-1 (que, como se observó después, no conservaría la estructura nativa).

Otra posibilidad que debe tenerse en cuenta es que los ectodominios de PD-1 producidos en forma recombinante en nuestro laboratorio no se encuentren plegados correctamente. Sin embargo, se demostró que el nanobody C11 es capaz de reconocer a los ectodominios recombinantes de PD-1, tanto humano como murino, cuando éstos se encuentran en solución, a pesar de que no es capaz de hacerlo cuando se los adsorbe en placas de poliestireno (sección 3.4.1).

Para optimizar la selección de clones capaces de reconocer la forma nativa de PD-1, lo ideal hubiera sido disponer de los ectodominios recombinantes comerciales de PD-1 fusionados a Fc para los *pannings* en placa. Según los datos proporcionados por el fabricante (R&D Systems), el PD-1-Fc comercial puede adsorberse sobre la placa de microtitulación sin perder la capacidad de unión al ectodominio recombinante de su ligando PD-L1, es decir que mantendría su estructura nativa intacta. En estos casos es probable que los dominios Fc participen en la unión a la placa a través de sus regiones hidrofóbicas, preservando la estructura de PD-1. Si la utilización de PD-1-Fc tampoco mejorase los resultados, lo más lógico sería considerar que la biblioteca generada no es óptima para la selección de nanobodies contra la forma nativa de PD-1.

Si se optara por generar una nueva biblioteca, se podría utilizar como antígeno de inmunización a las células HEK-293 transfectadas transitoriamente con PD-1, las cuales sobre-expresan esta proteína en su superficie en forma nativa. Emplear PD-1-Fc comercial para las inmunizaciones sería extremadamente costoso debido a la gran cantidad de proteína necesaria, pero se podría utilizar durante los *pannings* en placa para promover la selección de nanobodies contra PD-1 nativo. Para el *panning* también se podría utilizar otra línea celular transfectada con PD-1 (por ejemplo, células CHO).

Luego de los resultados obtenidos durante la búsqueda de nanobodies contra PD-1, se modificaron las estrategias de inmunización y de selección de nanobodies para el caso de PD-L1, con el objetivo de promover la selección de clones que reconocieran los ectodominios en su conformación nativa. Para ello, se utilizó la biblioteca generada a partir de la llama inmunizada con las líneas celulares positivas para PD-L1 humano y murino, y se realizaron los *pannings* sobre células HEK-293 que sobre-expresaban PD-L1. Sin embargo, tampoco se obtuvieron buenos resultados utilizando esta estrategia. En nuestra opinión, la limitante en este caso la constituyeron las líneas celulares utilizadas para la inmunización, las cuales, como comprobamos tardíamente por un retraso en el pedido de los reactivos de citometría, presentaban bajos niveles de expresión de PD-L1 en sus membranas al momento de la inmunización. Según los datos de nuestro grupo colaborador del CIMA, el cual nos proporcionó las células, la expresión de hPD-L1 en la línea HEK-293/hPD-L1<sup>E</sup> era adecuada para la inmunización. Esta discrepancia puede ser explicada si se toma en cuenta que, tras la medición de los niveles de expresión de hPD-L1 realizada por el grupo español, se realizaron al menos 15 pases antes de la inmunización y medición de los niveles de expresión en nuestro laboratorio. Puede haber ocurrido que las líneas estables perdieran la expresión de hPD-L1 a lo largo de los sucesivos pases. Siendo PD-L1 una proteína minoritaria en ambas líneas celulares, y tomando en cuenta la enorme cantidad de proteínas que componen una célula, es probable que la respuesta de anticuerpos de la llama fuera insuficiente contra el antígeno de interés. Esto está en concordancia con los resultados previos de nuestro grupo, en los cuales se observó una buena respuesta de anticuerpos de cadena pesada de llama contra proteínas de la superficie celular solamente si estaban altamente representadas [244].

Por otra parte, la titulación de los anticuerpos durante la inmunización de la llama se realizó a partir de un extracto de las proteínas totales de las líneas celulares utilizadas para la inmunización, indicando el desarrollo de una respuesta del animal contra la célula en su totalidad, pero no necesariamente una respuesta adecuada contra PD-L1. La titulación de los anticuerpos no se realizó utilizando el ectodominio recombinante de PD-L1 ya que se tenía la sospecha de que éste podría desnaturalizarse de igual forma que PD-1 al ser adsorbido directamente a los pocillos de ELISA, y un bajo título frente a la proteína recombinante adsorbida podría haber indicado simplemente que la respuesta se dirigió frente a epítopes presentes en la proteína nativa. Además, en ese momento no se contaba con el ectodominio recombinante de mPD-L1, por lo tanto, solamente se

habrían podido titular los anticuerpos contra la variante humana. Resultados posteriores demostraron que la adsorción del ectodominio recombinante de hPD-L1 permitía la selección de nanobodies contra la proteína nativa, es decir que no perdía su estructura al ser adsorbido en placas de ELISA como sucedió con PD-1. Cuando este hecho se hizo evidente, ya no se contaba con las muestras de suero necesarias para volver a medir los títulos de anticuerpos de la llama contra el ectodominio recombinante de hPD-L1, lo cual habría sido interesante para corroborar que la respuesta de la llama a ese antígeno fue subóptima.

Luego de haber obtenido resultados desalentadores utilizando las células positivas para PD-L1, se redireccionó la búsqueda de nanobodies centrando los esfuerzos nuevamente en estrategias básicas de selección, es decir, las basadas en el uso de las proteínas recombinantes. En este caso se tenía la esperanza de que la adsorción de PD-L1 en la placa de ELISA no generara una desnaturalización completa, debido a que se trata de una proteína de mayor peso molecular que PD-1. Cabe mencionar que el uso de anticuerpos convencionales como control del mantenimiento de la estructura nativa de una proteína adsorbida en placa de ELISA no es fiable, porque los nanobodies tienden a ser mucho más dependientes de la conformación de sus antígenos para reconocerlos en comparación con los anticuerpos convencionales. De hecho, muchos anticuerpos convencionales son capaces de reconocer a sus antígenos tanto en su forma nativa (citometría de flujo) como en su forma desnaturalizada (Western blot a partir de gel de SDS-PAGE).

Siguiendo este razonamiento, se partió de la biblioteca de nanobodies en fagos filamentosos obtenida a partir de una llama inmunizada con el ectodominio recombinante de PD-L1 humano. Lamentablemente, al no haberse podido producir el ectodominio recombinante de PD-L1 murino, no fue posible inmunizar con este antígeno y, por lo tanto, la selección de nanobodies en este caso se centró en la búsqueda de clones que presentaran reactividad cruzada entre las variantes humana y murina, basándonos en la alta homología de secuencia que presentan [100].

Luego de las rondas de selección realizadas con el ectodominio de hPD-L1 adsorbido en placa de microtitulación, se observó que la mayoría de los nanobodies analizados eran capaces de reconocer a PD-L1 tanto en ELISA como en citometría de flujo. A partir de estas observaciones se confirmó que el ectodominio de hPD-L1 no tiende a desnaturalizarse al ser adsorbido en placa (o al menos no se desnaturaliza completamente), lo cual facilitó la selección de nanobodies capaces de reconocer a la forma nativa de hPD-L1 expresada sobre las células HEK-293.

Tras haber obtenido buenos resultados a partir de estas estrategias de selección, se adquirió el ectodominio recombinante de PD-L1 murino fusionado a Fc para utilizarlo como sustrato para el *panning*, buscando clones que presentaran reactividad cruzada por PD-L1 humano y murino. Se obtuvieron algunos clones positivos en ELISA contra esta proteína, pero que no reconocieron el mPD-L1 expresado sobre células HEK-293,

aunque curiosamente presentaron reactividad contra la variante humana en citometría de flujo. Esto resultó confuso y se consideró entonces la posibilidad de que el mPD-L1 expresado en las células HEK-293 presentara alguna mutación o modificación postraducciona que impidiera el reconocimiento por parte de los nanobodies (a pesar de que era reconocido por el anticuerpo comercial utilizado como control, quizás dirigido contra otro epítoto no alterado por el supuesto cambio). En efecto, posteriormente se demostró que uno de los nanobodies, seleccionado a partir del *panning* sobre el ectodominio de hPD-L1, era capaz de inhibir la unión mPD-1-Fc/mPD-L1-Fc en ELISA, y de generar un efecto biológico en el experimento de reactivación de células T de ratón, a pesar de que no reconoció el mPD-L1 expresado sobre las células HEK-293 transfectadas.

A modo de resumen, en esta primera etapa del proyecto se lograron seleccionar: 1) dos nanobodies específicos para PD-1 humano expresado sobre células HEK-293 transfectadas, 2) un nanobody específico para PD-1, con reactividad cruzada por la variante humana y murina expresadas sobre células HEK-293 transfectadas, y 3) nueve nanobodies específicos para PD-L1 humano (tanto su ectodominio recombinante en ELISA como expresado sobre células HEK-293 transfectadas), sin reactividad cruzada por la variante murina en citometría sobre las células HEK-293 transfectadas.

#### 4.2. Evaluación de la capacidad de los nanobodies de inhibir la unión PD-1/PD-L1 *in vitro*

Luego de haber seleccionado nanobodies específicos para los antígenos de interés, el siguiente paso consistió en caracterizar los mismos en cuanto a su capacidad de inhibición de la unión PD-1/PD-L1, una característica imprescindible para poder continuar con el proyecto planteado. Como este hecho no era una garantía, se propusieron en un principio alternativas para la evaluación de los nanobodies seleccionados en caso de que ninguno fuera capaz de bloquear la unión PD-1/PD-L1. Estas alternativas estaban centradas en su potencial uso como reactivos de diagnóstico en técnicas como inmunohistoquímica o citometría de flujo, debido a las características de los nanobodies que los convierten en buenos candidatos para aplicaciones biotecnológicas (como se describió en la sección 1.5.1). Afortunadamente, esto no fue necesario ya que se lograron identificar nanobodies inhibidores de la unión PD-1/PD-L1 *in vitro*, con lo cual el proyecto pudo seguir adelante según el plan de trabajo planteado originalmente.

Los nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1 seleccionados fueron evaluados en primer lugar en ensayos de ELISA de inhibición de la unión PD-1/PD-L1, utilizando los ectodominios recombinantes comerciales fusionados a la región Fc. No fue posible poner a punto este ensayo utilizando los ectodominios producidos en el laboratorio, probablemente por la pérdida de la estructura nativa de PD-1. Como ya se comentó, las regiones Fc pueden participar en la adsorción de la proteína quimérica a la placa a través

de sus regiones hidrofóbicas. Además, el hecho de que cada dominio Fc esté unido a dos moléculas de ectodominio también podría favorecer la unión PD-1/PD-L1 aumentando la avidéz, ya que la interacción monomérica de PD-1 y PD-L1 es de baja afinidad, como se comentó en la introducción.

