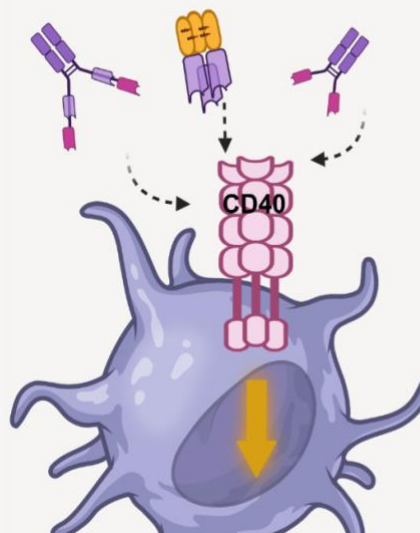


ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA ACTIVIDAD AGONISTA DE ANTICUERPOS MONODOMINIO ANTI-CD40



Avril Toledo

Tesina de grado de la Licenciatura en Bioquímica

Tutor: Gualberto González

Co-Tutora: Carolina Padula

Laboratorio de Inmunología- Facultad de Ciencias y Área Inmunología- Facultad de Química,
UDELAR

20 de noviembre de 2025

1 ÍNDICE

2	<u>AGRADECIMIENTOS</u>	<u>3</u>
3	<u>RESUMEN.....</u>	<u>5</u>
3.1	LISTA DE ABREVIATURAS	6
4	<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>9</u>
4.1	INMUNOTERAPIA: TRANSFORMANDO EL SISTEMA INMUNE EN UNA ARMA CONTRA EL CÁNCER.....	9
4.2	PUNTOS DE CONTROL DE LA INMUNIDAD COMO BLANCOS DE LA INMUNOTERAPIA.....	11
4.3	CD40 COMO UN BLANCO PROMETEDOR EN INMUNOTERAPIA	12
4.4	MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTICUERPOS AGONISTAS DE CD40.....	15
4.5	EL ROL DE LA MULTIVALENCIA: ANTICUERPOS BIPARATÓPICOS	22
4.6	EFFECTOS SECUNDARIOS Y TOXICIDAD DE LA INMUNOTERAPIA CON AGONISTAS DE CD40.....	26
4.7	USO DE NANOBODIES COMO ALTERNATIVA A LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONVENCIONALES 27	
4.8	ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO	32
5	<u>OBJETIVOS</u>	<u>37</u>
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	37
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
6	<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>38</u>
6.1	BUFFERS Y SOLUCIONES	38
6.2	MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS.....	39
6.3	GENERACIÓN DE NANOBODIES TRIMÉRICOS ASOCIADOS A DOMINIO FOLDON.....	40
6.4	PRUEBAS DE EXPRESIÓN DE NANOBODIES TRIMÉRICOS EN SISTEMA PROCARIOTA.....	44
6.5	EXPRESIÓN A GRAN ESCALA Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES ANTI-CD40 FOLDON	46
6.6	OBTENCIÓN DE HUELLA PEPTÍDICA POR MALDI-TOF CON TRIPSINIZACIÓN.....	49
6.7	PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE 4-2B FOLDONCYS EN SISTEMA EUCARIOTA	50
6.8	PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES ASOCIADOS A IGG1 MURINA.....	54
6.9	GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES BIPARATÓPICOS.....	56
6.10	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AGONISTA DE LOS NANOBODIES ANTI-CD40 IN-VITRO	59
6.11	EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ADYUVANTE DE NANOBODIES ANTI-CD40 ASOCIADOS A FOLDON.....	61

7	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	<u>64</u>
7.1	GENERACIÓN DE NANOBODIES TRIMÉRICOS ASOCIADOS A FOLDON	64
7.2	PRUEBAS DE EXPRESIÓN DE 4-2B FOLDON-CYS-FCRN-OT Y 4-2B FOLDON-FCRN EN <i>E. COLI</i>	67
7.3	EXPRESIÓN A GRAN ESCALA Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES ANTI-CD40 FUSIONADOS A FOLDON	69
7.4	PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE 4-2B FOLDONCYS Y 4-2B FOLDONCYS-FCRN-OT EN SISTEMA EUCARIOTA	76
7.5	PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES ASOCIADOS A LA REGIÓN FC DE IGG1 MURINA	81
7.6	GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES BIPARATÓPICOS	83
7.7	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AGONISTA DE LOS NANOBODIES ANTI-CD40 IN-VITRO	87
7.8	EXPLORACIÓN DEL POTENCIAL ADYUVANTE <i>IN VIVO</i> DE LOS NANOBODIES ASOCIADOS A FOLDON	98
8	<u>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u>	<u>103</u>
9	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>106</u>
10	<u>ANEXO</u>	<u>117</u>

2 AGRADECIMIENTOS

A veces hay que detenerse y contemplar todo lo que hemos logrado y hasta dónde hemos llegado, pero como todo camino, uno no lo recorre sola. Y en ese momento, solo me sale agradecer ...

A mis tutores, Gualberto y Carolina, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y acompañarme en este proceso de formación.

A Gualbe, por su claridad, su paciencia y por ser un gran guía. Gracias por confiar en mí, por cada consejo que me ayudó a pensar mejor, a ordenar mis ideas y a crecer como investigadora. A Caro, por todo lo que aprendí a su lado. Gracias por confiar en mí incluso en momentos en los que ni yo lo hacía, por darme libertad para crecer y por enseñarme a no rendirme aun cuando los experimentos salían mal. Tu apoyo, tu calidez y tu enorme capacidad científica hicieron que este camino fuera mucho más especial.

A las evaluadoras, gracias por el tiempo dedicado a la lectura y corrección de este trabajo. Aprecio profundamente su compromiso con la formación de nuevas investigadoras y su aporte constante al desarrollo de la ciencia en nuestro país.

A toda la Cátedra de Inmunología, gracias por hacer este camino más ameno, en un ambiente amable, divertido y estimulante, donde siempre me hicieron sentir parte de una comunidad. Una mención especial para la querida casita del fondo: gracias por recibirme con tanta calidez desde el día uno, por ayudarme aun cuando cada uno tenía sus propios experimentos que atender y por ese compañerismo tan genuino que nos caracteriza. Entre chismes, meriendas, chocolatitos y ensayos, hicieron que venir al laboratorio fuera mucho más llevadero y feliz. Son, de verdad, como una gran familia.

A mis amigas de toda la vida, gracias por estar siempre ahí. Agradezco que la vida nos haya mantenido juntas, creciendo y acompañándonos en cada etapa. Siempre festejando los logros individuales, cerca o lejos, pero siempre juntas. Su presencia constante es un regalo.

A mis compañeros de facultad, quienes hicieron este recorrido mucho más fácil. En especial a Silvi, Vicky, Coti y Juli, gracias por el apoyo en los parciales caóticos, las prácticas eternas, las jornadas de estudio y también por esos momentos de descarga y risas que tanto necesitábamos. Siempre salimos adelante juntas, y sé que confiaron en mi potencial incluso antes que yo misma.

A mis amistades que encontré en Montevideo, que hoy son parte fundamental de mi vida: gracias por estar, por ayudarme a crecer, por bancarme en los días difíciles y por acompañarme a descubrir una vida nueva lejos de casa. Encontrarlas fue, sin duda, uno de los mejores regalos de estos años.

A mi familia, gracias por acompañarme incluso en silencio. Aunque no siempre les contara todo, siempre sentí su presencia, su apoyo, su confianza y su orgullo. Ustedes son mi motor.

A Carmelita y a mis padres, gracias por sostenerme en todos los sentidos. Sé el esfuerzo emocional y económico que implica tener una hija estudiando lejos, pero siempre me dieron la libertad de elegir mi camino, sin condiciones, con amor y con una paciencia infinita. Hicieron que todo esto pareciera fácil. Este logro es tanto mío como de ustedes.

Finalmente, una parte de este agradecimiento va para quienes ya no están: mi tía María y mi abuelo Orli, que siguen presentes dentro de mí todos los días. Estoy segura de que estarían muy orgullosos. Su cariño, su fuerza y sus enseñanzas me acompañan siempre.

Simplemente, gracias.

3 RESUMEN

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y, a pesar de los avances en terapias convencionales, persisten limitaciones asociadas con recurrencia tumoral, resistencia y efectos adversos. En este contexto, la inmunoterapia representa una estrategia prometedora para mejorar los resultados clínicos. Entre las aproximaciones inmunoterapéuticas, los anticuerpos agonistas dirigidos a receptores inmunoestimuladores han mostrado un gran potencial terapéutico. Un blanco relevante es CD40, un receptor transmembrana de la familia TNFRSF, expresado principalmente en células presentadoras de antígeno (APCs). La activación de CD40 mediante anticuerpos agonistas estimula robustamente a las APCs, potenciando respuestas de células T citotóxicas y B, y transformando tumores “fríos” en “calientes”.

La mayoría de los anticuerpos anti-CD40 utilizados son IgG enteras convencionales, que dependen de la unión a FcγRIIB para el entrecruzamiento del receptor y, por lo tanto, para su actividad. Nuestro grupo ha seleccionado anticuerpos monodominio (nanobodies (Nb)) derivados de *Lama glama*, que reconocen el receptor CD40 de ratón. Dado que se asumió que los formatos monovalentes no presentarían actividad agonista, se generaron constructos multivalentes trimerizados mediante el dominio foldon de la fibrina del fago T4 (Nb-foldon) o bivalentes fusionados a la región Fc de la IgG1 murina (Nb-m1Fc). Estudios iniciales mostraron que los Nb-foldon eran activos únicamente *in vitro*, probablemente debido a su baja estabilidad y corta vida media, mientras que Nb-m1Fc demostraron eficacia tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque con margen de optimización para reducir las dosis requeridas.

En este trabajo se introdujeron modificaciones en ambos constructos para mejorar su desempeño. En el caso de los Nb-foldon se buscó estabilizar el trímero incorporando residuos de cisteína que dieran lugar a enlaces covalentes entre cadenas, junto con la adición de un péptido terminal con afinidad por el receptor neonatal. Se optimizó la producción de estas construcciones en células HEK293 constatándose la formación de trímeros covalentes, aunque en forma minoritaria. Los análisis funcionales demostraron una mayor actividad *in vitro* respecto al trímero no covalente y, al evaluar su uso como adyuvantes en experimentos de inmunización *in vivo* con un antígeno modelo, se observó un indicio de cambio de clase de inmunoglobulinas, aunque sin evidencia de una respuesta T específica.

En el caso de los Nb-m1Fc se generaron nanobodies que reconocen diferentes epítopes asociados a IgG1 murina, 4-2B, 1-2B y D9m1Fc, siendo el clon 1-2B el que exhibió una mejor actividad agonista *in vitro*. Contemplando antecedentes donde el aumento de la valencia juega un rol importante en el agonismo de CD40, se generaron versiones de anticuerpos multivalentes, entre ellas versiones biparatópicas que combinan Nbs que reconocen diferentes epítopes en fusión con

la región Fc de IgG1 murina, así como una versión con un Fc silenciado. Adicionalmente, se generó un anticuerpo tetravalente monoparatópico basado en el clon 1-2B.

Los estudios *in vitro* indicaron que el aumento de la valencia potencia la activación del receptor, aunque la configuración geométrica y la orientación de los epítopes parecen desempeñar un papel determinante. El constructo tetravalente monoespecífico mostró mayor actividad que el biparatópico, sugiriendo que la organización espacial de los sitios de unión puede ser clave para optimizar el agonismo. Además, el anticuerpo con un Fc silencioso conservó actividad independiente de Fc, evidenciando que la multivalencia por sí sola puede inducir el entrecruzamiento del receptor.

Estos resultados demuestran que la ingeniería de anticuerpos para nanobodies agonistas de CD40 permite optimizar su actividad funcional y ampliar las aplicaciones de la inmunoterapia basada en receptores coestimuladores, tanto como adyuvantes en vacunas como en terapias oncológicas.

3.1 LISTA DE ABREVIATURAS

AAT: Antígeno asociado a tumor

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)

APC: Célula presentadora de antígeno (Antigen Presenting Cell)

BLI: Interferometría de biocapa (Biolayer Interferometry)

bpAb: Anticuerpo biparatópico (Biparatopic Antibody)

CAR: Receptor quimérico de antígeno (Chimeric Antigen Receptor)

CD: Clúster de diferenciación (Cluster of Differentiation)

CDR: Región determinante de complementariedad (Complementarity Determining Region)

CL: Región constante de la cadena liviana (Constant Light chain)

CRD: Dominio rico en cisteínas (Cysteine-Rich Domain)

CTL: Linfocito T citotóxico (Cytotoxic T Lymphocyte)

DC: Célula dendrítica (Dendritic Cell)

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Fab: fragmento de unión al antígeno (fragment antigen-binding)

Fc: Fragmento cristizable de inmunoglobulina

FcγR: Receptor Fc gamma (Fc gamma Receptor)

FcγRIIB: Receptor Fc gamma RIIB (inhibidor)

FcRn: Receptor neonatal de Fc (Neonatal Fc Receptor)

FR: Región marco (Framework Region)

h1Fc: Región Fc humana (human Fc)

HcAb: Anticuerpo de cadena pesada únicamente (Heavy-Chain Only Antibody)

IgG: Inmunoglobulina G

IL: Interleucina

INF- γ (IFN- γ): Interferón gamma

ITAM: Motivo de activación del receptor inmunitario dependiente de tirosina (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif)

ITIM: Motivo inhibidor del receptor inmunitario dependiente de tirosina (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)

LALA: Mutación en Fc de IgG1 (L234A/L235A) que reduce afinidad por Fc γ Rs

MALDI-TOF: Espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight)

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno (Mitogen-Activated Protein Kinase)

mAb: Anticuerpo monoclonal (Monoclonal Antibody)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)

MHC-I: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

Nb: Nanobody

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras de células B activadas (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

OTI / OTII: Péptidos inmunodominantes de ovoalbúmina para MHC-I y MHC-II, respectivamente

OVA: Ovoalbúmina

PBS: Solución salina tamponada con fosfatos (Phosphate-Buffered Saline)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SPR: Resonancia de plasmones superficiales (Surface Plasmon Resonance)

STAT5: Transductor de señal y activador de transcripción 5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5)

AAT: Antígeno asociado a tumor

TAM: Macrófago asociado a tumor (Tumor-Associated Macrophage)

TCR: Receptor de células T (T Cell Receptor)

Th: Linfocito T colaborador (T helper)

Th1: Subtipo de linfocito T colaborador tipo 1

TNFRSF: Superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily)

TNFSF: Superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor Superfamily)

TRAF: Proteína asociada a receptor del factor de necrosis tumoral (TNF Receptor Associated Factor)

VH: Región variable de la cadena pesada (Variable Heavy chain)

VHH: Región variable de anticuerpo de cadena pesada de camélido

VL: Región variable de la cadena liviana (Variable Light chain)

4 INTRODUCCIÓN

4.1 INMUNOTERAPIA: TRANSFORMANDO EL SISTEMA INMUNE EN UNA ARMA CONTRA EL CÁNCER

Cada año, millones de personas reciben un diagnóstico de cáncer, lo que convierte a esta enfermedad en una de las principales preocupaciones de los sistemas de salud a nivel mundial, con más de 9,6 millones de muertes anuales. Las terapias convencionales, como la radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia, han demostrado ser efectivas en muchos casos; sin embargo, presentan limitaciones significativas, incluyendo efectos secundarios severos, el desarrollo de resistencia durante el tratamiento y una alta tasa de recurrencia del cáncer (1).

En las últimas décadas, la inmunoterapia ha evolucionado rápidamente hasta convertirse en uno de los pilares fundamentales en la lucha contra el cáncer. Este enfoque terapéutico busca estimular el sistema inmune para que ataque específicamente al tumor y representa una promesa significativa para superar las limitaciones de los tratamientos convencionales (1). Entre los componentes de la inmunidad antitumoral, se destacan los linfocitos T CD8⁺ por su capacidad de reconocer y eliminar células tumorales en forma específica de antígeno. Este proceso está mediado por la interacción específica de su receptor T (TCR) con complejos de péptidos derivados de antígenos asociados a tumores (AATs) unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I, por sus siglas en inglés) (2). El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) está formado por glicoproteínas que se expresan en la superficie celular y cuya función es presentar péptidos derivados de proteínas intracelulares o extracelulares a los linfocitos T. Existen dos clases principales: MHC-I, presente en prácticamente todas las células nucleadas y encargado de presentar péptidos a linfocitos T CD8⁺; y MHC-II, que se expresa principalmente en células presentadoras de antígenos (como las células dendríticas (DC, por su sigla en inglés), células B, y macrófagos y presenta péptidos a linfocitos T CD4⁺ (3). Los AATs aparecen por la expresión anómala de proteínas por las células tumorales, ya sea por mutaciones, sobreexpresión o reexpresión de proteínas propias que normalmente están ausentes en la etapa adulta o en niveles bajos en tejidos normales. La presentación de estos péptidos en MHC-I permite al sistema inmune distinguir a las células tumorales de las células normales (4).

El reconocimiento específico de los AATs por parte del TCR de los linfocitos T CD8⁺ constituye la llamada “primera señal” de activación. Sin embargo, este reconocimiento no es suficiente por sí solo para activar plenamente a las células T: para esto se requiere un proceso de activación inicial o *priming*, que tiene lugar en los órganos linfoides secundarios y que implica señales adicionales (3).

Las células dendríticas son los otros protagonistas involucrados en esta instancia de *priming*. Actúan como un puente entre la inmunidad innata y adaptativa, estando a cargo de la presentación en sus moléculas de MHC de fragmentos peptídicos derivados de proteínas (antígenos) según su ubicación intracelular. Esto es, presentación en el MHC I para péptidos de origen citosólico, o en el MHC II cuando el origen es vesicular. Estas células, tienen además la capacidad de realizar el proceso de presentación cruzada. Este es un mecanismo esencial en el contexto tumoral, mediante el cual las DC pueden presentar antígenos exógenos, captados del exterior de la célula, a través de MHC-I, lo que permite la activación de linfocitos T CD8⁺ (5). Existen dos rutas principales de presentación cruzada. En la vía vacuolar el procesamiento del antígeno y su carga en moléculas de MHC-I ocurren dentro del compartimento endo/lisosomal. Tras su internalización, los antígenos son degradados por proteasas lisosomales, como la cathepsina S, y los péptidos generados se cargan directamente sobre MHC-I en dicho compartimento (6). La segunda vía, llamada endosoma a citosol, se basa en que los antígenos internalizados son transportados desde el compartimento endosomal hacia el citosol, donde son degradados por el proteasoma. Los péptidos resultantes son luego transportados por TAP (*transporter associated with antigen processing*) hacia el retículo endoplásmico o de regreso a endosomas que contienen MHC-I, donde ocurre la carga del péptido (6).

No obstante, la presentación cruzada de antígenos en MHC-I no es suficiente para inducir el fenotipo efector de los linfocitos T CD8⁺. Para su activación completa y diferenciación en linfocitos T citotóxicos (CTLs) se requieren señales coestimuladoras (CD80/CD86–CD28) y un ambiente de citoquinas proinflamatorias, como IL-12 e IFN- α/β . Además, la colaboración de linfocitos T CD4⁺ Th1 es clave, ya que mediante la secreción de IL-2 e IFN- γ “licencian” a las células dendríticas, potenciando su capacidad para activar CTLs (3).

En una primera instancia, las DC interactúan con linfocitos T CD4⁺ específicos del mismo antígeno presentado en MHC-II. El reconocimiento del complejo MHC-II–péptido por el TCR de la célula T CD4⁺ desencadena su activación en un proceso conocido como licenciamiento cognato (7). Aquí es donde entra en juego el eje CD40–CD40L (**Figura 1**), que induce la maduración funcional de la DC la cual se traduce en una mayor expresión de moléculas coestimuladoras, así como en la producción de citoquinas como IL-12 e IFN- α/β que no solo promueve una respuesta T CD8⁺ efectiva, sino que además induce la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia el subtipo Th1, clave para una respuesta inmune celular eficaz contra tumores (8,9).

Como se mencionó durante este licenciamiento las DC maduras comienzan a expresar los ligandos CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) para el receptor CD28 (expresado en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺) donde se establece una unión coestimuladora (10). Esta señalización CD28/CD80–CD86 proporciona lo que se denomina la “segunda señal” en el proceso de activación de linfocitos T,

siendo la primera, como se mencionó, el reconocimiento específico del antígeno presentado en el complejo MHC por el TCR de la célula T. Esta interacción es indispensable para que las células desarrollen el proceso de activación, expansión clonal y diferenciación funcional. Sin embargo, esta segunda señal no es suficiente si la célula dendrítica no se encuentra adecuadamente activada. En conjunto, el licenciamiento de las células dendríticas y el *priming* de los linfocitos T CD8⁺ requieren la integración coordinada de señales coestimuladoras como CD40–CD40L y CD28/CD80–CD86, que aseguran una activación efectiva y controlada de la respuesta inmune adaptativa.

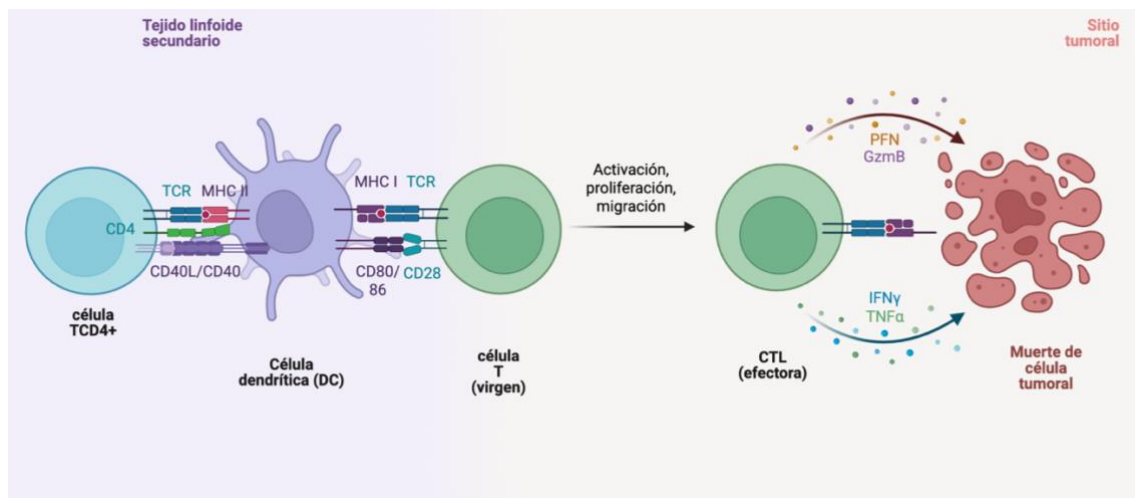


Figura 1. Licenciamiento de DCs por T colaboradoras y activación de linfocitos T CD8. Las células dendríticas (DCs) interactúan con linfocitos T CD4⁺ mediante péptidos presentados en MHC clase II reconocidos por el TCR y a través de interacciones CD40-CD40L. Esto permite la activación de DCs y expresión de moléculas coestimuladoras que provoca la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) por presentación cruzada de antígenos. Los CTL activados migran al sitio tumoral, donde reconocen péptidos derivados del tumor presentados en MHC clase I en la superficie de las células tumorales, induciendo su eliminación y contribuyendo al desarrollo de una respuesta antitumoral efectiva.

Una vez activados los linfocitos T CD8⁺ efectores migran al tumor (**Figura 1**) donde utilizan dos mecanismos para atacar a las células tumorales: la exocitosis de gránulos citotóxicos (que contienen granzimas A y B) y la vía apoptótica mediada por el Fas ligando (FasL). Además, secretan citoquinas como IFN-γ y TNF-α que modulan el microambiente tumoral y potencian la respuesta inmunitaria (2).

4.2 PUNTOS DE CONTROL DE LA INMUNIDAD COMO BLANCOS DE LA INMUNOTERAPIA

En el caso de los tumores sólidos los avances más sustanciales en inmunoterapia están relacionados con terapias que tienen como objetivo el bloqueo de los puntos de control inmunológicos, principalmente PD-1/PDL-1 y CTLA-4, los cuales regulan la función inmune en

el microambiente tumoral (11). CTLA-4 es un receptor homólogo a CD28, pero con mayor afinidad por los ligandos CD80 y CD86. A diferencia de CD28, la unión de CTLA-4 no estimula la célula T, sino que bloquea la señal coestimuladora necesaria para su activación, favoreciendo un estado de anergia. Por otro lado, PD-1 es un receptor inhibidor que, al unirse a sus ligandos PD-L1 o PD-L2, disminuye la proliferación y función de las células T, bloqueando la señal del receptor TCR. La expresión de PD-1 caracteriza a las células T “agotadas” tras estimulación crónica, como ocurre en tumores, lo que limita la respuesta (12). Por lo tanto, estos puntos de control actúan como “frenos” naturales del sistema inmune para evitar respuestas excesivas, pero las células tumorales aprovechan estas vías para inhibir la actividad de los linfocitos T, induciendo un estado de agotamiento funcional que disminuye su capacidad citotóxica y proliferativa de los mismos (13). Los anticuerpos monoclonales que bloquean estos receptores han revolucionado la inmunoterapia, pero su eficacia se correlaciona directamente con la presencia de células T en el tumor. En los tumores denominados “fríos”, esta infiltración de células T se ve reducida, lo que limita la formación de poblaciones de memoria contribuyendo a su evasión del sistema inmunológico y, por lo tanto, una capacidad limitada para activar una respuesta antitumoral (14).

La activación fisiológica de CD40 en las DCs por las células T CD4⁺ que expresan CD40L ocurre normalmente en el ganglio linfático y es esencial para la activación de linfocitos T CD8⁺ (15,16). Sin embargo, en el microambiente tumoral este mecanismo fisiológico se ve limitado debido a la baja presencia de células T CD4⁺ activas y al carácter inmunosupresor del entorno, que restringe la maduración de las células dendríticas. En este contexto, la activación exógena de CD40 mediante agonistas se propone como una estrategia capaz de restaurar la presentación antigénica y potenciar la infiltración y expansión de linfocitos T citotóxicos, actuando como un “adyuvante molecular” que sustituye la estimulación fisiológica ausente (11).

4.3 CD40 COMO UN BLANCO PROMETEDOR EN INMUNOTERAPIA

CD40 (*Cluster of Differentiation 40*) es una proteína transmembrana de 48 kDa, que forma parte de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) (17). Se expresa en la superficie de células presentadoras de antígenos (APCs) y algunas otras células ajenas al sistema inmunológico (18). CD40 actúa como un receptor coestimulador, y su ligando, CD40L (CD154), es una proteína transmembrana de 39 kDa (17) que se presenta en forma de trímero en la superficie de linfocitos T CD4⁺ activados. La interacción entre CD40 y CD40L desempeña un papel crucial al conectar la inmunidad innata y adaptativa.

Los receptores de la familia TNFRSF tienen funciones conservadas y su activación es similar requiriendo un agrupamiento tridimensional y formación de trímeros para llevar a cabo su señalización. Los ligandos, como CD40L, se encuentran en forma de unidades trivalentes funcionales con tres sitios de unión al receptor. Sin embargo, los receptores CD40 en su estado

natural se presentan como unidades individuales, por ende, requieren de la unión de este ligando homo-trimérico para su agrupamiento (17).

La señalización se induce por el reclutamiento de *TNF receptor associated factors* (TRAFs, por sus siglas en inglés), estas proteínas contienen un dominio carboxilo conservado (Dominio TRAF) que con la interacción CD40-CD40L se une a un motivo aminoacídico en el dominio citoplasmático de CD40 induciendo vías de señalización intracelular como NFκB, MAPKs, PI3K y PLCγ (10). Además, la quinasa de la familia Janus 3 (JAK3) puede unirse a la membrana citoplasmática proximal de CD40 e inducir la fosforilación de STAT5, generando así una señalización independiente de TRAFs (**Figura 2**).

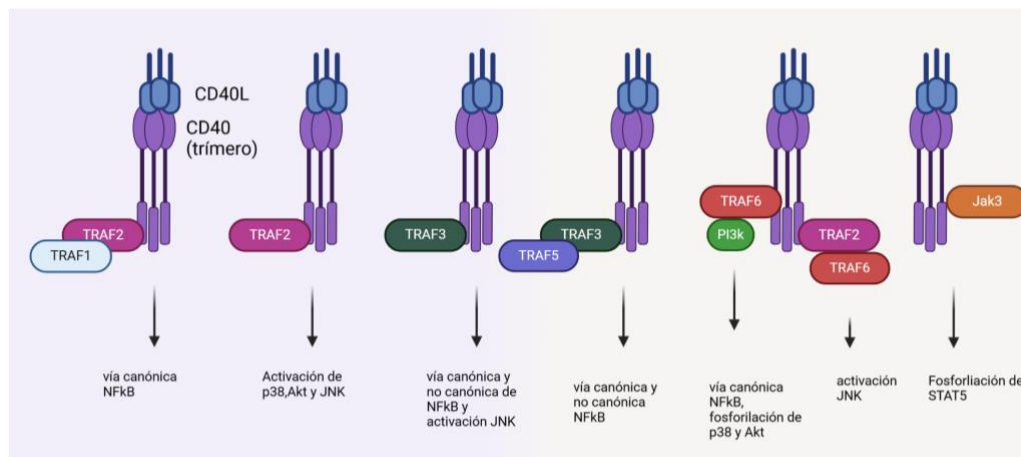


Figura 2. Señalización de CD40 dependiente e independiente de las proteínas del factor asociado al receptor de necrosis tumoral (TRAF). Tras la activación de CD40, las proteínas TRAF 1, 2, 3, 5 y 6 así como Jak3 son reclutadas a la cola citoplasmática de CD40, activando diferentes vías de señalización regulando distintos procesos celulares e inmunológico. Adaptado de **Elgueta et al. 2009**.

En el contexto del cáncer, CD40 tiene un rol diferencial en las distintas células del sistema inmune, que juntas ayudan a combatir a las células tumorales.

Como se mencionó anteriormente, esta molécula es fundamental para el “*DC licensing*”, el cual permite a las células dendríticas activar eficazmente a los linfocitos T vírgenes, incluyendo las células T citotóxicas (CTLs), responsables de atacar a las células tumorales. La estimulación de CD40 por su ligando (Figura 3) incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras CD86/CD80, regula positivamente la expresión de MHC y aumenta la secreción de IL-12 fundamental para la respuesta Th1 (18). CD40 además promueve la supervivencia de las DCs por la expresión de moléculas anti apoptóticas y es capaz de inducir la expresión de otros ligandos pertenecientes a la familia TNFSF como CD70, OX40L, y 4-1BBL que sustentan la expansión y diferenciación en células T de memoria (11).

Adicionalmente, las células B activadas por CD40 en el tumor son capaces de presentar antígenos y activar células T en un proceso dependiente de MHC-II, mejorando así las respuestas T

antitumorales (19). Otro punto interesante de la señalización a través de CD40 es el cambio fenotípico de macrófagos M2 (activación alternativa) a M1 que promueve una respuesta anti-tumorigénica, siendo este cambio especialmente relevante en los macrófagos asociados a tumores (TAM) (19).

La señalización de CD40 en células mieloides del microambiente tumoral, como células dendríticas y macrófagos, cumple un papel clave en la remodelación inmunológica del tumor. Tanto las DCs como los macrófagos activados por CD40 son además una fuente importante de quimioquinas como CXCL9, CXCL10 y CCL5, las cuales promueven el reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ y células NK al tumor, amplificando la respuesta inmunitaria local y contrarrestando el fenotipo “frío” característico de muchos tumores sólidos (20,21).

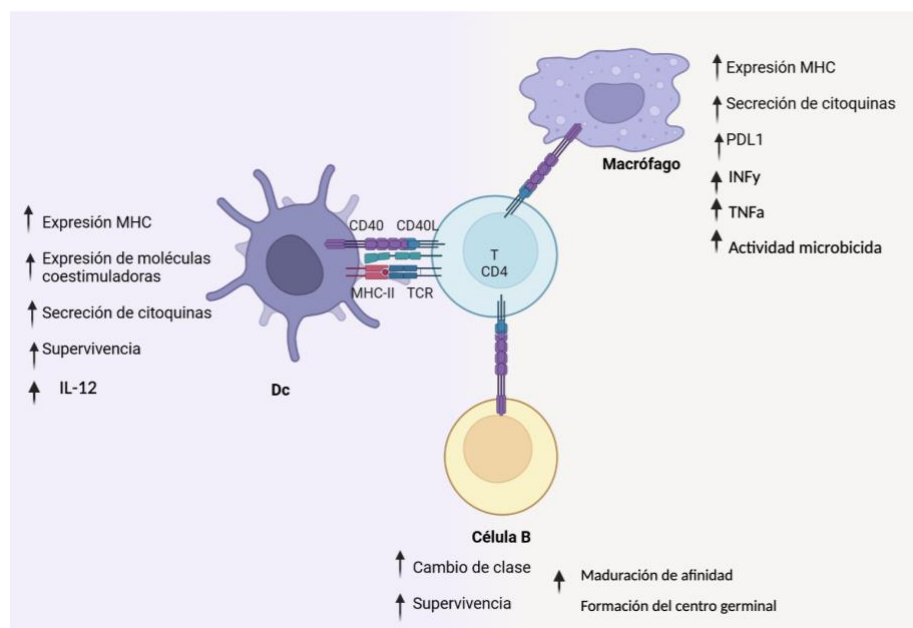


Figura 3. Interacciones de CD40 en el sistema inmune. Se observa la expresión de CD40 en células B, células dendríticas y macrófagos, y de CD40L en linfocitos T CD4⁺, así como sus interacciones. En células B, la señalización a través de CD40 induce activación, proliferación, diferenciación y cambio de clase de inmunoglobulinas. En células dendríticas, la activación de CD40 promueve la maduración, el aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras y de MHC, y la producción de citoquinas proinflamatorias, potenciando la activación de linfocitos T. En macrófagos, la interacción CD40–CD40L induce activación funcional, aumento de la capacidad fagocítica y producción de mediadores inflamatorios, contribuyendo a la respuesta inmune adaptativa.

Por estas razones CD40 emerge como un blanco interesante para aumentar el número y la calidad de células T infiltrantes del tumor (TILs) y anticuerpos producidos por las células B, por ende, una mayor efectividad en la respuesta ya sea como monoterapia, como adyuvante de vacunas o en combinación con anticuerpos bloqueantes de puntos de control.

4.4 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTICUERPOS AGONISTAS DE CD40

Los anticuerpos agonistas están diseñados para imitar en cierta forma a CD40L y promover mediante el entrecruzamiento del receptor la maduración y activación funcional de las DC, aumentando su capacidad de presentación antigénica, incluso de forma independiente a la ayuda proporcionada por los linfocitos T CD4⁺. (18).

Como monoterapia, el anticuerpo agonista anti-CD40 de ratón FGK45 demostró en modelo de linfoma murinos la capacidad de inducir una respuesta antitumoral potente incluso en ausencia de cooperación de linfocitos T CD4⁺, evidenciando que la activación de CD40 puede, por sí sola, movilizar respuestas citotóxicas efectivas (22). Este anticuerpo es ampliamente distribuido comercialmente y utilizado en modelos en combinación con otro tipo de terapias.

En modelos murinos, la activación de las DC mediante anticuerpos agonistas anti-CD40 ha demostrado un marcado potencial como estrategia vacunal. Un ejemplo particularmente eficaz es el direccionamiento antigénico a DC CD8 α^+ a través del receptor lectina DNNGR-1 (CLEC9-A), donde un anticuerpo específico para este receptor, administrado junto con un agonista de CD40 como adyuvante, indujo respuestas CTL robustas capaces de erradicar tumores trasplantables (23).