Como controles de inhibición, se contaba con un anticuerpo policlonal anti-hPD-L1 (R&D Systems), un anticuerpo convencional anti-mPD-L1 del CIMA, y un anticuerpo convencional anti-mPD-1 (en sobrenadante de hibridoma sin purificar). Lo ideal hubiera sido comparar la capacidad de inhibición de los nanobodies con respecto a anticuerpos con afinidad conocida y actividad antitumoral *in vivo* caracterizada (anticuerpos utilizados en la clínica o que ya hubieran sido evaluados en modelos preclínicos). Sin embargo, los anticuerpos aprobados para su uso en la clínica son extremadamente costosos y no fue posible adquirirlos. El único control de inhibición del cual se conoce su performance *in vivo* es el anticuerpo anti-mPD-L1, que ha sido utilizado por el grupo del CIMA en experimentos de tumores trasplantables derivados de la línea MC38, como se comentará más adelante (sección 4.4).

A partir de los ensayos de inhibición en ELISA utilizando los nanobodies seleccionados se pudieron extraer las siguientes conclusiones: 1) ninguno de los dos nanobodies específicos para PD-1 humano fue capaz de inhibir la unión hPD-1/hPD-L1, 2) el nanobody C11, con reactividad por PD-1 humano y murino, fue capaz de inhibir la unión PD-1/PD-L1 de ambas especies, 3) los nueve nanobodies específicos para hPD-L1 fueron capaces de inhibir la unión hPD-1/hPD-L1, y 4) dos de los nanobodies específicos para hPD-L1 (clones 6p y 11) también fueron capaces de inhibir la unión PD-1/PD-L1 de las variantes murinas, aunque el nanobody 11 presentó baja capacidad de inhibición.

En la mayor parte de los casos, se observó una mayor capacidad de inhibición de la unión PD-1/PD-L1 por parte de los nanobodies en comparación con los anticuerpos control (según los valores de concentración inhibitoria máxima media obtenidos a partir de las curvas de inhibición). Esto no fue así cuando se comparó el nanobody 6p con el anticuerpo anti-mPD-L1 del CIMA, pues en este caso ambos presentaron capacidades de inhibición similares. Sería interesante poder evaluar la actividad antitumoral del nanobody 6p tras haber demostrado que su capacidad de inhibición de la unión mPD-1/mPD-L1 *in vitro* es similar a la de un anticuerpo monoclonal que posee efecto antitumoral *in vivo*.

Además de la capacidad de inhibición de la unión PD-1/PD-L1, otra característica importante y de gran interés es el valor de afinidad de los nanobodies por sus correspondientes antígenos, la cual puede ser un indicio de la actividad antitumoral *in vivo*. Si bien aún no se han podido evaluar las afinidades de los nanobodies por sus antígenos, está planificado hacerlo próximamente utilizando la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR). Valores de afinidad del orden nM o pM según la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) son consideradas afinidades adecuadas para la mayoría de aplicaciones. En el caso de los nanobodies, es usual el aislamiento de

clones que posean afinidades dentro de este rango, especialmente a partir de llamas inmunizadas con el antígeno repetidas veces, ya que fueron expuestos al exigente proceso de maduración de la afinidad [178]. Los anticuerpos monoclonales que han sido aprobados para su uso en la clínica dirigidos al bloqueo de vías de inhibición de células T presentan valores de  $K_D$  del orden nM: 3,06 nM para nivolumab (anti-PD-1) ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)), 0,4 nM para atezolizumab (anti-PD-L1) [249] y 18,2 nM para ipilimumab (anti-CTLA-4) [250]. El anticuerpo pembrolizumab (anti-PD-1) presenta una afinidad mayor, con una  $K_D$  de 29 pM ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Tras haber identificado dos nanobodies capaces de inhibir la unión mPD-1/mPD-L1 en ELISA, éstos fueron evaluados en el experimento de reactivación de células T de ratón, una primera aproximación para evaluar el efecto de los nanobodies en un contexto biológico. Este experimento fue muy importante especialmente en el caso del nanobody específico para PD-1, para descartar la posibilidad de que presentara actividad agonista (es decir, que fuera capaz de generar señalización a través del receptor PD-1 al unirse a su antígeno, lo que derivaría en el efecto contrario al buscado).

Para evaluar los nanobodies inhibidores de la unión de las variantes humanas se podría realizar el mismo experimento a partir de células T humanas aisladas de PBMCs, sin embargo, durante esta tesis no se contaba con los medios necesarios para llevar este experimento a cabo (reactivos, muestras biológicas y aprobación de protocolo por comité de bioética). Si bien clínicamente sería de mayor interés trabajar con los nanobodies inhibidores de la unión de las variantes humanas de PD-1 y PD-L1, este proyecto se focalizó en el desarrollo preclínico de nanobodies con potencial terapéutico. Además, los dos nanobodies evaluados en esta etapa (C11 y 6p) mostraron reactividad cruzada por las variantes humana y murina de su correspondiente antígeno. En principio, teniendo en cuenta la elevada homología de secuencias entre los ortólogos humanos y murinos de PD-1 y PD-L1 [99,100], se podría asumir que estos nanobodies reconocen un epítipo conservado y que, por lo tanto, la acción biológica será similar en ambas especies. Para poder extrapolar de manera más fiable los datos en ratón al posible tratamiento en humanos, se debería determinar si las afinidades de unión del nanobody a ambas variantes son similares, y también sería interesante comparar los sitios de unión del nanobody a cada variante, para lo cual lo ideal sería la obtención de las estructuras cristalográficas. En este aspecto, existe un interés por parte del grupo del Dr. Almo, el cual ha generado las estructuras cristalográficas de los ectodominios de PD-1 y PD-L1, de realizar una colaboración para la cristalización de los complejos nanobody-PD-1 o PD-L1.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de reactivación de células T de ratón sugieren que los nanobodies C11 y 6p son capaces de restablecer la activación de las células T inhibidas en presencia de mPD-L1, según los niveles de los marcadores de activación evaluados en el sobrenadante de cultivo (IL-2 e IFN- $\gamma$ ). Si bien en las condiciones experimentales utilizadas las diferencias en los niveles de estos marcadores entre los diferentes grupos fueron sutiles, los resultados fueron consistentes

entre los distintos experimentos, y por lo tanto ambos nanobodies fueron considerados buenos candidatos para ser evaluados *in vivo* en un modelo murino tumoral. Además, datos similares fueron reportados con anterioridad en otros trabajos [83,243], en donde los autores se basaron principalmente en los datos de proliferación de las células, a partir de los cuales sí eran capaces de observar diferencias claras entre los grupos. Incluso se han reportado resultados contradictorios en cuanto a que PD-L1 aumentaría la proliferación [82], por lo tanto, es evidente que las condiciones de activación de las células parecen ser claves en este experimento.

Para optimizar los resultados del experimento con células T se podrían evaluar otras estrategias para la activación e inhibición de las células, que se asemejen más a lo que ocurre en el contexto tumoral. Por ejemplo, se podría realizar un co-cultivo de células T con DCs que expresen PD-L1 (lo cual se logra luego de su activación *in vitro* en presencia de citoquinas proinflamatorias) [251], o con células tumorales que expresen PD-L1 [252,253]. A partir de estas estrategias se ha observado una clara disminución de la proliferación de células T y de la secreción de IL-2, que se restablece utilizando anticuerpos inhibidores de la vía PD-1/PD-L1.

### 4.3. Evaluación de la expresión de nanobodies en células eucariotas a partir de los pAAVs generados

Tras haber identificado dos nanobodies prometedores para continuar con las actividades de esta tesis, capaces de inhibir la unión PD-1/PD-L1 *in vitro* y de reactivar a las células T de ratón inhibidas en presencia de mPD-L1, se clonaron sus secuencias en plásmidos que contenían el genoma recombinante de AAV2 (pAAV), cedidos por el CIMA. Se utilizaron cuatro plásmidos con diferentes promotores (EF1 $\alpha$ , CAG, CMV y SFFV), todos fuertes y constitutivos, y que se utilizan ampliamente debido a los buenos niveles de expresión que generan del transgén [254–257].

Se comprobó la correcta expresión de los nanobodies a partir de los pAAVs en dos líneas celulares de mamífero. Esto fue algo novedoso tanto para el grupo del CIMA, que no había trabajado previamente con nanobodies, como para nuestro grupo, que no había expresado nanobodies en otro sistema aparte de *E. coli*. Durante esta etapa se comparó la expresión de los nanobodies a partir de los distintos pAAVs, con el objetivo de identificar las construcciones que generaran mayor nivel de expresión. Obtener plásmidos que generen buenos niveles de expresión es de gran importancia para la terapia génica, donde muchas veces los niveles de expresión son una limitante para lograr eficacia terapéutica. Por lo tanto, es importante verificar los niveles de expresión que se obtienen *in vitro* previo a realizar estudios *in vivo*, aunque estas observaciones no necesariamente reflejan lo que ocurre en animales.

En general, se obtuvieron muy buenos niveles de producción de los nanobodies en ambas líneas celulares utilizadas. A partir de los pAAVs con promotores EF1 $\alpha$ , CAG y

CMV se generaron altos niveles de expresión de los nanobodies (entre 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en la línea BHK), mientras que la construcción conteniendo el promotor SFFV mostró un nivel de expresión marcadamente menor (2-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en la misma línea celular). Se obtuvieron niveles unas 100 veces superiores a los observados por el grupo del CIMA para el anticuerpo convencional anti-mPD-L1 expresado a partir de los mismos pAAVs en BHK, del cual se obtenían alrededor de 100-200 ng/mL (datos no publicados).

Además, se observó una secreción adecuada del nanobody, obteniendo en la mayoría de los casos el 90% del nanobody producido en el sobrenadante. En muchos casos, el cuello de botella en la producción de proteínas recombinantes es su correcta secreción a partir de las células productoras, lo cual constituye un problema difícil de resolver. Afortunadamente, los nanobodies no presentaron este problema en las líneas celulares utilizadas, indicando que los niveles de expresión y secreción *in vivo* también podrían ser muy buenos.