De forma complementaria, diversos estudios preclínicos han demostrado que el agonismo de CD40 puede potenciar de forma marcada la eficacia de los inhibidores de puntos de control inmunológico (24). En el modelo MC38 de cáncer colorrectal, la terapia con anti-CD40 indujo la expresión de PD-L1 en células mieloides intratumorales, generando resistencia adaptativa, pero su combinación con anti-PD-L1 mostró una sinergia terapéutica, logrando el rechazo tumoral en >50% de los animales, frente a menos de 5% con cada monoterapia (25). Del mismo modo, en tumores inicialmente “fríos” se observó que la combinación de un AcMo agonista de CD40 en combinación con un antagonista de PD-1 reprogramó el microambiente tumoral y habilitó una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T, ausente en tratamiento como monoterapia individual (26).

Estos hallazgos preclínicos alentaron el desarrollo de varios anticuerpos agonistas de CD40 humano evaluados en estudios clínicos tempranos. Entre ellos, selicrelumab, un IgG2 agonista, demostró en un estudio neoadyuvante en cáncer de páncreas resecable una profunda remodelación del microambiente tumoral, aumentando la infiltración de linfocitos T, activando células presentadoras de antígeno y reduciendo poblaciones inmunosupresoras (27).

De forma similar, otros agonistas fueron evaluados en fases tempranas, como ChiLob 7/4, el cual logró activar el sistema inmune sin generar respuestas objetivas (28), y dacetuzumab (SGN-40), que tampoco demostró eficacia clínica en leucemia linfocítica crónica pese a su actividad

biológica *in vitro* (29), teniendo un patrón de inmunomodulación robusta, pero beneficio clínico limitado.

En conjunto, estos hallazgos muestran que, pese a la intensa activación inmunológica que inducen los agonistas anti-CD40, su eficacia clínica continúa siendo limitada. Esto resalta la importancia de comprender qué características estructurales determinan un agonismo verdaderamente efectivo.

4.4.1 Entrecruzamiento de receptores

Los receptores TNFRSF, como CD40, son proteínas transmembrana de tipo I que presentan una estructura alargada y poseen entre tres y cuatro dominios altamente conservados ricos en cisteína (CRDs), estos típicamente contienen seis residuos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro (30). Sus ligandos, en cambio, son proteínas transmembrana de tipo II que se organizan en homotrimeros no covalentes mediante un dominio conservado con homología al dominio de homotrimerización del TNF en el extremo carboxilo (THD) (31). Esta interacción está finamente regulada porque la disposición espacial de los CRDs del receptor determina qué epítomos del ligando pueden ser reconocidos, cómo se forma el complejo trimérico y cuán eficientemente pueden acercarse múltiples receptores para inducir señalización.

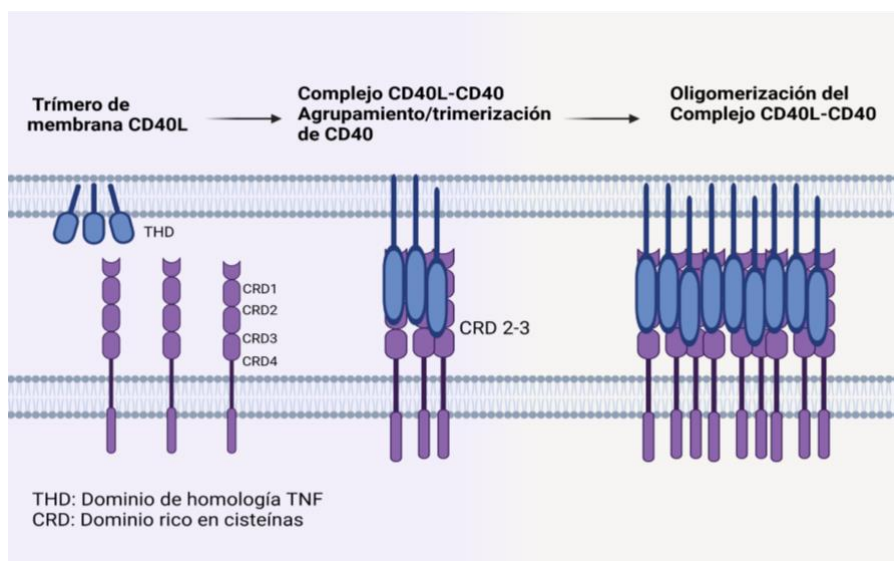


Figura 4. Esquema de oligomerización del Complejo CD40L-CD40. CD40L asociado a membrana en forma de trímero se une mediante su dominio de homología a TNF (THD) al dominio rico en cisteínas (CRD) de CD40, lo que da lugar a la formación de un complejo trímero CD40L- trímero CD40. La interacción secundaria del complejo trímero inicial conduce a la oligomerización de los complejos ligando-receptor.

El THD de CD40L se une principalmente a los dominios CRD 2 y 3 de CD40 (Figura 4) lo que facilita la formación del complejo activo mínimo TNFSF₃-TNFRSF₃ (Trímero CD40L-trímero

CD40). No obstante, para una activación eficiente de las cascadas de señalización, es necesario que se produzca la oligomerización de dos o más de estos complejos (32)

Entender la dinámica estructural es imprescindible al momento de plantear el desarrollo de los anticuerpos, ya que enfoques monovalentes serían de poca utilidad ya que no se genera el entrecruzamiento necesario para la activación. Sobre todo, ya que a diferencia de los anticuerpos terapéuticos que ejercen su acción simplemente por unirse a su molécula diana, la actividad de los anticuerpos monoclonales agonistas está regulada por factores más complejos y diversos, los cuales dependen de la combinación entre el epítipo reconocido, la afinidad por el mismo, el isotipo del anticuerpo y los requisitos de interacción con los receptores Fcγ (FcγR).

4.4.2 Determinantes del reconocimiento: el epítipo de unión

El epítipo de unión es un factor muy contribuyente a la actividad agonista intrínseca del anticuerpo, existiendo una correlación entre el epítipo de unión y la actividad agonista.

Se ha observado que los anticuerpos que se unen a la región CRD-1 del receptor exhiben una mayor actividad agonista (33). El ligando natural CD40L se une a la región CRD2-4 (34) por lo que la unión de un anticuerpo a CRD-1 permitiría que el ligando se una y promueva una acción conjunta. Adicionalmente, existe evidencia de que los anticuerpos que se unen a la región CRD2-4 bloquean la unión del ligando natural y por ende exhiben menor actividad agonista (**Figura 5**) (34).

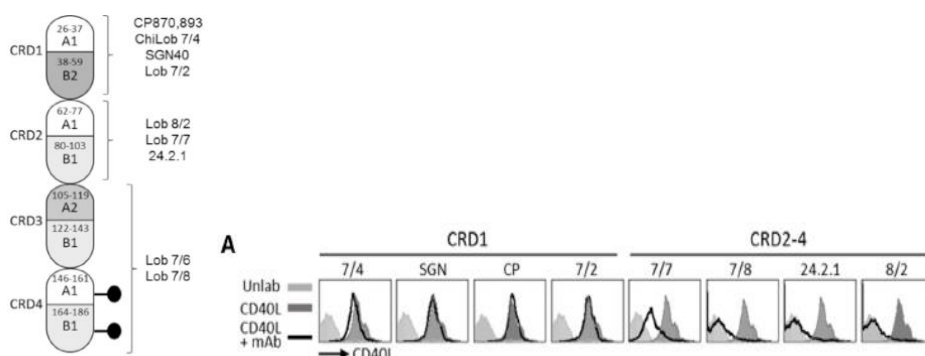


Figura 5. Localización aproximada de los epítipos reconocidos por diferentes anticuerpos monoclonales (mAbs) humanos anti-CD40 (izquierda) y análisis de la capacidad de bloqueo de la unión de CD40L (derecha). El esquema muestra la distribución de los anticuerpos evaluados en los cuatro dominios ricos en cisteínas (CRDs) de CD40. Ensayos de citometría de flujo en linfocitos B esplénicos de ratones transgénicos para hCD40 incubados con o sin los AcMo indicados (todos de isotipo IgG1 murina) y posteriormente estimulados con CD40L hexamérica. La unión de CD40L se detectó con anti-hIgG-FITC. Se observa que los anticuerpos dirigidos contra CRD1 no bloquean la interacción de CD40 con CD40L, en contraste con aquellos que reconocen epítipos en CRD2-4. Imagen extraída de Yu et al. 2018

Además, la región CRD-1, al ser la más expuesta debido a su localización en el N-terminal, resulta más accesible facilitando el entrecruzamiento. Sin embargo, en estudios preclínicos, varios anticuerpos que se unen a CRD-1 (29) han mostrado una actividad significativamente reducida

en comparación con otros anticuerpos que se unen al mismo dominio (35), lo que indica que sólo la unión a este dominio no es suficiente para asegurar una buena actividad agonista.

4.4.3 La interacción Fc-FcγRIIB: el factor clave de actividad agonista de anticuerpos anti-CD40

Los receptores Fc gamma (FcγRs) son moléculas esenciales en la regulación de la respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas G (IgG). Existen dos clases conservadas de FcγRs tipo I que se distinguen por su función: los receptores activadores (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIA y FcγRIIIB en humano, FcγRI, FcγRIII y FcγRIV en ratón) y el receptor inhibidor (FcγRIIB), presente tanto en humanos como en ratones (36,37). Excepto por FcγRIIIB, todos los receptores activadores comparten un mecanismo de señalización intracelular basada en un motivo de activación inmuno-receptor dependiente de tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés), que desencadena funciones efectoras como fagocitosis, desgranulación o citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) (36). Por otro lado, FcγRIIB posee en su dominio citoplasmático un motivo inhibidor (ITIM), que al activarse genera una actividad antiinflamatoria, previniendo una respuesta exacerbada y manteniendo la homeostasis (38).

La IgG es la clase de inmunoglobulina más utilizada en el diseño de anticuerpos terapéuticos debido a sus propiedades farmacocinéticas y su capacidad para interactuar con FcγRs. Existen distintas subclases de IgG, que difieren entre humanos (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) y ratones (IgG1, IgG2a/c, IgG2b, IgG3), y cada una presenta diferentes afinidades hacia los receptores Fcγ activadores e inhibidores (32).

Estas diferencias impactan directamente en la función de los anticuerpos, razón por la cual es fundamental establecer correlaciones funcionales y estructurales entre subclases homólogas para poder trasladar hallazgos entre modelos experimentales. Por ejemplo, la IgG1 humana se considera homóloga funcional de la IgG2a murina, mientras que la IgG2 humana se asemeja a la IgG1 de ratón.

En el contexto de los anticuerpos inmunoestimuladores dirigidos a CD40, como los anticuerpos anti-CD40, Ann L. White y colaboradores demostraron que la interacción con FcγRs y en particular con FcγRIIB, representa un determinante crítico para su actividad agonista (39). En este estudio analizaron la relevancia del isotipo en la actividad de anticuerpos anti-CD40 utilizando versiones murinas del anticuerpo fusionadas a Fc de IgG1 (m1) e IgG2a (m2a).

Mediante análisis de afinidad por SPR (Resonancia plasmónica de superficie) se observó que m2a presentaba alta afinidad por FcγRI y FcγRIV (ambos activadores) y menor afinidad a los receptores inhibidores, mientras que m1 no interactuaba con ellos y mostraba afinidad moderada por FcγRIIB. Sorprendentemente, m1 resultó ser más efectivo para inducir respuestas adaptativas

en el contexto de coadministración con un antígeno modelo, incluyendo activación de APCs, producción de anticuerpos y activación de células T. Además, en ratones deficientes en FcγRIIB, m1 perdió su capacidad inmunoestimuladora, lo que no ocurrió en animales knockout para receptores activadores. Estos hallazgos evidencian que la interacción con FcγRIIB es esencial para la actividad de estos anticuerpos, y que su función va más allá del control inhibitorio: su expresión y distribución en el entorno tisular permite generar el entrecruzamiento necesario para potenciar la señalización del CD40 (39).

Experimentos adicionales confirmaron que el rol de FcγRIIB en este contexto es principalmente estructural, actuando como una plataforma que facilita la agregación de los anticuerpos. Esto se basa en el hecho de que, al inmovilizar los anticuerpos y por ende forzar artificialmente el agrupamiento del receptor CD40, ambos isotipos evaluados (m1 y m2a) mostraron una capacidad similar para inducir la proliferación de células B. Este resultado refuerza la idea de que la función crítica del receptor no es transmitir señales inhibitorias, sino promover el entrecruzamiento necesario para la activación efectiva del receptor CD40. Este entrecruzamiento es entonces fundamental para inducir la oligomerización del receptor CD40 y activar de forma efectiva la señalización en las células presentadoras de antígenos (39).

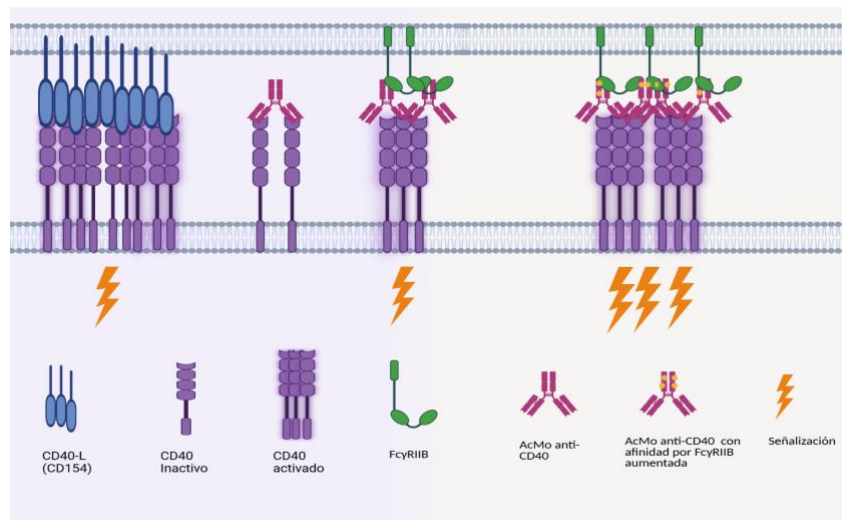


Figura 6. Modelo de activación de CD40 por interacción de AcMo con FcγRIIB. CD40L endógeno es capaz de agrupar CD40 y activar su señalización. Sin FcγRIIB, el agrupamiento mediado por los dos brazos de un anticuerpo agonista no alcanza para imitar este efecto. En cambio, al unirse a FcγRIIB *in vivo*, los anticuerpos pueden entrecruzarse, promoviendo un agrupamiento efectivo similar al de los ligandos multiméricos. Si además estos anticuerpos están optimizados para la unión con FcγRIIB, este entrecruzamiento se potencia, incrementando la activación. Imagen adaptada de **Liu et al 2022**

Así, la interacción Fc–FcγRIIB juega un papel central en la actividad agonista de los anticuerpos anti-CD40. Dado que el mecanismo clave de activación de CD40 es el agrupamiento del receptor, la capacidad de los FcγRIIB para inducir el entrecruzamiento de orden mayor de los anticuerpos

se vuelve esencial como se resume en la **Figura 6**. Este conocimiento ha llevado a clasificar a los anticuerpos anti-CD40 en dos grupos: los agonistas dependientes de Fc γ R, que requieren de esta interacción para su función, y los independientes, que son capaces de activar por sí solos (32).

Finalmente, es importante considerar el contexto del microambiente tisular o tumoral, donde la expresión de CD40 y de Fc γ Rs puede variar significativamente (40). En microambientes con baja expresión de Fc γ RIIB, la eficacia de ciertos AcMo agonistas puede verse limitada, lo que subraya la importancia de adaptar el diseño de los anticuerpos no sólo a su blanco molecular, sino también al entorno fisiopatológico en el que actuarán.

Por ende, el nivel de la actividad de los anticuerpos agonistas de CD40 dependientes de Fc depende de:

- La accesibilidad a la región Fc
- La afinidad del anticuerpo a Fc γ RIIB
- El nivel de expresión de Fc γ RIIB fisiológico

Sin embargo, los anticuerpos IgG humanos no están optimizados para la unión con Fc γ RIIB, lo cual podría explicar la limitada eficacia clínica observada con muchos de estos anticuerpos en estudios iniciales (18). Los anticuerpos con una mejora selectiva para la unión con Fc γ RIIB se posicionan como los agonistas más potentes y esta estrategia es la más eficiente para mejorar la actividad agonista de los AcMo anti-CD40 (41). Por ejemplo, en el caso del anticuerpo derivado de Selicrelumab (CP-870,893), se logró mejorar la actividad agonista mediante la ingeniería del dominio Fc. La variante resultante, denominada 2121-V11, de isotipo hIgG1, incorpora cinco mutaciones puntuales diseñadas para incrementar la afinidad por Fc γ RIIB, lo que se traduce en una mayor respuesta antitumoral (42).

4.4.4 El isotipo hIgG2: modulador independiente en la actividad agonista

Algunos anticuerpos particularmente del isotipo IgG2, han expuesto actividad intrínseca como en el caso de Selicrelumab y CDX-1140 (43,44). Se ha visto que la actividad agonista de los anticuerpos anti-CD40 con hIgG2 podría atribuirse a la isoforma B del isotipo hIgG2, la cual se diferencia de la isoforma A en la formación de los puentes disulfuro entre el dominio CH1 y los dominios CL y bisagra (**Figura 7**), lo que resulta en una disposición menos flexible de los dos fragmentos de unión a antígeno (Fab) de la molécula (45).

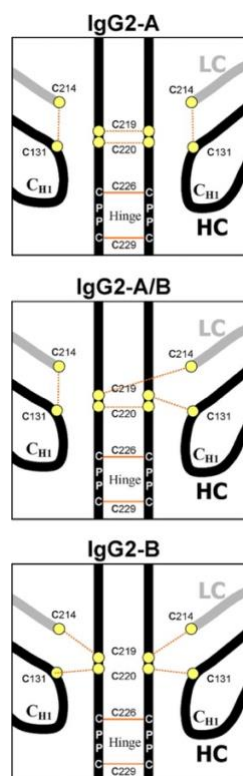


Figura 7. Isoformas de la subclase IgG2 humana según su conectividad de puentes disulfuro.

La isoforma A presenta puentes intercatenarios entre los dominios CH1 y CL que confieren mayor flexibilidad a los brazos Fab, mientras que en la isoforma B estos enlaces se reconfiguran hacia la región *hinge*/bisagra, generando una disposición más rígida. La isoforma A/B representa un estado intermedio. Extraído de Wypych J et al 2008

Por esta razón se han propuesto también estrategias, como la ingeniería en la zona bisagra del anticuerpo y su unión con el dominio CH1, donde a partir de mutaciones específicas en cisteínas se puede bloquear el Ab en la conformación B, la cual promueve mayor actividad agonista (46).

Al igual que el epítipo de unión, la región bisagra de la IgG constituye solo uno de los múltiples determinantes estructurales que contribuyen a la actividad agonista global del anticuerpo. Esta actividad resulta de la integración funcional de todos estos componentes individuales en un determinado modelo experimental.

4.4.5 Influencia de la Afinidad

La actividad agonista de los anticuerpos monoclonales anti-CD40 está determinada por una compleja interacción entre el epítipo reconocido, el isotipo del anticuerpo y su interacción con receptores de Fc lo cual regula distintos niveles de agrupamiento del receptor (*clustering*) (34).

En un estudio sobre la influencia de la afinidad en la actividad agonista de AcMo anti-CD40 Xiaojie Yu y colaboradores exploraron cómo los parámetros cinéticos afectan la señalización mediada por CD40. Sorprendentemente, los anticuerpos con interacciones menos estables mostraron una mayor capacidad agonista, tanto en sistemas murinos como humanos (47).

Los análisis cinéticos revelaron que la constante de disociación (k_d), más que la constante de asociación (k_a), es el principal determinante de la actividad agonista al evidenciar que aquellas variantes con una mayor tasa de disociación promovieron un mayor grado de activación (47). Este comportamiento sugiere que una interacción transitoria entre el anticuerpo y CD40 favorece un reordenamiento más eficiente de los receptores en la membrana, promoviendo el *clustering* necesario para la activación del receptor.

Además, observaron que estos efectos se mantenían incluso en ausencia de receptores Fcγ, como FcγRIIB, lo cual indica que la actividad agonista inducida por los anticuerpos de baja afinidad no depende del reclutamiento de estos receptores. Si bien se sabe que la interacción con FcγRIIB puede potenciar la señalización, en este contexto no resulta necesaria, y la actividad agonista parece estar mediada principalmente por la capacidad intrínseca de estas variantes inducir *clustering* (47).

En resumen, la actividad agonista de los anticuerpos anti-CD40 no depende sólo de un único factor estructural, sino que es el resultado de una combinación entre el epítipo que reconocen, el isotipo del Fc, la interacción con FcγRIIB, la afinidad y el contexto en el que actúan. Entender cómo se integran todos estos elementos es clave para diseñar anticuerpos más eficaces.

4.5 EL ROL DE LA MULTIVALENCIA: ANTICUERPOS BIPARATÓPICOS

El incremento de la valencia es un factor importante en el agonismo a CD40. El trabajo de **Hesen et al.** (2024) demostró de manera concluyente que tanto la oligomerización como la multivalencia son determinantes estructurales esenciales para conferir agonismo intrínseco a los anticuerpos anti-CD40. Mediante ingeniería genética, los autores generaron variantes oligoméricas y multivalentes de anticuerpos monodominio de camélidos, mostrando que el simple aumento en la valencia, sin necesidad de entrecruzamiento mediado por FcγR, es suficiente para inducir una potente activación de CD40. En particular, observaron que la oligomerización forzada de moléculas anti-CD40, lograda a través de fusiones covalentes o dominios multimerizantes, confería una fuerte actividad agonista intrínseca independientemente del epítipo reconocido. Además, los constructos de anticuerpos monodominio específicos de CD40 con valencias hexa- y nonavalentes mostraron una estimulación del receptor significativamente mayor que sus contrapartes bi- o tetravalentes, subrayando el rol crítico del número de sitios de unión en la amplificación de la señal. Estos hallazgos consolidan el concepto de que el *clustering* eficiente es el factor determinante para desencadenar señalización agonista (43).

Los anticuerpos biparatópicos (bpAbs) son una variante dentro de los anticuerpos biespecíficos, diseñados para unirse simultáneamente a dos epítopos diferentes y no superpuestos del mismo

antígeno. Este tipo de unión, descrito por primera vez hace más de 30 años, permite activar mecanismos de acción particulares que no se logran con anticuerpos convencionales (44).

El diseño de bpAbs implica múltiples consideraciones estructurales críticas que impactan directamente en su funcionalidad. Entre ellas se encuentran los epítopes seleccionados, el número y tipo de dominios de unión, la inclusión de regiones para extender la vida media o conferir funciones efectoras, y la estrategia para asegurar el ensamblaje correcto de todas las partes en una molécula funcional (50).

Aquellos que han llegado a fases clínicas presentan una gran diversidad en cuanto a formato y composición. Particularmente, los fragmentos de anticuerpos de cadena única, como anticuerpos de monodominio (sdAbs) o los fragmentos variables de cadena única (scFv), han demostrado ser especialmente adecuados para formar biparatópicos, debido a su tamaño reducido y flexibilidad estructural. De hecho, los dos primeros bpAbs en ingresar a ensayos clínicos, ALX-0651 que inhibe CXCR4 (51) y BI 1034020 que une dos epítopes diferentes de β amiloides (52) estaban compuestos por tandems de sdAbs.

Una limitación común en los formatos en tandem de anticuerpos monodominio es su corta vida media en circulación. Por esta razón la mayoría de los bpAbs actuales adoptan un formato más convencional que incluye una región Fc. Según la simetría a lo largo del eje de cadena pesada (HC), pueden clasificarse como moléculas simétricas (misma HC) o asimétricas (dos mitades distintas con dominios diferentes). Un ejemplo relevante es KN060, un bpAb simétrico, que inhibe enzimáticamente al factor XI de la cascada de coagulación, compuesto por brazos de tandem de sdAbs sin cadenas livianas (50).

Una de las principales ventajas de los anticuerpos biparatópicos es su capacidad de generar interacciones simultáneas en modo cis (dos epítopes dentro de una misma molécula del antígeno) o en modo trans (epítopes distribuidos en moléculas distintas). Esta organización espacial permite que, una vez que se establece el primer punto de contacto, aumente la probabilidad de que el anticuerpo mantenga la unión, favoreciendo interacciones más estables y sostenidas (53).

Además del epítipo, la geometría de los dominios de unión, el diseño de las regiones espaciadoras entre dominios (*linkers*), y el ajuste fino de la afinidad son aspectos críticos para optimizar el mecanismo de acción y maximizar la eficacia terapéutica. Por ejemplo, estudios sobre HER2 mostraron que ciertas configuraciones de bpAbs generaban efecto agonista, mientras que otras lo inhibían completamente, dependiendo de la orientación de los dominios de unión (54). A su vez, los bpAbs se han integrado con éxito en plataformas de inmunoterapia celular, como CAR-T. En modelos preclínicos, CAR-T anti-CD19 que secretan una proteína puente biparatópica dirigida contra CLEC12A mostraron una avidéz funcional hasta 30 veces mayor por las células

leucémicas, junto con una actividad antitumoral significativamente superior en comparación con las versiones monopatónicas. (55).

Mediante la unión simultánea a dos epítopos no solapados en trans es posible formar inmunocomplejos de orden superior (**Figura 8**). Este entrecruzamiento del blanco es la base de múltiples mecanismos de acción, que incluyen un aumento en la actividad agonista, funciones efectoras mediadas por la región Fc o la eliminación de blancos solubles, así como la regulación negativa del receptor (50). La agrupación inducida por los bpAbs puede entonces potenciar la actividad agonista, especialmente en receptores que dependen del entrecruzamiento para una señalización intracelular eficiente, como lo es CD40. Adicionalmente, la agrupación de receptores promovida por los bpAbs incrementa la concentración local de regiones Fc, lo que puede traducirse en una mejora de la función efectora o, en el caso de agonistas de CD40, en una mayor accesibilidad de la región Fc hacia los receptores FcγR.

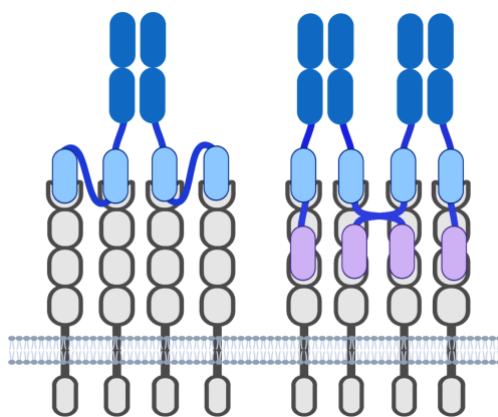


Figura 8. Representación de la acción de los Anticuerpos Biparatónicos. Los Ac biparatónicos pueden unirse tanto en cis como en trans, aumentando la agrupación de receptores que genera un superclustering, lo que induce una mayor actividad agonista. Los anticuerpos biparatónicos aportarían un mayor entrecruzamiento que los tetravalentes monopatónicos por la unión a dos epítopos no solapantes.

Una limitación de los anticuerpos dirigidos contra miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF), como CD40, OX40, 4-1BB y CD27, es que su actividad agonista depende críticamente del entrecruzamiento mediado por FcγRs, que no siempre se encuentran en cantidades suficientes en el microambiente tumoral humano.

Los resultados presentados por **Yang et al.** aportan un marco conceptual particularmente relevante para el desarrollo racional de agonistas contra miembros de la familia TNFRSF, incluido CD40.

En ensayos de activación de OX40 con células reporteras de NF-κB, las versiones tetravalentes biparatónicas mostraron una activación significativamente mayor que los anticuerpos parentales, los formatos bivalentes biparatónicos y los tetravalentes monopatónicos, aun en ausencia total de entrecruzamiento extrínseco (**Figura 9a-e**), gracias a la formación de *superclusters* de

receptores que simulan el patrón de activación fisiológico inducido por los ligandos naturales. Esta superioridad se mantuvo a lo largo de múltiples configuraciones moleculares (r:Fv-IgG, r:Fab-IgG, c:Fab-IgG), demostrando que la biparatopía y la tetravalencia son los factores determinantes de la actividad (56).

De forma notable, esta superioridad funcional se extendió también al receptor DR5, donde los tetravalentes biparatópicos indujeron activación de caspasa-8 y pérdida de viabilidad celular (**Figura 9.f-g**), reflejando un agonismo intrínseco independiente del Fc (56). Estos resultados indican que la estrategia biparatopica tetravalente es aplicable de manera general a otros receptores TNFRSF.

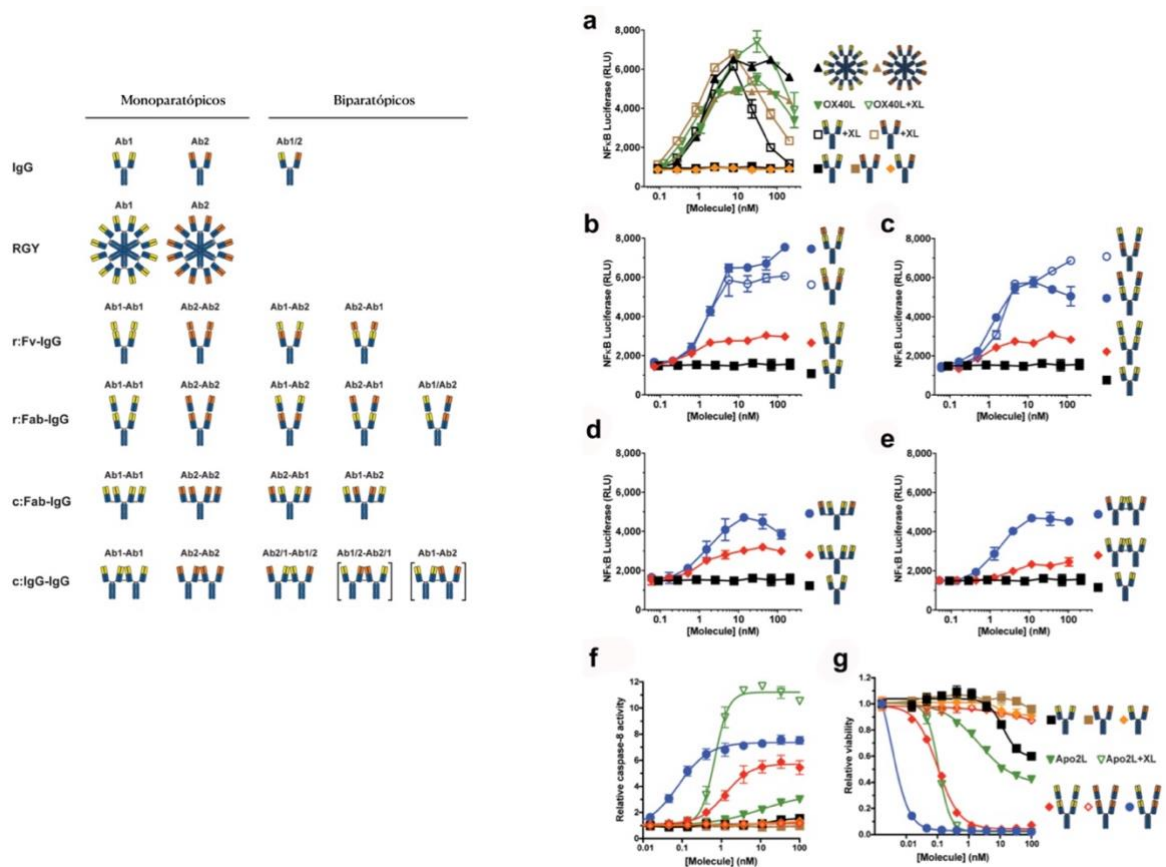


Figura 9. Diseño, formatos estructurales y actividad agonista intrínseca de anticuerpos tetravalentes biparatópicos contra miembros de la familia TNFRSF. Representación esquemática de los distintos formatos de anticuerpos monoparatópicos y biparatópicos evaluados (IgG convencionales humanas, variantes multivalentes RGY, formatos recombinantes r:Fv-hIgG y r:Fab-hIgG, y formatos químicos c:Fab-hIgG y c:IgG-hIgG). (**a-e**) Activación de la vía NF-κB en células Jurkat hOX40⁺ con reportero luciferasa para anticuerpos anti-OX40 (**f-g**) señalización apoptótica (caspasa-8) y actividad antiproliferativa en células COLO-205 para anticuerpos anti-DR5. Imagen extraída y adaptada de **Yang et al. 2019**

Finalmente, estos hallazgos se validaron *in vivo* en ratones *knock-in* para OX40 humano. Tras la inmunización, los anticuerpos tetravalentes biparatópicos promovieron mayores respuestas humorales, expansión de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (efectores y de memoria), y respuestas más robustas tras una dosis de refuerzo. Importante, esta actividad se conservó en variantes LALA-

PG, incapaces de interactuar con FcγRs, confirmando que el agonismo observado es intrínseco y no depende del Fc (56).

En conjunto, la multivalencia y la biparatopidad representan enfoques convergentes para inducir una señalización eficiente de CD40. Mientras los bpAbs pueden promover un *superclustering* de receptores mediante la unión a epítomos distintos, las variantes multivalentes y oligoméricas amplifican la capacidad de unión, promoviendo la activación del receptor sin necesidad de mediadores celulares. Estas estrategias abren nuevas posibilidades para el desarrollo de agonistas de CD40 con alta eficacia terapéutica y menor dependencia del contexto tisular.

4.6 EFECTOS SECUNDARIOS Y TOXICIDAD DE LA INMUNOTERAPIA CON AGONISTAS DE CD40

A pesar de su eficacia en modelos preclínicos, la traslación clínica de anticuerpos agonistas anti-CD40 ha estado limitada por efectos adversos, entre ellos hepatotoxicidad, síndrome de liberación de citoquinas (CRS), trombocitopenia y toxicidad sistémica generalizada. Estos efectos se relacionan con la amplia expresión de CD40 en diversos tejidos, y por tanto con la activación indeseada de múltiples tipos celulares (18).

La hepatotoxicidad inducida por anti-CD40 ha sido uno de los principales efectos limitantes. Estudios recientes en modelos murinos han demostrado que esta toxicidad se desencadena por la activación local de células inmunes en el hígado, en particular las células de Kupffer (macrófagos residentes), que tras la estimulación con anti-CD40 inducen una cascada inflamatoria con participación de monocitos y neutrófilos (57). Esta respuesta se caracteriza por la secreción de IL-12 y la posterior producción de TNF e IFN-γ, siendo este último no hepatotóxico por sí solo, pero sí capaz de inducir la liberación secundaria de TNF por neutrófilos, aumentando el daño hepático (58).

Además, se ha demostrado que la activación de plaquetas, que también expresan CD40, contribuye a eventos trombóticos y liberación de enzimas hepáticas, como alanina y aspartato aminotransferasas, en modelos humanizados (59). El papel de los monocitos también es crítico en el desarrollo del CRS, como lo demuestran niveles elevados de IL-6 tras administración de anti-CD40 en modelos preclínicos (57).

A pesar de estos desafíos, se están desarrollando estrategias para ampliar la ventana terapéutica y minimizar la exposición sistémica de los anticuerpos agonistas. Entre estas estrategias destacan los anticuerpos biespecíficos diseñados para restringir la activación de CD40 a poblaciones celulares específicas donde se han desarrollado formatos que direccionan selectivamente los agonistas hacia células dendríticas mediante el reconocimiento de receptores altamente restringidos, como CLEC9A, potenciando la activación de DCs sin activar otras poblaciones

mieloides o B circulantes (23). Otras estrategias incluyen, por ejemplo, el diseño de anticuerpos biespecíficos CD40×AAT que condicionan la activación de CD40 al microambiente tumoral, limitando el entrecruzamiento del receptor únicamente a células CD40⁺ que se encuentren en contacto con antígenos tumorales (18).

Adicionalmente se propone también la administración local (intratumoral) en lugar de sistémica, y enfoques innovadores como la reprogramación selectiva de macrófagos hepáticos mediante eritrofagocitosis dirigida (57).

En conjunto, estos hallazgos destacan la necesidad de enfoques dirigidos que separen la potente activación inmunitaria antitumoral de los circuitos celulares que desencadenan toxicidades dosis-limitantes.

4.7 USO DE NANOBODIES COMO ALTERNATIVA A LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONVENCIONALES

En 1993 Raymond-Hamer Casterman y su grupo de investigación, de la Vrije Universiteit Brussel (VUB), realizaron un gran descubrimiento al estudiar dromedarios infectados con *Trypanosoma evansi*. Al tratar las inmunoglobulinas G (IgG) con agentes reductores, daba como producto además de los anticuerpos convencionales de 150 kDa, unos anticuerpos de aproximadamente 100 kDa que solo poseían dos cadenas pesadas (60). Desde su descubrimiento, los HcAbs (Heavy-chain only antibodies, por sus siglas en inglés) se han identificado exclusivamente en camélidos, representando entre el 50 y el 80 % del total de anticuerpos circulantes en camellos, y entre el 11 y el 25 % en camélidos sudamericanos indicando su importancia en la protección inmunológica en estos animales. Fuera de este grupo, no se han encontrado HcAbs en otros organismos, con la curiosa excepción de los tiburones y otros peces cartilaginosos, los vertebrados más antiguos que poseen un sistema inmune adaptativo, quienes poseen los llamados IgNAR (Ig new antigen receptor) (61,62).

Los anticuerpos convencionales del tipo IgG tienen una estructura bien conocida y conservada en todos los mamíferos. Están compuestos por dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas livianas (L) que se unen entre sí mediante enlaces disulfuro. Cada cadena liviana contiene dos dominios, mientras que cada cadena pesada posee cuatro. Ambas cadenas presentan un dominio variable en su extremo N-terminal, VL en la cadena liviana y VH en la pesada que, en conjunto, forman el fragmento variable (Fv) responsable del reconocimiento específico del antígeno.

La secuencia remanente de las cadenas H y L son más conservadas, CH y CL respectivamente, siendo las dos últimas regiones (CH2 y CH3) las que conforman la región Fc y las responsables de interactuar con las células inmunes o de cumplir funciones efectoras (3).

Por otro lado, los anticuerpos de cadena pesada (HcAbs) presentan una región Fc típica de IgG con isotipos IgG2 e IgG3, pero carecen de cadena liviana y del dominio CH1 (**Figura 10**). En su extremo N-terminal, la cadena pesada contiene una región variable conocida como VHH (Variable Heavy domain of Heavy chain, por sus siglas en inglés), que es la encargada de reconocer y unirse al antígeno específico, por ende, cumple una función similar a la del fragmento Fab (fragment antigen-binding) de los anticuerpos tradicionales, a pesar de su estructura más simple (63).

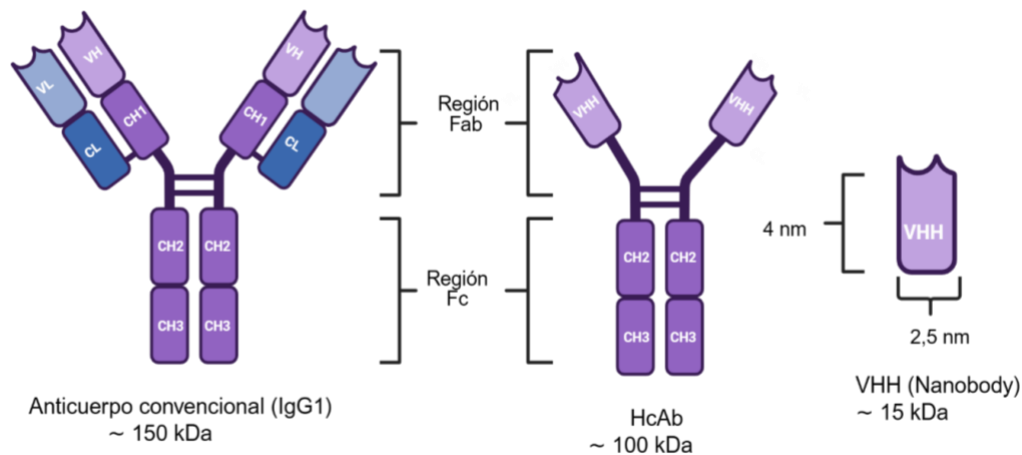


Figura 10. Representación esquemática de las estructuras de los anticuerpos convencionales, los anticuerpos de cadena pesada únicamente (HcAbs) y del dominio VHH o nanobody. En comparación con los anticuerpos convencionales, los anticuerpos HcAbs carecen del dominio CH1 además de carecer de cadena liviana, por ende, el sitio de reconocimiento de epítopo solo se conforma por un dominio llamado VHH (Variable Heavy domain of Heavy chain, por sus siglas en inglés).

El dominio VHH aislado es un fragmento de 15 kDa como se ilustra en la **figura 10**, que conserva el potencial de unión a antígeno con fuerte afinidad (63). Debido a su pequeño tamaño, de apenas pocos nanómetros, la empresa biofarmacéutica Ablynx se inspiró en esta característica para nombrarlos “nanobodies” (64).

Los nanobodies comparten la misma arquitectura general que los dominios variables de la cadena pesada (VH): cuatro regiones de secuencia conservada o “*framework*” (FR 1/2/3/4) rodeadas de tres bucles hipervariables (CDR, *complementarity determining regions*) agrupados en el extremo N-terminal, conformando el sitio de unión del antígeno o paratope (**Figura 11**) (60).

La estructura general está conformada por nueve cadenas β , una lámina de cuatro hebras β y otra de cinco, conectadas entre sí por bucles y estabilizadas mediante un puente disulfuro entre las cisteínas en las posiciones 23 y 94 (63). Adicionalmente, la identidad de secuencia entre los VHH y los VH de las inmunoglobulinas humanas de la familia III (VH3) es mayor a 80% (66).

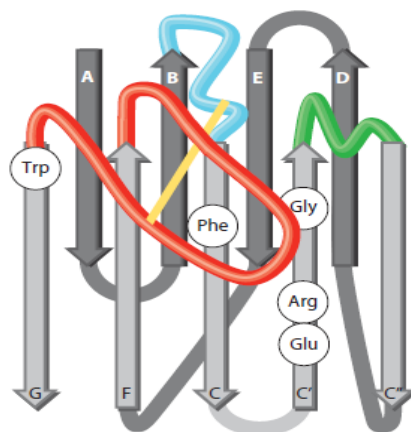


Figura 11. Plegamiento del dominio VHH de camello. Dos hojas beta anti-paralelas, una con 4 y otra con 5 cadenas beta. En celeste, verde y rojo, CDR1, CDRVH de3, respectivamente. En amarillo, el enlace disulfuro no canónico entre CDR1 y CDR3. Imagen extraída de Muydelrmans(63)

Sin embargo, existen pequeñas pero significativas diferencias entre los VHHs y los VHs. En el *framework 2* (FR2), algunos aminoácidos hidrofóbicos altamente conservados (Val47, Gly49, Leu50, Trp52), que normalmente participan en la interacción con el dominio VL, son reemplazados en los VHH por aminoácidos más pequeños y/o hidrofílicos (Phe/Tyr42, Glu/Gln49, Arg50 y Phe/Gly/Leu52), lo que contribuye a una mayor solubilidad de la molécula la cual es una característica destacable de los nanobodies (67). Esta sustitución es necesaria porque, a diferencia del VH convencional que se asocia con el VL, el VHH carece de dicho dominio. Por tanto, si se conservaran esos residuos hidrofóbicos expuestos, sería más propenso a agregarse (68). Estos aminoácidos están codificados en genes VHH de la línea germinal, y no son el resultado de hipermutación somática (69).

Dentro de los CDRs, El CDR3 es el principal responsable del reconocimiento del antígeno y la especificidad, mientras que el CDR1 y el CDR2 contribuyen a la fuerza de unión (64).

La comparación entre las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VHH revela claramente que las regiones hipervariables CDR1 y CDR3 de los VHH son más extensas que las de los VH, con un promedio de 19.3 aminoácidos contra 10-15 respectivamente, lo que compensa la falta de superficie de unión al antígeno debido a la ausencia del dominio variable de la cadena liviana (VL) (70). A su vez, en el caso de los camellos, pero mucho menos frecuente en las llamas, estas regiones suelen presentar residuos extra de cisteína que forman un puente disulfuro adicional que contribuyen a estabilizar los CDRs, muy comúnmente a través de una unión del CDR3 con el *framework 1* (71).

Los nanobodies han ganado atención debido a sus propiedades físicoquímicas, que los hacen ideales para una amplia gama de aplicaciones en biotecnología y medicina. Estas pequeñas moléculas poseen una excelente estabilidad, manteniéndose funcionales a temperaturas tanto bajas como altas desde -20°C a 60-80°C, y pueden soportar períodos prolongados a 37°C sin

perder su capacidad de unión antigénica. Además, son resistentes a condiciones extremas como pH no fisiológicos (3-9), presiones elevadas (500-750 MPa) y la presencia de concentraciones moderadas de desnaturalizantes químicos como el cloruro de guanidina y la urea, lo que las hace especialmente útiles en matrices donde otros anticuerpos pueden desnaturalizarse (72,73). La clave de esta robustez radica en su capacidad de “*refolding*” eficaz tras sufrir desnaturalización térmica o química, aunque recientemente se ha debatido sobre la reversibilidad de este proceso bajo ciertas condiciones (74). Además, su estructura monomérica y la ausencia de modificaciones postraduccionales les permiten ser expresados en sistemas microbianos como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, lo que facilita su producción a gran escala a bajo costo (75).

Durante las últimas décadas, los anticuerpos monoclonales (AcMo) han revolucionado la terapia oncológica al permitir una inmunoterapia dirigida contra antígenos tumorales específicos. Sin embargo, su gran tamaño (~150 kDa) limita la penetración en tumores sólidos y representa una seria desventaja en aplicaciones como imagenología, donde una rápida eliminación renal es crítica (76).

Los nanobodies poseen una gran ventaja frente a los AcMo ya que exhiben resistencia térmica y estabilidad lo que facilita la ruta de administración pudiendo ser intravenosa, oral, intraperitoneal o intratumoral (64). Cabe destacar que, debido a su pequeño tamaño y la alta homología con la familia VH3 humana, los nanobodies presentan un perfil inmunogénico bajo, lo que los hace adecuados para su administración en humanos (77).

Sin embargo, los nanobodies monoméricos son eliminados rápidamente del torrente sanguíneo a través de los riñones y, si éstos están conjugados a sustancias tóxicas, su acumulación en los riñones podría provocar una toxicidad renal no deseada (78). A su vez, la rápida eliminación de estos hace que disminuya su vida media y por ende su potencial terapéutico.

Para superar esta limitación, y gracias a su gran versatilidad estructural, los nanobodies pueden fusionarse mediante ingeniería genética a dominios Fc o a nanobodies anti-albúmina, estrategias que permiten extender la vida media ya sea a través del reciclaje mediado por el receptor neonatal Fc (FcRn) o bien aprovechando el prolongado tiempo de residencia plasmática de la albúmina, respectivamente. Por otro lado, los nanobodies también pueden conjugarse a etiquetas peptídicas, toxinas, fármacos, radionúclidos, fotosensibilizadores o nanopartículas, modificaciones orientadas a aplicaciones diagnósticas o terapéuticas específicas y no necesariamente vinculadas al aumento de la vida media. Estas propiedades los convierten en herramientas particularmente adecuadas para el direccionamiento específico y eficiente de tumores *in vivo* (79).

En este contexto, los anticuerpos quiméricos tipo nanobody-Fc integran las ventajas estructurales y de especificidad de los nanobodies con las funciones efectoras conferidas por los dominios Fc humanos y con aproximadamente la mitad del tamaño de un anticuerpo convencional.

Terapéuticamente, se han desarrollado nanobodies contra diversos antígenos tumorales como EGFR (80) HER2 (81), CAIX (82), entre otros, mostrando eficacia en modelos preclínicos. En inmunoterapia, nanobodies dirigidos contra puntos de control inmunológico como PD-L1 (83), CTLA-4 (84), TIM-3 (85) y CD47 (80), han demostrado potenciar la respuesta inmune antitumoral, incluso en combinación con anticuerpos monoclonales o terapias celulares. Asimismo, nanobodies anti-VEGF y anti-VEGFR2 han sido eficaces en inhibir la angiogénesis tumoral (87). Su modularidad ha facilitado el desarrollo de células CAR-T (82), BiTEs, bi-específicos dirigidos a CD3 y antígenos tumorales como los anti-HER2/CD3 o anti-CEA/CD3 (89) y activadores de células NK mediante nanobodies anti-CD16 fusionados a antígenos tumorales (90,91). Por otro lado, se han utilizado células madre mesenquimales y bacterias programadas como vehículos de liberación local y sostenida de nanobodies terapéuticos en el microambiente tumoral (92). Estas estrategias demuestran el amplio potencial de los nanobodies para integrarse en inmunoterapias dirigidas y combinadas en oncología (**Figura 12**).

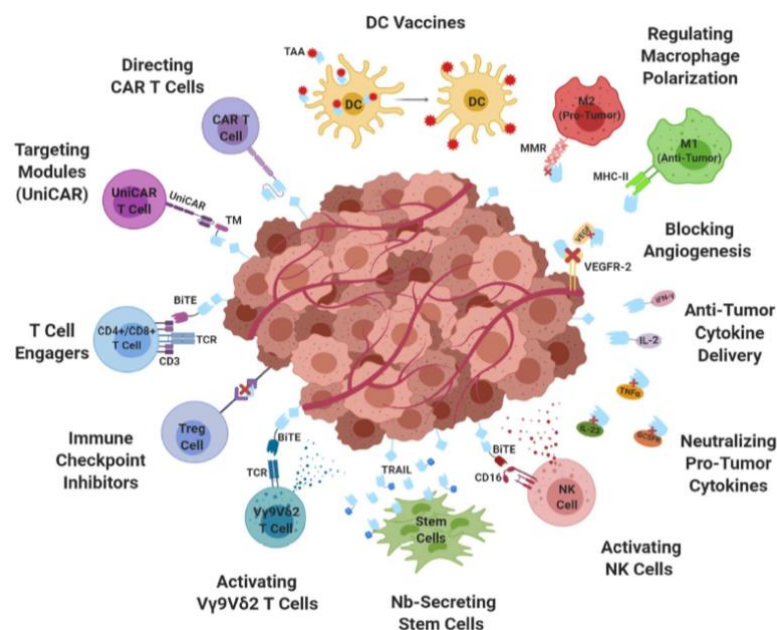


Figura 12. Nanobodies dirigidos al microambiente tumoral Obtenido de Yang EY y Shah K (86). El esquema representa las múltiples estrategias terapéuticas basadas en nanobodies dirigidas al microambiente tumoral (TME), ilustrando su potencial sinérgico en la modulación de distintos componentes. Abreviaturas: TAA: antígeno asociado a tumor; DC: célula dendrítica; MMR: receptor de manosa de macrófagos; MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR2: receptor 2 de VEGF; IFN- γ : interferón gamma; IL-2: interleucina-2; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa; IL-23: interleucina-23; GCSFR: receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos; BiTE: biespecífico que recluta células T; CD16: marcador de células NK; NK: célula natural killer; TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF; TCR: receptor de células T; Treg: células T reguladoras; CAR: receptor quimérico de antígeno; UniCAR: CAR universal; TM: módulo de direccionamiento.

4.8 ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una plataforma para la generación y caracterización de nanobodies, y se han generado nanobodies dirigidos contra CD40 murino, con el objetivo de explorar su potencial como agonistas inmunomoduladores. Se inmunizó una llama (*Lama glama*) con tres dosis del ectodominio recombinante de CD40 murino en adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmune fue monitoreada mediante ELISA, observándose una saturación en los niveles de anticuerpos IgG de cadena pesada anti-CD40 tras la tercera inmunización.

Los VHHs o nanobodies se obtienen a partir de la extracción del ARN total de linfocitos B de la sangre (fracción de PBMCs), con posterior amplificación y clonado de genes V (construcción de una biblioteca) y selección de clones por la técnica de *phage display*.

La técnica de phage display fue desarrollada por G. Smith en 1985 como un método de obtención de péptidos al presentarlos en la superficie de bacteriófagos filamentosos lisogénicos. Como el fenotipo y el genotipo del fago están directamente ligados, el ADN de las proteínas presentadas se empaqueta en el ADN del mismo virión y se expresan en fusión a proteínas de la cápside (93).

La tecnología de phage display se basa en la conexión física entre genotipo y fenotipo del fago, ya que el gen que codifica la proteína o péptido de interés está empaquetado en el mismo virión que lo expresa fusionado a una proteína de su cápside (93). Los fagos filamentosos f1, fd y M13 son comúnmente utilizados con este fin, ya que infectan bacterias gram-negativas como *E. coli* y poseen un genoma circular de ADN de hebra simple que codifica 11 genes, incluyendo aquellos que conforman su cápside. Entre estas proteínas destacan pVIII, que recubre la mayor parte del virión con aproximadamente 3000 copias, y pIII, presente en 3–5 copias en un extremo y fundamental para la infección al interactuar con el pilus F bacteriano. Generalmente, los genes que codifican péptidos o proteínas a presentar se fusionan al gen de pIII (94).

Para generar bibliotecas de VHHs, se emplean vectores fagémidos que contienen solo los genes necesarios para expresar la fusión VHH-pIII, por lo que requieren un *fago helper* para empaquetar los viriones (94). Tras la infección de *E. coli*, se obtiene una progenie de fagos recombinantes que expresan distintos nanobodies. Esta biblioteca se somete a un proceso de selección por afinidad llamado panning, que consiste en ciclos de incubación con el antígeno, lavados para eliminar los fagos no específicos y amplificación de los fagos unidos. Finalmente, clones seleccionados al azar se analizan mediante screening, expresando los nanobodies de forma libre en bacterias y evaluando su unión al antígeno mediante ELISA. Los VHHs positivos se secuencian y se clonan en vectores para su expresión recombinante y purificación por afinidad. El proceso de selección se resume en la **figura 13**.

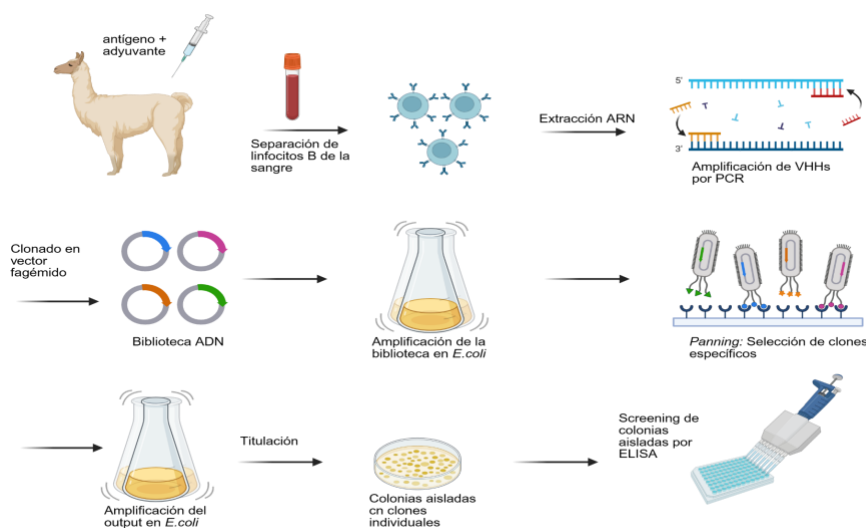


Figura 13. Obtención de nanobodies específicos mediante phage display. A partir de sangre de una llama inmunizada se aíslan PBMCs (fracción que contiene a los linfocitos B), se extrae el ARN total, se retrotranscribe y se amplifican las secuencias de VHH y se construye una biblioteca en un vector fagémido. La biblioteca se amplifica en presencia de un fago helper y se somete a panning para seleccionar clones específicos contra el antígeno. El output se amplifica, se titula, y los clones individuales se evalúan por ELISA.

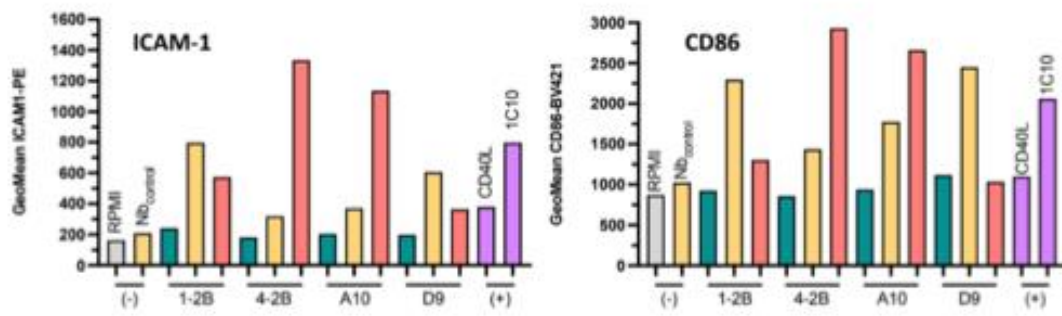
Para obtener nanobodies anti-CD40 en nuestro laboratorio, a partir de una llama inmunizada con el CD40 de ratón se generó una biblioteca de nanobodies expresado en fagos, y se realizaron dos estrategias de panning para seleccionar fagos específicos contra CD40. En la primera (panning A), se recuperaron fagos unidos al ectodominio de CD40 mediante digestión con tripsina. En la segunda (panning B), orientada a seleccionar clones contra epítopes solapantes con el de un anticuerpo agonista, se eluyeron los fagos unidos a CD40 con un buffer ácido y, luego de neutralizar, los fagos eluidos se incubaron en pocillos cubiertos con CD40 previamente adsorbidos con el anticuerpo agonista FGK45, para finalmente recuperar los fagos no unidos. Estos resultados forman parte del Proyecto de tesis de Doctorado en Biotecnología de Carolina Padula (no publicados).

Se cultivaron colonias de *E. coli* ER2738 transformadas con ADN fagémido de los outputs 2 y 3, induciendo la expresión soluble de VHH-pIII-HA con IPTG. Los sobrenadantes se evaluaron por ELISA para detectar reactividad con CD40 mediante un anticuerpo anti-HA-peroxidasa. Los clones positivos se analizaron en un segundo ELISA para identificar inhibidores de la unión del anticuerpo FGK45 a CD40. Se secuenciaron 33 clones, identificando tres familias de VHHs. Se seleccionaron cuatro clones representativos (1-2B, 4-2B, A10 y D9), de los cuales 1-2B y D9 mostraron fuerte capacidad de inhibición de unión de FGK45 a CD40.

Dado que la activación de CD40 requiere el entrecruzamiento de sus monómeros y que su ligando natural (CD154) es una proteína trimérica, se diseñaron nanobodies anti-CD40 en formato trímero, fusionándolos al dominio “foldon” de 27 aminoácidos de la proteína fibrarina del

bacteriófago T4 (95), el cual ya ha sido utilizado exitosamente para trimerizar otras proteínas recombinantes (90, 91). Estos nanobodies se expresaron en el periplasma de *E. coli* (DE3), se purificaron por cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA acoplada a remoción de endotoxinas con PBS-Tritón X-114 0.1%, y se confirmó el estado trimérico por cromatografía de exclusión molecular. A su vez los nanobodies se fusionaron a la región Fc de IgG1 humana (h1Fc) dando lugar a homodímeros potencialmente capaces de estimular al receptor en forma análoga a AcMo agonistas previamente caracterizados. Para estos últimos se realizó un ensayo de interferometría de bicapa donde utilizando biosensores inmovilizados con el ectodominio recombinante de CD40, y permitiendo la asociación secuencial de distintas combinaciones de clones (Nb-Fc y AcMo agonistas). Los resultados revelan que los clones D9 y 1-2B reconocen epítopes solapantes entre sí y con anticuerpos agonistas conocidos (FGK45 y 1C10), mientras que A10 y 4-2B se unen a epítopes distintos. Para evaluar el potencial agonista de los nanobodies anti-CD40 en formatos fusionados a foldon y a la región Fc humana, se incubaron cultivos de esplenocitos de ratón C57BL/6 con estos anticuerpos durante 48 horas. Se midió la activación de linfocitos B (CD19+) mediante viabilidad y expresión de CD86 e ICAM-1 por citometría de flujo (**Figura 14**). Estos resultados son preliminares debido a la cantidad de réplicas experimentales, aunque todos los nanobodies mostraron tendencia a aumentar estos marcadores. Sin embargo, en el formato Fc, la activación efectiva requirió la adición de un anticuerpo secundario anti-humano para favorecer el entrecruzamiento, sugiriendo que la interacción con receptores Fc (como FcγRIIB) es clave para la activación óptima de CD40, aunque esta interacción puede verse limitada debido a la baja afinidad entre h1Fc y FcγRIIB de ratón (39,98). Por esta razón se generó una variante de fusión al Fc de IgG1 murino del nanobody 4-2B, ya que este Fc tiene mayor afinidad por FcγRIIB de ratón, generando la proteína 4-2B-m1Fc que mostró eficacia *in vitro* (**Figura 14.b**).

a.



b.

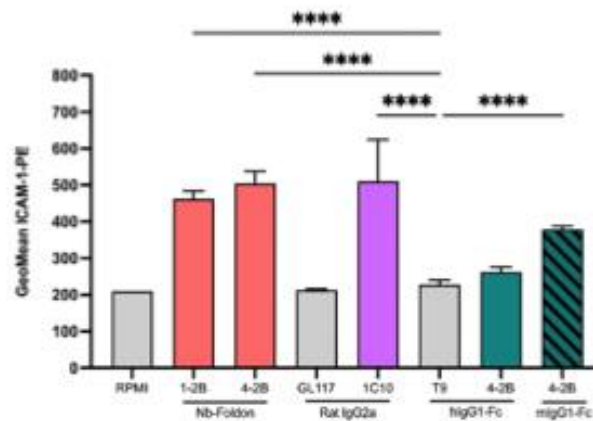


Figura 14. Evaluación *in vitro* de la actividad agonista de nanobodies anti-CD40. Esplenocitos de ratón C57BL/6 se incubaron con distintos estímulos durante 48 h y se analizaron por citometría de flujo la viabilidad y la expresión de los marcadores de activación ICAM-1 y CD86 en células B (CD19+). **a)** Se compararon los distintos clones obtenidos de nanobodies anti-CD40 (1-2B, 4-2B, A10 y D9); código de colores: turquesa: Nb-hFc; amarillo: Nb-hFc + anticuerpo anti-hFc (inducción mediante clustering secundario); naranja/salmón: Nb-foldon trimérico; **b)** Se compararon nanobodies en formatos monomérico, trimérico (foldon) y fusionados a Fc, junto con controles como el ligando trimérico soluble CD40L y anticuerpo agonista 1C10.

Posteriormente, se evaluó el potencial adyuvante de los nanobodies anti-CD40 (clones 1-2B y 4-2B, que reconocen epítopes distintos) en combinación con el antígeno quimérico Nb_{CD11c}-Fc-OVA (ovoalbúmina direccionada a células presentadoras CD11c+). Se inmunizaron ratones con el antígeno solo, con nanobodies fusionados a foldon o a h1Fc, y con el anticuerpo agonista 1C10 como control positivo. La activación de células T CD8+ específicas de la OVA se evaluó midiendo la producción de IFN γ mediante ELISPOT tras reestimulación con el péptido SIINFEKL de clase I de la OVA. Ninguno de los nanobodies triméricos (foldon) mostró actividad *in vivo*, probablemente debido a la inestabilidad del trimero o su corta vida media. Tampoco se observó actividad con nanobodies fusionados a h1Fc, en línea con los resultados *in vitro*. Sin embargo, el constructo 4-2B m1Fc si generó una respuesta exitosa *in vivo*, activando células T CD8+ específicas y potenciando la respuesta humoral. Los clones 1-2B y D9, que reconocen epítopes distintos a 4-2B, no fueron fusionados al Fc murino.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la actividad agonista de nanobodies anti-CD40 mediante la implementación de diversas estrategias moleculares.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar nanobodies anti-CD40 triméricos por fusión al dominio foldon, utilizando una variante de éste capaz de formar enlaces disulfuro intercatenarios para incrementar su estabilidad.
- Generar nanobodies anti-CD40 de fusión a la región Fc de IgG1 de ratón (clones 1-2B y D9).
- Generar anticuerpos biparatópicos utilizando nanobodies anti-CD40 con epítopes no solapantes fusionados a la región Fc de IgG1 de ratón e IgG2a con mutación LALA que disminuye afinidad por receptores de Fc γ .
- Comparar la actividad agonista de las distintas construcciones *in vitro* e *in vivo*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 BUFFERS Y SOLUCIONES

Buffer fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, agua destilada, pH 7.5.

Buffer de remoción de endotoxinas (PBS-tritón): PBS 1X, Tritón X114 0.1%, pH 7.5, en frío para solubilizar.

Buffer tris acetato (TAE) 1X: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, agua Milli Q, pH 8.0.

Buffer Tris-EDTA-sacarosa (TES): Tris-HCl 0.2 M, EDTA 0,5 mM, Sacarosa 0,5 M, pH 8.0.

Buffer de unión para HisTrap: Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, Agua Milli Q, pH 8.0.

Buffer de unión para HisTrap-Excel: Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, Agua Milli Q, pH 8.0.

Buffer de elución HisTrap / HisTrap-Excel: PBS 1X apirógeno, Imidazol 500 mM, pH 8.0.

Buffer unión cromatografía de afinidad VH3: Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4

Buffer de elución cromatografía de afinidad VH3: Buffer Acetato de Sodio 50 mM, pH 3.5

Buffer de lavado cromatografía de afinidad VH3: Buffer Acetato de Sodio 50 mM, pH 6.0

Buffer A NI-NTA: 6 M GuHCl; 0.1 M NaH₂PO₄; 0.01 M Tris·HCl; pH 8.0

Buffer de elución pH 4.5 proteína A: NaCl 0,15 M, Ácido Acético 0,58%

Buffer de elución pH 3.0 proteína A: Glicina 0,1 M

Buffer FACS: BSA 0.1%, EDTA 2 mM, en PBS 1X.

Buffer FA (fosfatasa alcalina): 10 mM NaCl, 100 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 9.5.

Sustrato para fosfatasa-alcalina (FA): 12 mL de buffer FA con 79 µL de NBT 50 ug/mL y 40 µL de BCIP 50 ug/mL

Solución de revelado para ELISA: 12.5 mL Buffer acetato 0.1 M pH= 5.5, TMB concentración final de 0,4 mg/mL disuelto en DMSO, H₂O₂ a concentración final de 0,006%.

Gel separador/running SDS-PAGE 12,5%: Tris-HCl **0,75 M pH 8,8**, SDS 0,1%, acrilamida: bisacrilamida (30:0,8) ajustada al 12,5%, persulfato de amonio (APS) 0,05% y TEMED 0,05%.

Gel stacking SDS-PAGE 4%: Tris-HCl **1 M pH 6,8**, SDS 0,1%, acrilamida: bisacrilamida (30:0,8) ajustada al 4%, APS 0,05% y TEMED 0,05%.

Buffer de carga 6X para SDS-PAGE: Tris-HCl 0.35 M, SDS 10%, Glicerol 30%, 2-mercaptoethanol 5%, azul bromofenol 0.024%, pH 6.8

Buffer de corrida 10X para SDS-PAGE: Tris base 10 mM, glicina 1.44%, SDS 0.1% en agua destilada

Solución colorante para tinción azul de Coomassie: ácido acético glacial 10%, etanol 20%, Coomassie 0.1%, en agua destilada

Solución decolorante para tinción azul de Coomassie: ácido acético glacial 10%, etanol 20%, en agua destilada

Solución de Lisis de eritrocitos: 150 mM de NH_4Cl , 10 mM de KHCO_3 y 0,1 mM de EDTA disódico, Agua Milli Q, pH 7,2–7,4.

Solución de inmovilización BLI (sensoers AR2G, sartorius): Buffer acetato 10 mM, pH 5,0, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, PM 191,7 g/mol) a una concentración final de 20 mM y NHS (N-hidroxisuccinimida, PM 217,14 g/mol) a una concentración final de 10 mM.

6.2 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

Luria Bertani broth (LB; SigmaAldrich)

Luria Bertani agar (LB agar; SigmaAldrich)

Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC): triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, MgCl_2 10 mM, glucosa 20 mM, en Milli Q, pH=7.0.

Kanamicina stock: 40 mg/mL en Agua Milli Q. Concentración de trabajo 40 ug/mL (0.1%).

Glucosa stock: 40% en agua Milli Q.

Ampicilina Stock: 50 mg/ μL en Agua Mili Q. Concentración de trabajo 100 ug/mL.

RPMI 1640 (Cat N° RPMI-A, Capricorn scientific).

DMEM High-glucose (Cat N° DEMEM-HXA, Dulbecco's Modified Eagle Medium, Capricorn scientific).

RPMI completo: RPMI, Suero fetal bovino 10%, Antibiótico/Antimicótico 1%, β -mercaptoetanol 0.1%.

Expi293™ Expression Medium (Thermo Fisher, Cat. N° A1435101).

Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher, Cat. N° 31985070).

6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism (versión 10.0, GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se obtuvieron a partir de al menos tres experimentos independientes, y se presentan como media \pm desviación estándar (DE) o media \pm error estándar de la media (SEM), o como media geométrica de fluorescencia, según la naturaleza del experimento y el tipo de variable analizada.

Previo al análisis estadístico, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. En aquellos casos en que los datos cumplieron con los criterios de distribución normal, se utilizaron pruebas paramétricas. Para la comparación entre dos grupos, se empleó el test t de Student no pareado. Para comparaciones entre más de dos grupos, se aplicó ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías, dependiendo del número de factores analizados, seguido de pruebas post hoc de Tukey para comparaciones múltiples cuando correspondió.

En los ensayos de citometría de flujo, los datos de fluorescencia se analizaron utilizando la media geométrica de fluorescencia (geo-mean) como medida representativa de la intensidad de señal.

En los ensayos de ELISA, las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal con ajuste sigmoideal, permitiendo la estimación de parámetros de afinidad aparente, como la concentración efectiva media (EC_{50}).

En todos los análisis, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

6.4 GENERACIÓN DE NANOBOODIES TRIMÉRICOS ASOCIADOS A DOMINIO FOLDON

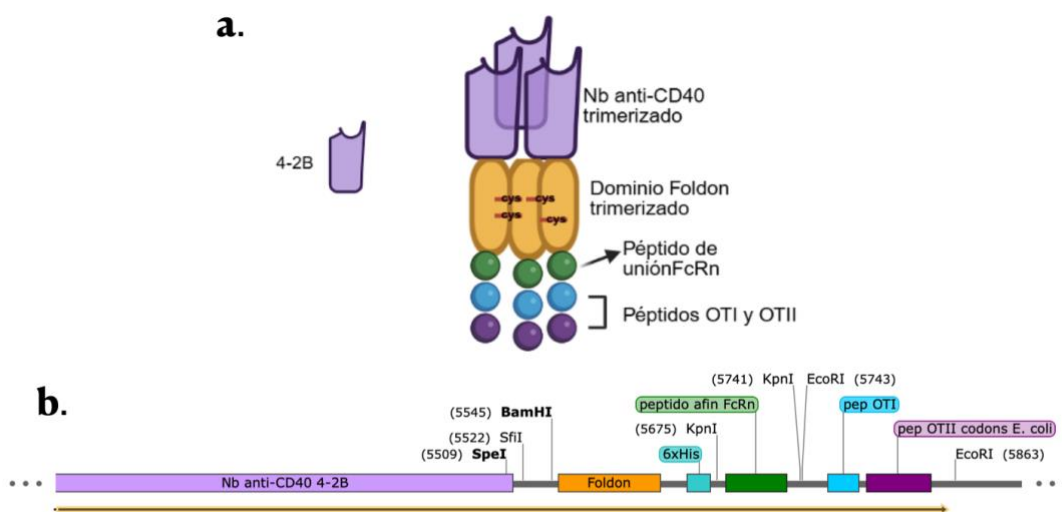


Figura 16. Representación de la construcción 4-2B Foldoncys-FcRn-OT. a) Representación esquemática del constructo trimerizado; b) secuencia lineal del constructo. En violeta se ve el nanobody 4-2B, en naranja el dominio foldon trimerizado por los puentes disulfuro, en verde el péptido de unión a FcRn y en azul y violeta los péptidos OTI y OTII respectivamente

Este constructo posee un PM de 26,4 kDa en su forma monomérica. El gen correspondiente al nanobody anti-CD40 4-2B (**Figura 16**) fue fusionado al dominio Foldon derivado de la fibrina del fago T4 (aminoácidos 455–487), incorporando las sustituciones A12C y K16C (99) para promover la formación de puentes disulfuro. Este dominio de 27 aa (3 kDa) fue incluido con el objetivo de inducir la trimerización del nanobody y aumentar la estabilidad del complejo basado en lo reportado por **Lu et al** (101).