En el caso de las construcciones pAAV-SFFV-nanobody, el porcentaje de células positivas en IF fue muy bajo en comparación con las transfecciones realizadas con el resto de los pAAVs. Se evaluó la eficiencia de transfección a partir de co-transfecciones utilizando los pAAVs codificantes para los nanobodies y un plásmido codificante para GFP bajo el promotor CMV (este último elegido para normalizar las eficiencias de transfección). A partir de estos experimentos se pudo concluir que los bajos niveles de expresión obtenidos utilizando las construcciones con el promotor SFFV no se debían a transfecciones ineficientes sino a un problema a nivel de la expresión a partir de este vector. Contrariamente, el grupo del CIMA había obtenido el mayor nivel de expresión a partir del promotor SFFV al comparar estos cuatro promotores para la expresión del anticuerpo anti-mPD-L1 (datos no publicados). Esta discordancia podría estar relacionada con el pequeño tamaño de la construcción pAAV-SFFV-nanobody generada, ya que, según la experiencia del grupo del CIMA, los niveles de expresión del transgén a partir de un pAAV dependen tanto del promotor como de la interferencia (que puede ser positiva o negativa) de los ITRs con el promotor y/o entre sí. La distancia ITR-ITR o ITR-promotor podría generar interferencias que disminuyen la expresión del transgén.

Mediante las co-transfecciones utilizando los pAAVs-nanobody y pCMV-GFP, se pudo corroborar que la construcción que lleva el promotor SFFV es la que presenta menor expresión, en comparación con las que llevan los promotores CAG y EF1 $\alpha$ . La construcción con el promotor CMV mostró la mayor expresión de los nanobodies *in vitro* tras la normalización. Sin embargo, en este caso, la expresión de GFP según los datos de RT-qPCR resultó menor, lo cual podría reflejar algún tipo de interferencia entre el plásmido GFP y el que lleva el C11, ya que ambos portan el mismo promotor. En esta situación al normalizar los datos con respecto al ARNm de GFP estaríamos sobrevalorando la expresión de C11. De todas maneras, se pudo concluir que tres de los pAAVs (los que poseen los promotores EF1 $\alpha$ , CAG y CMV) generaron muy buenos

niveles de expresión de los nanobodies *in vitro*, mientras que la construcción pAAV-SFFV-nanobody fue descartada para los estudios *in vivo*.

La caracterización de los nanobodies producidos a partir de las células eucariotas transfectadas demostró que: 1) los nanobodies se expresaron en muy buenos niveles a partir de ambas líneas celulares, con un porcentaje de secreción de más del 90% en la mayoría de los casos; 2) los nanobodies fueron capaces de unirse a su antígeno en ELISA, por lo que mantuvieron su reactividad, 3) una fracción del nanobody producido presentó una modificación (posiblemente glicosilación), que aumentó su peso molecular en aproximadamente 1 kDa según el análisis por Western blot, 4) esta modificación no impidió que el nanobody reconociera a su antígeno, según lo observado utilizando la técnica de inmunoprecipitación.

Por lo tanto, los dos nanobodies con potencial terapéutico seleccionados en esta tesis (C11 y 6p) lograron ser correctamente expresados en células eucariotas a partir de los pAAVs generados.

#### 4.4. Evaluación de la eficacia antitumoral del nanobody C11 expresado a partir de AAVs recombinantes

En los experimentos *in vivo* realizados en esta tesis, se trabajó únicamente con el nanobody anti-PD-1 C11 debido a la escasez de tiempo. Se produjeron tres vectores virales recombinantes de AAV8 (con los promotores EF1 $\alpha$ , CAG y CMV) codificantes para el nanobody C11, obteniéndose títulos adecuados para llevar a cabo los experimentos *in vivo* planteados. También se contó con el nanobody recombinante producido en *E. coli*.

Se realizó un primer experimento de expresión a largo plazo de C11 a partir de los rAAV8 administrados sistémicamente, para evaluar los niveles de expresión del nanobody alcanzados y la posibilidad de silenciamiento de la expresión *in vivo*. Durante este experimento se observó que la cinética de expresión del nanobody es lenta a partir de los rAAV8, aumentando los niveles de C11 en suero de forma significativa tras 4 semanas de haberse inoculado los rAAV8. A partir de uno de los vectores (rAAV8-EF1 $\alpha$ -C11) se obtuvieron niveles de expresión bajos de C11 a lo largo de todo el experimento (alrededor de 5 ng/mL). Los vectores rAAV8-CAG-C11 y rAAV8-CMV-C11 generaron mayores niveles de expresión del nanobody, especialmente a partir de la semana 8 (alrededor de 500 y 50 ng/mL respectivamente). Cabe destacar que no se observó una disminución en la expresión de C11 a lo largo del tiempo que pudiera estar relacionada con el silenciamiento de los promotores o el desarrollo de respuestas de anticuerpos contra el nanobody.

El nivel de expresión del anticuerpo convencional anti-mPD-L1 fue evaluado por el grupo del CIMA en ratones inoculados sistémicamente con un rAAV8 codificante para el mismo bajo el promotor EF1 $\alpha$ , observándose también una cinética lenta de expresión. Los

niveles séricos de anticuerpo anti-mPD-L1 en estos animales se mantuvieron bajos hasta la semana 12 (alrededor de 5 ng/mL), tras lo cual aumentaron hasta la semana 25 (alcanzando una concentración de 25 ng/mL). Es posible entonces que los niveles de C11 obtenidos a partir del vector rAAV8-EF1 $\alpha$ -C11 puedan aumentar luego de la semana 12 (de hecho, uno de los ratones presentó un aumento importante de los niveles de C11 en este punto, alcanzando un valor de 70 ng/mL).

Luego de las observaciones realizadas durante el experimento de expresión a largo plazo de C11, se consideró que su lenta cinética de expresión a partir de los rAAV8 *in vivo* podía influir negativamente en la evaluación de la actividad antitumoral del nanobody, especialmente en modelos tumorales de rápido crecimiento. La experiencia del grupo del CIMA con respecto al anticuerpo convencional anti-mPD-L1, expresado en ratones inoculados con un rAAV8-EF1 $\alpha$  codificante para el mismo, es que los bajos niveles obtenidos durante las primeras semanas no son suficientes para observar eficacia terapéutica en el modelo de tumores subcutáneos derivados de la línea MC38. El mismo anticuerpo muestra eficacia terapéutica en dicho modelo tumoral cuando es expresado a partir de otro vector viral derivado del virus del bosque Semliki (SFV), el cual genera una expresión más rápida y elevada del transgén, aunque de forma transitoria (datos no publicados). En nuestro caso, sin embargo, la expresión de C11 a partir de los rAAV8 con promotores CAG y CMV fue mayor que la del anticuerpo convencional anti-mPD-L1 a partir de rAAV8-EF1 $\alpha$ , especialmente si se comparan las concentraciones molares, aunque se desconocía si los niveles alcanzados eran suficientes como para observar actividad antitumoral. Además, también era posible que la administración intratumoral de los rAAV8 fuera capaz de compensar los bajos niveles de expresión del nanobody al permitir la acumulación del mismo en el sitio tumoral.

Para la evaluación de la actividad antitumoral de C11, se utilizó el modelo de tumores subcutáneos empleando la línea celular de adenocarcinoma colorrectal murino MC38, en ratones singénicos de la cepa C57BL/6. Los tumores fueron inducidos en forma subcutánea debido a la facilidad de este modelo, pues tanto la inoculación de las células como el seguimiento del crecimiento de los tumores son tareas sencillas. Lo ideal hubiera sido utilizar un modelo de metástasis hepática de carcinoma colorrectal (utilizando la misma línea celular MC38), debido al tropismo principalmente hepático que presenta el serotipo de AAV utilizado, y al reto terapéutico que revisten los casos de cáncer colorrectal con metástasis hepáticas en humanos. Utilizando este modelo se habría obtenido mayor expresión del nanobody localizada en el área peritumoral, lo cual podría significar una mayor eficacia terapéutica además de ser una aproximación más cercana a la forma de terapia final propuesta originalmente. Sin embargo, dicho modelo es sensiblemente más complejo pues implica la necesidad de realizar cirugías para implantar las células en hígado y para el seguimiento del crecimiento de los tumores, lo cual está asociado a una alta mortalidad de los animales si no se realiza por personal experimentado. Por lo tanto, como primera aproximación para evaluar el potencial

terapéutico del nanobody C11 se decidió utilizar un modelo tumoral sencillo y de fácil seguimiento.

En el primer experimento de tratamiento de tumores establecidos, se administraron los rAAV8 codificantes para C11 por vía sistémica o intratumoral tras 12 días de haber inoculado las células tumorales (cuando los tumores presentaban un tamaño promedio de 5 mm x 5 mm). En este experimento no se pudo observar efecto terapéutico de C11 y tampoco se observaron diferencias (en cuanto a la tasa de crecimiento tumoral) entre los grupos a los cuales se les administró el tratamiento en forma intratumoral o sistémica. Sin embargo, como ya se había previsto, esto podría explicarse teniendo en cuenta la lenta cinética de expresión de C11 a partir de estos vectores, máxime teniendo en cuenta que muchos animales tuvieron que ser sacrificados en un corto período de tiempo (aproximadamente 2 semanas luego de la administración de los tratamientos) debido al rápido crecimiento de los tumores. Estas observaciones son concordantes con las del grupo del CIMA, quienes tampoco observaron beneficio terapéutico en este modelo tumoral a partir del anticuerpo convencional anti-mPD-L1 utilizando el vector rAAV8-EF1 $\alpha$  administrado intratumoralmente.

Sin embargo, más significativo fue el hecho de no observar efecto terapéutico utilizando el nanobody recombinante administrado por vía intraperitoneal. Esto puede deberse a la corta vida media del nanobody en suero, lo cual, como ya se comentó en la introducción, puede significar una desventaja a nivel terapéutico. Sin embargo, luego de haber concluido los experimentos de esta tesis, se publicó un trabajo en el cual se demostró que es posible que un nanobody inhibidor de una vía de co-inhibición presente una actividad antitumoral similar a la del anticuerpo convencional utilizado como control correspondiente [200]. En este caso, el nanobody evaluado era específico para CTLA-4, y el modelo tumoral consistió en tumores subcutáneos derivados de la línea de melanoma B16/BL6, la cual es más inmunogénica y tiende a favorecer el desarrollo de respuestas objetivas a las inmunoterapias. Si bien el cronograma de administración del nanobody fue diferente al nuestro (menor número de dosis pero mayor cantidad de proteína), las cantidades totales de nanobody administrado por ratón fueron similares (400  $\mu$ g vs 350  $\mu$ g en nuestro caso). En los modelos tumorales de rápido crecimiento, es posible que el bloqueo de CTLA-4 sea una estrategia terapéutica más efectiva que el bloqueo de la vía PD-1/PD-L1, puesto que CTLA-4 actúa a nivel del *priming* de las células T y probablemente tenga un rol más importante durante las primeras etapas del desarrollo tumoral. En cambio, la señalización por PD-1 es más importante en un contexto crónico y en células T exhaustas, condiciones que quizás no se logren a corto plazo.