En el extremo C-terminal se incorporó un péptido afín al receptor neonatal de Fc (FcRn) de 38 aa (4 kDa) cuya función es prolongar la vida media sérica del constructo al facilitar su reciclaje endosomal dependiente de pH (100). Finalmente, se añadieron los péptidos modelo derivados de la ovoalbúmina OT-I (aa 257-264, 0,9 kDa) y OT-II (aa 323-339, 1,8 kDa), que actúan como epítopos de referencia para el estudio de la presentación antigénica y activación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ específicos, respectivamente. Estos péptidos fueron incluidos con el fin de permitir la evaluación *in vivo* de la eficacia del constructo para promover respuestas de células T específicas a antígenos direccionados a CD40.

Entre los distintos módulos se incluyeron espaciadores (*spacers*) flexibles ricos en glicina y serina G₄S, destinados a preservar la independencia estructural de cada dominio y facilitar el correcto plegamiento de la proteína trimerizada. Estos tramos, además, incorporan sitios de restricción estratégicos que confieren modularidad al diseño del constructo. En particular, los sitios KpnI y EcoRI fueron posicionados de manera tal que permiten la remoción secuencial de los péptidos afín a FcRn y OT, posibilitando la generación de variantes truncadas o la sustitución independiente de cada módulo sin alterar el marco de lectura ni comprometer la integridad del trómero.

6.4.1 Transformación de células electrocompetentes con pINQ 4-2B-foldoncys-FcRn-OT

La electroporación o electro permeabilización consiste en provocar un aumento significativo y transitorio de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular mediante un campo eléctrico aplicado externamente y permitiendo así incorporar ADN (plásmidos) dentro de la célula. Con el vector original representado en la Figura 15 se transformaron células electro competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* que se define por tres mutaciones: recA1, inactiva recombinación homóloga asegurando así la estabilidad de los insertos; endA1, inactiva endonucleasas intracelulares que podrían degradar ADN plasmídico y lacZ M15 que permite el screening de colonias blanco/azul (no aplicado). Esta cepa tiene una muy buena eficiencia de transformación y por eso es utilizada para la clonación de ADN.

La transformación se realizó con 1 μ L de vector pINQ y 40 μ L de células en cubetas de 1 mm en un equipo MicroPulser (BIORAD). Las células se resuspendieron en 1 mL de SOC y se incubaron durante 1 hr a 37°C y 250 rpm. Se concentraron las células por centrifugación a 5000 x g por 3 minutos y se resuspendieron en 100 μ L de LB para ser sembradas en placa de LB Agar-Kanamicina, las cuales permanecieron a 37°C Overnight (ON, 16-20 horas).

6.4.2 Extracción de ADN plasmídico por Minipreparación.

De la placa de bacterias transformadas se seleccionaron colonias aisladas y se incubaron en tubos con 5 mL de LB-Kanamicina ON a 37°C a 250 rpm. Se obtuvieron los pellets por centrifugación a 5000 x g, 10 minutos, y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el Kit Comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo correspondiente.

6.4.3 Digestión del ADN Plasmídico: remoción de secuencias OTI y OTII

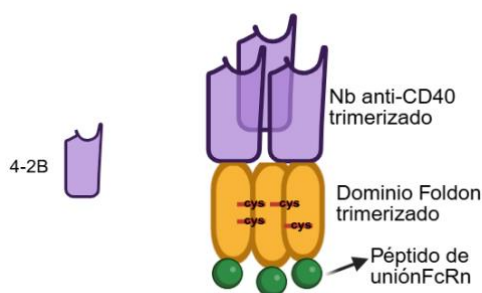


Figura 17. Representación esquemática de la construcción 4-2B Foldoncys-FcRn. En violeta se ve el nanobody 4-2B, en naranja el dominio foldon trimerizado por los puentes disulfuro y en verde el péptido de unión a FcRn. Proteína de 220 aminoácidos

El gen sintetizado originalmente para la construcción 4-2B-Foldoncys-FcRn-OT fue diseñado con una arquitectura modular, conteniendo distintos dominios funcionales que podían ser modificados o eliminados mediante enzimas de restricción específicas (**Figura 16**). Es importante destacar que los péptidos modelo OT-I y OT-II, incorporados en el extremo C-terminal, no participan en la activación del receptor CD40, sino que fueron añadidos con el propósito de evaluar al Nb anti-CD40 tanto para la activación de CD40 como para el direccionamiento de antígenos a células CD40⁺. Esta estrategia de digestión secuencial permite evaluar la contribución individual de cada módulo en la actividad agonista del nanobody anti-CD40. Como parte de la estrategia de ingeniería molecular, se propuso remover los péptidos C-terminales (OT-I y OT-II) para obtener una versión truncada del constructo (4-2B-Foldoncys-FcRn) (**Figura 17**). Los sitios de restricción EcoRI, ubicados en los extremos de las secuencias OTI y OTII, permitieron eliminar el fragmento correspondiente de aproximadamente 120 pb mediante digestión con la enzima EcoRI.

Se digirió 7ug de ADN con la enzima EcoRI a 10U por ug de ADN, utilizando Buffer O (ThermoFisher) 1X.

6.4.4 Electroforesis en Gel de agarosa

Las muestras se diluyeron en buffer de carga 6X (Thermo Fisher R 0611) con el fin de obtener concentración final 1X. Se utilizó el MPM Generuler 1Kb Plus DNA Ladder (NEB). La totalidad del volumen digerido se corrió por electroforesis de gel de agarosa 0,8% en Buffer TAE 1X con GelRed como agente intercalante para distinguir el vector digerido (5600 pb) del no digerido (6000 pb). Los productos se visualizaron bajo irradiación UV con un equipo transiluminador.

6.4.5 Purificación del vector digerido

El ADN digerido se corrió por electroforesis en gel de agarosa 0,8% hasta lograr discernir entre las moléculas completamente digeridas de las no digeridas o parcialmente digeridas.

Se extrajeron las bandas del Gel y se purificó el ADN del vector digerido utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Purification (QIAGEN), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante sustituyendo la 1ra centrifugación a 100g x 3 min.

6.4.6 Reacción de religación

Para ligar el vector digerido se trabajó con 30 ng del mismo. Se realizó la reacción con la enzima T4 DNA ligasa (Thermo) en Buffer de reacción 1X en un volumen final de 20 µL durante 30 min a 24°C seguido de 5 min de inactivación a 70°C.

El ADN de la ligación transformó y se extrajo por Miniprep el ADN de 5 colonias distintas y se envió al servicio de secuenciación CES (Capillary Electrophoresis Sequencing) de la empresa MacroGen. La reacción se realizó con el primer universal T7 terminador. Los clones que presentaron la secuencia completa del vector sin los péptidos OTI y OTII se seleccionaron.

6.4.7 Remoción del péptido de unión al receptor neonatal (FcRn)

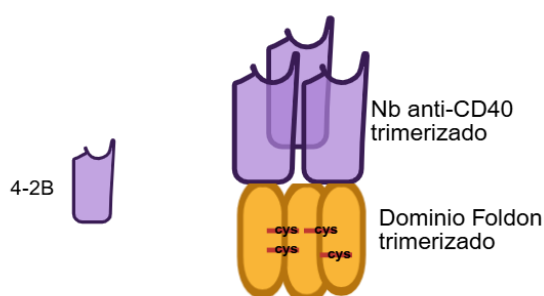


Figura 18. Representación esquemática de la construcción 4-2B Foldoncys. En violeta se ve el nanobody 4-2B y en naranja el dominio foldon trimerizado por los puentes disulfuro. Es la construcción más simple del Nb-foldon.

Para remover el Péptido de unión al receptor neonatal (**Figura 18**) se realizó el mismo procedimiento de digestión, purificación, ligación y secuenciación desde el plásmido sin OTs, pero utilizando la enzima de restricción KpnI que se encuentra a los extremos del péptido FcRn. se digirió 5 ug de ADN con la enzima KpnI (NEB) ,10U/ μ L, utilizando 1U por ug de ADN plasmídico en Buffer NEB 1.1 1X y H₂O de Biología molecular.

6.4.8 Intercambio de Nb 4-2B por el Nb 1-2B en el vector carente de péptidos OTs

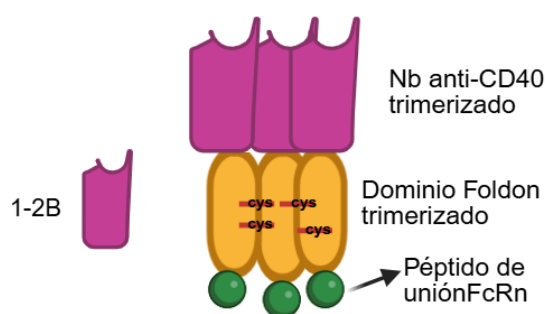


Figura 19. Representación esquemática de la construcción 1-2B Foldoncys-FcRn. En rosa se ve el nanobody 1-2B que reconoce un epítipo diferente a 4-2B, en naranja el dominio foldon trimerizado por los puentes disulfuro y en verde el péptido de unión a FcRn.

Para generar la construcción correspondiente a 1-2B-Foldoncys-FcRn (**Figura 19**) se empleó el mismo procedimiento de digestión, purificación, ligación y secuenciación que en las construcciones anteriores. En este caso, se utilizó la enzima de restricción SfiI, que se encuentra flanqueando la región de inserción del nanobody dentro del vector previamente digerido con EcoRI para remover los péptidos OT se digirieron 5 μ g de ADN tanto del vector sin OT (4-2B foldoncys-FcRn) como del plásmido conteniendo 1-2B, empleando 1 unidad de SfiI (NEB, 10 U/ μ L) por microgramo de ADN en buffer NEB 1.1 (1X) y H₂O de biología molecular.

6.5 PRUEBAS DE EXPRESIÓN DE NANOBODIES TRIMÉRICOS EN SISTEMA PROCARIOTA

6.5.1 Fundamento del sistema de expresión

Para la expresión se transformaron células electrocompetentes *E. coli* de la cepa BL21 (DE3). La misma contiene el profago lambda DE3 que porta el gen para la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor lacUV5. Además, la cepa carece de las proteasas Ion y OmpT, reduciendo la degradación de proteínas heterólogas expresadas en la célula. El vector de expresión pINQ utilizado codifica para el represor Lac y presenta el operador Lac precedido por el promotor T7. De este modo, el sistema de expresión se basa en la síntesis de la T7 ARN polimerasa producida por la bacteria que actuará sobre el promotor T7 del plásmido, culminando en la expresión del gen bajo el control del represor lac. Este también es codificado en el genoma de la bacteria y actúa

inhibiendo la transcripción tanto de la T7 ARN polimerasa como de la proteína heteróloga mediante la unión a su operador (102).

Solo en presencia de una molécula inductora, como lactosa, alolactosa o IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), se impide la acción del represor, lo que permite tanto la expresión de la proteína como de la polimerasa. La proteína expresada desde el vector pINQ es exportada al compartimiento periplasmático de la bacteria gracias al péptido señal OmpA (Outer membrane protein A), que es clivado en la proteína final. Esta exportación es fundamental en estas construcciones ya que poseen puentes disulfuro, que son fundamentales para la trimerización del dominio foldon, los cuales no podrían formarse en el citoplasma de esta cepa.

Para estas pruebas, se evaluó el impacto de diferentes concentraciones de IPTG (2, 10 y 30 μ M) y de las condiciones de inducción, utilizando temperaturas de 28°C durante toda la noche (ON) o 37°C durante 4 horas. Estas condiciones permiten comparar el rendimiento de expresión bajo inducciones suaves y prolongadas frente a inducciones rápidas y de alta temperatura.

6.5.2 Pruebas de expresión en BL21

La transformación de los productos de ligación en BL21 y cultivo en placas de LB agar-kanamicina se realizó de igual manera que se describió en 5.3.1. Para las pruebas de expresión a pequeña escala, se tomó una colonia aislada en las placas, se resuspendió en LB-kanamicina y glucosa al 4% y se inoculó ON a 37°C y 250 rpm. La glucosa en el medio cumple la función de reprimir la transcripción del gen de la proteína recombinante, porque asegura la acción del represor lacI, con la finalidad de evitar la presencia de una posible pre-inducción antes de la etapa específica de expresión y evitar que se acumule la proteína recombinante que podría llegar a ser toxica para la bacteria

A partir del cultivo ON se inocularon tubos de 2 mL de LB-kanamicina a una dilución de 1/50 y se mantuvieron a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una OD 600nm de aproximadamente 0.6-0.8. En este punto se agregó IPTG a concentraciones de 2, 10 y 30 μ M. Las muestras fueron incubadas bajo dos condiciones: a 28°C durante toda la noche (ON) o a 37°C durante 4 horas. Como control negativo se incluyó un cultivo de células BL21 no transformadas.

6.5.3 Lisis de cultivos y preparación de extractos solubles e insolubles

De cada cultivo se tomó una alícuota de 1 mL y se centrifugó a $5000 \times g$ por 10 minutos. El pellet se resuspendió en 200 μ L del buffer de lisis B-PER™ (ThermoScientific), se mezcló usando un agitador de vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se centrifugó a máxima velocidad ($17000 \times g$) por 5 minutos.

Se recuperó el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble y el pellet se resuspendió con 20 μ L de una solución de Urea 8 M en H20mq para obtener las fracciones insolubles, se mezcló

en un agitador de vórtex e incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y luego se agregó 180 μ L de PBS 1X. Se centrifugó a velocidad máxima por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante recuperado en ambas etapas se purificó por mini columnas Ni-NTA (N.º de cat. / ID. 31314 QIAGEN). Debido a la presencia de la cola de seis histidinas en la proteína de interés, ésta puede ser coordinada por hasta tres residuos de Níquel y por ende ser retenida en la columna. Ésta se equilibra con 600 μ L de Buffer A y se centrifuga a 900 x g por 2 min. Luego se aplica la muestra y se centrifuga a 250 x g por 5 min, se realizan lavados con Buffer A y finalmente se eluye la proteína con Buffer A suplementado con 250 mM de imidazol.

6.5.4 SDS-PAGE

Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12.5% y buffer de corrida 1X. Las muestras se diluyeron en buffer de carga 6X, con o sin agente reductor, y se incubaron a 100°C durante 5 minutos para promover la desnaturalización. La corrida electroforética se realizó a 90 voltios durante los primeros 15 minutos y a 140 voltios el resto de la corrida. Las bandas se revelaron mediante tinción con Coomassie seguida de inmersión en solución decolorante.

6.6 EXPRESIÓN A GRAN ESCALA Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES ANTI-CD40 FOLDON

6.6.1 Transformación de células electrocompetentes y expresión de Nanobodies

Las células electrocompetentes de *E. coli* BL21, fueron transformadas con el vector pINQ-4-2B-foldon-sinOTs y se sembraron en LB Agar con kanamicina y se dejaron a 37°C ON. Pasado ese tiempo se seleccionó una colonia de la placa y se inoculó en 15 mL de LB-Kanamicina-Glucosa y se dejó ON a 37°C. Se inocularon 3 mL del cultivo overnight en un matraz con 250 mL de LB-Kanamicina, incubando a 37°C y 250 rpm hasta la obtención de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (OD 600 nm 0,5-0,8). La expresión de nanobodies se indujo con IPTG a una concentración final de 10 μ M y se dejó proceder a 28°C y 250 rpm ON.

6.6.2 Lisis Celular por Shock Osmótico

Las células se recolectaron por centrifugación a 5000 x g por 10 minutos. Para la lisis osmótica se aplicó un protocolo previamente descrito(103). El pellet fue resuspendido en 5 mL de buffer TES y se congeló a -80°C. Posteriormente, se descongela en hielo y se añadió más buffer TES y se incubó en hielo por 30 minutos. Para completar la lisis se agregaron 10 mL de Buffer TES diluido 1:5 y se dejó incubar otros 30 minutos. Luego de una centrifugación a 30000 g por 20 minutos, se recuperó el sobrenadante que contenía los nanobodies solubles.

6.6.3 Purificación de Nanobodies

Para la purificación de nanobodies asociados a dominio foldon, se emplearon tanto columnas HisTrap como MabSelect™ VH3 (Cytiva).

se utilizó una columna His-Trap (Cytiva) de 1 mL, equipada con una matriz de Sefarosa cargada con iones de níquel, que facilita la retención específica de las proteínas etiquetadas con histidina. Para equilibrar la columna se utilizó el buffer de unión de HisTrap. Los sobrenadantes obtenidos se llevaron a condiciones de salinidad del buffer de unión y se aplicaron a la columna utilizando una bomba peristáltica a un flujo constante de 1 mL/min. Posteriormente, la columna se lavó con Buffer de unión para eliminar proteínas no unidas, seguido de un lavado adicional con Buffer de unión suplementado con 50 mM de imidazol para remover interacciones de baja afinidad.

Como se planea utilizar estas construcciones para la inmunización de ratones y para la realización de ensayos de actividad biológica con cultivos primarios de esplenocitos, se debe agregar un paso de remoción de endotoxinas provenientes de *E. coli*. Estas endotoxinas promoverían un potente efecto pro-inflamatorio que no solo desestimaría la acción inmunológica de estos nanobodies, sino que sería peligroso para los animales en ensayos *in vivo*.

Para ello se siguió un protocolo previamente descrito (104), donde se pasaron 50 mL de PBS conteniendo 0,1% de Tritón X-114a través de la columna manteniendo el mismo flujo de 1 mL/min utilizado durante el lavado y manteniendo en hielo el PBS-Tritón para asegurar su miscibilidad. Este paso permitió que el detergente solubilizara y removiera las endotoxinas asociadas tanto a la matriz como a la proteína unida al Ni²⁺.

Posteriormente, se realizó un lavado con 20 mL de PBS apirógeno a igual velocidad de flujo, con el fin de eliminar el exceso de detergente y los restos de endotoxinas desprendidas.

Para eluir las muestras se necesitó aumentar la concentración de imidazol con un buffer PBS 1X apirógeno 500 mM Imidazol para que desplace a las histidinas del tag de la proteína, liberándola de la matriz y permitiendo su recolección.

En cuanto a la columna MabSelect VH3, está diseñada para unirse específicamente al dominio VH3 del anticuerpo mediante un ligando de proteína A modificado que conserva la interacción con el marco germinal VH3, pero carece de afinidad por la región Fc. Este diseño permite la captura eficiente de fragmentos de anticuerpo, incluidos nanobodies, que presentan similitud con las secuencias germinales de la familia VH3 (105).

El sobrenadante de la lisis celular fue ajustado a la composición del buffer de unión (20 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 7.4) y filtrado (0.22 µm). Las muestras fueron cargadas en la columna, seguida de lavados con el mismo buffer de unión para MabSelect VH3. En este protocolo se realizó adicionalmente un lavado de endotoxinas con 50 mL PBS 1X con tritón X-

114 al 0,1% en hielo. Luego de esto se realiza un lavado de 20 volúmenes con PBS apirógeno para proseguir con un lavado de 5 volúmenes del Buffer de lavado cromatografía de afinidad VH3. Los nanobodies fueron eluidos usando un buffer de elución de 50 mM de acetato de sodio, pH 3.5, y neutralizados en un buffer alcalino de 1 M Tris-HCl, pH 9.0.

6.6.4 Cambio de buffer mediante columna de desalinización (*Desalting/Buffer Exchange*)

En este caso, se utilizó una columna de *desalting* para cambiar el buffer de las fracciones de proteína purificada más puras y en mayor concentración, asegurando que se encuentre en condiciones óptimas para su uso en ensayos *in vitro* o *in vivo*. Se utilizaron columnas de Sephadex G25 (Cytiva), pre-empacada con una matriz de exclusión de tamaño diseñada para separar moléculas pequeñas como sales delusivas de biomoléculas de mayor tamaño como proteínas. Este procedimiento se realizó en una cabina de flujo laminar para trabajar en condiciones de esterilidad y obtener la proteína estéril para poder utilizarse en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Las columnas se equilibraron en PBS apirógeno. Las proteínas fueron filtradas por 0.22 previamente.

6.6.5 Estimación de la concentración de Nanobodies mediante espectrofotometría

La concentración de los nanobodies purificados se estimó mediante espectrofotometría en un equipo NanoDrop 1000 (ThermoScientific), utilizando PBS 1X como blanco. El equipo mide la absorbancia a 280 nm y, a partir de este valor, se calculó la concentración en base al coeficiente de absortividad molar (ϵ) y el peso molecular (PM) teóricos para los nanobodies, obtenidos a partir de su secuencia aminoacídica mediante la función ProtParam en la herramienta web ExPasy(106).

6.6.6 SDS-PAGE

Las fracciones eluidas fueron evaluadas por SDS-PAGE para analizar la pureza de los nanobodies obtenidos al igual que en la sección 5.4.4. Se utilizaron como marcador de peso molecular MPM Prestained Protein Ladder (#26612 Thermo) y PAGEMASTER Protein Standard de GenScript.

6.6.7 Ensayo de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para evaluar la reactividad con CD40

La actividad funcional de los nanobodies fue evaluada mediante un ensayo de ELISA para determinar su reactividad con el antígeno CD40. Las placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con el ectodominio de CD40 recombinante (AcroBiosystems TN5-M52H8) 0,5 ug/mL diluido en PBS 1X a 4°C durante la noche. Luego, se bloqueó con PBS-BSA 1%, para evitar uniones no específicas, a 37°C por 30 minutos. Las muestras de nanobodies purificados fueron añadidas a los pocillos en diluciones seriadas 1/3 en PBS-BSA 0.1% desde una concentración inicial de 0.5 μ g/mL y la unión al antígeno CD40 fue detectada usando un anticuerpo secundario anti-VHH conjugado a HRP (Genscript, Cat N°. A01861-200, dilución 1/5000). Tras la adición del sustrato,

la reacción de color se midió a 450 nm en un lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtechnologies, serie n.º 4130170) para cuantificar la reactividad específica de los nanobodies con CD40.

6.7 OBTENCIÓN DE HUELLA PEPTÍDICA POR MALDI-TOF CON TRIPSINIZACIÓN

La espectrometría de masas MALDI-TOF permite la identificación de proteínas mediante la obtención de una huella peptídica. El enfoque estándar para identificar proteínas incluye la separación de las proteínas mediante electroforesis en gel o cromatografía líquida. Posteriormente, las proteínas se digieren con endoproteasas específicas de secuencia, siendo la más común la tripsina. Tras la digestión, los péptidos generados se analizan determinando sus masas moleculares. Para identificar las proteínas, las masas obtenidas experimentalmente se comparan con las masas teóricas de los péptidos correspondientes a proteínas almacenadas en bases de datos o a secuencias esperadas, utilizando programas de búsqueda por espectrometría de masas. La técnica proporciona información sobre la identidad molecular y la pureza de las muestras en condiciones cercanas a las naturales (107).

Se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida al 12.5%, cargando 10-15 µg de proteína en un volumen final de 20 µL en PBS 1X y 4 µL de buffer de carga 6X. Posteriormente, el gel fue sometido a tinción y destinción utilizando soluciones preparadas con agua Milli-Q. Se trabajó de forma tal de minimizar la contaminación ya que la queratina de la piel puede afectar las señales en el MALDI-TOF.

Las bandas de proteína fueron cortadas en fragmentos pequeños con un bisturí estéril sobre Parafilm y transferidas a tubos Eppendorf. Se realizaron lavados sucesivos con bicarbonato de amonio 50 mM y acetonitrilo 50%, seguidos de bicarbonato de amonio 25 mM con acetonitrilo 50%, y finalmente bicarbonato de amonio 45 mM con acetonitrilo 10%, bajo condiciones de incubación específicas para eliminar contaminantes y preparar la muestra para la digestión enzimática.

La digestión se llevó a cabo con tripsina, utilizando una solución de bicarbonato de amonio 50 mM con 0.16 µg de tripsina, y se incubó la muestra toda la noche a 37°C. La reacción se detuvo con ácido trifluoroacético (TFA) al 10%.

Para la adquisición de datos en el espectrómetro de masas, se mezcló 1 µL de la muestra con 1 µL de matriz α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) a 10 mg/mL en buffer TA (TFA/ Acetonitrilo). La mezcla se depositó sobre la placa MALDI y se dejó secar antes del análisis.

6.8 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE 4-2B FOLDONCYS EN SISTEMA EUCARIOTA

6.8.1 Generación de primers específicos para los sitios de clonado

Se diseñaron primers específicos para amplificar las regiones de interés y generar los sitios de restricción necesarios en el vector de partida (4-2BpcDNA) para la clonación de los distintos elementos funcionales. El vector pcDNA3.1 es ampliamente utilizado para la expresión génica en células de mamíferos debido a sus características optimizadas, que incluyen:

- Promotor/*enhancer* de Citomegalovirus (CMV): Permite una expresión génica de alto nivel.
- Sitio de clonación múltiple (MCS): Amplio, disponible en orientaciones positiva (+) o negativa (-).
- Señal de poliadenilación y terminación de transcripción de la Hormona de Crecimiento Bovino (BGH): Mejora la estabilidad del ARNm transcrito.
- Origen SV40: Permite replicación episomal y facilita la recuperación del vector en líneas celulares que expresan el antígeno T grande (ej., COS-1 y COS-7).
- Gen de resistencia a ampicilina y origen de replicación pUC: Facilita la selección y el mantenimiento del vector en *E. coli*.

Adicionalmente, al vector utilizado se le agregaron en el grupo de trabajo secuencias específicas para optimizar las construcciones:

- Intrón A: Es el intrón A de citomegalovirus que está reportado que aumenta la expresión proteica en células HEK293 (108).
- Fc de IgG1 humana (secuencia de los dominios bisagra, CH2 y CH3) entre sitios de restricción FseI y XbaI.
- péptido *IgKappa leader*: secuencia de señalización de 16-30 péptidos en N-terminal que guía a las proteínas a ser secretadas. Este es clivado antes de la secreción.

Como vector de partida se utilizó un plásmido que contenía el nanobody 4-2B clonado entre sitios SfiI, fusionado originalmente a un dominio Fc. Con el fin de reemplazar dicha región Fc por los nuevos constructos trimerizados, se diseñaron primers específicos que hibridan inmediatamente aguas abajo del Nb y en los extremos correspondientes a cada módulo deseado.

Para ello se empleó un primer forward común, dirigido al inicio del dominio foldon con las mutaciones Cys:

Fw-spFoldonCys-FseI: 5'-ggccAGGCCGGCCAGggcggttc-3'

Y se diseñaron tres primers reverse alternativos, cada uno ubicado en el extremo correspondiente del módulo a incorporar:

Rv-6HisFoldonCys-XbaI: 5'-aaaaTCTAGACTAATGGTGATGGTGATGGTGccctg-3'

Rv-PeptFcRn-XbaI: 5'-aaaaTCTAGACTAgccgttcgccgatacaggcc-3'

Rv-FoldonFcRnOT-XbaI: 5'-aaaaTCTAGACTctaACGTCCCGCCTCATTGATTTTCAGCGTG-3'

Estos tres pares de primers (Fw + cada Rv) permiten amplificar de forma independiente las tres variantes generadas, además de incorporar los sitios de restricción necesarios (para XbaI y FseI) para su posterior clonación en pcDNA: 4-2B-FoldonCys-6His, 4-2B-FoldonCys-FcRn y 4-2B-FoldonCys-FcRn-OT (**Figura 20**).

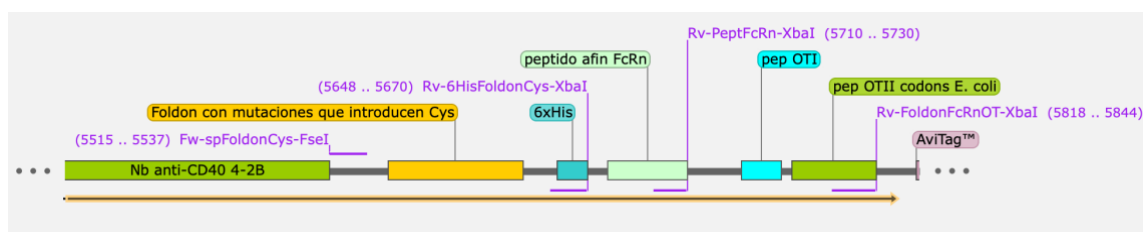


Figura 20. Mapa esquemático del vector mostrando las regiones donde hibridan los primers utilizados para generar los constructos foldon. El primer forward Fw-spFoldonCys-FseI se ubica inmediatamente después del nanobody 4-2B, mientras que los primers reverse Rv-6HisFoldonCys-XbaI, Rv-PeptFcRn-XbaI y Rv-FoldonFcRnOT-XbaI hibridan en los extremos 3' de los módulos 6xHis, péptido FcRn u OT, respectivamente. Estos pares de primers permiten amplificar las tres versiones: 4-2B-FoldonCys-6His, 4-2B-FoldonCys-FcRn y 4-2B-FoldonCys-FcRn-OT.

Los *primers* fueron sintetizados por GenScript y sus temperaturas de *melting* (Tm) fueron las siguientes:

Fw: 72°C

Rv 1: 64°C

Rv 2: 67°C

Rv 3: 67°C

Estos se resuspendieron en *Elution Buffer* (Kit miniprep QIAgen) y se alicuotaron a una concentración de 5µM.

6.8.2 Reacción de PCR

Para la amplificación de los insertos se utilizaron los primers a una concentración final de 0.2 µM, 1.25 U de la enzima Taq ADN polimerasa (ThermoScientific™), buffer Taq 1X, 0.2 mM de dNTPs y 1 µL de molde (vector que contiene la secuencia foldon) en un volumen final de 50 µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador LifeEco (BIOER) bajo el siguiente programa: 1 minuto a 95°C (desnaturalización inicial) y 25 ciclos de: 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a 62°C (annealing), 30 segundos a 72°C (elongación), 10 minutos a 72°C (extensión final). El producto de PCR fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa.

6.8.3 Purificación de los productos de PCR

El ADN amplificado se corrió por electroforesis en gel de agarosa 1%. Se extrajeron las bandas del Gel y se purificó el ADN utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Purification (QIAGEN), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante sustituyendo la primera centrifugación a 100g x 3 min.

6.8.4 Digestión del vector e inserto con enzimas de restricción: XbaI y FseI

Los sitios de corte de las enzimas XbaI y FseI se encuentran en las regiones flanqueantes del inserto a clonar, por lo que se emplearon para preparar tanto el vector como los productos de PCR para la clonación. Se digirieron diferentes cantidades de ADN obtenido por PCR junto con 5 µg del vector de expresión, utilizando 5 unidades de cada enzima por µg de ADN, en un volumen final de 100 µL. Las digestiones se realizaron en buffer rCutsmart 1X (NEB) a 37°C ON con desactivación de 5 min a 60°C. El vector digerido se corrió por electroforesis en gel de agarosa 1% hasta lograr discernir entre el vector digerido del no digerido. Se extrajeron las bandas del Gel y se purificó el ADN del vector digerido utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Purification (QIAGEN),

6.8.5 Ligación vector-inserto

La ligación de los insertos en el vector pcDNA se llevó a cabo utilizando T4 DNA ligasa en un volumen final de 20 µL. Se emplearon 30 ng del vector y una relación molar de inserto de 3:1. La mezcla de reacción incluyó:

-Buffer T4 1X: 2 µL.

-Enzima T4 ligasa (dilución 1:10): 2 µL.

-Agua ultrapura csp: 20 µL.

Además, se realizaron controles de ligación sin inserto para evaluar la eficiencia del proceso.

Estas ligaciones se transformaron en DH5a siguiendo el protocolo 3.3.1, excepto que se utilizaron placas de LB-agar suplementadas con ampicilina para la selección de colonias transformadas.

6.8.6 PCR de colonias para la identificación de clones positivos

A partir de las colonias crecidas en 5.7.6, se realizaron reacciones de PCR para evidenciar la presencia de clones positivos. Se tomaron cuatro colonias de cada placa (reacciones de ligación y controles) y cada una se resuspendió en 100 µL de agua para biología molecular, y de ésta se tomó 1 µL como molde para la reacción de PCR. Se siguió el mismo protocolo que para la PCR convencional usando los pares de *primers* Fw y Rv. Además, se incluyó un control positivo de la reacción con un plásmido con foldon como molde. El resultado se evidenció por electroforesis en

gel de agarosa. A partir de las réplicas de las colonias que resultaron positivas se crecieron cultivos ON en 5 mL de LB-ampicilina para extraer el ADN plasmídico por miniprep al día siguiente. Los plásmidos fueron enviados al servicio de secuenciación de Macrogen (Corea) y se verificaron las secuencias para proceder a las pruebas de expresión.

6.8.7 Células Expi293F

La línea celular Expi293F™ (Thermo Fisher Scientific, Cat. N° A14527) es una variante de células HEK293 adaptada al crecimiento en suspensión y optimizada para la producción transiente de proteínas recombinantes con alto rendimiento. Estas células derivan de HEK293F y se cultivan en medio definido, libre de suero y proteínas animales. Las Expi293F presentan alta viabilidad, crecimiento acelerado y una fuerte capacidad de expresión bajo el promotor CMV.

Se mantienen en incubadoras con agitación orbital a 37 °C, 8% de CO₂ y 125 rpm (diámetro orbital de 25 mm).

6.8.8 Preparación de células y medio de cultivo

Las células se cultivaron en Expi293™ Expression Medium, un medio definido, libre de suero, diseñado específicamente para crecimiento celular y expresión de proteínas en suspensión. Para prevenir contaminaciones, se añadió un mix antibiótico-antimicótico en una dilución 1:100.

Las células se cultivaron en matraces Erlenmeyer plásticos de fondo redondo con tapa con filtro, adecuados para cultivo en suspensión y manteniendo condiciones estériles. Se mantuvieron entre 0.32×10^6 y 6×10^6 células/mL, y se pasaron cada 2–3 días con conteo en cámara de Neubauer y tinción con azul de tripán para verificar viabilidad celular.

Un día antes o el mismo día de la transfección, las células se ajustaron a una densidad de $2.5\text{--}3 \times 10^6$ células/mL en 30 mL de medio por matraz, asegurando una viabilidad superior al 95%. Las células se sembraron en matraces plásticos con tapa filtrante de 125 mL, y se mantuvieron bajo agitación en incubadora.

6.8.9 Transfección de 4-2B Foldoncys y 4-2B Foldoncys-FcRn-OT

La transfección se realizó utilizando las células Expi293F. Se utilizaron 30 µg de ADN plasmídico por cada 30 mL de cultivo y se diluyó en 1.5 mL de Opti-MEM (Invitrogen). Se mezclaron 80 µL de PEI 40 (polietilenimina de 40 kDa) 1.5 mL de Opti-MEM® en un tubo separado. Se combinaron ambas mezclas, se mezcló suavemente y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió lentamente al cultivo de 30 mL de células. Las células se mantuvieron en cultivo durante 5 a 7 días, con agitación constante. El sobrenadante se colectó por centrifugación a 350 x g por 5 minutos para separar las células con posterior centrifugación 4,000

× g por 15 minutos, se filtró con filtro de 0.22 µm y se almacenó a -20 °C o se procesó para purificación.

6.8.10 Purificación de Nanobodies

Los nanobodies fueron purificados por la columna de afinidad HisTrap Excel 1mL siguiendo el protocolo mencionado en la sección 5.5.3. Luego de eluir se realizó también un cambio de buffer en esterilidad para dejar las muestras en PBS 1X siguiendo el protocolo 5.5.4.

6.8.11 Caracterización estructural y funcional

Se analizaron las fracciones eluidas por SDS-PAGE 12,5% siguiendo el protocolo 5.5.6. La actividad funcional de los nanobodies fue evaluada mediante un ensayo de ELISA para determinar su reactividad con el antígeno CD40. Se siguió el mismo protocolo que para la expresión procariota (sección 5.5.5).

6.9 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES ASOCIADOS A IgG1 MURINA

Nanobodies D9 y 1-2B que reconocen distinto epítipo que 4-2B fueron clonados en vector pcDNA fusionados a un Fc IgG1 murino para generar las construcciones de la **figura 21**.

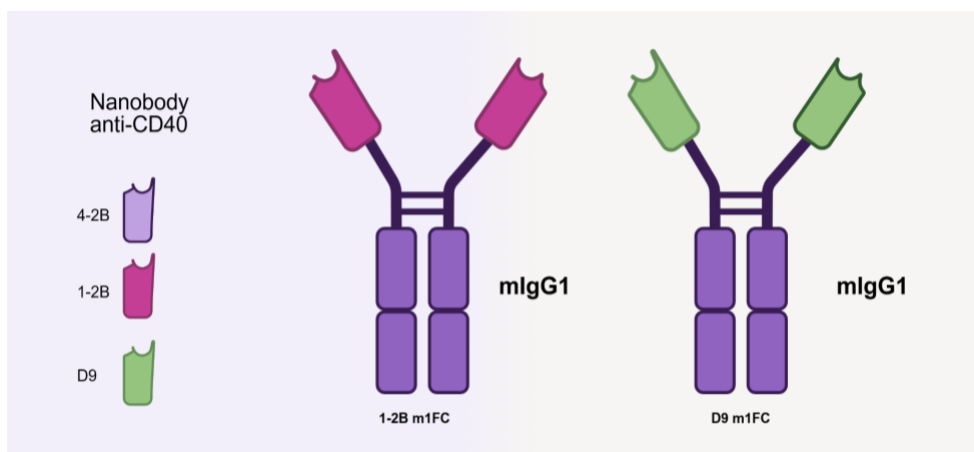


Figura 21. Diseño esquemático de construcciones de nanobodies anti-CD40 fusionados a Fc murino (m1Fc). Se muestran las construcciones monoespecíficas, en las que un único nanobody se encuentra fusionado al dominio constante de IgG1 murino (m1Fc), generando un formato bivalente.

El constructo Nb-m1Fc fue diseñado fusionando el gen del nanobody anti-CD40 al dominio Fc murino de isotipo IgG1, seguido de una etiqueta de histidina (6×His) en el extremo C-terminal para facilitar su purificación por afinidad a Ni-NTA.

Este diseño se seleccionó ya que el isotipo murino IgG1 (m1Fc) presenta baja afinidad por la proteína A, lo que hace ineficiente su recuperación mediante columnas basadas en este ligando.

Para estos constructos se utilizó la línea celular HEK293, esta es una cepa de células de riñón embrionario humano inmortalizadas. Cabe señalar la expresión de los constructos Nb-Fc se llevó a cabo en células HEK293, dado que en ese momento el sistema de expresión en células Expi293 aún no se encontraba implementado en el laboratorio. Una vez optimizadas las condiciones de transfección y cultivo en el sistema Expi, se utilizó esta plataforma para la producción de los nanobodies trimerizados (Nb-Foldon) como se explicita en la sección 5.7.8, debido a su mayor rendimiento y eficiencia de secreción.

6.9.1 Preparación de células y medio de cultivo

El medio completo utilizado para el cultivo de células HEK293 fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alto en glucosa, con piruvato de sodio y glutamina estable. Se suplementó con un 10% de suero fetal bovino (FBS), y un mix antibiótico-antimicótico para prevenir contaminación. Este medio es ideal para la proliferación y el mantenimiento de células adherentes, incluyendo células transformadas como HEK293, y se utiliza ampliamente en experimentos que incluyen transfecciones y estudios funcionales de proteínas.

Las células se cultivaron en frascos T25, T75 y T175, seleccionados según la escala de crecimiento y el requerimiento experimental, utilizando T25 para los mantenimientos iniciales, T75 para expansiones intermedias y T175 para alcanzar la densidad necesaria para las transfecciones a gran escala. El crecimiento de las células se realizó en incubadoras a 37°C y 5% de CO₂, monitoreando la confluencia y realizando pasajes cuando fue necesario.

6.9.2 Pasaje de células

Para la transfección fue necesario realizar varios pasajes con el fin de lograr el número de células y la confluencia óptima para la transfección. Se retiró y descartó el medio agotado y se agregó ½ volumen de cultivo de PBS 1X para lavar la superficie y eliminar restos de medio o metabolitos. Posteriormente, se descartó el PBS y se agregó tripsina al 0.12% con EDTA al 0.02% en PBS 1X, en un volumen equivalente al 10% del total (3 mL para una botella T175), con el fin de disgregar el monocapa celular. Se incubó a 37°C durante 5 minutos para des adherir las células.

Mediante el agregado de ½ del volumen de medio completo se detuvo la acción de la tripsina. Las células se transfirieron a tubos Falcon y se centrifugaron a 400 × g durante 5 minutos, para luego ser resuspendidas y contadas en cámara de Neubauer.

6.9.3 Transfección con ADN pcDNA-Nb-mIgG1

Las células HEK293 se cultivaron en frascos T175 y se transfectaron cuando alcanzaron una confluencia de aproximadamente 50–80%. Para cada frasco se utilizaron 36 µg de ADN plasmídico (pcDNA 1-2B y D9), incubados en DMEM con PEI en una relación 5:1 (PEI:ADN).

La mezcla se agregó al cultivo junto con 12 mL de medio completo y se incubó durante 4–6 horas, tras lo cual se reemplazó por 30 mL de medio fresco.

A las 48 horas post-transfección se realizó un cambio de medio y se colectó el sobrenadante correspondiente a ese período. Las células se mantuvieron en cultivo durante 3–5 días adicionales, momento en el que se colectó un segundo sobrenadante. Ambos se combinaron, centrifugaron ($350 \times g$, 5 min; luego $4000 \times g$, 15 min) y filtraron con un filtro de $0,22 \mu m$ para la posterior purificación.

6.9.4 Purificación por columna HisTrap y gel filtración

Para la purificación se utilizó una columna His-Trap Excel de 1 mL. Se siguió el mismo protocolo que la sección 5.5.3 pero utilizando el buffer de unión para Histrap-Excel.

Las proteínas eluidas se sometieron a un cambio de buffer por gel filtración, realizado bajo condiciones estériles, para obtener las muestras en PBS 1X. Posteriormente, se caracterizaron por SDS-PAGE y ELISA, revelando las placas con un anticuerpo anti-mIgG1 conjugado a HRP.

6.10 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES BIPARATÓPICOS

A partir de los nanobodies que poseen diferente sitio de unión en CD40 se generaron anticuerpos tetravalentes mono y biparatópicos (**Figura 22**).

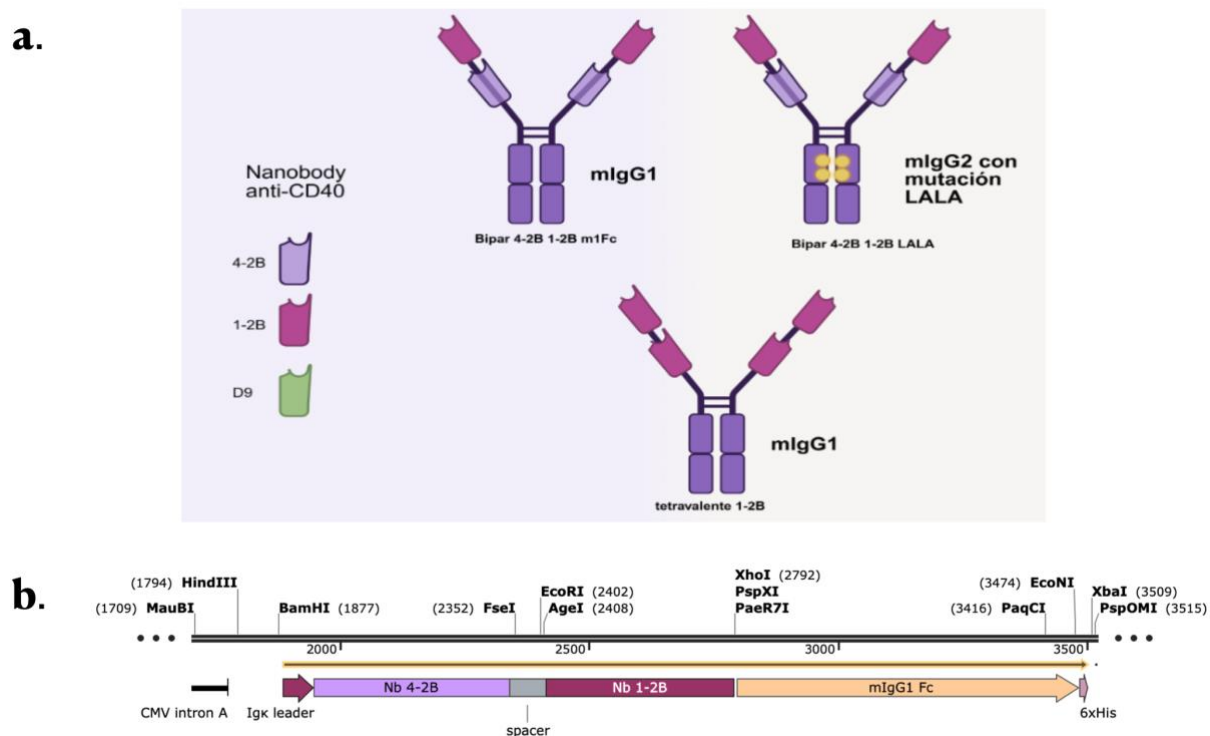


Figura 22. Esquema de formatos biparatópicos de nanobodies anti-CD40 fusionados a dominios Fc murinos. a) Se representan diferentes estrategias de diseño biparatópico: (i) fusión a IgG1 murina, (ii) fusión a IgG2a murina con mutación LALA (minimizando la interacción con FcγR), y (iii) un control tetravalente monoespecífico con el mismo Nb repetido en tándem (1-2B-1-2B), sin diversidad paratópica. b) Secuencia lineal esquemática de la construcción general pcDNA-Nb1-Nb2-mIgG1

6.10.1 Clonación del inserto 1-2B en el vector de nanobodies biespecíficos

El inserto 1-2B fue clonado entre los sitios SfiI del vector de clonación pcDNA-Nb1-Nb2-mIgG1 Fc-6His con Intrón A y pcDNA-Nb2-mIgG2a Fc LALA-6His con Intrón A. Estos vectores contienen regiones Fc de inmunoglobulinas murinas que permiten evaluar la funcionalidad de los nanobodies biparatópicos, diferenciando entre las variantes m1Fc IgG1 (funcional) y m1Fc IgG2a LALA (mutada para inhibir la interacción con los receptores FcRγIIB y otros).

El inserto 4-2B fue anteriormente clonado entre los sitios EcoRI y XhoI del vector correspondiente y entre los sitios SfiI se encuentra un clon irrelevante para nuestro análisis.

Se generó también una versión tetravalente monoespecífica del nanobody 1-2B, clonando el mismo inserto entre los sitios EcoRI y XhoI del vector que ya contenía 1-2B entre los SfiI. Este constructo permitirá evaluar si el aumento de la valencia, en ausencia de biparatopidad, es suficiente para mejorar la actividad agonista, o si es necesario el reconocimiento simultáneo de dos epítomos distintos para potenciar la señalización mediada por CD40.

Las digestiones y ligaciones se realizaron según las recomendaciones del fabricante (NEB), y las construcciones obtenidas se transformaron en *E. coli* DH5α (ver 5.7.4). Las colonias seleccionadas se verificaron por secuenciación, y los clones correctos se emplearon para la expresión en células HEK293 (ver Sección 5.8).

6.10.2 Purificación de los nanobodies Biparatópicos

La purificación del biparatópico y del tetravalente asociados a mIgG1 se realizó en columnas His-Trap Excel de 1mL al igual que los nanobodies monoespecíficos fusionados a IgG1 murina (5.8.4).

Para la construcción con la mutación LALA, al carecer de cola de Polyhis, se purifica por columna de Proteína A. Luego de equilibrar la columna con 5 volúmenes de PBS1X se pasó la muestra filtrada por 0.22 μm y se realizaron lavados de 50 volúmenes de PBS1X-tritón para remover endotoxinas y 20 volúmenes de PBS-1X apirógeno. La elución se realizó en dos pasos con los Buffer pH 4.5 y 3.0 y las fracciones se colectaron en tubos de microcentrífuga con 30 uL de Buffer Tris-HCl pH=9.

A su vez ambas construcciones se les realizó el cambio de Buffer a PBS 1X por columna de Gel Filtración.

Luego de la purificación, la funcionalidad de los constructos biparatópicos se evaluó mediante un ELISA de unión simultánea, diseñado para determinar si el nanobody es capaz de reconocer dos epítomos diferentes del CD40 al mismo tiempo.

En el primer ensayo, los pocillos de una placa ELISA se sensibilizaron con CD40 recombinante y se incubaron con anticuerpos monoespecíficos fusionados a IgG1 humana a una concentración constante que asegurara saturación del antígeno. Posteriormente, se incubó con el nanobody biparatópico, con el objetivo de analizar su capacidad de unirse simultáneamente a un segundo epítomo presente en la misma molécula de CD40.

La detección se realizó utilizando un anticuerpo anti-IgG1 murino conjugado a HRP (dilución 1:5000, BETHYL A90-105P). Finalmente, se añadió el sustrato para peroxidasa, se permitió el desarrollo de la reacción colorimétrica y la absorbancia se midió en un lector de placas a 450 nm.

En un segundo ensayo, los pocillos se sensibilizaron nuevamente con CD40, pero en la primera incubación se añadió el nanobody monoespecífico 1-2B. En la segunda incubación, se evaluó la unión de distintos constructos: el nanobody biparatópico, el nanobody biespecífico que contiene únicamente el dominio 4-2B, y un nanobody irrelevante no específico para CD40. La comparación de las señales obtenidas permitió discriminar la unión específica de la no específica y determinar la capacidad diferencial de los constructos para reconocer epítomos independientes.

6.10.3 Análisis de unión de epítomos por Interferometría de biocapa

La interferometría de biocapa (Biolayer interferometry (BLI)) es una técnica que mide la interacción en tiempo real entre dos biomoléculas. La técnica permite determinar la afinidad de unión antígeno-anticuerpo proporcionando datos sobre la constante de equilibrio de disociación (K_d) y las constantes cinéticas.

El antígeno CD40 se inmovilizó en un biosensor amino-reactivo de segunda generación (AR2G Sartorius) siguiendo el siguiente protocolo.

Para la inmovilización del antígeno se utilizó el programa de inmovilización del equipo BLItz. Primero se estableció una línea base inicial con agua ultrapura (H_2O mq) durante 30 segundos. Posteriormente, se llevó a cabo la activación del sensor incubándolo durante 300 segundos con la solución de inmovilización compuesta por EDC 20 mM y NHS 10 mM preparados en buffer acetato 10 mM, pH 5,0. Luego, se realizó una nueva línea base en agua ultrapura durante 30 segundos y a continuación se inmovilizó el CD40 recombinante a una concentración de 40 μ g/mL en el mismo buffer acetato durante 600 segundos. Finalmente, se bloqueó la superficie con una mezcla de 60 μ L de etanolamina 1 M y 940 μ L de Tris 1 M pH 8,0, para bloquear los grupos reactivos remanentes y prevenir uniones no específicas.

Para evaluar la competencia entre los nanobodies, se empleó un programa de binning optimizado en el grupo de trabajo. En primer lugar, se estableció una línea base en Kinetic Buffer (PBS 1X, 0,02% Tween-20, 0,1% BSA, 0,05% NaN₃) durante 30 segundos, repetida dos veces. Luego, se realizaron las etapas de asociación, en las cuales cada nanobody se aplicó de manera secuencial durante 120 segundos, variando el orden de exposición según la interacción que se deseaba analizar. Este diseño experimental permitió determinar si los nanobodies se unen simultáneamente al CD40 o si compiten por el mismo sitio de unión.

6.11 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AGONISTA DE LOS NANOBODIES ANTI-CD40 IN-VITRO

6.11.1 Estimulación de esplenocitos in-vitro

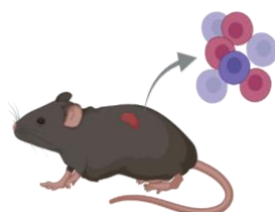


Figura 23. Esquema representativo de la extracción del bazo y la obtención de esplenocitos para su posterior estimulación *in vitro*

Se extrajo el bazo de un ratón hembra de la cepa C57BL/6 (**Figura 23**), se procesó el tejido entre dos mallas de 84 μm en 3 mL de medio RPMI 1640 para obtener una suspensión celular. Se centrifugó a 350g por 5 minutos y se resuspendió el pellet en 2 mL de solución de lisis de eritrocitos, la cual se detiene con el agregado de 20 mL de RPMI con posterior centrifugación a 350 g por 5 minutos. Las células obtenidas se resuspendieron en medio RPMI completo para su posterior conteo. Teniendo la concentración celular calculada se cultivaron 1 millón de células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (NUNC), sembrando 100 μL de suspensión celular por pocillo. Posteriormente, se agregaron los estímulos correspondientes a distintas proteínas recombinantes con nanobodies anti-CD40 en concentraciones equimolares en un volumen de 50 μL y se incubaron las placas durante 48 horas a 37 °C, 5 % CO₂.

6.11.2 Tinción de citometría

Para la tinción de citometría se emplearon placas de 96 pocillos con fondo en V, facilitando los lavados y centrifugaciones necesarios. Las células estimuladas se pasaron a su pocillo correspondiente de la placa con fondo en V y se centrifugaron a 350 g por 5 minutos a 4 grados. Se realizó un lavado con PBS 1X (100 μL por pocillo), se centrifugó a 350 g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se utilizó la sonda de viabilidad ZOMBIE AQUA (BioLegend, Cat N°. 423101) en una dilución 1:200 en PBS 1X, agregando 10 μL por pocillo e incubando durante 10

minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. A continuación, se bloquearon los receptores de Fc para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos de citometría mediante la adición de 15 µL de suero normal de rata (SNR) al 10% en buffer FACS y se incubó durante 20 minutos en hielo. El marcaje para la citometría se realizó con 25 µL de una mezcla de anticuerpos asociados a fluorocromos específicos para los marcadores de interés. En este experimento se utilizaron anti-B220-APC-Cy7 (BioLegend, Cat. N° 103224, dilución 1:200) para identificar linfocitos B, anti-CD3-PerCP-Cy5.5 (BioLegend, Cat. N° 100328, dilución 1:200) para linfocitos T, e ICAM-1-PE (BioLegend, Cat. N° 116107) y CD86-BV421 (BioLegend, Cat. N° 105031) ambos a una dilución 1:100, como marcadores de activación de linfocitos B. Las muestras se incubaron durante 45 minutos en hielo, protegidas de la luz, y se realizaron tres lavados sucesivos con buffer FACS mediante centrifugaciones de 5 minutos a 350 g para eliminar el exceso de anticuerpos. Finalmente, las células teñidas se resuspendieron en 100-150 µL de FACS para el análisis por citometría.

6.11.3 Análisis por citometría de Flujo

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo BD FACSCanto™ (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo™ (versión 10, BD Biosciences).

Las estrategias de *gating* (**Figura 24**) utilizadas en el análisis por citometría de flujo para evaluar la activación de linfocitos B incluyen los siguientes pasos:

1. Diferenciar la población de células y singuletes: Primero se delimita la población de células en base a los parámetros de dispersión (FSC vs SSC), excluyendo residuos. Luego, se seleccionan los singuletes mediante FSC-A vs FSC-H para eliminar agregados celulares y analizar solo eventos individuales.
2. Viabilidad: La sonda Zombie Aqua (Biolegend) que emite fluorescencia para BV510-A se emplea para determinar la viabilidad celular. Las células negativas para la sonda son viables, ya que esta solo penetra en las células muertas.
3. Exclusión de células T: Se utiliza el marcador B220 conjugado APC-Cy7 para identificar específicamente las células B, en conjunto con el marcador CD3 conjugado a PerCP-Cy5 que nos indican la población de células T. A partir de la población B220 positivas/CD3 negativas se permite separar a las células B de otras poblaciones no deseadas.
4. Análisis de marcadores de activación: Dentro de la población de células B vivas, se evaluó la expresión de marcadores de activación mediante histogramas de fluorescencia. Dependiendo del experimento, se utilizó un anticuerpo **ICAM-1-PE** o **CD86-BV421**. Para definir con precisión la población positiva, se aplicó

un control FMO (fluorescence minus one), permitiendo discriminar células con expresión específica del marcador de activación correspondiente. Los valores de intensidad de fluorescencia se obtuvieron utilizando el parámetro GeoMean (geometric mean fluorescence intensity), que refleja la expresión media del marcador dentro de la población analizada.

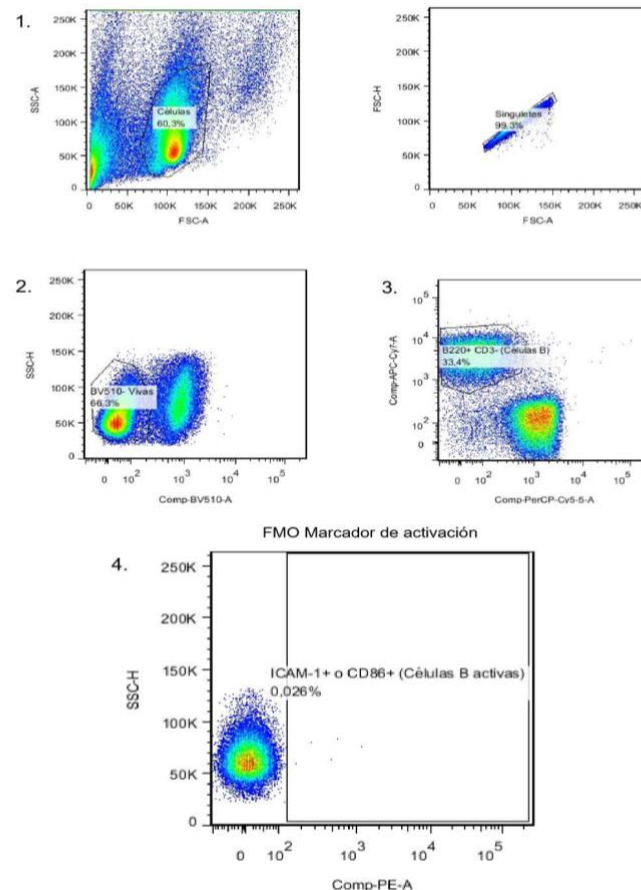


Figura 24. Estrategia de *gating* en software Flowjo para el análisis de activación de células B de esplenocitos de ratón. Se ilustra la estrategia de *gating* para seleccionar la población celular correspondiente a las células B activas. La estrategia y los ejes se describen en el texto anterior.

6.12 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ADYUVANTE DE NANOBODIES ANTI-CD40 ASOCIADOS A FOLDON

Con el fin de evaluar el potencial *in vivo* de las nuevas construcciones de nanobodies se procedió a un ensayo *in vivo* optimizado por la Lic. Carolina Padula anteriormente.

6.12.1 Inmunización y obtención de muestras séricas

Se inmunizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 (n = 3 por grupo) con 5 ug de una químera anti-CD11c-OVA (Nb_{CD11c}-h1Fc-OVA) como antígeno y como agentes adyuvantes se utilizaron las distintas construcciones:

- G1: 4-2B Foldoncys, 30 µg.
- G2: 4-2B Foldoncys-FcRn-OT, 30 µg.
- G3: 4-2B m1Fc, 20 µg, como grupo control positivo.
- G4: 4-2B Foldoncys-FcRn-OT sin antígeno, 30 µg para evaluar la respuesta T producida por los epítopes T de los péptidos OT.

Dado el menor peso molecular de las construcciones Foldon en comparación con los formatos Fc, esto representa una dosis molar considerablemente mayor.

Las preparaciones se administraron en el lomo por vía subcutánea en un volumen final de 150 µL en PBS apirógeno. Al día 7 post-inmunización, los animales fueron sometidos a eutanasia humanitaria, tras lo cual se obtuvo sangre por punción cardíaca y se recuperó el bazo para el posterior aislamiento de esplenocitos y análisis inmunológico.

6.12.2 Determinación de títulos de anticuerpos y subclases por ELISA

Se evaluaron los niveles de IgG totales y las subclases IgG1, IgG2c, IgG2b e IgG3 específicas contra el antígeno ovoalbúmina mediante ELISA indirecto. Las placas de alta unión se recubrieron con OVA (Sigma, Cat. N° A5503) a una concentración de 10 µg/mL en PBS y se incubaron toda la noche a 4 °C. Tras el bloqueo por 30 min a 37°C con BSA 1%, se incubaron diluciones seriadas 1/3 de suero (punto inicial 1:100) en duplicado. La detección se realizó con anticuerpos secundarios anti-IgG total de ratón (Jackson ImmunoResearch, Cat N° 1115035062, dilución 1/10000) o anti-subclases conjugados biotina (dilución 1/5000), IgG1-biot (Southern Biotech, 1070-08), IgG2b-biot (Southern Biotech, 1090-08), IgG2c-biot (Southern Biotech, 1079-08), IgG3-biot (Southern Biotech, 1100-08). Para los anticuerpos biotinilados se agregó un paso de incubación con estreptavidina-HRP (dilución 1/5000). Se reveló con TMB y midió la absorbancia a 450 nm en el lector de placas FLUOstar.

Los títulos de anticuerpos IgG totales se calcularon a partir de las curvas de dilución obtenidas por ELISA. Se consideró como título la dilución que alcanzó un valor de absorbancia equivalente al 10 % de la señal máxima obtenida en el ensayo con un suero conocido a una concentración saturante.

6.12.3 Evaluación de respuesta de células T citotóxicas por ELISpot

La respuesta celular inducida se evaluó mediante ELISpot, cuantificando esplenocitos productores de IFN-γ tras estimulación *ex vivo* con péptidos derivados del antígeno (OVA). Las placas *MILLIPORE MultiScreen Immobilon Filtratton Plates de PVDF MAIP N45 96 wells* fueron activadas con etanol 70%, lavadas con H₂O, sensibilizadas con anticuerpo de captura anti-IFN-γ (BioLegend, Cat. N° 505702, 4 µg/mL) ON a 4°C y bloqueadas con PBS-BSA 1% 2hs a 37° C, todas estas soluciones estériles y filtradas por 0.22. Los esplenocitos de cada ratón, obtenidos tras

lisis de eritrocitos y filtración por malla de 0.84 μm , se sembraron en presencia o ausencia de estímulo (péptido SIINFEKL 1 $\mu\text{g/mL}$) y se incubaron 20 horas a 37 °C 5% CO_2 . El péptido SIINFEKL es reconocido por linfocitos T CD8⁺ en ratones de la cepa C57BL/6 y es presentado en MHC-I por lo que funciona para caracterizar la respuesta T citotóxica de aquellas células previamente activadas por la inmunización.

Tras la incubación, las placas se lavaron para eliminar las células adheridas, realizando siete lavados de dos minutos con 200 μL de PBS–Tween 0,05% filtrado por 0,22 μm . Las células secretoras específicas se detectaron incubando con el anticuerpo anti-IFN- γ biotinilado (BioLegend, Cat. N° 505804, 4 $\mu\text{g/mL}$) 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se repitieron siete lavados de dos minutos con la misma solución de PBS–Tween 0,05%, y se añadió el conjugado estreptavidina–fosfatasa alcalina (dilución 1:2000 en PBS filtrado), incubando durante una hora a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron nuevamente cinco veces con PBS–Tween 0,05%, seguidas de un lavado con PBS y un último lavado con agua filtrada, asegurando limpiar ambos lados de la membrana tras retirar la base de la placa. Finalmente, se realizó el revelado con la solución de sustrato BCIP/NBT, preparada mezclando 12 mL de buffer FA, 79 μL de NBT (50 mg/mL en DMF 70%) y 40 μL de BCIP (50 mg/mL en DMF 100%). Se añadieron 100 μL por pocillo y las placas se incubaron durante aproximadamente 15 minutos, controlando la formación de los *spots*. La reacción se detuvo lavando con agua destilada filtrada, y las placas se dejaron secar antes de la cuantificación.

Los spots se cuantificaron mediante un lector automatizado (ImmunoSpot CTL S6 FluoroSpot Analyzer) y se expresaron los resultados como número de spots por número de células sembradas (4×10^5 o 2×10^5 por pocillo).

Es importante mencionar que los procedimientos que implicaron la manipulación de animales fueron realizados por mi co-tutora la Lic. Carolina Padula que cuenta con la acreditación correspondiente por parte de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Dichos procedimientos se realizaron bajo el protocolo aprobado N.º **070151-000022-25**.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de potenciar la actividad agonista de los nanobodies anti-CD40 y superar las limitaciones relacionadas con su diseño, afinidad o dependencia del dominio Fc, nos propusimos explorar diversas estrategias de ingeniería molecular. En particular, implementamos enfoques que incluyeron la generación de formatos multivalentes, la fusión con dominios Fc y generación de anticuerpos biparatómicos.

7.1 GENERACIÓN DE NANOBODIES TRIMÉRICOS ASOCIADOS A FOLDON

7.1.1 Versión completa: Nanobody 4-2B-foldon-cys-FcRn-OTs

A vistas de que la proteína ya había sido expresada y se había congelado el lisado bacteriano se procedió a la purificación del nanobody mediante cromatografía por afinidad a níquel (HisTrap); sin embargo, los resultados fueron desalentadores. En las fracciones eluidas no se detectó proteína mediante espectrofotometría UV (Nanodrop), lo cual podría deberse a distintos factores, como una baja expresión del constructo, una ineficiente retención de la proteína en la columna u otras pérdidas durante el proceso de purificación.

Para evaluar si el problema era la unión a la columna, se realizó un ELISA de reactividad frente al ectodominio recombinante de CD40. Utilizando una curva de calibración previamente establecida para esta construcción (**Figura 25**), se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos para distintas fracciones del proceso de purificación (lisado celular sin purificar, fracción no unida y lavado).

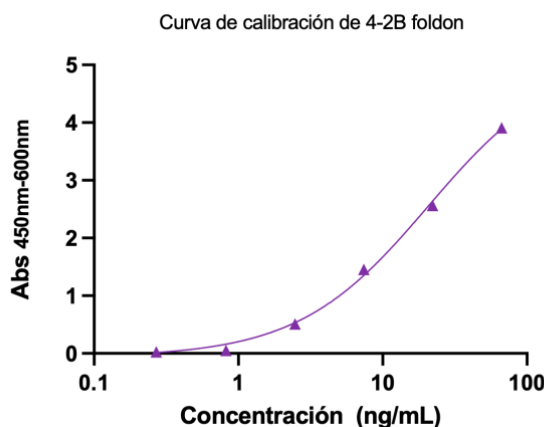


Figura 25. Curva de calibración para 4-2B foldon. Reactividad por ELISA contra el ectodominio de CD40 a concentraciones crecientes del Nanobody 4-2B foldon generado y expresado por el grupo de trabajo.

A partir de la curva de dilución mostrada en la **Figura 25**, y utilizando el rango lineal de la misma, se interpolaron con un intervalo de confianza del 95% los valores de absorbancia obtenidos para cada fracción (**Tabla 1**) con el fin de estimar la concentración de proteína reactiva presente en el sobrenadante previo a la purificación y en las fracciones obtenidas durante el proceso.

Se estimó que el lisado celular previo a purificar contenía 463 µg/mL de proteína reactiva. Al pasarlo por la columna se detectaron 147,6 µg/mL de proteína con reactividad por CD40 en el flowthrough y 0,104 µg/µL en la fracción de lavado, confirmando que la mayor parte de la proteína no fue retenida en la resina de afinidad.

Tabla 1. Valores de absorbancia (450 nm) obtenidos por ELISA para distintas diluciones del sobrenadante previo a la purificación, el *flowthrough* y la fracción de lavado.

Factor de dilución	Sobrenadante	Flowthrough	Lavado
10			1,902
100			0,213
1000	3,038	3,067	0
10000	2.854	2,021	0
100000	0,936	0,317	0
1000000	0,16	0,092	0

Con el objetivo de recuperar proteína funcional presente en el *flowthrough* (FT), se procedió a re-purificar esta fracción utilizando condiciones menos competitivas, mediante la reducción de la concentración de imidazol. Sin embargo, el análisis por SDS-PAGE (**Figura 26**) reveló la presencia de contaminantes en los eluidos y no se observa una banda en el PM correspondiente al tamaño del constructo monomérico (26,4kDa). Adicionalmente, al evaluar la reactividad frente a CD40, se observó una señal muy baja en las fracciones eluidas, mientras que la fracción de *flowthrough* continuó presentando una señal elevada, sugiriendo una baja eficiencia de retención de la proteína por parte de la columna (Anexo, **Figura A1**).

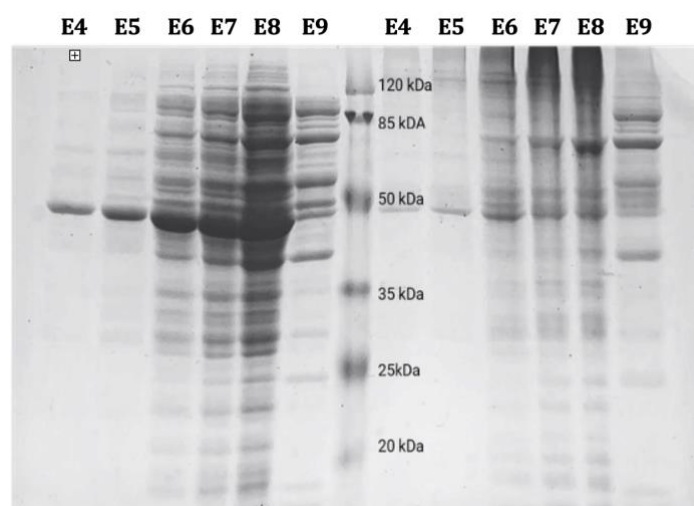


Figura 26. Análisis de expresión y solubilidad del constructo 4-2B Foldoncys-FcRn-OT. Fracciones E4-E9 eluidas con tratamiento reductor y a la derecha sin reductor.

Por esta razón hipotetizamos que de alguna forma los péptidos localizados en el C-terminal del foldon estarían interfiriendo en la exposición de la cola de histidina y por ende la capacidad de unión a la columna His-trap. Como alternativa nos planteamos purificar el constructo utilizando una columna de afinidad específica para el dominio VH3 (VH3 MabSelect). Por otro lado, buscamos generar versiones truncadas, una de ellas eliminando los péptidos OTs y otra eliminando ambos péptidos (afín a FcRn y OTs). Estos nos permitiría conservar la región activa (Nb anti-CD40-foldón) en formatos más simples que pudiesen facilitar la expresión y purificación

7.1.2 Versión 4-2B Foldoncys-FcRn, 4-2B Foldoncys y 1-2B Foldoncys-FcRn

A partir del vector original se generó primero una variante sin los péptidos OTI y OTII, mediante digestión con EcoRI (4-2B Foldoncys-FcRn). La linealización observada en el gel de agarosa y la secuenciación posterior confirmaron la eliminación completa de ambas secuencias, obteniéndose así un vector base adecuado para la construcción de las versiones posteriores (Figura 27).