Por lo tanto, la ausencia de eficacia terapéutica del nanobody C11 a partir de los resultados obtenidos no debe tomarse como definitiva. Para evaluar si niveles elevados en suero de C11 podrían conferir protección frente al desarrollo tumoral, se inocularon células MC38 en los animales con niveles elevados de C11 en suero (tras 13 semanas de haberse administrado los rAAV8 por vía sistémica). A pesar de que el número de

animales utilizado en este experimento fue pequeño, se observó menor desarrollo de tumores en los ratones que expresaban C11 en comparación con los animales control que no recibieron tratamiento (60% vs 100% del total de ratones en cada grupo desarrollaron tumor). También se observó un crecimiento menos agresivo de los tumores en los ratones que expresaban C11 con respecto a los animales sin tratar. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el nanobody C11 podría otorgar protección frente al desarrollo de tumores derivados de la línea MC38 cuando se encuentra en niveles elevados y sostenidos en suero.

Cabe destacar que no se observaron efectos adversos evidentes en los animales que expresaron el nanobody C11 a largo plazo, según su comportamiento, peso corporal y aspecto macroscópico del hígado. No se realizaron estudios más exhaustivos al respecto, si bien es información relevante que debería ser evaluada en mayor profundidad en el futuro.

#### 4.5. Perspectivas

La información obtenida a partir de los experimentos *in vivo* durante esta tesis es limitada, aunque fue posible observar efecto de protección del nanobody C11 frente al desarrollo tumoral. Si bien el efecto de protección no es el más interesante a nivel terapéutico, se debe tener en cuenta que los modelos de tumores trasplantables en ratones, como el utilizado en este estudio, presentan un crecimiento muy rápido que no refleja el crecimiento real de los tumores en pacientes. Además, el comportamiento observado con los vectores de AAV8-C11 muestra que quizás podrían ser capaces de inhibir el desarrollo de metástasis una vez que los niveles séricos del nanobody fueran los adecuados. De todas formas, el experimento de protección utilizando ratones con expresión sostenida de C11 debería ser repetido empleando un mayor número de animales para una mayor fiabilidad en el análisis estadístico.

Otra posibilidad para evaluar fácilmente la actividad antitumoral de C11 es utilizar un modelo tumoral que responda mejor al tratamiento de inhibidores de PD-1/PD-L1, por ejemplo, los tumores derivados de la línea de melanoma B16.

En una siguiente etapa, el efecto terapéutico de C11 podría ser evaluado utilizando el modelo de implantación intrahepática de células MC38, como fue propuesto originalmente. La expresión del nanobody en el área peritumoral podría potenciar su efecto terapéutico, aunque los niveles en suero sean bajos.

Otro modelo que sería interesante evaluar es el de carcinogénesis química, a partir de la cual se logran obtener tumores que representan de forma más adecuada los tumores humanos, ya que poseen una tasa de crecimiento más lenta y una mayor heterogeneidad genética. Asimismo, se desarrolla una respuesta inmune antitumoral y un ambiente inmunosupresor más complejo debido a que el desarrollo tumoral se prolonga durante más tiempo. La desventaja de estos modelos es que pueden

requerirse varios meses para que el tumor se desarrolle, y que la heterogeneidad entre los tumores puede generar resultados difíciles de interpretar [258]. Por ejemplo, la 1,2-dimetilhidrazina es utilizada frecuentemente para la inducción de tumores en colon de ratones y ratas [259,260].

Como ya se comentó anteriormente, resta evaluar la seguridad toxicológica del nanobody C11. Al administrar el vector de AAV8 en forma sistémica, éste transduce principalmente el hígado, que será el principal órgano productor del nanobody. Por lo tanto, en estos casos sería interesante evaluar el impacto que se genera en el hígado debido a la expresión del nanobody (ya que el rAAV no genera daño hepático por sí mismo). Para esto se suelen medir los niveles de transaminasas de alanina y aspartato en suero como marcadores de daño hepático, que en este caso podrían indicar la aparición de efectos adversos de origen autoinmune relacionados con la expresión del nanobody. En los casos en donde el vector de AAV se administre por vía intratumoral, se esperaría que el daño en el hígado y otros tejidos distantes fuera despreciable. Además de medir las transaminasas en suero, es interesante evaluar la presencia de inflamación y/o infiltrados de células inmunes en distintos órganos (hígado, colon, pulmón, etc.), que reflejan el desarrollo de autoinmunidad. Para ello se realizan cortes histológicos de estos órganos que son analizados por anatomopatólogos. El peso de los órganos también puede aportar información del grado de infiltración de células inmunes [261].

Por otra parte, el grupo colaborador del CIMA tiene amplia experiencia en el trabajo con el vector viral derivado de SFV, un alfavirus con gran potencial como vector de terapia génica que se caracteriza por generar una expresión transitoria muy elevada del transgén y por inducir la apoptosis de las células infectadas. En el área de la terapia contra el cáncer, la capacidad de inducir apoptosis puede significar una ventaja a nivel terapéutico, sin embargo, debido al amplio tropismo del virus, la administración del vector debe ser a nivel intratumoral [262]. El pico de expresión del transgén ocurre en los días posteriores a la inoculación del vector, lo cual podría conferir una mayor actividad antitumoral para el nanobody C11 en modelos de tumores trasplantables. Sin embargo, también se debe contemplar que la expresión a partir de los vectores de SFV es a corto plazo, a diferencia de los vectores de AAV, lo cual podría ser una desventaja teniendo en cuenta la corta vida media de los nanobodies *in vivo*. De todas maneras, se podría evaluar la posibilidad de administrar ambos vectores en forma combinada, con el fin de controlar el tumor en forma inmediata con el vector de SFV y de prevenir posibles brotes a largo plazo con el vector de AAV.

Durante la pasantía realizada en el CIMA se comenzó a trabajar en esta línea, completándose el clonaje de la secuencia del nanobody C11 a un plásmido de SFV. A partir del mismo se realizó la síntesis *in vitro* del ARN codificante para C11, que fue empleado para transfectar células BHK por electroporación, según protocolos descritos [263]. La expresión de C11 a partir de estas células fue evaluada por IF con un anticuerpo específico para el epítipo de HA, obteniéndose alta proporción de células

positivas. Si bien resta caracterizar el nanobody producido a partir de estas transfecciones, el trabajo realizado es un valioso adelanto para continuar con futuros experimentos.

Cabe destacar que durante los experimentos *in vivo* de esta tesis solamente se pudo evaluar el nanobody anti-PD-1 C11, debido a que el tiempo era una limitante, pero que otra interesante línea de investigación podría desarrollarse utilizando el nanobody anti-PD-L1 6p. De hecho, en el marco del trabajo de Maestría de Sofía Ulloa, una estudiante del laboratorio del CIMA, se subclonó el nanobody 6p en un vector de SFV para ser expresado fusionado a la apolipoproteína A1 (ApoA1) de ratón, el principal componente proteico de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La vida media en suero de la ApoA1 es de 10-12 horas [264], por lo que la fusión del nanobody a esta proteína aumentaría el tiempo que se encuentra en circulación. La ApoA1 se acumula en el hígado [265], por lo que este sistema sería ideal para ser evaluado en un modelo de metástasis hepática. Esta construcción no ha sido evaluada *in vivo*, aunque *in vitro* demostró muy buenos niveles de expresión y secreción de la proteína quimérica nanobody-ApoA1. La fusión a ApoA1 es una de las muchas estrategias que pueden emplearse para aumentar la vida media de los nanobodies en suero, algunas de las cuales fueron mencionadas en la introducción. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el aumento de tamaño debido a la fusión a la ApoA1 puede disminuir la penetrabilidad en el tumor.

Por otro lado, si se lograra demostrar actividad antitumoral del nanobody C11 o 6p en alguno de los modelos tumorales planteados, sería interesante evaluar el efecto que genera el tratamiento a nivel de las células del sistema inmune, en particular de las células T específicas de tumor (cantidad, estado de activación y capacidad citotóxica). Para esto, se suelen utilizar líneas de células tumorales modificadas que expresan antígenos como la ovoalbúmina (OVA). Para evaluar la proporción de células T CD8<sup>+</sup> contra este antígeno, es decir, las células T específicas de tumor, se utiliza un tetrámero comercial de MHC-I cargado con el péptido inmunodominante de OVA (tetrámero H-2Kb SIINFEKL), partiendo de muestras de sangre periférica, bazo, nódulos linfáticos y/o tumor [266]. Para evaluar el estado funcional de las CTLs específicas de tumor, se purifican las células T CD8<sup>+</sup> (a partir de bazo o médula ósea) y se cultivan en presencia de las células tumorales *in vitro*. Luego, se pueden medir los niveles de citoquinas de tipo I en sobrenadante (IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF) o realizar ensayos de ELISPOT para IFN- $\gamma$  [267].

Además de utilizar a los nanobodies como agentes terapéuticos aislados, se podrían desarrollar diversas estrategias para potenciar el efecto antitumoral. Por ejemplo, se podría evaluar el tratamiento combinado utilizando ambos nanobodies (C11 y 6p) expresados a partir de un mismo vector, con un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) entre ellos, pues al ser tan pequeños no superan la capacidad máxima de clonaje de los vectores virales que se utilizan normalmente. También se podría diseñar un biespecífico a partir de ambos nanobodies.

Por otra parte, también se pueden generar nanobodies biparatópicos dirigidos contra el mismo receptor o ligando pero que reconozcan diferentes epítopes. Por ejemplo, se podrían evaluar los nanobodies específicos para hPD-L1 (inhibidores de la unión a hPD-1) aislados durante esta tesis a través de un mapeo de epítopes por SPR, e identificar clones que reconozcan epítopes distintos no solapantes. A partir de ellos se podría construir un biparatópico, el cual, además de adquirir avidéz, podría potenciar el efecto inhibitor obtenido.

Experimentos de combinación de los nanobodies (anti-PD-1 o anti-PD-L1) con otras estrategias terapéuticas también podrían plantearse como posibilidades a futuro. Por ejemplo, se podría combinar el uso de vectores codificantes para C11 con terapias estándar como la quimioterapia, o con otro tipo de inmunoterapias como la administración de citoquinas proinflamatorias (IL-12 o IL-15), vacunas con antígenos tumorales, bloqueo de otros receptores de co-inhibición, entre otras.

El grupo colaborador del CIMA tiene amplia experiencia en el uso de IL-12 como terapia antitumoral. Esta citoquina posee propiedades antitumorales importantes, sin embargo, su administración sistémica genera efectos adversos severos. Por lo tanto, se han desarrollado numerosos vectores de terapia génica para la expresión de la IL-12 de forma local en el tumor, los cuales han demostrado buenos resultados en distintos modelos preclínicos de cáncer [268]. La terapia combinada utilizando un vector de AAV codificante para IL-12 y el bloqueo de PD-1 ha demostrado sinergia en el tratamiento de tumores derivados de las líneas celulares MC38 y B16-OVA [269]. Por otra parte, se ha desarrollado un sistema de control de la expresión de IL-12 basado en la doxiciclina, que permite regular la expresión de la citoquina otorgando al vector una mayor seguridad para su uso en la clínica [235]. Este mismo sistema podría implementarse para la regulación de la expresión del nanobody terapéutico en vectores de AAV, otorgando mayor seguridad en caso de que se desarrollen efectos secundarios de tipo autoinmune relacionados a la expresión sostenida del nanobody.