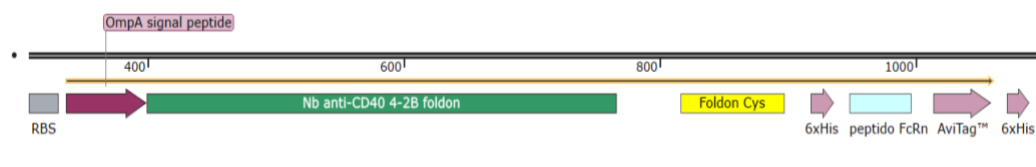


Figura 27. Secuencia esquemática correspondiente a clones sin OTs obtenidas por digestión enzimática con EcoRI. Secuencia enviada por MacroGen, correspondiente al constructo sin los péptidos OTs

Sobre esta base, se diseñó el constructo 4-2B Foldoncys, en el cual se conservó únicamente el nanobody 4-2B fusionado al dominio foldon con las sustituciones en cisteínas. La digestión con KpnI permitió remover el péptido afin a FcRn, y la secuenciación de las colonias seleccionadas confirmó la presencia de la secuencia correcta sin mutaciones indeseadas (**Figura 28**).



Figura 28. Secuencia esquemática correspondiente a clones sin péptido de unión a FcRn obtenidas por digestión enzimática con KpnI. Secuencia enviada por MacroGen, correspondiente al constructo sin los péptidos, construcción más sencilla

Finalmente, se generó la variante **1-2B Foldoncys-FcRn** mediante reemplazo del nanobody 4-2B por 1-2B usando digestión con SfiI. El inserto purificado y el vector base fueron ligados exitosamente, y la secuenciación confirmó la inserción precisa del nanobody 1-2B en el marco de lectura del constructo FcRn.

En conjunto clonar estas tres construcciones nos permitió trabajar con variantes estructuralmente comparables y orientar el diseño del Nb-foldon hacia la construcción más prometedora.

7.2 PRUEBAS DE EXPRESIÓN DE 4-2B FOLDON-CYS-FcRn-OT Y 4-2B FOLDON-FcRn EN *E. COLI*

Se realizaron ensayos de expresión para ambos constructos: la versión original (**4-2B Foldoncys-FcRn-OT**) y la versión sin los péptidos de OVA (**4-2B Foldoncys-FcRn**), con el objetivo de optimizar las condiciones de expresión en un sistema procariota, en la cepa BL21 de *E. coli*. Las condiciones evaluadas incluyeron tres concentraciones de IPTG (2, 10 y 50 μ M), combinadas con dos regímenes de incubación: a 28 °C durante la noche (ON) y a 37 °C durante 4 horas.

Tras el periodo de inducción, los cultivos fueron lisados por shock osmótico y las proteínas recombinantes fueron parcialmente purificadas utilizando mini columnas de afinidad Ni-NTA. Se recolectaron tanto alícuotas del sobrenadante de lisis (muestras no purificadas) como fracciones eluidas, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE para evaluar la calidad de la expresión y purificación.

El análisis por SDS-PAGE del sobrenadante de lisis reveló una alta concentración de proteínas totales; sin embargo, en las fracciones purificadas no se detectaron bandas definidas que indicaran una purificación exitosa del constructo de interés (Anexo, **Figura A2**). Esto sugirió que la proteína recombinante no se encontraba en forma soluble en el sobrenadante, sino probablemente en cuerpos de inclusión.

Ante esta posibilidad, se repitió el procedimiento de lisis utilizando el buffer B-PER, el cual lisa completamente las células en contraste al shock osmótico que nos permite solo obtener proteínas del periplasma, y así logrando obtener fracciones con mayor proporción de proteína soluble (**Figura 29**). Para considerar que la proteína se encontrara en cuerpos de inclusión, se trató la fracción insoluble con una solución de urea 8 M, permitiendo así la recuperación de proteínas presentes en dicha fracción.

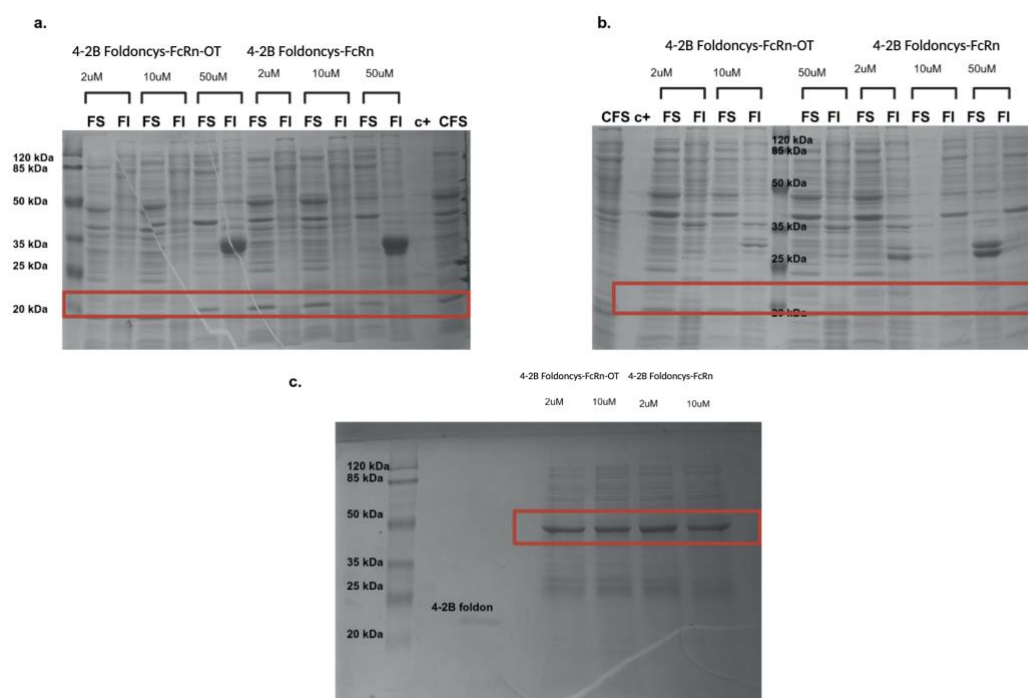


Figura 29. Análisis de expresión y solubilidad de los constructos 4-2B-Foldoncys y 4-2B-Foldoncys-FcRn.

(a) Expresión a 28 °C y (b) a 37 °C, evaluadas mediante SDS-PAGE con tratamiento reductor. Se muestran las fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) obtenidas tras lisis con B-PER y tratamiento con urea. CFS corresponde al control no inducido de la fracción soluble. (c) Purificación por afinidad a níquel (Ni-NTA) de ambos constructos inducidos a 28 °C, comparando dos concentraciones de IPTG (2 μM y 10 μM).

Los geles correspondientes a las fracciones solubles e insolubles obtenidas tras la lisis con B-PER mostraron una banda definida en torno a ~20 kDa en las condiciones de inducción a 28 °C (**Figura 29.a**), mientras que a 37 °C (**Figura 29.b**) esta señal no se detectó con claridad. Si bien este tamaño se encuentra dentro del rango esperado para los constructos, la misma banda también aparece en el control sin inducir, lo que indica que podría corresponder a una proteína endógena de *E. coli* y no necesariamente al producto recombinante.

Por otro lado, tanto en los extractos como en el eluido de la purificación por Ni-NTA realizada tras inducción a 28 °C (**Figura 29.c**) se observó consistentemente una banda intensa alrededor de ~45 kDa, que resulta ser la especie mayoritaria que se purifica bajo estas condiciones. Dado que este tamaño no coincide con el peso molecular esperado del constructo, es altamente probable que esta señal corresponda a una proteína endógena con afinidad por la resina, y no al nanobody.

En conjunto, la presencia simultánea de una banda de ~20 kDa no concluyente y de otra banda dominante de ~45 kDa que no corresponde al constructo impidió obtener información clara sobre la expresión del 4-2B Foldoncys-FcRn a pequeña escala. Por este motivo, decidimos avanzar directamente a una expresión a gran escala, seleccionando la condición que mostró el patrón más prometedor, 28 °C y 10 µM de IPTG, con el objetivo de intentar recuperar el constructo mediante una purificación optimizada.

7.3 EXPRESIÓN A GRAN ESCALA Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES ANTI-CD40 FUSIONADOS A FOLDON

Luego de las pruebas de expresión se escaló la misma a una producción mayor de los constructos teniendo en cuenta las condiciones de expresión, lisis y purificación más favorables (**28 °C y 10 µM de IPTG**). Dado que la purificación por IMAC mostraba un rendimiento bajo o nulo (ver sección 6.1.1), decidimos implementar un protocolo basado en cromatografía de afinidad usando la resina MabSelect™ VH3 de Cytiva.

Al comparar la secuencia del clon 4-2B con los motivos conservados descritos para las secuencias germinales de la familia VH3, se observaron coincidencias en regiones del marco FR1, particularmente con el motivo **EVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSC**, característico de este subgrupo (109). Estas similitudes sugieren que el nanobody comparte determinantes estructurales suficientes para ser reconocido por el ligando de proteína A modificado de la resina, lo que respalda su uso para la purificación específica de esta construcción.

7.3.1 Versión 4-2B Foldoncys-FcRn

En vista de los resultados obtenidos en las pruebas de expresión y considerando la mayor simplicidad estructural del constructo sin los péptidos OTs, se procedió a escalar la producción de dicha quimera en cultivos de 250 mL, induciendo ON a 28°C con 10 µM de IPTG, con el objetivo de obtener una mayor cantidad de proteína para análisis posteriores.

La lisis celular se realizó mediante shock osmótico y los sobrenadantes fueron purificados mediante cromatografía de afinidad específica al dominio VH3.

Se recolectaron 15 fracciones eluidas que fueron analizadas por SDS-PAGE (**Figura 30**). En el gel se detectó una banda minoritaria similar al peso molecular esperado para la proteína recombinante. Sin embargo, también se observó una banda mayoritaria de menor peso molecular, lo que sugiere la posible presencia de una forma degradada del constructo.

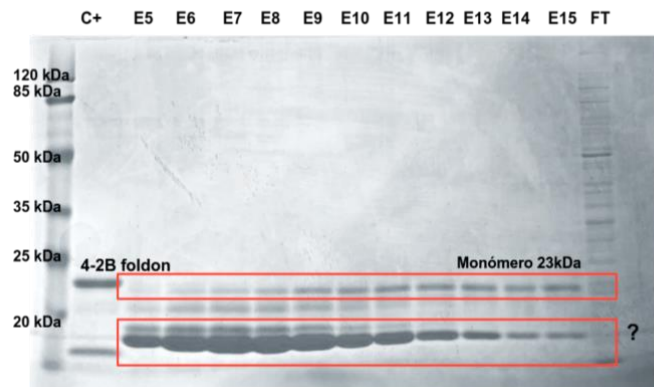


Figura 30. SDS-PAGE reductor 12.5% de la purificación del constructo 4-2B Foldoncys-FcRn. Fracciones eluidas y flowthrough, control positivo correspondiente a 4-2B foldon (sin cisteínas) producido previamente por el grupo de trabajo.

Adicionalmente, las fracciones obtenidas tras la purificación por afinidad a VH3 fueron evaluadas por su capacidad de reconocimiento a CD40 mediante ELISA revelando con un anti-VHH (**Figura 31**). Se realizaron curvas de unión con diluciones seriadas 1/10 de los pools de fracciones E5-E7, E13-E15 y control. Todas las fracciones mostraron reactividad frente a CD40. Sin embargo, las fracciones E13-E15, que presentaban menor grado de degradación aparente en SDS-PAGE, exhibieron una respuesta ligeramente inferior al compararse con E5-E7 y con el control positivo correspondiente a la versión original del constructo.

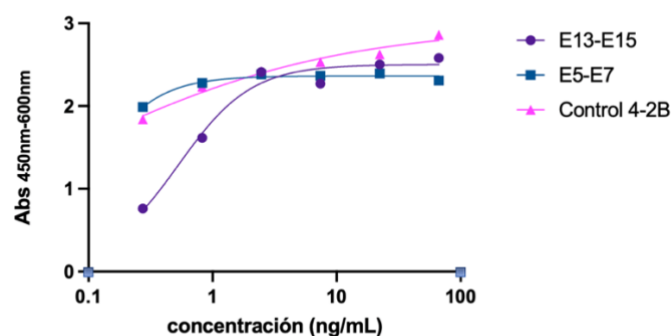


Figura 31. Reactividad funcional de las fracciones purificadas frente a CD40. Eje x corresponde a las diluciones seriadas 1/10 a partir de 200 ng/uL de las fracciones 13-15 con menor grado de degradación, 5-7 con mayor grado de degradación y control positivo (+) correspondiente al 4-2B Foldon sin cisteínas.

Estos resultados permiten inferir que la banda observada en el gel corresponde al nanobody (Nb) de interés, el cual conserva, al menos parcialmente, su capacidad de unión al antígeno. No obstante, este análisis no permite confirmar el estado estructural completo del resto de la proteína

de fusión. Es decir, aunque la porción del sitio de unión del nanobody parece funcional, no puede asegurarse que el resto del constructo esté íntegro.

Como solución a este conflicto se realizó una nueva expresión a gran escala con la diferencia de que al lisado se lo trató con inhibidores de proteasas para evitar la degradación. Específicamente, se adicionaron PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) y EDTA al buffer de lisis para la mitad del cultivo generado, para inhibir serina proteasas y metaloproteasas, respectivamente. Simultáneamente, la mitad del cultivo fue tratada con un cóctel comercial de inhibidores de proteasas (Roche, 14584200) junto con EDTA, permitiendo comparar el efecto de ambos tratamientos sobre la estabilidad de la proteína.

En el gel de SDS-PAGE 12.5% realizado luego de purificar la proteína se observó que en el tratamiento con el cóctel inhibidor la degradación persistió, ya que se evidencia una banda mayoritaria en un PM menor del esperado y correspondiente con la supuesta degradación (**Figura 32.a**). No obstante, bajo condiciones no reductoras (**Figura 32.b**), se evidenció que el nanobody conserva su capacidad de oligomerización, observándose la formación de dímeros y, en menor proporción, oligómeros de mayor tamaño. Esto sugiere que la modificación estructural introducida en el dominio foldon cumplió parcialmente su objetivo, permitiendo la multimerización del nanobody a través de enlaces disulfuro.

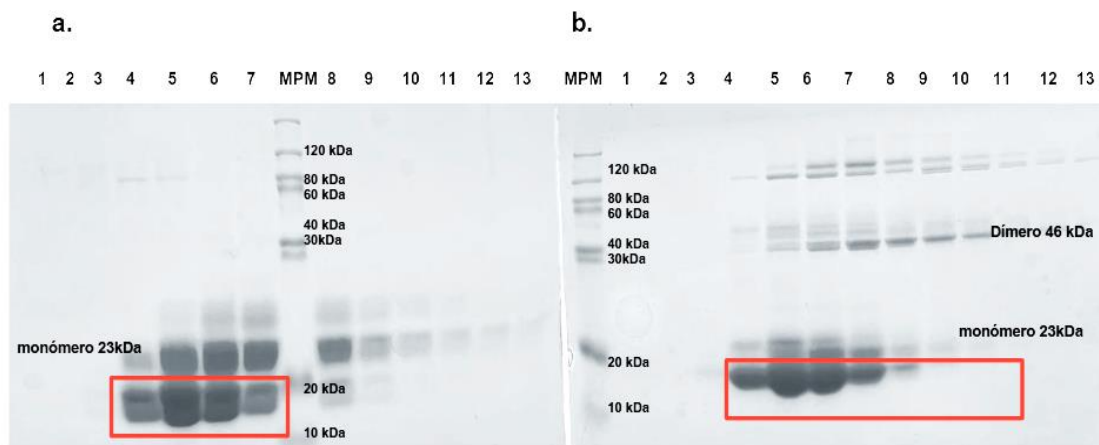


Figura 32. SDS-PAGE 12.5% de la purificación del constructo 4-2B Foldoncy-FcRn con tratamiento con inhibidores de proteasas. Fracciones obtenidas tras la purificación del constructo 4-2B Foldoncy-FcRn, expresado a gran escala y tratado con cóctel inhibidor de proteasas y EDTA durante la lisis. **a)** bajo condiciones reductoras (β -mercaptoetanol) **b)** no reductoras (sin β -mercaptoetanol). En rojo se destaca la banda de menor peso molecular correspondiente a una supuesta degradación.

Para el tratamiento con PMSF (**Figura 33**) se observa una mejora en el perfil de bandas, con reducción de productos de degradación en comparación con expresiones previas sin inhibidores. Se observó que las fracciones con mayor concentración de proteína total presentaban también una mayor proporción de producto degradado. En contraste, las fracciones correspondientes a las

fracciones eluidas E9–E12 mostraron un perfil más limpio, con menor presencia de productos de degradación. Este resultado sugiere que las proteínas en estas fracciones se encontraban en un estado conformacional más estable o correctamente plegado, lo que favoreció una interacción de mayor afinidad y fuerte con la resina anti-VH3 y por ende eluyeron más tarde.

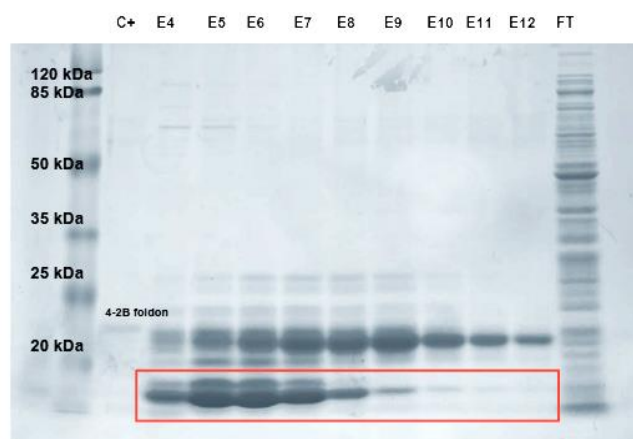


Figura 33. SDS-PAGE 12,5% de la purificación del constructo 4-2B Foldoncys-FcRn con tratamiento con PMSF. Fracciones obtenidas tras la purificación del constructo 4-2B-foldon cys sin OTs, expresado a gran escala y tratado con PMSF y EDTA durante la lisis para inhibir la actividad proteolítica.

Se seleccionaron las fracciones con menos porcentaje de degradación para un análisis más detallado, realizando un nuevo gel SDS-PAGE tanto en condiciones reductoras como no reductoras con el fin de caracterizar de manera más precisa el estado de integridad y multimerización del constructo recombinante (**Figura 34**).

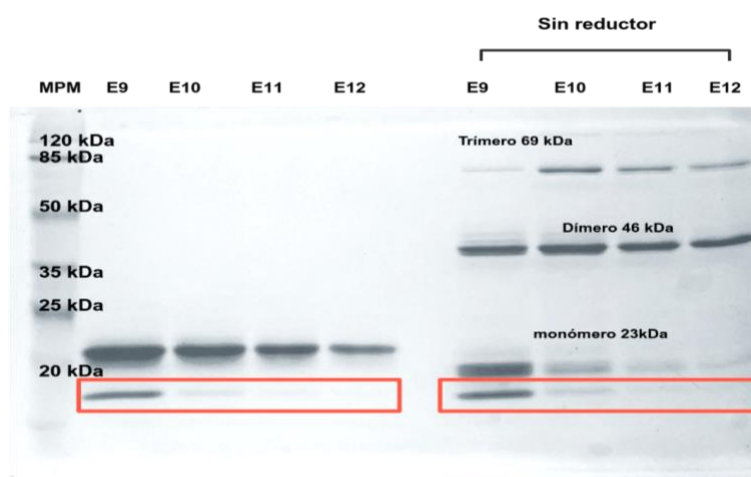


Figura 34. SDS-PAGE de las fracciones E9–E12 del constructo 4-2B Foldoncys-FcRn en condiciones reductoras y no reductoras. Análisis de las fracciones más puras (E9–E12) seleccionadas por su menor proporción de degradación.

Los resultados sugieren que aún en las fracciones más limpias y menos degradadas persiste la degradación y esta isoforma de menor PM. No obstante, fue posible observar la formación de dímeros y trímeros en condiciones no reductoras, lo que confirma que la construcción conserva su capacidad de multimerización. Sin embargo, entre las fracciones analizadas, E9 presentó una banda de degradación más evidente y una proporción menor de trímeros en comparación con las fracciones posteriores, lo que sugiere que esta muestra podría contener una mayor proporción de especies parcialmente degradadas.

Para evaluar la capacidad de unión del nanobody a CD40, se realizó un ELISA en el que se sensibilizó la placa con CD40 recombinante y se incubó con diluciones seriadas de un pool de las fracciones E9-E12 de 4-2B Foldoncys-FcRn (**Figura 35**). A pesar de observarse productos de degradación en el análisis por SDS-PAGE, el nanobody mantuvo su capacidad de reconocimiento del blanco y la curva de unión obtenida por ELISA (**Figura 35**) muestra un perfil sigmoidal, indicativo de una interacción específica y saturable.

La afinidad aparente fue estimada mediante ajuste sigmoidal de los datos, obteniéndose una concentración efectiva media (EC_{50}) cercana a 11,5 ng/μL, equivalente aproximadamente a $4,79 \times 10^{-7}$ M para un constructo de 23 kDa. Un EC_{50} de esta magnitud sugiere una interacción de afinidad moderada con CD40, consistente con un reconocimiento específico, aunque inferior al rango nanomolar característico de anticuerpos de alta afinidad

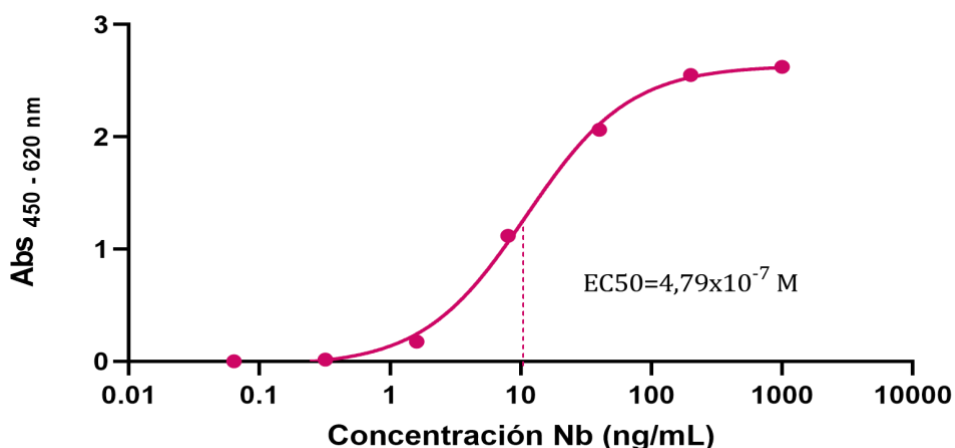


Figura 35. Curva de unión del nanobody anti-CD40 4-2Bfoldoncys-FcRn, determinada por ELISA. Las placas fueron sensibilizadas con CD40 recombinante y se incubaron con diluciones seriadas del nanobody. La línea representa el ajuste sigmoidal de los datos experimentales (puntos). La línea discontinua indica la EC_{50} estimado por ajuste no lineal.

A pesar de los resultados del estado de integridad de la proteína, teniendo en cuenta que el constructo conserva su reactividad por el blanco, se realizó un pool de las fracciones con menos producto de degradación (E9-E12) y se cuantificó mediante espectrofotometría, obteniéndose un

total de proteína de 0,46 mg a una concentración de 0,23 mg/mL. Posteriormente, se realizó un cambio de buffer a PBS apirógeno en condiciones estériles y la muestra fue alicuotada para su conservación a -20°C y posterior utilización en ensayos *in vitro*.

7.3.2 Versión 4-2B Foldoncys

Al igual que en las versiones anteriores, esta construcción fue expresada en cultivo bacteriano, purificada utilizando una columna de afinidad VH3 y se empleó tratamiento con PMSF y EDTA durante la lisis celular. Si bien la purificación fue técnicamente exitosa en términos de cantidad proteica, los resultados obtenidos fueron igualmente desalentadores: el análisis por SDS-PAGE reveló una proporción significativa de proteína degradada, sugiriendo que la eliminación de las secuencias adicionales no fue suficiente para evitar la degradación de la proteína funcional (Anexo, **Figura A3**)

7.3.3 Versión 1-2B Foldoncys-FcRn

Como alternativa, también se generó una construcción equivalente utilizando el nanobody 1-2B en lugar de 4-2B, manteniendo el diseño estructural simplificado sin los péptidos OT. Esta estrategia tuvo como objetivo evaluar si la degradación observada previamente era específica de la secuencia del nanobody 4-2B o si representaba una limitación general del diseño del constructo. El nanobody 1-2B fue clonado exitosamente entre los sitios SfiI del vector, siendo comprobado por secuenciación. La construcción fue expresada en condiciones similares a las previamente ensayadas, sin embargo, los resultados obtenidos fueron desfavorables.

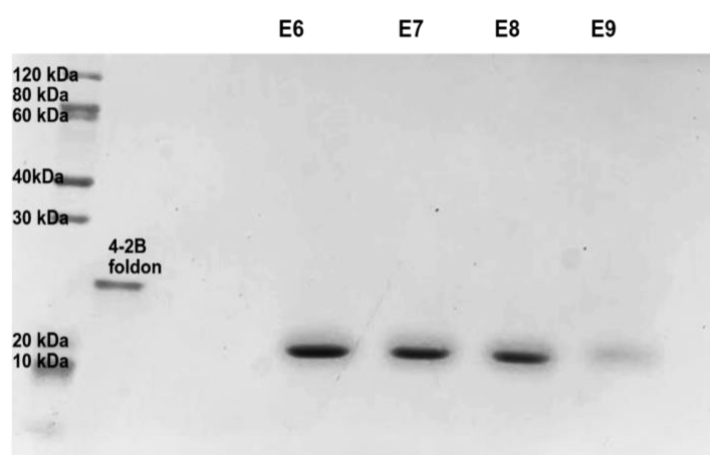


Figura 36. SDS-PAGE de las fracciones purificadas del constructo 1-2B-Foldoncys-FcRn en condiciones reductoras. Fracciones E6-E9 comparadas con el 4-2B Foldon sin cys.

En el análisis por SDS-PAGE (**Figura 36**) no se observó una banda correspondiente al peso molecular teórico esperado; en su lugar, se detectó una banda predominante de peso molecular

considerablemente inferior, compatible con una forma degradada o truncada de la proteína recombinante. Estos resultados sugieren que el problema de estabilidad podría estar asociado a la arquitectura general del constructo y no exclusivamente a la secuencia del nanobody 4-2B.

7.3.4 Obtención de Huella Peptídica por MALDI-TOF

Para confirmar que efectivamente la banda de menor PM corresponde a un producto de degradación de la proteína recombinante se realizó un análisis de huella peptídica.

En el análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF del constructo 4-2B Foldoncys-FcRn, se compararon los espectros obtenidos para dos condiciones experimentales: la banda correspondiente al peso molecular esperado para la proteína entera y la banda de menor peso molecular observada en gel, presuntamente degradada, con datos de tripsinización teórica obtenidos en la herramienta web ExPASy (**Tabla 2**).

Tabla 2. Comparación entre las masas teóricas y experimentales de los péptidos obtenidos tras la digestión con tripsina. Se indican la masa teórica calculada para cada péptido, la masa experimental medida por espectrometría de masas, la diferencia entre ambas (Δ , en Da) y el tramo de la secuencia proteica que abarca cada péptido. Este análisis permitió mapear los fragmentos detectados y evaluar la integridad estructural de la proteína expresada.

Peso molecular teórico	Secuencia peptídica	Posición en la proteína (220 aminoácidos)	4-2B Foldoncys-FcRn experimental	Δ (Da)	4-2B Foldoncys-FcRn degradada experimental	Δ (Da)
3647.7632	SDDYTSWGQGTQVT TSGQAGGQGGSGSG SYIPEAPR	111-147	3647.648	0.1152	no detectada	
3252.4692	CDGEWVLLSTFLGSG SGSHHHHGTGGQR	155-185	no detectada		no detectada	
3102.3887	FVTGHFGGLYPANG GGTGGLNDIFEAK	186-215	no detectada		no detectada	
2805.1062	NTVDLQMNSLKPED TAVYYCAANSR	80-104	no detectada		no detectada	
2213.4661	EFVAMITWSGGSTY YADSVK	49-68	2212.97	0.4961	no detectada	
2128.4539	AMAVVQLVQSGGGL VQAGGSLR	1-22	2128.025	0.4289	no detectada	
1420.6278	TFTNYPMGWFR	31-41	no detectada		no detectada	

840.9288	DGQCYVR	148-154	no detectada		no detectada	
806.955	LSCAVTGR	23-30	804.177	2.778	804.151	2.804
713.7674	IEWHE	216-220	no detectada		no detectada	
658.7314	YSGGFK	105-110	no detectada		no detectada	
623.7295	FTLSR	71-75	no detectada		no detectada	
500.5749	QAPGK	42-46	no detectada		no detectada	

Teniendo en cuenta que el equipo cuenta con una alta precisión (con un error estimado de 1 Da cada 1×10^9) la comparación entre los picos teóricos y experimentales revela una baja coincidencia. Si bien algunos péptidos esperados fueron detectados, estos no se confirmaron mediante secuenciación, la mayoría de los picos obtenidos no corresponden con los valores teóricos, lo cual dificulta, aún más, una conclusión definitiva respecto al estado estructural completo del constructo.

A pesar de la señal de secreción al periplasma que poseen nuestros constructos, la formación de puentes disulfuro no es completamente eficiente en bacterias, lo que probablemente favoreció el mal plegamiento y la exposición de regiones sensibles del C-terminal a proteasas. A pesar de degradación, se puede inferir que la región VHH sigue siendo funcional debido a que los constructos mantienen su reactividad contra CD40 y además fue posible la purificación por la columna de afinidad a VH3. De todas formas, ante las dificultades encontradas decidimos explorar otro sistema de expresión.

7.4 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE 4-2B FOLDONCYS Y 4-2B FOLDONCYS-FcRn-OT EN SISTEMA EUCARIOTA

Como alternativa a la expresión procariota y sus limitaciones para este constructo, se clonaron individualmente las diferentes regiones funcionales en un vector de expresión eucariota, con el fin de mejorar su estabilidad y obtener una proteína que se exprese de manera óptima.

7.4.1 Generación de versiones 4-2B Foldoncys, 4-2B Foldoncys-FcRn y 4-2B Foldoncys-FcRn-OT

Se generaron mediante PCR amplicones del tamaño esperado: para el par 1 (Fw- Rv Foldoncys) 169 pb, par 2 (Fw-Rv Foldoncys-FcRn) 229 pb, par 3 (Fw-Rv Foldoncys-FcRn-OT) 345 pb. La

ausencia de bandas en los controles confirma la especificidad de la reacción y la ausencia de contaminación (**Figura 37**).

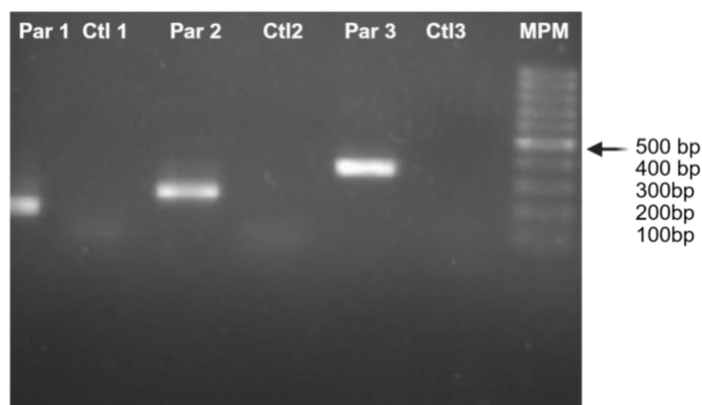


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa para las reacciones de PCR de las tres variantes: foldon (Par 1), foldon-FcRn (Par 2) y foldon-FcRn-OT (Par 3). Se incluyen los respectivos controles negativos sin ADN molde (Ctl). Se utilizó marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (NEB).

Estos amplicones fueron digeridos y ligados al vector pcDNA para expresión eucariota exitosamente. A partir de los clonados se realizó una PCR de colonias (*colony-PCR*) para confirmar el clonado correcto.

Por PCR de colonias con los pares de primers generados en 6.4.1 se observó amplificación específica en las colonias C y D correspondientes a la construcción 4-2B Foldoncys-FcRn-OT (marcadas en rojo), con un tamaño de banda esperado de 345pb (**Figura 38**). No se detectó amplificación en las colonias de las construcciones restantes, lo que indica ausencia del inserto. Los controles positivos (+) para cada construcción presentaron bandas con el tamaño esperado, confirmando la especificidad de los primers y diferenciando claramente los tamaños de los tres productos esperados (169 pb, 229 pb y 345 pb). El control negativo de colonia para 4-2B Foldoncys presentó una banda de menor peso molecular, indicando posible contaminación.

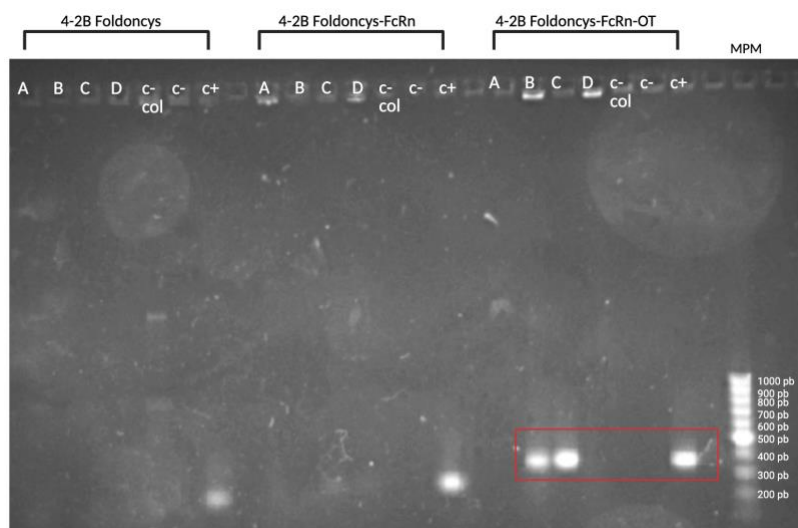


Figura 38. Análisis por PCR de colonias para la identificación de clones positivos. PCR de colonias utilizando los primers diseñados en la sección 6.4.1 para detectar la presencia de los insertos correspondientes a tres construcciones: 4-2B Foldoncys (169 pb), 4-2B Foldoncys-FcRn (229 pb) y 4-2B Foldoncys-FcRn-OT (345 pb). A–D: colonias seleccionadas; C-: control negativo de PCR; C+: control positivo de la construcción; C- col: colonia proveniente del control de ligación sin inserto; MPM: marcador de peso molecular.

Se realizó la ligación nuevamente del vector con el inserto que solo contiene el Foldoncys (amplificado con el par 1 de primers) y a partir de 4 colonias se realizó una amplificación del ADN por miniprep y desde este ADN se confirmó el clonado por PCR con una nueva estrategia de amplificación, donde se utilizó como primer Forward un primer que amplifica en la región del vector de IgKappaleader y el reverse que amplifica al Foldon-cys obteniendo una colonia positiva.

7.4.2 Expresión y caracterización de quimeras recombinantes

Se expresaron ambas construcciones en células HEK293 y EXPI293F, obteniendo aproximadamente 3.5 mg de la proteína 4-2B Foldoncys y 0.4 mg de 4-2B Foldoncys-FcRn-OT a partir de 30 mL de cultivo.

Para caracterizar a 4-2B Foldoncys se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE 12,5% en condiciones reductoras y no reductoras para comprobar la formación de complejos multiméricos (dímeros y trímeros) esperados por la asociación de los dominios foldon (**Figura 39**).

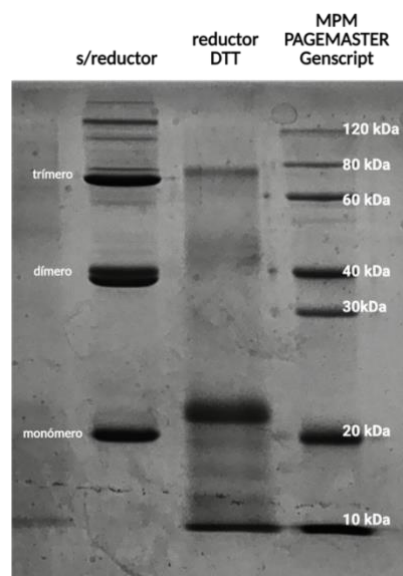


Figura 39. Análisis de la oligomerización de 4-2B Foldoncys por SDS-PAGE.

Gel SDS-PAGE 12,5% en condiciones no reductoras y reductoras (DTT) donde se distinguen especies monoméricas, dimericas y triméricas. Se utilizó el marcador de peso molecular (MPM) PAGEMASTER de GenScript.

Dado que surgieron dudas sobre el tamaño de las bandas, para estimarlas con mayor precisión se construyó una curva de calibración representando el logaritmo del peso molecular (log MW) frente a la retención (o distancia de migración) de los estándares de peso molecular (MPM) que se usó para estimar sus pesos moleculares aparentes.

En presencia de agente reductor, la proteína migró mayoritariamente en forma monomérica, con un peso molecular aparente de 18,9 kDa que es cercano al esperado (19,14 kDa obtenido en protparam ExPASy), confirmando la correcta expresión de la construcción. Adicionalmente, en condiciones no reductoras fue posible identificar la multimerización del constructo, obteniendo tres especies mayoritarias de 17 kDa, 40,4 kDa y 73,6 kDa, correspondiente a las formas monomérica, dimerica y una posible especie de mayor orden (trímero/tetrámero). Cabe destacar que, a esa altura del gel, la resolución de las bandas es limitada, por lo que la señal de 73,6 kDa podría corresponder a una mezcla de trímeros y tetrámeros.

En la publicación original de **Lu et al.** se reportan niveles de trimerización cercanos al 100 % utilizando la misma configuración de cisteínas introducidas en el dominio foldon (101). Por tanto, se esperaba observar una trimerización casi completa del Nb-foldon en condiciones no reductoras. Sin embargo, el análisis densitométrico de las bandas, realizado con el software *MyGels* (110), reveló que solo un 27,5 % de la proteína se encontraba en forma trimérica, mientras que las fracciones monomérica y dimerica representaron el 32 % y 40,5 %, respectivamente.

Cabe destacar que, al tratarse de un gel desnaturalizante, este análisis no refleja el estado de oligomerización en solución, lo cual correspondería analizar por gel filtración.

Con el objetivo de confirmar la presencia de las distintas especies observadas en el gel, se realizó además un análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF) de este constructo. En dicho análisis se identificaron picos correspondientes al monómero (~18 kDa), así como a especies de mayor masa (~38 kDa, ~58 kDa y ~77 kDa), compatibles con las formas di-, tri- y tetramérica del constructo (**Figura 40**). Estos resultados respaldan la capacidad del dominio foldon-cys para promover la multimerización esperada y constituyen una evidencia complementaria de la correcta formación de estructuras oligoméricas.

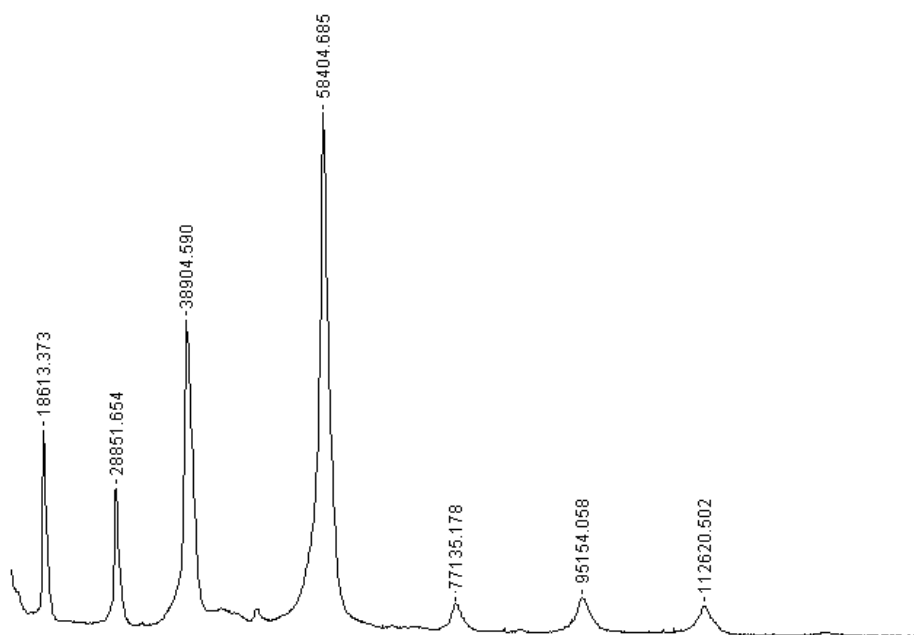


Figura 40. Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF del constructo Nb-Foldon-cys, utilizando ácido sinapínico como matriz. En el analizador de masas se observaron picos a 18 062 Da, 38 192 Da, 57 877 Da y 77 239 Da, correspondientes a las distintas especies detectadas del constructo.

Con estos resultados y considerando que el objetivo de la multimerización covalente a través de la introducción de los residuos de cisteínas es aumentar la estabilidad del trímero que permita realizar estudios de actividad agonista *in vivo*, esta preparación podría oficial como una primera aproximación a estos estudios.

Mediante ensayos de ELISA se observó que ambas construcciones Nb-foldon mantienen una buena capacidad de unión a CD40. En particular, el constructo 4-2B Foldoncys mostró una curva de unión con un EC_{50} bajo, lo que indica una avidéz mayor que el constructo 4-2B Foldoncys-FcRn-OT (**Figura 41**). No obstante, debido a la baja eficiencia de producción, no fue posible caracterizar correctamente a 4-2B Foldoncys-FcRn-OT por SDS-PAGE, lo que limita la interpretación estructural y dificulta establecer una correlación directa entre el estado oligomérico y la avidéz observada. Aun así, los resultados confirman que ambas versiones conservan la capacidad de interactuar con CD40, aunque pueden diferir en su grado de multivalencia funcional.

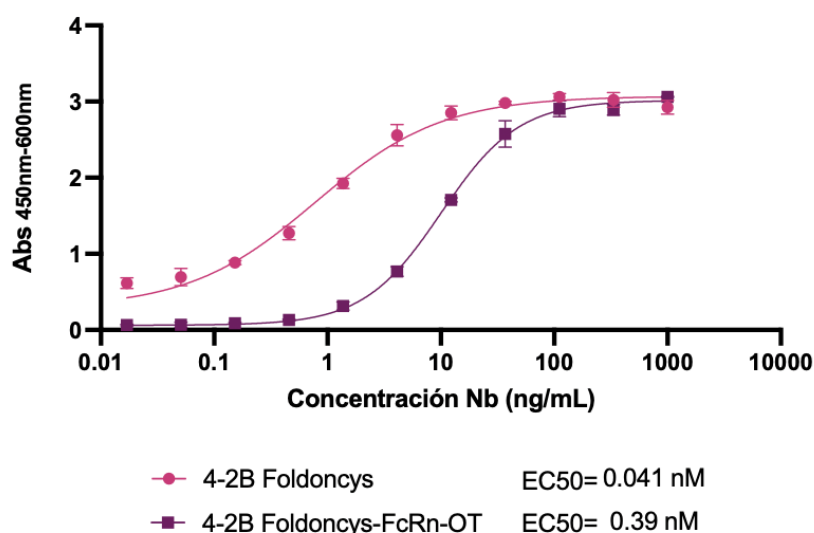


Figura 41. Curva de unión a CD40 de los nanobodies 4-2B Foldoncys y 4-2B Foldoncys-FcRn-OT determinada por ELISA. Las placas fueron sensibilizadas con CD40 recombinante y se incubaron con diluciones seriadas del nanobody. La curva muestra una respuesta dependiente de la concentración, con saturación a concentraciones elevadas. La línea representa el ajuste sigmoide de los datos experimentales (puntos). Se indica el EC₅₀ estimado en nM por ajuste no lineal.

Estos resultados nos impulsaron a evaluar su capacidad de activación *in vitro*, dado que existen antecedentes que demuestran que el dominio foldon puede inducir multimerización funcional. Sin embargo, nuestro objetivo fue determinar si las modificaciones introducidas en nuestras construcciones podrían potenciar dicha activación. Asimismo, decidimos avanzar con su evaluación *in vivo*, ya que versiones previas de esta construcción no mostraban actividad biológica detectable.

7.5 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES ASOCIADOS A LA REGIÓN Fc DE IgG1 MURINA

Dado que las construcciones originales 1-2B y D9 se encontraban fusionadas a un Fc humano (h1Fc), y se había observado en el grupo de trabajo que estas no inducían activación debido a la baja afinidad del h1Fc por el receptor FcγRIIb murino, se procedió a generar nuevas versiones fusionadas al Fc de IgG1 murina (m1Fc) con el objetivo de favorecer la interacción con FcγRIIb y potenciar su actividad agonista. Para ello, los nanobodies 1-2B y D9 fueron clonados exitosamente en el vector pcDNA-Fc IgG1 murina, en el que previamente se había insertado el nanobody 4-2B. La selección de estos clones se basó en su reconocimiento de epítopos distintos al de 4-2B, lo que permite evaluar diferencias en el modo de interacción con CD40. En particular, D9 fue incluido por presentar un epítipo solapante con 1-2B y por contar con antecedentes de actividad agonista similar en otro formato experimental, lo que lo convierte en un candidato relevante para comparar la respuesta funcional en el contexto del Fc murino.

Estos se expresaron de manera exitosa en células eucariotas HEK293 obteniendo 0,5 mg de cada Nanobody-m1Fc a partir de 150 ml de cultivo. Se analizaron por SDS-PAGE con y sin tratamiento reductor (**Figura 42**), donde se observó en ambos casos una banda cercana al PM esperado para estos Nb (46 kDa), destacados en el cuadrante rojo, aunque se observa en los carriles reducidos una reducción parcial.

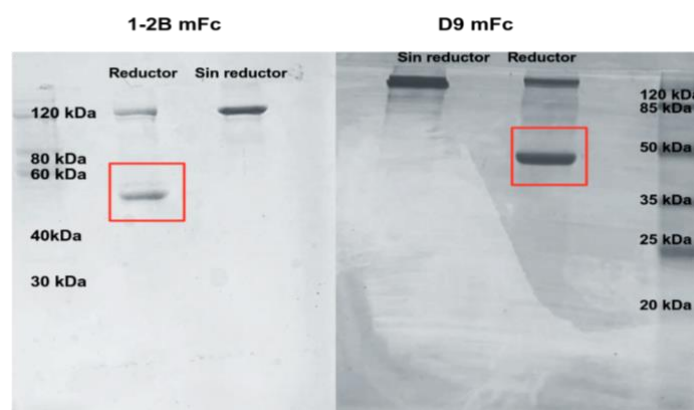


Figura 42. Análisis por SDS-PAGE de los nanobodies anti-CD40 fusionados a IgG1 murina. Se evaluaron las proteínas purificadas 1-2B-m1Fc y D9-m1Fc por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% bajo condiciones reductoras y no reductoras. Ambas construcciones muestran una banda mayoritaria con una movilidad compatible con el peso molecular esperado para un nanobody fusionado a la región Fc de IgG1 murina (~50 kDa). MPM pagemaster GenScript

La reactividad de los nanobodies contra CD40 se evaluó en un ensayo de ELISA (**Figura 43**). Ambos nanobodies fusionados a Fc (1-2B-m1Fc y D9-m1Fc) reconocen eficientemente el ectodominio murino de CD40, como lo demuestra la similitud en la forma de las curvas de unión por ELISA y los valores de EC50 obtenidos ($2,9 \times 10^{-8}$ M y $6,3 \times 10^{-8}$ M, respectivamente). Estos valores se encuentran dentro del rango esperado para nanobodies de afinidad moderada-alta y muy similares, lo que confirma una interacción eficiente de los Nanobodies 1-2B y D9 por CD40.

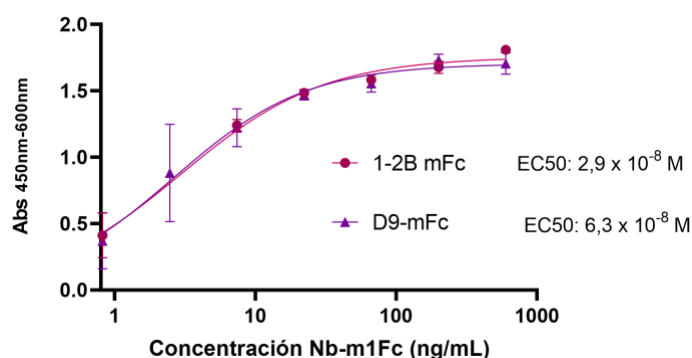


Figura 43. Curva de ELISA evaluando la reactividad de los nanobodies D9-m1Fc (▲) y 1-2B-m1Fc (●). La placa se sensibilizó con 0,5 μ g/mL de ectodominio murino recombinante de CD40 y se reveló con un anticuerpo anti-IgG1 murina conjugado a peroxidasa. EC50: concentración correspondiente al 50 % de la señal máxima de absorbancia a 450 nm.

Esta primera caracterización, valida la correcta expresión y funcionalidad de los nanobodies fusionados a IgG1 murina, y constituyen un paso clave para su posterior evaluación funcional *in vitro*.

7.6 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBODIES BIPARATÓPICOS

Con el fin de potenciar la señalización mediada por CD40 mediante el reconocimiento simultáneo de epítopes distintos, se generaron construcciones tetravalentes mono y biparatópicas fusionadas a regiones Fc de inmunoglobulinas murinas.

La expresión del anticuerpo biparatópico 1-2B/4-2B recombinante en HEK293 fue evaluada por SDS-PAGE, observándose una banda de aproximadamente 60 kDa correspondiente al formato biparatópico con Fc murina (**Figura 44**) distinta de la del formato monoespecífico m1Fc-1-2B, lo que confirma la correcta expresión y el aumento esperado de peso molecular por la incorporación del segundo dominio. Asimismo, se observa una banda en el flowthrough similar a la proteína, sin embargo, por el sistema de expresión y PM se sabe que podía corresponder a BSA del suero fetal del medio de cultivo de las células HEK293.

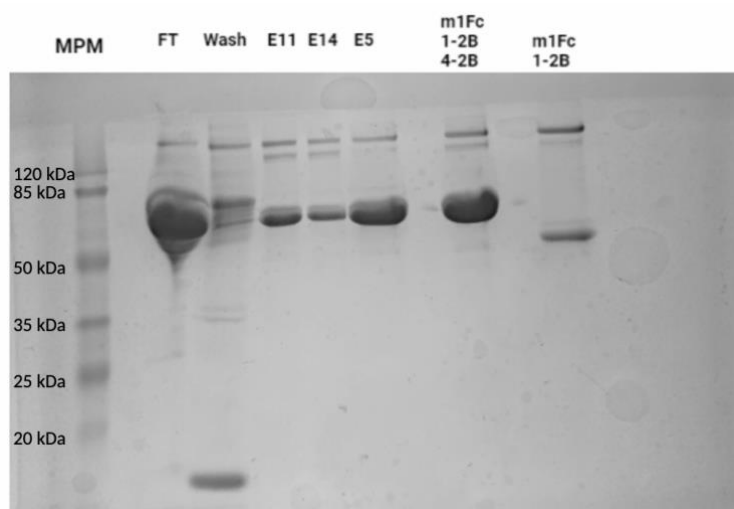


Figura 44. SDS-PAGE de las fracciones FT, Wash, E11, E14 y E5. Fracciones correspondientes a la purificación por HisTrap-Excel del constructo biparatópico m1Fc-1-2B-4-2B comparando con el formato monoespecífico m1Fc-1-2B, junto al marcador de peso molecular preteñido (MPM: Prestained Protein MW Marker 26612). El análisis se realizó en condiciones reductoras.

Se evaluó la capacidad de unión del nanobody biparatópico mediante ELISA, comparando su comportamiento con el de un formato biespecífico que contiene un nanobody irrelevante junto a 4-2B. A partir de las curvas de unión (**Figura 45**) se realizó el cálculo de valores de EC_{50} por ajuste sigmoideal, siendo $9,6 \times 10^{-11}$ M para m1Fc 1-2B/4-2B y $1,5 \times 10^{-10}$ M para m1Fc mR31/4-2B (control biespecífico). Los valores de EC_{50} no nos permiten diferenciar la avidéz entre ambos formatos, aunque si representan una alta afinidad por el antígeno. No obstante, esto no descarta

que el formato biparatópico pueda mejorar la funcionalidad a través de otros mecanismos, como la inducción más eficiente de agrupamiento de receptores, relevante para su posible actividad agonista.

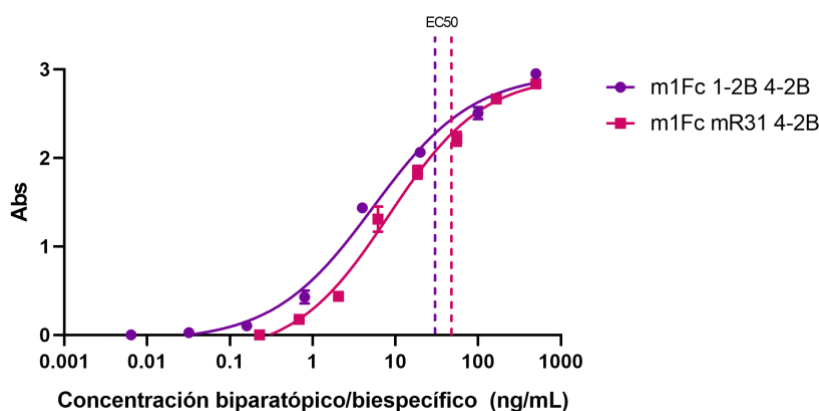


Figura 45. Curva de ELISA evaluando la reactividad del nanobody biparatópico m1Fc 1-2B 4-2B (●) en comparación con un formato biespecífico de control m1Fc MR31 4-2B (■). La placa se sensibilizó con 0,5 µg/mL de ectodominio murino recombinante de CD40 y se reveló con un anticuerpo anti-IgG1 murina conjugado a peroxidasa. EC₅₀: concentración molar correspondiente al 50 % de la señal máxima de absorbancia a 450 nm.

Para investigar si el formato biparatópico permite la unión simultánea a ambos epítopes, se realizó un ensayo de bloqueo por ELISA. En este, se pre-incubó el antígeno con uno de los nanobodies monoespecíficos (1-2B o 4-2B) fusionados a h1Fc, seguido de una segunda incubación con el biparatópico en diluciones seriadas. Este ensayo se reveló con un anti-mouseIgG1 que no posee reactividad cruzada por IgG humana. Los resultados (**Figura 46**) evidencian que la señal de unión del biparatópico no se ve afectada por la saturación previa de uno de los epítopes, lo que sugiere que puede unirse simultáneamente a ambos sitios.

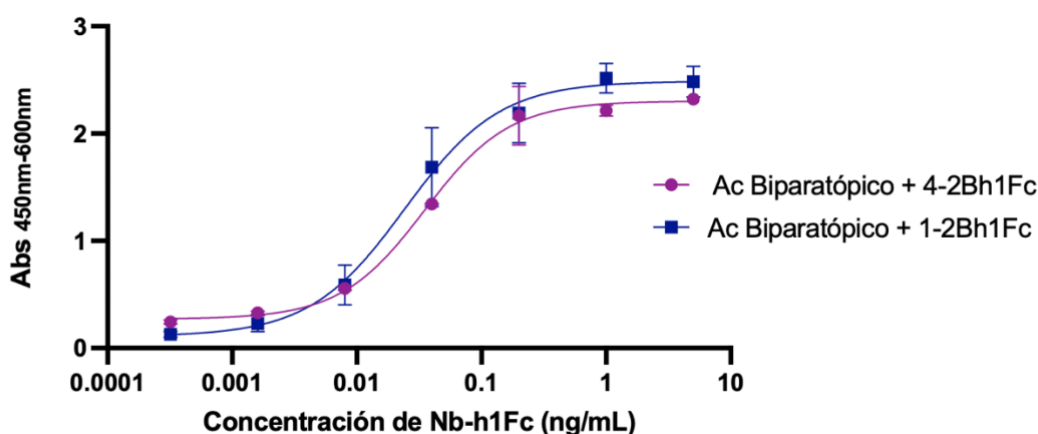


Figura 46. Ensayo de bloqueo por ELISA para evaluar la capacidad del nanobody biparatópico m1Fc 1-2B 4-2B de unirse simultáneamente a los epítopes 1-2B y 4-2B. La placa fue sensibilizada con 0,5 µg/mL de ectodominio murino recombinante de CD40. Se pre incubó el antígeno con uno de los nanobodies monoespecíficos fusionados al Fc de IgG1 humana (1-2Bh1Fc o 4-2Bh1Fc), seguido de incubación con el biparatópico en diluciones

seriadas. La detección se realizó con un anticuerpo anti-IgG1 murina conjugado a peroxidasa. Absorbancia medida a 450 nm.

Como complemento al ensayo de ELISA de bloqueo, se realizó un experimento de unión secuencial por interferometría de biocapa, con el objetivo de evaluar la capacidad del nanobody biparatópico de unirse simultáneamente a ambos epítopes reconocidos por los clones 1-2B y 4-2B (**Figura 47**). Para ello, se diseñaron varias condiciones experimentales en las que se bloquearon uno o ambos epítopes utilizando nanobodies monoespecíficos, seguidos de la incubación con el constructo biparatópico.

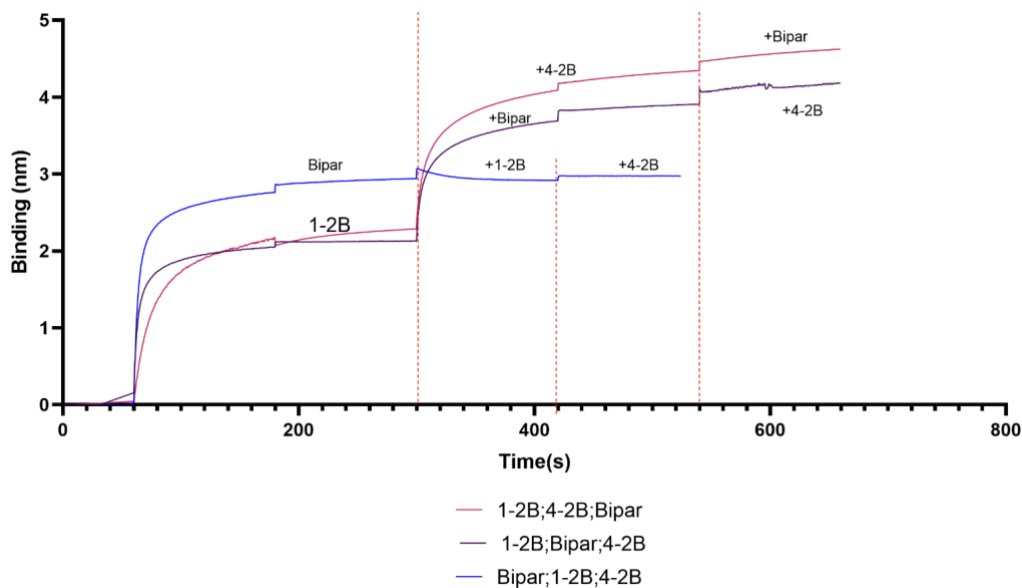


Figura 47. Experimento de unión secuencial por interferometría de biocapa para evaluar la capacidad del nanobody biparatópico 1-2B;4-2B de unirse simultáneamente a ambos epítopes. Se emplearon biosensores amino-reactivos sensibilizados con CD40 recombinante, seguido de incubaciones secuenciales con nanobodies monoespecíficos y biparatópico según el orden indicado. El eje Y representa el cambio en interferometría (*binding*, nm) como indicador de interacción molecular.

En un primer esquema (línea violeta), se inmovilizó el antígeno y se incubó inicialmente con el nanobody 1-2B, bloqueando así uno de los epítopes. Posteriormente, se añadió el biparatópico para evaluar si aún podía unirse al epítopo restante (4-2B). Para confirmar que se había producido esta unión, se agregó 4-2B al final observando que no había unión. En este caso, se observó un incremento de señal al añadir el biparatópico tras 1-2B, lo cual indica que el epítopo 4-2B permanecía accesible. La posterior adición de 4-2B no generó mayor señal, lo que confirma que dicho epítopo ya había sido ocupado por el biparatópico.

En una segunda condición (línea rosa), se bloquearon ambos epítopes incubando secuencialmente con los nanobodies 1-2B y 4-2B antes de añadir el biparatópico. En este caso, no se detectó señal

adicional al agregar el biparatópico, lo que demuestra que su interacción depende de la presencia libre de al menos uno de los sitios de unión.

En sentido inverso (línea azul), se incubó primero con el biparatópico, y luego con los nanobodies monoespecíficos por separado o en combinación. La falta de incremento de señal tras la adición de los monoespecíficos sugiere que el biparatópico había ocupado ambos sitios de forma simultánea, impidiendo la unión de los clones individuales.

En conjunto, estos resultados confirman que el anticuerpo biparatópico puede reconocer y unirse de forma simultánea los epítopes reconocidos por los clones 1-2B y 4-2B, cumpliendo con los criterios funcionales de biparatopicidad.

Además del anticuerpo biparatópico de fusión a m1Fc, se generaron dos versiones alternativas para evaluar los factores determinantes del agonismo a CD40. Por un lado, se logró expresar y purificar un anticuerpo biparatópico 1-2B/4-2B donde la región Fc en lugar de ser IgG1 murina es una versión IgG2a LALA, versión que presenta mutaciones y está diseñada para disminuir la afinidad por receptores Fc (111). Esta versión se generó para comprobar si el aumento de la valencia podría dotar de actividad agonista independiente de la interacción con FcγRs. Además, se generó una versión tetravalente monoespecífica del nanobody 1-2B, clonando un segundo inserto del mismo nanobody entre los sitios *EcoRI* y *XhoI* del vector que ya contenía 1-2B entre los sitios *SfiI* lo que permitirá evaluar si el aumento de la valencia, en ausencia de biparatopicidad, es suficiente para conferir actividad agonista.

En el caso de la variante biparatópica 1-2B/4-2B-IgG2a LALA, no se presentan de forma independiente los análisis de SDS-PAGE ni ELISA, dado que su caracterización bioquímica se realizó en conjunto con la versión 1-2B/4-2B-m1Fc, confirmándose en ambos casos una correcta expresión y unión a CD40.

Por el contrario para el anticuerpo tetravalente 1-2B/1-2B se incluyó la caracterización por SDS-PAGE en el Anexo (**Figura A4**) y se incorporó un análisis comparativo de avidéz mediante ELISA (**Figura 48**).

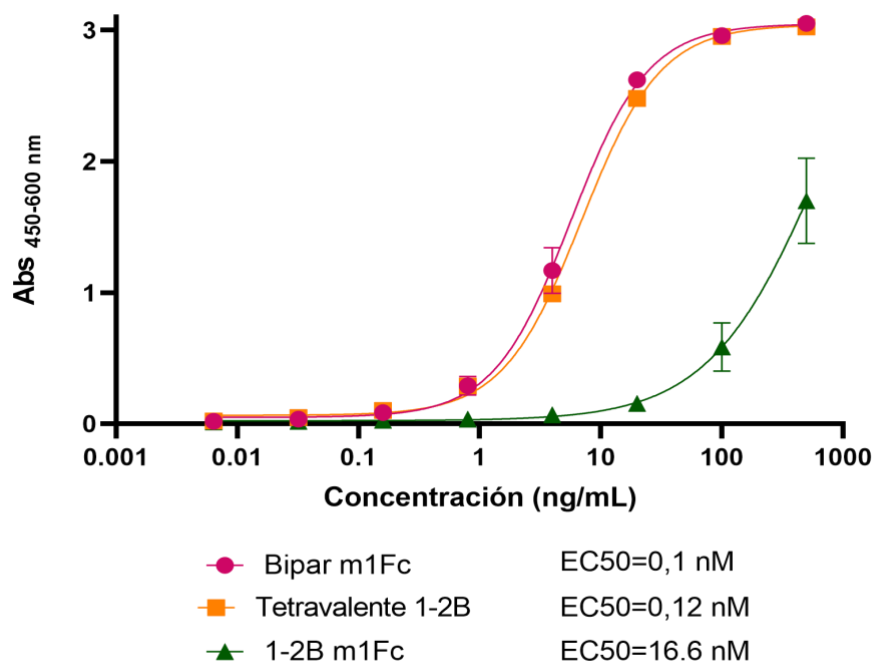


Figura 48. Curvas de ELISA evaluando la reactividad frente a CD40 de los constructos 1-2B-m1Fc (■), 1-2B/4-2B-m1Fc (●) y 1-2B tetravalente (▲). Las placas se sensibilizaron con 0,5 µg/mL de ectodominio murino recombinante de CD40 y la detección se realizó utilizando un anticuerpo anti-IgG1 murina conjugado a peroxidasa. EC₅₀: concentración molar correspondiente al 50 % de la señal máxima de absorbancia a 450 nm.

En esta figura se observa cómo tanto el anticuerpo biparatópico m1Fc como el tetravalente 1-2B m1Fc poseen curvas superpuestas con una avidéz comparable (EC₅₀ 0.1 nM y 0.12 nM, respectivamente). Adicionalmente ambos constructos mostraron valores de EC₅₀ claramente inferiores al del 1-2B-m1Fc (EC₅₀ 16.6 nM), indicando que requieren menores concentraciones para alcanzar la mitad de la señal máxima, y por ende la unión por CD40 es de mayor avidéz, que es lo esperable al aumentar la valencia.

7.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AGONISTA DE LOS NANOBODIES ANTI-CD40 *IN-VITRO*

7.7.1 Formatos utilizados y posibles formas de activación

Tras la caracterización bioquímica de los nanobodies seleccionados, y con el objetivo de determinar su potencial funcional, se procedió a evaluar su actividad agonista sobre CD40 mediante ensayos funcionales *in vitro*. Reproduciendo los ensayos previamente realizados en el grupo de trabajo, se estimularon esplenocitos de ratón y se evaluó la activación de células B mediante la detección de **ICAM-1** o **CD86** por citometría de flujo.

Como se evidenció, a lo largo de este trabajo se generaron distintos formatos con los Nbs anti-CD40 disponibles. Estos incluyen formas resultantes de la combinación con el dominio foldon, y versiones con distintos Fc asociados a uno o dos nanobodies, estos últimos en combinaciones bivalentes (ambos nanobodies idénticos) o biparatópicos (dos nanobodies que reconocen epítopes distintos en CD40) (**Figura 49**).

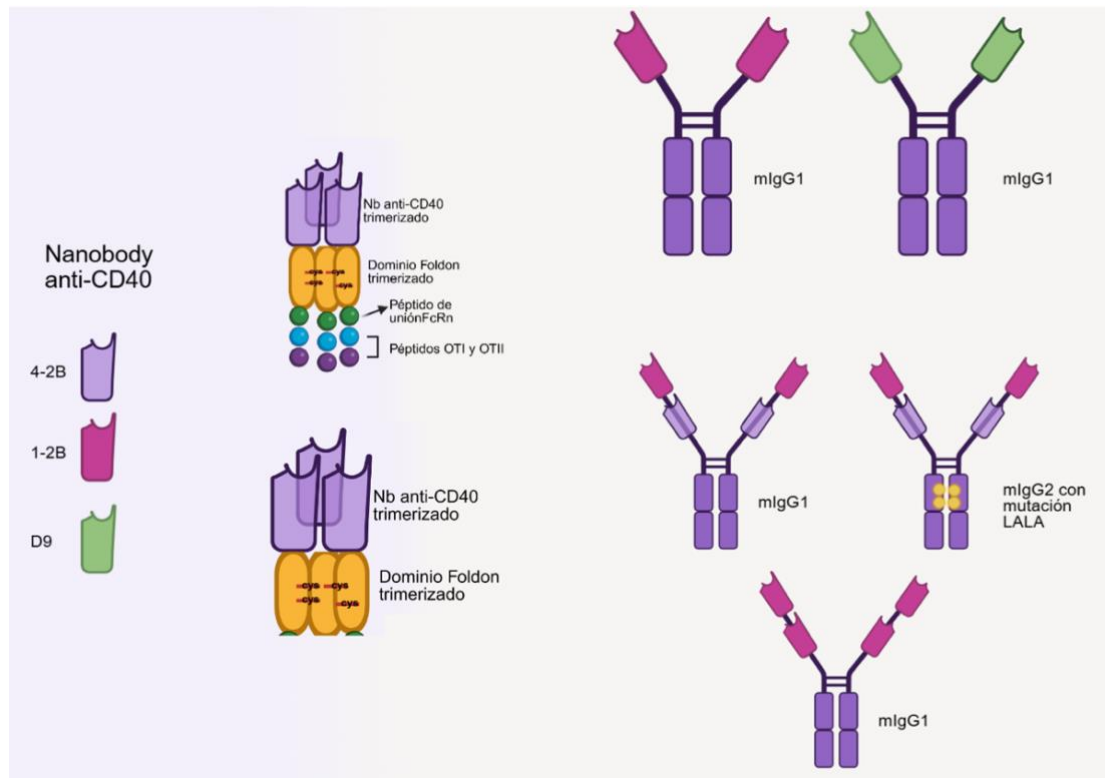


Figura 49. Esquema general de los distintos formatos generados con los nanobodies anti-CD40 evaluados *in-vitro*. Se muestran los nanobodies 4-2B, 1-2B y D9, junto con las construcciones derivadas que incluyen: un nanobody trimerizado mediante el dominio foldon y fusionado a péptidos afin a FcRn, OTI y OTII para ensayos de presentación antigénica. También las versiones fusionadas a regiones Fc de inmunoglobulinas murinas (mIgG1 y mIgG2 con mutación LALA).

Estas variantes podrían dar lugar a distintas formas de activación *in vitro* como se muestra en la **figura 50**.

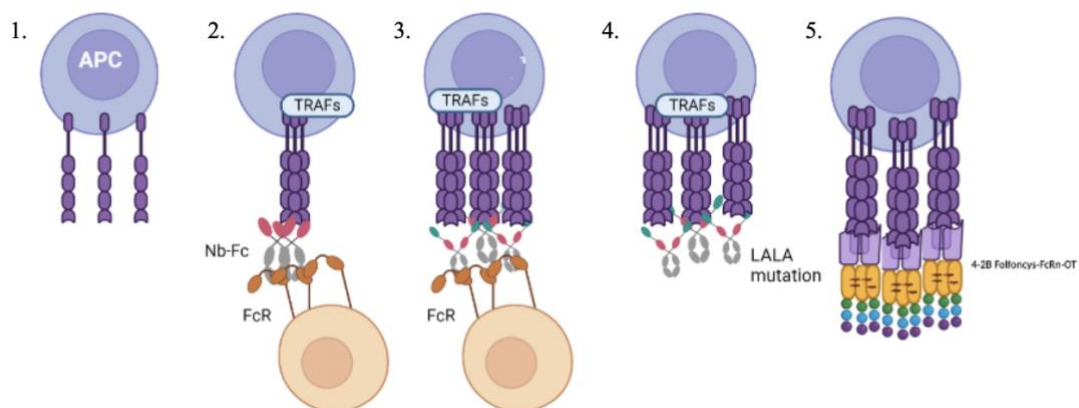


Figura 50. Mecanismos de activación del receptor CD40 por distintos formatos de ligandos y anticuerpos.