Como se explicó en la introducción, el microambiente tumoral es complejo y la inmunosupresión se genera a través de numerosas vías de señalización. Se ha observado que la inhibición de una única vía de señalización puede ser compensada aumentando la señalización por otras vías que tengan efectos similares. Por ejemplo, la inhibición de receptores de co-inhibición de células T de forma aislada puede ser compensada aumentando la señalización a través de otros receptores, limitando la eficacia terapéutica [270]. Actualmente existe un amplio consenso científico con respecto a que la combinación de más de una estrategia de inmunoterapia, tanto en forma simultánea como secuencial, puede generar un efecto sinérgico en los tratamientos. En este sentido, está reportado que el bloqueo combinado de PD-1 y de otros receptores de co-inhibición incrementa la eficacia terapéutica en comparación con la monoterapia dirigida al bloqueo de PD-1 en distintos modelos preclínicos y también en algunos ensayos clínicos. Los receptores que han sido más explorados para el bloqueo combinado con el de PD-1 son CTLA-4 [146,167,169,271,272], LAG-3

[170,171,273] o TIM-3 [173–175,274,275]. Por lo tanto, sería muy interesante combinar el tratamiento de los nanobodies inhibidores de PD-1/PD-L1 con nanobodies dirigidos contra otros receptores de co-inhibición. Se podrían generar vectores virales codificantes para ambos como mono-agentes o en forma de biespecíficos.

De forma análoga, la estimulación de receptores de co-estimulación utilizando anticuerpos agonistas en combinación con el bloqueo de receptores de co-inhibición también ha demostrado ser una estrategia válida para potenciar la eficacia terapéutica en distintos modelos preclínicos de cáncer [147,148,151,152]. Por lo tanto, podría ser interesante combinar los nanobodies inhibidores de PD-1/PD-L1 con un nanobody agonista dirigido contra un receptor de co-estimulación como 4-1BB u OX40.

## 4.6. Conclusiones

Durante esta tesis se pudieron cumplir con la mayor parte de los objetivos planteados inicialmente. Los principales resultados obtenidos se resumen a continuación:

1. Se seleccionaron nanobodies específicos para PD-1 y PD-L1, tanto para las variantes humanas como para las murinas.
2. Se identificaron dos nanobodies capaces de inhibir la unión mPD-1/mPD-L1 en ensayos *in vitro*, uno específico para PD-1 y el otro para PD-L1 (ambos con reactividad cruzada por la variante humana y murina).
3. Los nanobodies inhibidores de la vía mPD-1/mPD-L1 se subclonaron en plásmidos que contienen el genoma recombinante de AAV2, y se evaluó la expresión de los mismos en líneas celulares de mamífero a partir de las construcciones generadas.
4. Se produjeron las partículas virales recombinantes de AAV8 codificantes para el nanobody anti-PD-1 C11, inhibidor de la unión PD-1/PD-L1, y se evaluó la expresión del nanobody a lo largo del tiempo en ratones inoculados con las partículas virales por vía sistémica.
5. Se realizaron experimentos preliminares para evaluar la actividad antitumoral del nanobody C11 en un modelo murino de cáncer (tumor subcutáneo derivado de la línea celular MC38), utilizando los vectores de AAV8 codificantes para C11. No se observó efecto terapéutico en el experimento de tratamiento de tumores establecidos, aunque sí se observó protección frente al desarrollo de tumores en el experimento de profilaxis.

Los resultados obtenidos durante esta tesis son de gran interés y podrían tener una aplicación biomédica en un futuro, considerando el éxito de las terapias con anticuerpos inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 para numerosos tipos de cáncer y también el creciente interés en el área de la terapia con nanobodies. En este sentido, la empresa Ablynx, la

principal compañía dedicada al desarrollo de nanobodies para distintas aplicaciones, cuenta con varios nanobodies en distintas etapas de ensayos clínicos, y se espera que durante este año se apruebe el primer tratamiento basado en nanobodies, el caplacizumab, una construcción bivalente de un nanobody dirigido contra un factor de la coagulación para el tratamiento de una enfermedad poco frecuente (púrpura trombocitopénica trombótica adquirida) [276].

Por otra parte, los nanobodies aislados durante esta tesis también podrían ser empleados para otras aplicaciones además de la terapia. Al ser baratos y fáciles de producir, pueden utilizarse en el laboratorio como reactivos para investigación, y también podrían ser evaluados para su uso en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con cáncer, por ejemplo, mediante imagenología con nanobodies anti-PD-L1.

## 5. Referencias bibliográficas

---

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer. 2014(9 April 2014) (2014).
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144(5), 646–674 (2011).
3. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *J. Cell. Biochem.* 101(4), 805–815 (2007).
4. Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, *et al.* Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.* 35, S25–S54 (2015).
5. Okada T, Lopez-Lago M, Giancotti FG. Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 171(2), 361–371 (2005).
6. Curto M, Cole BK, Lallemand D, Liu CH, McClatchey AI. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J. Cell Biol.* 177(5), 893–903 (2007).
7. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 26(9), 1324–1337 (2007).
8. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 140(6), 883–899 (2010).
9. Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6(8), 611–622 (2005).
10. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 86(3), 353–364 (1996).
11. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.* 36(3), 321–331 (2010).
12. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. *Cancer Res.* 70(14), 5649–5669 (2010).
13. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* 15(2), 73–86 (2015).
14. Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem. Soc. Trans.* 44(5), 1499–1505 (2016).
15. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* (80-. ). 331(6024), 1565–1570 (2011).
16. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br. Med. J.* 1(5022), 779–86 (1957).
17. Thomas, Lewis; Ed: Lawrence HS. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. *Pediatrics*. 24(5), 773–773 (1959).
18. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3(11), 991–998 (2002).
19. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 97(1), 192–197 (2001).
20. Dighe a S, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1(6), 447–56 (1994).
21. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, *et al.* Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Immunology*. 95(June), 7556–7561 (1998).
22. van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, *et al.* Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184(5), 1781–90 (1996).
23. Smyth MJ, Thia KY, Street SEA, *et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* 191(4), 661–668 (2000).
24. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J. Exp. Med.* 193(6), 661–670 (2001).
25. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, *et al.* Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med.* 195(2), 161–169 (2002).
26. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, *et al.* IFN $\gamma$ , and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 410(6832), 1107–1111 (2001).
27. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 29, 235–271 (2011).
28. May KF, Jinushi M, Dranoff G. Immunosurveillance: Innate and Adaptive Antitumor Immunity. In: *Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth: Second Edition.* , 101–113 (2013).
29. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315(26), 1650–9 (1986).

30. Schäfer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: An old hypothesis revisited. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(8), 628–638 (2008).
31. Lin W-W, Karin M. A cytokine - mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer. *J. Clin. Invest.* 117(5), 1175–1183 (2007).
32. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* 19(2), 203–208 (2007).
33. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev.* 222(1), 155–161 (2008).
34. Teng MWL, Kershaw MH, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: From Surveillance to Escape. In: *Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth: Second Edition.* , 85–99 (2013).
35. Demaria S. Immune Escape: Immunosuppressive Networks. In: *Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth: Second Edition.* , 149–164 (2013).
36. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 13(18 Pt 1), 5262–70 (2007).
37. Aruga a, Aruga E, Tanigawa K, Bishop DK, Sondak VK, Chang a E. Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. *J. Immunol.* 159(2), 664–673 (1997).
38. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell.* 5(3), 241–251 (2004).
39. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 9(10), 1269–1274 (2003).
40. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 34(1), 539–573 (2016).
41. Terabe M, Berzofsky JA. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16(2), 157–162 (2004).
42. Prieto J, Melero I, Sangro B. Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12(12), 681–700 (2015).
43. Nishimura T, Nakui M, Sato M, et al. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46, Suppl., S52–S61 (2000).
44. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (80- )*. 313(5795), 1960–1964 (2006).
45. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 71(4), 1263–1271 (2011).
46. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J. Immunol.* 167(5), 2972–8 (2001).
47. Lauerová L, Dušek L, Šimíčková M, et al. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma.* 49(3), 159–166 (2002).
48. Barros MHM, Segges P, Vera-Lozada G, Hassan R, Niedobitek G. Macrophage polarization reflects T cell composition of tumor microenvironment in pediatric classical Hodgkin lymphoma and has impact on survival. *PLoS One.* 10(5) (2015).
49. Wilke CM, Kryczek I, Wei S, et al. Th17 cells in cancer: Help or hindrance? *Carcinogenesis.* 32(5), 643–649 (2011).
50. Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: The paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 60(7), 909–918 (2011).
51. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood.* 108(9), 2957–2964 (2006).
52. Álvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.* 11(4), 1467–1473 (2005).
53. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 187(9), 1383–93 (1998).
54. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *J. Exp. Med.* 188(12), 2205–2213 (1998).
55. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12(6), 492–499 (2011).
56. Brito C, Naviliat M, Tiscornia a C, et al. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J. Immunol.* 162, 3356–3366 (1999).
57. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget.* (2017).

58. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, *et al.* Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity*. 27(4), 670–684 (2007).
59. Tsai HF, Hsu PN. Cancer immunotherapy by targeting immune checkpoints: Mechanism of T cell dysfunction in cancer immunity and new therapeutic targets. *J. Biomed. Sci.* 24(1) (2017).
60. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *J. Virol.* 77(8), 4911–4927 (2003).
61. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 439(7077), 682–687 (2006).
62. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* 15(8), 486–499 (2015).
63. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection by multiple inhibitory receptors. *Nat Immunol.* 10(1), 29–37 (2009).
64. Burugu S, Dancsok AR, Nielsen TO. Emerging targets in cancer immunotherapy. *Semin. Cancer Biol.* (2017).
65. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science (80- )*. 348(6230), 56–61 (2015).
66. Grosso JF, Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun.* 13, 5 (2013).
67. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science (80- )*. 270(5238), 985–988 (1995).
68. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 3(5), 541–547 (1995).
69. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science (80- )*. 271(5256), 1734–1736 (1996).
70. Hurwitz a a, Yu TF, Leach DR, Allison JP. CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(17), 10067–10071 (1998).
71. van Elsas A, Hurwitz a a, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied . *J. Exp. Med.* 190(3), 355–366 (1999).
72. Waitz R, Fassò M, Allison JP. CTLA-4 blockade synergizes with cryoablation to mediate tumor rejection. *Oncoimmunology*. 1(4), 544–546 (2012).
73. Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, *et al.* Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Cancer Immunol. Res.* 1(1), 32–42 (2013).
74. Zamarin D, Holmgaard RB, Subudhi SK, *et al.* Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* 6(226) (2014).
75. Yang JC, Hughes M, Kammula U, *et al.* Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J. Immunother.* 30(8), 825–830 (2007).
76. Hodi FS, Butler M, Oble DA, *et al.* Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(8), 3005–3010 (2008).
77. Carthon BC, Wolchok JD, Yuan J, *et al.* Preoperative CTLA-4 blockade: Tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial. *Clin. Cancer Res.* 16(10), 2861–2871 (2010).
78. Van den Eertwegh AJM, Versluis J, Van den Berg HP, *et al.* Combined immunotherapy with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic prostate cancer cells and ipilimumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 13(5), 509–517 (2012).
79. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 363(8), 711–723 (2010).
80. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, *et al.* Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364(26), 2517–2526 (2011).
81. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11(11), 3887–95 (1992).
82. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 5(12), 1365–1369 (1999).
83. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, *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.* 192(7), 1027–1034 (2000).
84. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2(3), 261–268 (2001).
85. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, *et al.* B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory

- properties for T cells. *J. Exp. Med.* 193(7), 839–846 (2001).
86. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 11(2), 141–151 (1999).
  87. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, *et al.* Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science (80- ).* 291(5502), 319–322 (2001).
  88. Keir ME, Liang SC, Guleria I, *et al.* Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 203(4), 883–895 (2006).
  89. Xiao Y, Yu S, Zhu B, *et al.* RGMb is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance. *J. Exp. Med.* 211(5), 943–959 (2014).
  90. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity.* 27(1), 111–122 (2007).
  91. Park JJ, Omiya R, Matsumura Y, *et al.* B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood.* 116(8), 1291–1298 (2010).
  92. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front. Immunol.* 7 (2016).
  93. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26(1), 677–704 (2008).
  94. Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, Husby S, Lillevang ST. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell. Immunol.* 235(2), 109–116 (2005).
  95. Wan B, Nie H, Liu A, *et al.* Aberrant Regulation of Synovial T Cell Activation by Soluble Costimulatory Molecules in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* 177(12), 8844–8850 (2006).
  96. Zhang X, Schwartz JCD, Guo X, *et al.* Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity.* 20(3), 337–347 (2004).
  97. Lázár-Molnár E, Scandiuzzi L, Basu I, *et al.* Structure-guided development of a high-affinity human Programmed Cell Death-1: Implications for tumor immunotherapy. *EBioMedicine.* 17, 30–44 (2017).
  98. Cheng X, Veverka V, Radhakrishnan A, *et al.* Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J. Biol. Chem.* (2013).
  99. Zak KM, Grudnik P, Magiera K, Dömling A, Dubin G, Holak TA. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure.* 25(8), 1163–1174 (2017).
  100. Lin DY -w., Tanaka Y, Iwasaki M, *et al.* The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(8), 3011–3016 (2008).
  101. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, *et al.* Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307(3), 672–677 (2003).
  102. Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, *et al.* PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int. Immunol.* 22(8), 651–660 (2010).
  103. Chen Y, Liu P, Gao F, Cheng H, Qi J, Gao GF. A dimeric structure of PD-L1: Functional units or evolutionary relics? *Protein Cell.* 1(2), 153–160 (2010).
  104. Zak KM, Kitel R, Przetocka S, *et al.* Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure.* 23(12), 2341–2348 (2015).
  105. Zhang F, Wei H, Wang X, *et al.* Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discov.* 3 (2017).
  106. Lazar-Molnar E, Yan Q, Cao E, Ramagopal U, Nathenson SG, Almo SC. Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(30), 10483–10488 (2008).
  107. Velu V, Titanji K, Zhu B, *et al.* Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature.* 458(7235), 206–210 (2009).
  108. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, *et al.* IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* 71(16), 5393–5399 (2011).
  109. Bellucci R, Martin A, Bommarito D, *et al.* Interferon- $\gamma$ -induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Oncimmunology.* 4(6) (2015).
  110. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206(13), 3015–3029 (2009).
  111. Rodig N, Ryan T, Allen JA, *et al.* Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+T cell activation and cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 33(11), 3117–3126 (2003).
  112. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3?? signalosome and downstream signaling to PKC?? *FEBS Lett.* 574(1–3), 37–41 (2004).
  113. Hui E, Cheung J, Zhu J, *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science (80- ).* 355(6332), 1428–1433 (2017).
  114. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* 209(6), 1201–1217 (2012).
  115. Chemnitz JM, Parry R V., Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 Associate with

- Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J. Immunol.* 173(2), 945–954 (2004).
116. Parry R V., Chernnitz JM, Frauwirth KA, *et al.* CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 25(21), 9543–9553 (2005).
  117. Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis VA. Selective effects of PD-1 on Akt and ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci. Signal.* 5(230) (2012).
  118. Karwacz K, Bricogne C, MacDonald D, *et al.* PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8 + T cells. *EMBO Mol. Med.* 3(10), 581–592 (2011).
  119. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* 6 (2015).
  120. Amarnath S, Mangus CW, Wang JCM, *et al.* The PDL1-PD1 Axis Converts Human TH1 Cells into Regulatory T Cells. *Sci. Transl. Med.* 3(111), 111ra120-111ra120 (2011).
  121. Shrimali RK, Janik JE, Abu-Eid R, Mkrtychyan M, Khleif SN. Programmed death-1 & its ligands: promising targets for cancer immunotherapy. *Immunotherapy.* 7(7), 777–792 (2015).
  122. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 114(8), 1537–1544 (2009).
  123. Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. PD-L1. *J. Clin. Pathol.* , jclinpath-2017-204853 (2017).
  124. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, *et al.* Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(52), 20852–20857 (2008).
  125. Green MR, Monti S, Rodig SJ, *et al.* Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood.* 116(17), 3268–3277 (2010).
  126. Taube JM, Anders RA, Young GD, *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci. Transl. Med.* 4(127) (2012).
  127. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, *et al.* Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 66(7), 3381–3385 (2006).
  128. Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med. Oncol.* 28(3), 682–688 (2011).
  129. Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori.* 98(6), 751–755 (2012).
  130. Choueiri TK, Fay AP, Gray KP, *et al.* PD-L1 expression in nonclear-cell renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 25(11), 2178–2184 (2014).
  131. Massi D, Brusa D, Merelli B, *et al.* PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. *Ann. Oncol.* 25(12), 2433–2442 (2014).
  132. Ishii H, Azuma K, Kawahara A, *et al.* Significance of programmed cell death-ligand 1 expression and its association with survival in patients with small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 10(3), 426–30 (2015).
  133. Muenst S, Schaeferli AR, Gao F, *et al.* Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 146(1), 15–24 (2014).
  134. Zhang Y, Wang L, Li Y, *et al.* Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. *Onco Targets Ther.* 7, 567–573 (2014).
  135. Khunger M, Hernandez A V., Pasupuleti V, *et al.* Programmed Cell Death 1 (PD-1) Ligand (PD-L1) Expression in Solid Tumors As a Predictive Biomarker of Benefit From PD-1/PD-L1 Axis Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JCO Precis. Oncol.* (1), 1–15 (2017).
  136. Meng X, Huang Z, Teng F, Xing L, Yu J. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat. Rev.* 41(10), 868–876 (2015).
  137. Blank C, Kuball J, Voelkl S, *et al.* Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int. J. Cancer.* 119(2), 317–327 (2006).
  138. Wong RM, Scotland RR, Lau RL, *et al.* Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int. Immunol.* 19(10), 1223–1234 (2007).
  139. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, *et al.* Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 65(3), 1089–1096 (2005).
  140. Nomi T, Sho M, Akahori T, *et al.* Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 13(7), 2151–2157 (2007).
  141. Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, *et al.* Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect

- in a mouse pancreatic cancer model. *Int. J. Oncol.* 35(4), 741–749 (2009).
142. Zhou Q, Xiao H, Liu Y, *et al.* Blockade of programmed death-1 pathway rescues the effector function of tumor-infiltrating T cells and enhances the antitumor efficacy of lentivector immunization. *J. Immunol.* 185(9), 5082–92 (2010).
  143. Juneja VR, McGuire KA, Manguso RT, *et al.* PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* (2017).
  144. Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int. Immunol.* 17(2), 133–144 (2005).
  145. Tran L, Allen CT, Xiao R, *et al.* Cisplatin Alters Antitumor Immunity and Synergizes with PD-1/PD-L1 Inhibition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunol. Res.* 5(12), 1141–1151 (2017).
  146. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(9), 4275–4280 (2010).
  147. Shindo Y, Yoshimura K, Kuramasu A, *et al.* Combination immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. *Anticancer Res.* 35(1), 129–136 (2015).
  148. Chen S, Lee L-F, Fisher TS, *et al.* Combination of 4-1BB Agonist and PD-1 Antagonist Promotes Antitumor Effector/Memory CD8 T Cells in a Poorly Immunogenic Tumor Model. *Cancer Immunol. Res.* 3(2), 149–160 (2015).
  149. Lu L, Xu X, Zhang B, Zhang R, Ji H, Wang X. Combined PD-1 blockade and G1TR triggering induce a potent antitumor immunity in murine cancer models and synergizes with chemotherapeutic drugs. *J. Transl. Med.* 12(1) (2014).
  150. Villarreal DO, Chin D, Smith MA, Luistro LL, Snyder LA. Combination G1TR targeting/PD-1 blockade with vaccination drives robust antigen-specific antitumor immunity. *Oncotarget.* 8(24), 39117–39130 (2017).
  151. Guo Z, Wang X, Cheng D, Xia Z, Luan M, Zhang S. PD-1 blockade and OX40 triggering synergistically protects against tumor growth in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One.* 9(2) (2014).
  152. Messenheimer DJ, Jensen SM, Afentoulis ME, *et al.* Timing of PD-1 blockade is critical to effective combination immunotherapy with anti-OX40. *Clin. Cancer Res.* 23(20), 6165–6177 (2017).
  153. Robert C, Soria JC, Eggermont AMM. Drug of the year: Programmed Death-1 receptor/Programmed Death-1 Ligand-1 receptor monoclonal antibodies. *Eur. J. Cancer.* 49(14), 2968–2971 (2013).
  154. Hamid O, Robert C, Daud A, *et al.* Safety and Tumor Responses with Pembrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369(2), 134–144 (2013).
  155. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366(26), 2443–2454 (2012).
  156. Robert C, Long G V., Brady B, *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* 372(4), 320–30 (2015).
  157. Friedman CF, Proverbs-Singh TA, Postow MA. Treatment of the Immune-Related Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors. *JAMA Oncol.* (2016).
  158. De Velasco G, Je Y, Bossé D, *et al.* Comprehensive Meta-analysis of Key Immune-Related Adverse Events from CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Inhibitors in Cancer Patients. *Cancer Immunol. Res.* (2017).
  159. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, *et al.* Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): A randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* (2015).
  160. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, *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. *Lancet Oncol.* (2015).
  161. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* (2015).
  162. Herbst RS, Baas P, Kim DW, *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet.* (2016).
  163. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, *et al.* Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* (2016).
  164. Horn L, Spigel DR, Vokes EE, *et al.* Nivolumab versus docetaxel in previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer: Two-year outcomes from two randomized, open-label, phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *J. Clin. Oncol.* (2017).
  165. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, *et al.* First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* (2017).
  166. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 27(4), 451–461 (2015).
  167. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, *et al.* Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369(2), 122–133 (2013).

168. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, *et al.* Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 372(21), 2006–2017 (2015).
169. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, *et al.* Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 373(1), 23–34 (2015).
170. Woo SR, Turnis ME, Goldberg M V., *et al.* Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* 72(4), 917–927 (2012).
171. Huang R-Y, Eppolito C, Lele S, Shrikant P, Matsuzaki J, Odunsi K. LAG3 and PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8+ T cell signaling and dampen antitumor immunity in a murine ovarian cancer model. *Oncotarget.* 6(29), 27359–27377 (2015).
172. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8 + T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med.* 207(10), 2175–2186 (2010).
173. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 207(10), 2187–2194 (2010).
174. Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood.* 117(17), 4501–4510 (2011).
175. Ngiow SF, Von Scheidt B, Akiba H, Yagita H, Teng MWL, Smyth MJ. Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN-g-mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. *Cancer Res.* 71(10), 3540–3551 (2011).
176. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(1), 13–22 (2007).
177. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, *et al.* Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* 198(3), 157–174 (2009).
178. Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* [Internet]. 82(1), 775–797 (2013). Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
179. Liu Y, Huang H. Expression of single-domain antibody in different systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(2), 539–551 (2018).
180. Conrath KE, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S. Camel Single-domain Antibodies as Modular Building Units in Bispecific and Bivalent Antibody Constructs. *J. Biol. Chem.* 276(10), 7346–7350 (2001).
181. Harmsen MM, Van Solt CB, Fijten HPD, Van Setten MC. Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine.* 23(41), 4926–4934 (2005).
182. Coppieters K, Dreier T, Silence K, *et al.* Formatted anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 54(6), 1856–1866 (2006).
183. Roovers RC, Laeremans T, Huang L, *et al.* Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunol. Immunother.* 56(3), 303–317 (2007).
184. Agrawal V, Slivac I, Perret S, *et al.* Stable expression of chimeric heavy chain antibodies in CHO cells. *Methods Mol. Biol.* 911, 287–303 (2012).
185. Nguyen VK, Zou X, Lauwereys M, Brys L, Brüggemann M, Muyldermans S. Heavy-chain only antibodies derived from dromedary are secreted and displayed by mouse B cells. *Immunology.* 109(1), 93–101 (2003).
186. Qasemi M, Behdani M, Shokrgozar MA, Molla-Kazemiha V, Mohseni-Kuchesfahani H, Habibi-Anbouhi M. Construction and expression of an anti-VEGFR2 Nanobody-Fc fusionbody in NS0 host cell. *Protein Expr. Purif.* 123, 19–25 (2016).
187. Vanlandschoot P, Stortelers C, Beirnaert E, *et al.* Nanobodies<sup>®</sup> : New ammunition to battle viruses. *Antiviral Res.* 92(3), 389–407 (2011).
188. Harmsen MM, Van Solt CB, Van Zijderveld-Van Bommel AM, Niewold TA, Van Zijderveld FG. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72(3), 544–551 (2006).
189. Hussack G, Hiramata T, Ding W, MacKenzie R, Tanha J. Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. *PLoS One.* 6(11) (2011).
190. Van Heeke G, Allosery K, De Brabandere V, De Smedt T, Detalle L, de Fougerolles A. Nanobodies<sup>®</sup> as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacol. Ther.* 169, 47–56 (2017).
191. Steeland S, Vandembroucke RE, Libert C. Nanobodies as therapeutics: Big opportunities for small antibodies. *Drug Discov. Today.* 21(7), 1076–1113 (2016).
192. Kijanka M, Dorresteyn B, Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PMP. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine.* 10(1), 161–174 (2015).
193. Chakravarty R, Goel S, Cai W. Nanobody: The “magic bullet” for molecular imaging? *Theranostics.* 4(4), 386–398 (2014).
194. Broos K, Keyaerts M, Lecocq Q, *et al.* Non-invasive assessment of murine PD-L1 levels in

- syngeneic tumor models by nuclear imaging with nanobody tracers. *Oncotarget*. (2017).
195. Tijink BM, Laeremans T, Budde M, *et al*. Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Mol. Cancer Ther.* 7(8), 2288–2297 (2008).
  196. Harmsen MM, van Solt CB, Fijten HPD, *et al*. Passive immunization of guinea pigs with llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease. *Vet. Microbiol.* 120(3–4), 193–206 (2007).
  197. Hu Y, Liu C, Muyldermans S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy. *Front. Immunol.* 8(NOV) (2017).
  198. Roovers RC, Vosjan MJWD, Laeremans T, *et al*. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int. J. Cancer.* 129(8), 2013–2024 (2011).
  199. Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, *et al*. Efficient Cancer Therapy with a Nanobody-Based Conjugate. *Cancer Res.* 64(8), 2853–2857 (2004).
  200. Wan R, Liu A, Hou X, *et al*. Screening and antitumor effect of an anti-CTLA-4 nanobody. *Oncol. Rep.* (39), 511–518 (2017).
  201. Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh Gh. G, *et al*. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer.* 98(3), 456–462 (2002).
  202. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front. Immunol.* 8(NOV) (2017).
  203. Vincke C, Loris R, Saelens D, Martinez-Rodriguez S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J. Biol. Chem.* 284(5), 3273–3284 (2009).
  204. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, *et al*. Caplacizumab reduces the frequency of major thromboembolic events, exacerbations and death in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 15(7), 1448–1452 (2017).
  205. Arbabi-Ghahroudi M. Camelid single-domain antibodies: Historical perspective and future outlook. *Front. Immunol.* 8(NOV) (2017).
  206. Liu W, Song H, Chen Q, *et al*. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol. Immunol.* 96, 37–47 (2018).
  207. Smith GP. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* (80- ). 228(4705), 1315–1317 (1985).
  208. Barbas CF, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 88(18), 7978–7982 (1991). Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.88.18.7978>.
  209. Barbas CF *et al*. Phage Display: a laboratory manual. .
  210. Løset GÅ, Bogen B, Sandlie I. Expanding the versatility of phage display I: Efficient display of peptide-tags on protein VII of the filamentous phage. *PLoS One.* 6(2) (2011).
  211. Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 414(3), 521–526 (1997).
  212. Gupta A, Shrivastava N, Grover P, *et al*. A Novel Helper Phage Enabling Construction of Genome-Scale ORF-Enriched Phage Display Libraries. *PLoS One.* 8(9) (2013).
  213. Hammers CM, Stanley JR. Antibody phage display: Technique and applications. *J. Invest. Dermatol.* 134(2), 1–5 (2014).
  214. Zhao A, Tohidkia MR, Siegel DL, Coukos G, Omid Y. Phage antibody display libraries: A powerful antibody discovery platform for immunotherapy. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36(2), 276–289 (2016).
  215. Rossotti MA. Plataforma para acelerar el descubrimiento de nanobodies contra blancos de interés biomédico y sus aplicaciones [Internet]. (2015). Available from: <http://riqim.fq.edu.uy/archive/files/4ad5a6da4c490acf41c3c074e68b5045.pdf>.
  216. Pearson S, Jia H, Kandachi K. China approves first gene therapy. *Nat. Biotechnol.* 22(1), 3–4 (2004).
  217. Santiago-Ortiz JL, Schaffer D V. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J. Control. Release.* 240, 287–301 (2016).
  218. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7(1), 33–40 (2001).
  219. Lu Y. Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review. *Stem Cells Dev.* 13(1), 133–45 (2004).
  220. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 31(4), 317–334 (2017).
  221. Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(22), 10220–10225 (2010).
  222. Grimm D. Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods.* 28(2), 146–157 (2002).
  223. Gonçalves MAFV. Adeno-associated virus: From defective virus to effective vector. *Virology.* 339(2), 205–215 (2005).
  224. Saraiva J, Nobre RJ, Pereira de Almeida L. Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. *J. Control. Release.* 241, 94–109 (2016).

225. Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol. Ther.* 7(6), 839–850 (2003).
226. Hauck B, Zhao W, High K, Xiao W. Intracellular viral processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adeno-associated virus transduction. *J. Virol.* 78(24), 13678–13686 (2004).
227. Yang J, Zhou W, Zhang Y, Zidon T, Ritchie T, Engelhardt JF. Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J. Virol.* 73(11), 9468–77 (1999).
228. Nakai H, Storm TA, Kay MA. Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J. Virol.* 74(20), 9451–63 (2000).
229. Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA. Extrachromosomal Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes Are Primarily Responsible for Stable Liver Transduction In Vivo. *J. Virol.* 75(15), 6969–6976 (2001).
230. Pañeda A, Vanrell L, Mauleon I, *et al.* Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum. Gene Ther.* (2009).
231. Berraondo P, Crettaz J, Ochoa L, *et al.* Intrahepatic injection of recombinant adeno-associated virus serotype 2 overcomes gender-related differences in liver transduction. *Hum. Gene Ther.* (2006).
232. Zabaleta N, Salas D, Paramo M, *et al.* Improvement of Adeno-Associated Virus-Mediated Liver Transduction Efficacy by Regional Administration in *Macaca fascicularis*. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* (2017).
233. Murillo O, Luqui DM, Gazquez C, *et al.* Long-term metabolic correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy. *J. Hepatol.* (2016).
234. Pignataro D, Sucunza D, Vanrell L, *et al.* Adeno-Associated Viral Vectors Serotype 8 for Cell-Specific Delivery of Therapeutic Genes in the Central Nervous System. *Front. Neuroanat.* (2017).
235. Vanrell L, Di Scala M, Blanco L, *et al.* Development of a liver-specific tet-on inducible system for AAV vectors and its application in the treatment of liver cancer. *Mol. Ther.* (2011).
236. Zhang X, Schwartz J-CD, Almo SC, Nathenson SG. Expression, refolding, purification, molecular characterization, crystallization, and preliminary X-ray analysis of the receptor binding domain of human B7-2. *Protein Expr. Purif.* (2002).
237. Lau J, Cheung J, Navarro A, *et al.* Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nat. Commun.* 8 (2017).
238. Hitoshi N, Ken-ichi Y, Jun-ichi M. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* (1991).
239. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Gene Expr.* (2001).
240. Durocher Y. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* (2002).
241. Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, *et al.* Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* (1999).
242. Dong H, Strome SE, Salomao DR, *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* (2002).
243. Carter LL, Fouser LA, Jussif J, *et al.* PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *Eur. J. Immunol.* (2002).
244. Rossotti M, Tabares S, Alfaya L, Leizagoyen C, Moron G, González-Sapienza G. Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* (2015).
245. Eden T, Menzel S, Wesolowski J, *et al.* A cDNA immunization strategy to generate nanobodies against membrane proteins in native conformation. *Front. Immunol.* 8(JAN) (2018).
246. Veugelen S, Dewilde M, De Strooper B, Chávez-Gutiérrez L. Screening and Characterization Strategies for Nanobodies Targeting Membrane Proteins. In: *Methods in Enzymology.* , 59–97 (2017).
247. Nunes-Silva S, Gangnard S, Vidal M, *et al.* Llama immunization with full-length VAR2CSA generates cross-reactive and inhibitory single-domain antibodies against the DBL1X domain. *Sci. Rep.* 4 (2014).
248. Pardon E, Laeremans T, Triest S, *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* 9(3), 674–693 (2014).
249. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 515(7528), 563–567 (2014).
250. He M, Chai Y, Qi J, *et al.* Remarkably similar CTLA-4 binding properties of therapeutic ipilimumab and tremelimumab antibodies. *Oncotarget* [Internet]. 5(0), 67129–67139 (2017). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/18004>.
251. Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R, *et al.* Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol.* 170(3), 1257–66 (2003).

252. Chen K, Huang HT, Hang WJ, Pan LB, Ma HT. Effects of lung cancer cell-associated B7-H1 on T-cell proliferation in vitro and in vivo. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* (2016).
253. Yang W, Chen PW, Li H, Alizadeh H, Niederkorn JY. PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49(6), 2518–2525 (2008).
254. Doll RF, Crandall JE, Dyer CA, Aucoin JM, Smith FI. Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. *Gene Ther.* 3(5), 437–447 (1996).
255. Qin JY, Zhang L, Clift KL, *et al.* Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One.* 5(5) (2010).
256. Damdindorj L, Karnan S, Ota A, *et al.* A comparative analysis of constitutive promoters located in adeno-associated viral vectors. *PLoS One.* 9(8) (2014).
257. Winiarska M, Nowis D, Firczuk M, *et al.* Selection of an optimal promoter for gene transfer in normal B cells. *Mol. Med. Rep.* 16(3), 3041–3048 (2017).
258. Liu J, Blake SJ, Smyth MJ, Teng MW. Improved mouse models to assess tumour immunity and irAEs after combination cancer immunotherapies. *Clin. Transl. Immunol.* (2014).
259. Thumherr N, Deschner EE, Stonehill EH, Lipkin M. Induction of Adenocarcinomas of the Colon in Mice by Weekly Injections of 1, 2-Dimethylhydrazine. *Cancer Res.* (1973).
260. Femia AM, Caderni G. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Med.* (2008).
261. Liu J, Blake SJ, Harjunpää H, *et al.* Assessing immune-related adverse events of efficacious combination immunotherapies in preclinical models of cancer. *Cancer Res.* (2016).
262. Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2003).
263. Liljeström P, Garoff H. Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* (2001).
264. Tape C, Kisilevsky R. Apolipoprotein A-I and apolipoprotein SAA half-lives during acute inflammation and amyloidogenesis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* (1990).
265. Kim SI, Shin D, Choi TH, *et al.* Systemic and specific delivery of small interfering RNAs to the liver mediated by apolipoprotein A-I. *Mol. Ther.* (2007).
266. Fransen MF, Van Der Sluis TC, Ossendorp F, Arens R, Melief CJM. Controlled local delivery of CTLA-4 blocking antibody induces CD8+T-cell-dependent tumor eradication and decreases risk of toxic side effects. *Clin. Cancer Res.* (2013).
267. Jing W, Gershan JA, Weber J, *et al.* Combined immune checkpoint protein blockade and low dose whole body irradiation as immunotherapy for myeloma. *J. Immunother. Cancer.* (2015).
268. Hernandez-Alcoceba R, Poutou J, Ballesteros-Briones MC, Smerdou C. Gene therapy approaches against cancer using in vivo and ex vivo gene transfer of interleukin-12. *Immunotherapy.* (2016).
269. Quetglas JI, Labiano S, Aznar MA, *et al.* Virotherapy with a Semliki Forest Virus-Based Vector Encoding IL12 Synergizes with PD-1/PD-L1 Blockade. *Cancer Immunol. Res.* (2015).
270. Koyama S, Akbay EA, Li YY, *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat. Commun.* (2016).
271. Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res.* (2013).
272. Beavis PA, Henderson MA, Giuffrida L, *et al.* Dual PD-1 and CTLA-4 checkpoint blockade promotes antitumor immune responses through CD4+Foxp3- cell-mediated modulation of CD103+ dendritic cells. *Cancer Immunol. Res.* [Internet]. (2018). Available from: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/early/2018/07/17/2326-6066.CIR-18-0291.abstract>.
273. Wierz M, Pierson S, Guyonnet L, *et al.* Dual PD1/LAG3 immune checkpoint blockade limits tumor development in a murine model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* (2018).
274. Shayan G, Srivastava R, Li J, Schmitt N, Kane LP, Ferris RL. Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by tim-3 upregulation is mediated by the PI3k-akt pathway in head and neck cancer. *Oncimmunology.* (2017).
275. Kim JE, Patel MA, Mangraviti A, *et al.* Combination therapy with anti-PD-1, anti-TIM-3, and focal radiation results in regression of murine gliomas. *Clin. Cancer Res.* (2017).
276. Sheridan C. Ablynx's nanobody fragments go places antibodies cannot. *Nat. Biotechnol.* (2017).

## Agradecimientos

Esta tesis fue posible gracias al apoyo de muchas personas, que de una manera u otra me regalaron tiempo, enseñanzas y sugerencias. No es un trabajo individual ni mucho menos, y por eso tengo una larga lista de personas a las que quiero aprovechar para agradecer.

En primer lugar, los agradecimientos van para mi tutora Lucía Vanrell, por ponerse al hombro este proyecto, y por siempre estar pendiente de mí, tanto académica como personalmente. Sus enseñanzas van más allá de la ciencia, y me alegro de que hayamos podido trabajar y crecer juntas.

En segundo lugar, quiero agradecer a Cristian Smerdou, quien me dirigió durante mi estancia en Pamplona, dándome la oportunidad de crecer científicamente y aprender muchísimas cosas en esos siete meses. Le agradezco mucho la confianza que depositó en mí, y también que haya estado presente durante la culminación y la escritura de la tesis.

También quiero agradecer a Gualberto González, por haberme permitido trabajar durante estos cuatro años en la Cátedra de Inmunología, tanto en la tesina de Licenciatura como en la tesis de Maestría. Han sido años de puro trabajo y aprendizaje, que disfruté muchísimo y que volvería a hacer.

Les agradezco a todos los integrantes del grupo Inmunoquímica, por hacer el día a día muy llevadero y por siempre hacerse un tiempo para ayudar o discutir ideas, o simplemente para las mil horas de charlas y compañía. A Diego, por su enorme amistad, porque fue juntos que empezamos a trabajar en este proyecto y porque los días de experimentos eternos se hicieron muy cortos. A las chicas del fondo: Nati, Maca, Tri y Ceci, cada una a su manera hicieron los días de trabajo mucho más disfrutables, y les agradezco por siempre estar ahí para hablar (de trabajo o no), por los mil y un consejos, y por dejarme elegir la música de vez en cuando. A Andrés González le agradezco un montón porque siempre se hizo un tiempo para discutir experimentos y resultados, y para dar sus consejos. Gracias a los que me ayudaron en los primeros meses para adaptarme al laboratorio, dedicando su tiempo de forma desinteresada (Martín Rossotti, Sofía Tabáres, Gabriel Lassabe), y también a las chicas nuevas por alegrar el ambiente (Romi y Dani). Y a Clau, parcialmente de nuestra casita, también le agradezco un montón su compañía, su disposición para escuchar y sus consejos.

Tengo que agradecer enormemente al resto de integrantes de la Cátedra de Inmunología, tanto pasados como presentes. Mis agradecimientos son no sólo por recibir ayuda en incontables ocasiones, sino también porque son un grupo de personas muy agradable, y a todos siempre los encontré con un oído dispuesto a escuchar. No

los voy a nombrar porque son muchos y no quiero olvidarme de nadie, pero les agradezco a todos y cada uno de corazón. Estos cuatro años no hubieran sido lo mismo sin todos ustedes. Y a Ceci Fernández un abrazo especial por todo el apoyo durante este último tiempo.

También quiero agradecer al grupo de trabajo en Pamplona, de quienes no sólo aprendí mogollón sino que me sentí muy cómoda trabajando, con la libertad y también la ayuda necesaria. A mi amiga Eva le agradezco eternamente la ayuda en mis primeros pasos en el CIMA, así como las charlas y la compañía siempre. A Cristina también le agradezco muchísimo toda la ayuda que me brindó y las charlas que hicieron el día a día más llevadero. Muchas gracias al resto de las integrantes del despacho (Sofía, María, Nerea), porque cada una a su manera hizo mi estancia en Pamplona más linda. También quiero agradecer al resto del laboratorio por el buen ambiente y por siempre estar dispuestos a dar una mano (Puri, Juan Pablo, Marina, Mónica, Manoli, Celia, Laura, Nick, Leticia).

También quiero agradecer a Gloria González por haberme dado la oportunidad de realizar la pasantía en el CIMA, y a su grupo que me brindó ayuda en varias ocasiones. A Noelia Casares le agradezco por su enorme ayuda con el experimento de células T.

No puedo dejar de agradecer a todo el personal del Parque Lecocq, especialmente a Carmen Leizagoyen, que hicieron posible el desarrollo de este proyecto al estar siempre disponibles para la manipulación de las llamas.

Y porque no sólo se vive de la ciencia, quiero agradecer a esas personas que nada tienen que ver con el desarrollo de la tesis, pero que sin ellos hubiera sido imposible que yo llegara hasta acá. A mis padres y mi familia, por siempre darme para adelante. A Martín, por su apoyo incondicional a cada momento, estando cerca o lejos. A mis amigas, todas ellas, por ser un remedio instantáneo para el bajón y porque sé que siempre están ahí (Bolo, Cami, Contu, Fabi, Flo, Iri, Lucy, Noe, Noel, Pame, Rocío, Romi, Vale y Vicky). Y también a esas personas que conocí en Pamplona y que hicieron mi tiempo allí mucho más agradable (Mayra, Flor, y la hermosa familia de Silvia y Gaby).

Por último, un agradecimiento a las agencias financiadoras que permitieron la realización de esta tesis y la pasantía en Pamplona (CAP, ANII y CSIC).