(1) Monómeros del receptor CD40 distribuidos en la membrana sin entrecruzamiento, en estado inactivo. (2) Anticuerpos monoespecíficos agonistas requieren la interacción de su región Fc con FcγRIIB en células accesorias para inducir la agregación de CD40 y activar la señalización intracelular. (3) Anticuerpos biparatópicos diseñados para reconocer epítopos no superpuestos pueden inducir activación mediante entrecruzamiento directo de CD40. Al poseer una región Fc (IgG1 de ratón), también pueden interactuar con FcγRIIB, lo que potencia la señalización. (4) Anticuerpos biparatópicos con Fc mutado (LALA), diseñados para reconocer epítopos no superpuestos, inducen activación mediante entrecruzamiento directo de CD40, de forma independiente de FcγRIIB (5) Nanobody fusionado al dominio foldon podría trimerizarse e inducir el entrecruzamiento del receptor y activación exitosa.

En un primer experimento (**Figura 51**), se logró evidenciar que el clon 1-2B indujo la mayor expresión de ICAM-1 entre todos los nanobodies monoespecíficos de fusión a m1Fc, lo que sugiere un mayor potencial agonista.

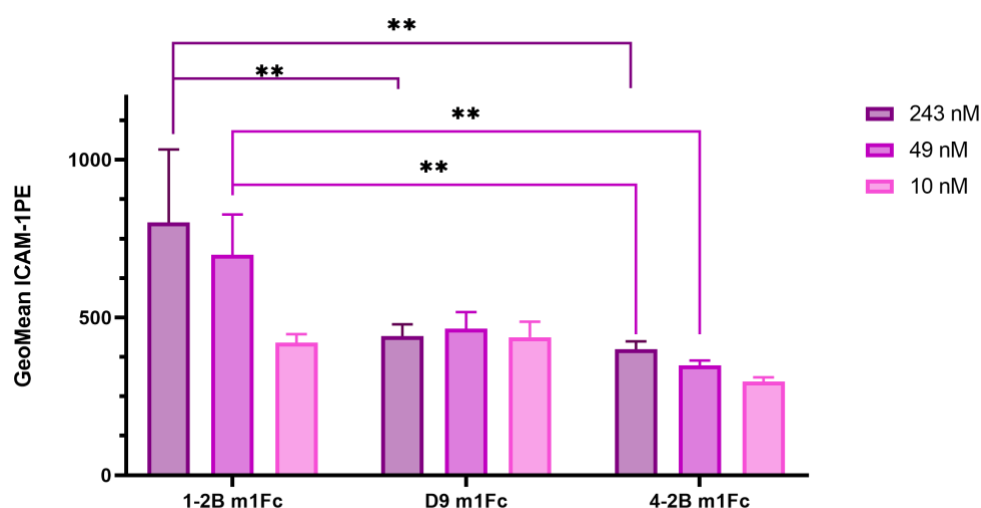


Figura 51. Análisis por citometría de flujo de la activación de células B en esplenocitos de ratón estimulados con nanobodies anti-CD40. Las células B fueron definidas como B220⁺CD3⁻. Se evaluó la expresión del marcador ICAM-1 como indicador de activación en células B tras estimulación con distintos nanobodies anti-CD40: D9, 1-2B-Fc, 4-2B-Fc y 4-2B-Foldon (sin modificaciones cys ni péptidos). Se analizaron tres concentraciones diferentes para cada proteína, y se reporta la media geométrica de fluorescencia de ICAM-1-PE para cada condición. Se utilizó el test Two Way Anova con el test Tukey's para comparaciones múltiples: *p<0,05; **p<0,01

Estos resultados se correlacionan con observaciones previas reportadas para otros anticuerpos monoclonales anti-CD40, donde se ha demostrado que la actividad agonista depende de múltiples factores, incluyendo el epítipo de unión, la valencia del constructo y la interacción con FcγRIIB (34). En este caso, donde el único factor que difiere es el epítipo de unión, la variabilidad observada entre los clones 1-2B, D9 y 4-2B sugiere que la geometría de unión al receptor CD40 y los epítopos reconocidos son determinantes para la activación de este receptor.

En un segundo experimento se buscó evaluar el efecto del aumento de la valencia sobre la actividad agonista *in vitro*. Para este análisis se empleó la expresión de CD86 como marcador de activación de células B, dado que corresponde a un marcador validado en ensayos previos y

representa una alternativa viable, considerando que el grupo de trabajo ya no disponía de anticuerpos para detectar ICAM-1.

Se realizaron dos ensayos independientes (A y B) bajo las mismas condiciones experimentales, comparando los constructos bivalentes (1-2B m1Fc y 4-2B m1Fc) con las variantes tetravalentes monoespecíficas (1-2B/1-2B) y biparatópicas (1-2B/4-2B) en sus versiones con Fc de IgG1 murina funcional (m1Fc) y con Fc de IgG2a portador de la mutación LALA (m2aLALA) (**Figura 52**).

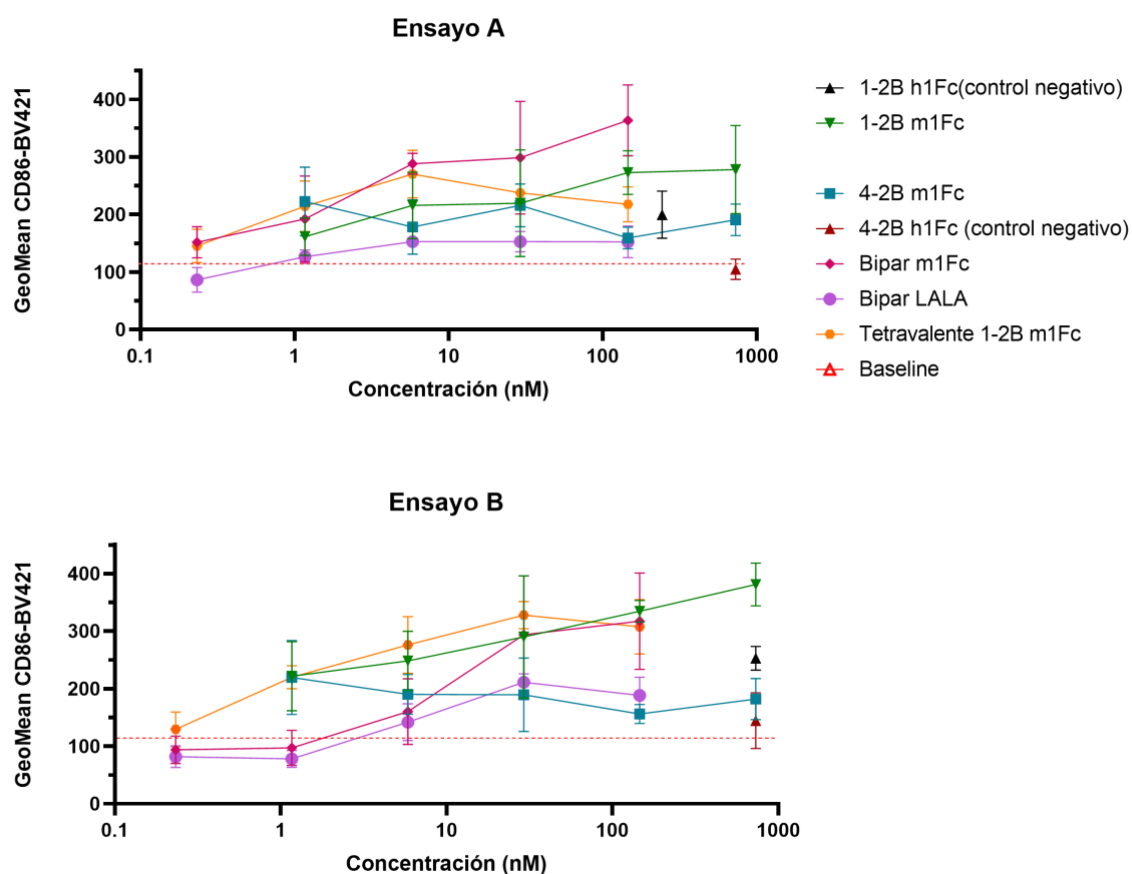


Figura 52. Análisis por citometría de flujo de la activación de células B por anticuerpos anti-CD40 evaluadas mediante expresión de CD86. Se evaluó la activación de células B en esplenocitos de ratón mediante la expresión de CD86, tras estimulación con diferentes constructos de nanobodies anti-CD40. Se analizaron cinco concentraciones por constructo, en dos experimentos independientes realizados el 9 y el 28 de abril, cada uno con tres réplicas. Se reporta la media geométrica de fluorescencia de CD86 para cada condición. El baseline corresponde a la intensidad de fluorescencia en pocillos no estimulados.

En ambos ensayos el constructo Biparatopico-LALA mostró una actividad casi nula y se observaron comportamientos erráticos en los niveles de activación inducidos por los distintos constructos, con curvas con alta variabilidad entre réplicas.

Dada esta variabilidad, para facilitar la comparación entre agonistas particulares, procedimos a normalizar las curvas para cada anticuerpo respecto a la intensidad de fluorescencia en ausencia de

estímulo (baseline). Como se muestra en la **Figura 53**, se pudo observar gran variabilidad entre los experimentos, sobre todo en los anticuerpos que nos interesan: los biparatónicos y el tetravalente.

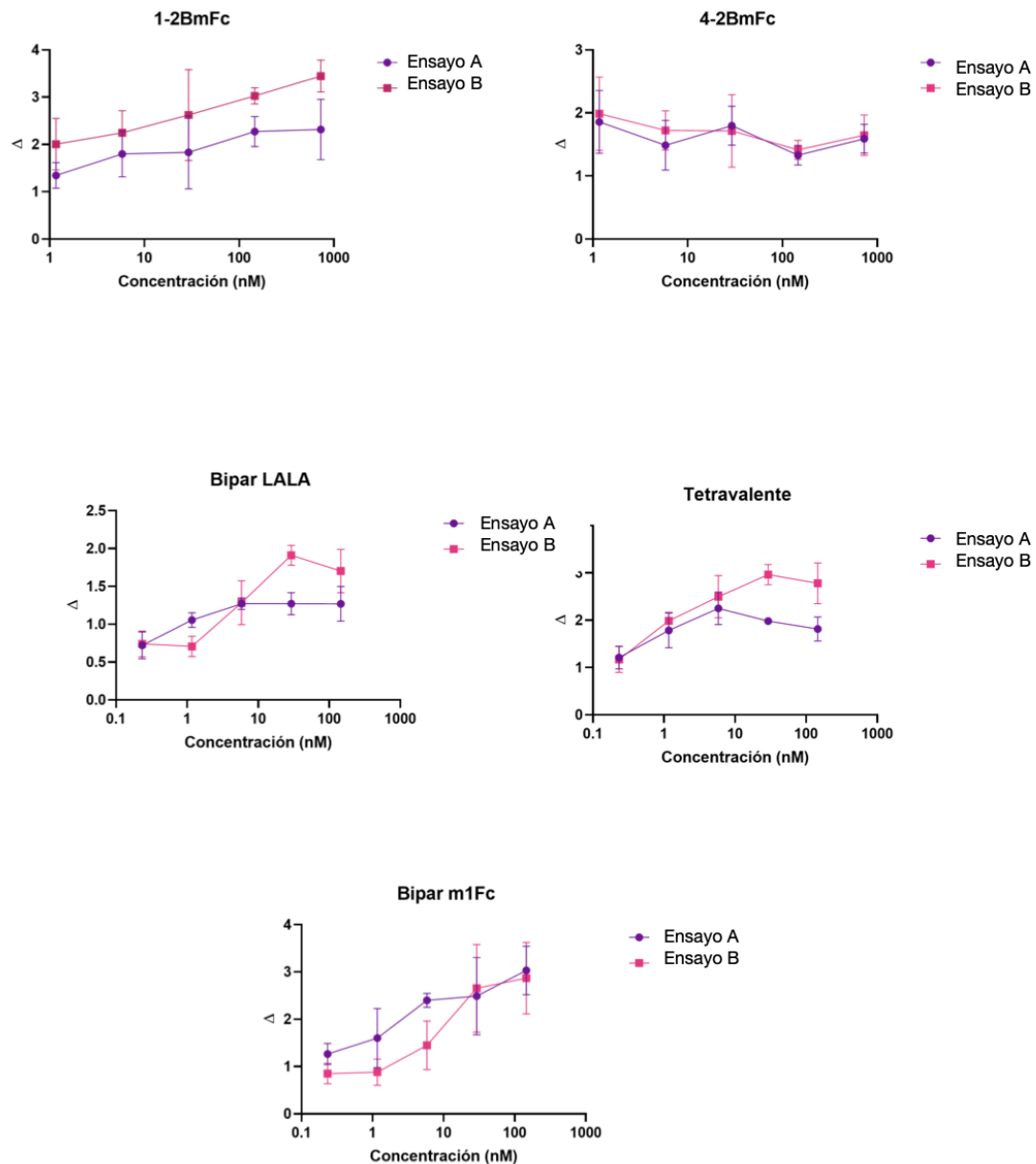


Figura 53. Comparación de la activación de células B entre dos experimentos independientes mediante normalización de la señal de CD86. Para evaluar la reproducibilidad entre ensayos, los valores de fluorescencia media geométrica de CD86 fueron normalizados respecto al control sin estimular (RPMI) en cada experimento. Se comparan las curvas de activación de los distintos constructos entre las estimulaciones de los ensayos A y B.

La activación estimada mediante la expresión de CD86 no mostró un patrón reproducible entre experimentos, particularmente a concentraciones altas de los constructos. En lugar de observar curvas dosis-dependientes que aumentan progresivamente hasta alcanzar una meseta, algunas

curvas exhibieron un comportamiento atípico, con una disminución de la media geométrica a concentraciones elevadas.

Un ejemplo es el anticuerpo tetravalente 1-2B, que presenta una caída de la señal a altas dosis. Aunque inicialmente podría considerarse que este patrón no es el esperado para receptores de la familia TNFR, evidencia reciente indica que lo que en realidad no se ajusta a estos agonistas es la clásica relación dosis–respuesta sigmoidal. Diversos estudios muestran que los anticuerpos agonistas dirigidos a receptores coestimuladores suelen presentar curvas en campana, con pérdida de actividad a concentraciones elevadas (112).

En particular, **Yang et al.** reportaron que los agonistas altamente potentes del receptor OX40 mostraron una disminución de la señal a concentraciones elevadas (56). Aunque OX40 es un receptor distinto, pertenece a la misma superfamilia que CD40 y comparte un mecanismo de activación basado en el entrecruzamiento y la formación de agregados supramoleculares en la membrana. Por ello, este antecedente podría ser relevante para interpretar la caída observada en nuestros ensayos, especialmente para los constructos con mayor capacidad agonista.

De acuerdo con el review de *Nature Reviews Drug Discovery*, este comportamiento podría explicarse por dos mecanismos no excluyentes. Por un lado, concentraciones muy altas de anticuerpo pueden provocar una sobreactivación que derive en atenuación de la señal, agotamiento celular o incluso *activation-induced cell death* (AICD). Aunque el agotamiento se describe típicamente tras estímulos crónicos, el *review* señala que, en ensayos *in vitro*, concentraciones excesivas pueden generar una activación no productiva desde el inicio. Por otro lado, también se describe que un exceso de anticuerpo altera la estequiometría óptima para el entrecruzamiento, favoreciendo la formación de complejos no productivos que impiden la oligomerización eficiente del receptor y reducen su capacidad agonista (112).

Otro problema fue que, al comparar la respuesta de diferentes constructos a una concentración determinada, un nanobody podía mostrar mayor activación relativa que otro, pero esa relación se invertía a otra concentración. Esta falta de consistencia impide establecer comparaciones confiables entre los diferentes formatos y limita la validez de las conclusiones derivadas de estos experimentos.

Teniendo estos resultados en cuenta se procedió a repetir el experimento, esta vez analizando los marcadores ICAM-1 y CD86 en simultaneo (**Figura 54**). En este experimento, hubo dificultades al analizar la actividad del anticuerpo tetravalente 1-2B en las concentraciones superiores (20 y 200 nM). Se observaron pocas células y por ende no se pudieron definir poblaciones ni realizar el gating correspondiente en el análisis por citometría de flujo, como consecuencia estos puntos no fueron incluidos (Anexo, **figura A5**). Esto podría relacionarse con un efecto de citotoxicidad o pérdida celular inducida por activación excesiva del receptor CD40, lo cual es coherente con el

perfil en forma de campana observado previamente para este tetravalente a altas concentraciones (Figura 53), donde una señalización no productiva o desregulada podría traducirse tanto en una caída de la activación como en una disminución del número de células recuperadas.

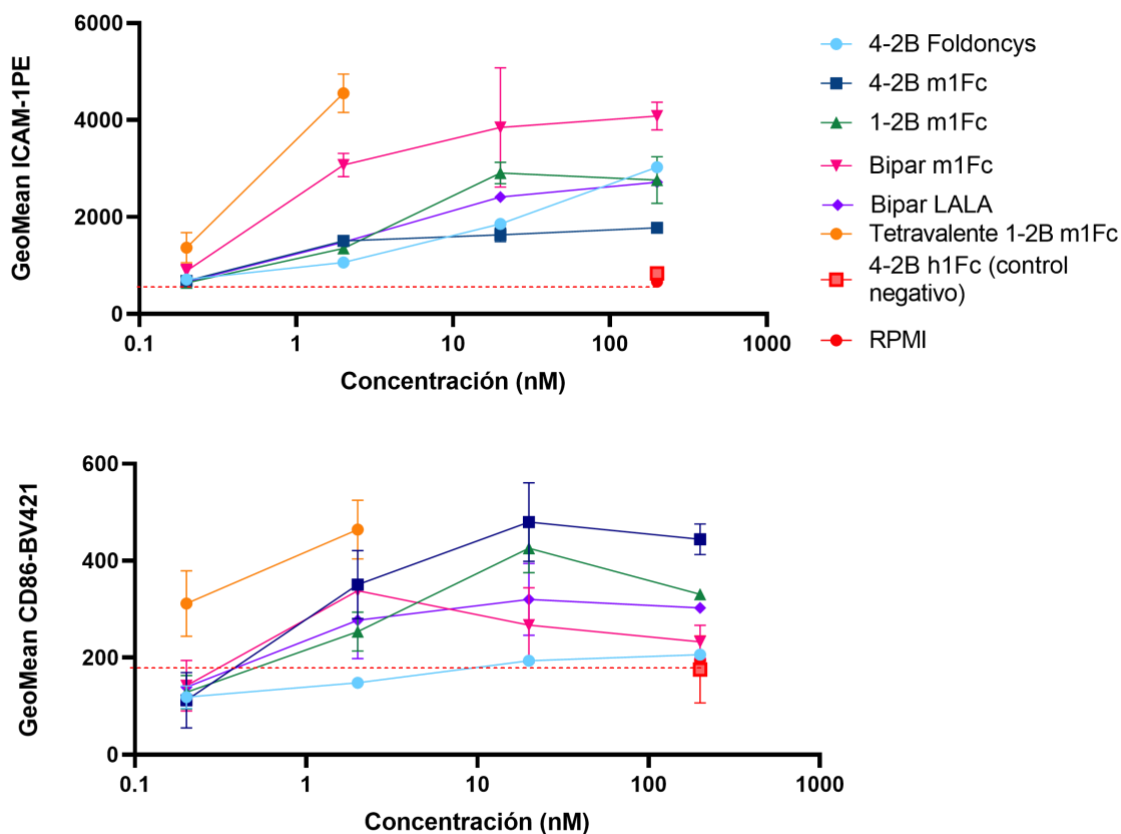


Figura 54. Curvas de activación de células B por nanobodies anti-CD40 evaluadas mediante expresión de ICAM-1 y CD86. En el eje Y se expresa la media geométrica para los marcadores asociados a fluoróforos ICAM1-PE y CD86-BV421, el eje x corresponde a las concentraciones de estímulo en nM. Se observan las curvas correspondientes a los distintos constructos detallados en la figura

Al analizar la titulación de los estímulos (Figura 54) nos encontramos con una gran diferencia de expresión de los marcadores ICAM-1 y CD86. Observamos que para los mismos estímulos los resultados son muy distintos, teniendo una mejor sensibilidad el marcador ICAM-1. Para este último, los resultados indican que el aumento de la valencia, tanto en el formato biparatopico, más aún para el Nb 1-2B tetravalente, hay un aumento en la expresión del marcador en comparación con los anticuerpos monovalentes (4-2B m1Fc y 1-2B m1Fc) y el constructo foldon. Asimismo, la construcción biparatópica con la mutación LALA, cuya acción es independiente al receptor de Fc, mostró cierta activación que fue similar a los constructos monovalentes y mayor al constructo 4-2B h1Fc, a pesar de que ambos presentan afinidad reducida por el receptor FcγRIIB. Este resultado sugiere que al aumentar la valencia se puede prescindir de la interacción con los receptores de Fc, a pesar de que la interacción con los mismos potencia la actividad.

A concentraciones altas, el efecto observado resulta confuso, y algunos agonistas, inseperadamente, parecen disminuir su actividad. Esto sumado al problema de mortalidad celular mencionado anteriormente al analizar la actividad del Nb 1-2B tetravalente a altas concentraciones, nos llevaron a focalizar la comparación de la actividad agonistas a bajas concentraciones (0,2 nM y 2 nM).

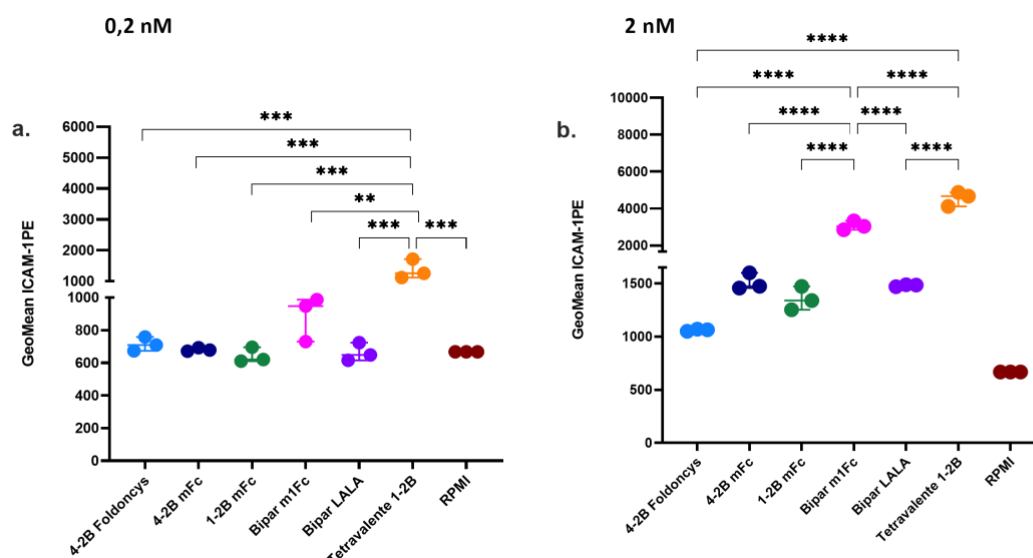


Figura 55. Comparación de la media geométrica de ICAM1-PE en células B para los distintos anticuerpos anti-CD40 a bajas concentraciones . a) Media geométrica de los constructos a una concentración de 0,2 nM de estímulo b) Media geométrica de los constructos a una concentración de 2 nM de estímulo. . Si bien no se muestra en la figura, a la concentración de 2 nM todos los anticuerpos evaluados presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo (RPMI). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con prueba Tukey de comparaciones múltiples *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001

Como se observa en la **figura 55**, a la concentración más baja (0,2 nM), la única construcción que exhibió diferencias significativas con el control sin estimulación fue el anticuerpo tetravalente 1-2B. Esta tendencia como mejor activador se ve reflejada también en la siguiente concentración (2 nM), donde el anticuerpo tetravalente exhibió una activación significativamente mayor que todos los otros constructos. En esta última concentración todos los anticuerpos mostraron una diferencia significativa respecto al control (RPMI), indicando una activación moderada.

Al comparar las distintas estrategias de multimerización u oligomerización, se observó que los anticuerpos tetravalentes, tanto monoespecíficos como biparatópicos, presentaron una actividad significativamente mayor que la construcción Foldoncys. Esto indica que el aumento de la valencia tiene un impacto más pronunciado sobre la potencia agonista, favoreciendo un entrecruzamiento más eficiente del receptor CD40 y una señalización intracelular más robusta en las condiciones ensayadas *in vitro*. Sin embargo, es importante considerar que la construcción Foldoncys presentó la limitación de no formar un 100 % de trímeros covalentes; y dado que no se realizó una caracterización del estado oligomérico por cromatografía de filtración en gel, no es

posible determinar con precisión la proporción real de trímeros presentes en la preparación. Esto podría contribuir a la menor actividad observada en comparación con los anticuerpos tetravalentes.

Es importante destacar que a esta concentración, el anticuerpo biparatópico m1Fc fue significativamente más activador que las construcciones monovalentes, la construcción con foldon y el anticuerpo biparatópico con la mutación LALA. Sin embargo, la activación sigue siendo menor que la versión tetravalente 1-2B. Este resultado nos indica que la biparatopidad por sí sola no constituye un factor determinante para potenciar la activación de CD40, como pensamos que podría ocurrir.

Dado que ambos anticuerpos comparados son tetravalentes y presentan una avidéz aparente comparable (**Figura 48**), la diferencia observada en su actividad agonista *in vitro* no puede atribuirse únicamente a la multivalencia ni a la fuerza de unión, lo que indica que factores adicionales, particularmente la geometría de unión y el epítipo reconocido, podrían desempeñar un rol determinante en la eficacia agonista.

En efecto, el Nb tetravalente está conformado por el nanobody 1-2B, el cual mostró previamente un mayor potencial agonista que 4-2B (**Figura 51**), por lo que resulta coherente que la versión tetravalente exhiba un efecto más potente que la combinación de ambos nanobodies. Diversos estudios señalan que el epítipo de unión es un factor clave en la actividad agonista (34), y estos resultados sugieren que la disposición espacial generada por el reconocimiento de un epítipo más favorable, y no la multivalencia en sí misma, es lo que potencia la activación de CD40, en comparación con su asociación con un nanobody de menor actividad.

En un análisis análogo para el marcador CD86 (**Figura 56**), si bien existen diferencias en la sensibilidad, la tendencia general se mantiene. El constructo tetravalente 1-2B sigue una tendencia de ser mejor activador a la concentración más baja, donde es significativamente mayor a todas las construcciones que están a nivel del control. A la concentración más alta observamos nuevamente una mejor activación por parte de este constructo, aunque las diferencias entre los demás constructos no fueron consistentes. En particular, ni el constructo 1-2B m1Fc ni la versión trimerizada mediante foldon presentaron una actividad significativa, y la versión monovalente 4-2B no difirió de las construcciones biparatópicas.

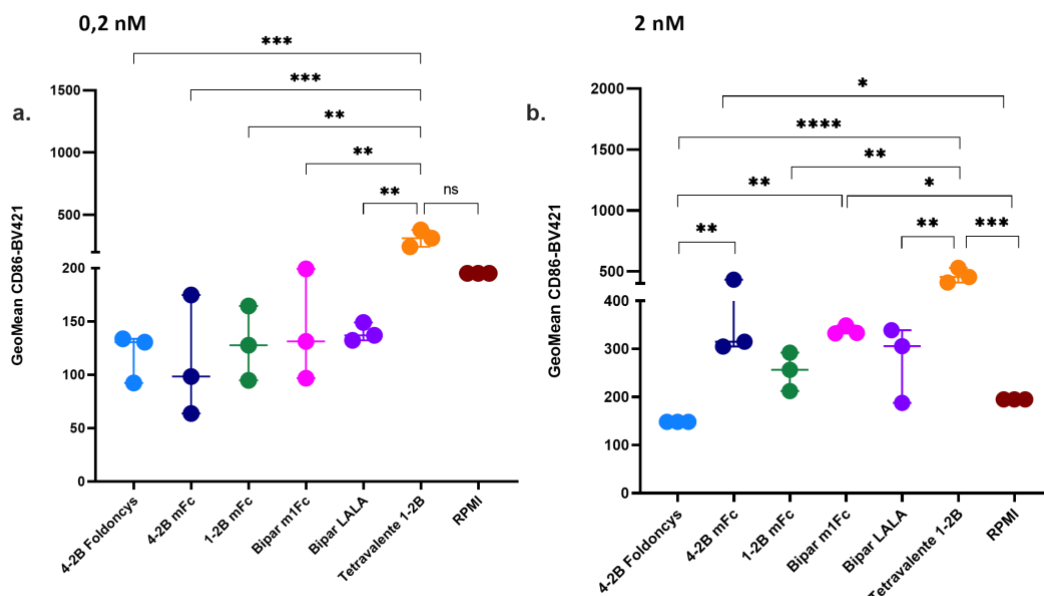


Figura 56. Comparación del aumento de la expresión de CD86 a bajas concentraciones de los distintos anticuerpos. a) Media geométrica de los constructos a una concentración de 0.2 nM de estímulo b) Media geométrica de los constructos a una concentración de 2 nM de estímulo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con prueba Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados, se observa que el marcador CD86 presentó comportamientos variables entre experimentos, evidenciando cierta heterogeneidad en la respuesta. No obstante, resulta consistente la potencia agonista del anticuerpo tetravalente 1-2B, que se mantuvo como el activador más eficaz en todas las condiciones evaluadas.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por **Hesen et al. (2024)**, quienes demostraron que la oligomerización y el aumento de la valencia de anticuerpos anti-CD40 a través de ingeniería genética confieren una potente actividad agonista intrínseca y que constructos hexa- y monovalentes de un nanobody específico para CD40 humano presentan una estimulación del receptor mucho más marcada que la de los constructos bi- o tetravalentes (48).

En este sentido los resultados respaldan la idea de que el aumento de la valencia constituye un factor determinante para potenciar el agonismo de anticuerpos anti-CD40 y que el epítipo reconocido puede contribuir a esta mayor actividad agonista. Todo apunta a que los constructos multivalentes tienen el potencial de mejorar la actividad agonista sobre CD40 en comparación con nanobodies monovalentes. Sin embargo, en nuestro caso, la variabilidad entre experimentos y la falta de reproducibilidad en algunos ensayos impiden establecer conclusiones definitivas sobre su eficacia.

Según los antecedentes del grupo de trabajo, los nanobodies asociados a foldon exhibían una actividad *in vitro* que luego no era reproducible en ensayos *in vivo*. Para comprobar que nuestras construcciones 4-2B Foldoncys y 4-2B Foldoncys-FcRn-OT también exhibieran actividad *in vitro*, antes de poder evaluar su funcionalidad *in vivo*, se realizó la estimulación de esplenocitos de ratón, donde se observó la activación de células B con el marcador CD86-BV421 (**Figura 57**).

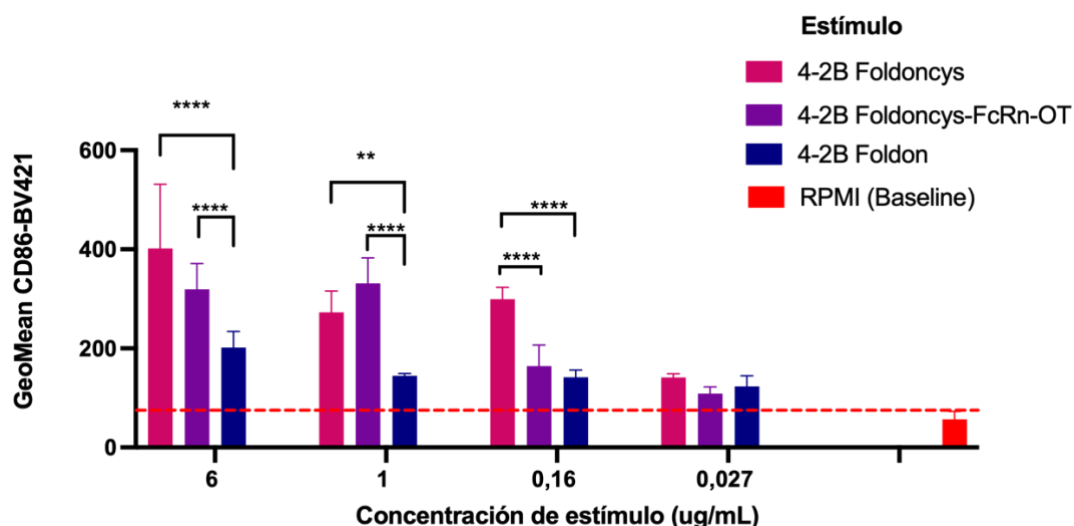


Figura 57. Activación de células B por diferentes construcciones del nanobody 4-2B fusionadas a foldon. Esplenocitos de ratón fueron estimulados *in vitro* con construcciones 4-2Bfoldoncys, 4-2BfoldoncysFcRnOTs y 4-2Bfoldon a distintas concentraciones, y se evaluó la expresión de CD86 en células B mediante citometría de flujo. Se muestra el valor de la media geométrica de fluorescencia (GeoMean) de CD86 para cada condición. La línea roja punteada indica el nivel basal (control con medio RPMI sin estimular). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con prueba de comparaciones múltiples * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Todos los constructos presentaron diferencias significativas con el control sin estimular (RPMI), menos en la concentración más baja (0,027 $\mu\text{g/mL}$). Ambas construcciones con adición de cisteínas en el foldon exhibieron un mayor potencial activador con diferencias significativas en los niveles de activación comparado con la versión inicial sin modificaciones (4-2B Foldon) generada en nuestro grupo. También se observó que, a concentraciones más bajas, equivalentes a 0,16 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, el único que conserva una activación significativa es la versión 4-2B Foldoncys.

Esta diferencia podría explicarse por un mayor enriquecimiento de la forma trimérica funcional en una proteína respecto a la otra o presencia de especies mono o sub oligoméricas, más que por un aumento de la estabilidad del constructo por la adición de cisteínas. Para poder corroborar esto sería necesario comparar ambas proteínas por cromatografía de exclusión molecular y cuantificar la fracción trimérica recuperada antes de atribuir el efecto a cambios de estabilidad.

Este resultado, en conjunto con la caracterización por SDS-PAGE y espectrometría de masas que reveló la formación de oligómeros Nb-foldon de unión covalente, nos impulsó a realizar una primera exploración del potencial adyuvante de estas construcciones, como medida indirecta de su actividad agonista *in vivo*.

7.8 EXPLORACIÓN DEL POTENCIAL ADYUVANTE *IN VIVO* DE LOS NANOBODIES ASOCIADOS A FOLDON

El efecto adyuvante de los nanobodies asociados a foldon resultó nula en construcciones generadas anteriormente en el grupo de trabajo, lo que justamente llevó a generar las variantes con cisteínas. Teniendo en cuenta que estas nuevas construcciones revelaron la formación de trímeros y tetrameros de unión covalente, exhibieron una mayor actividad *in vitro* y presumiblemente podrían tener una mayor estabilidad *in vivo*, se relizó un experimento de inmunización utilizandolas como adyuvantes. Para esto se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 con ovoalbumina fusionada a una región Fc humana equipada con un Nb contra el receptor CD11c que las dirige a las células dendríticas, como se muestra en el esquema de la **figura 57**, usando protocolos de inmunización ya optimizados por el grupo.

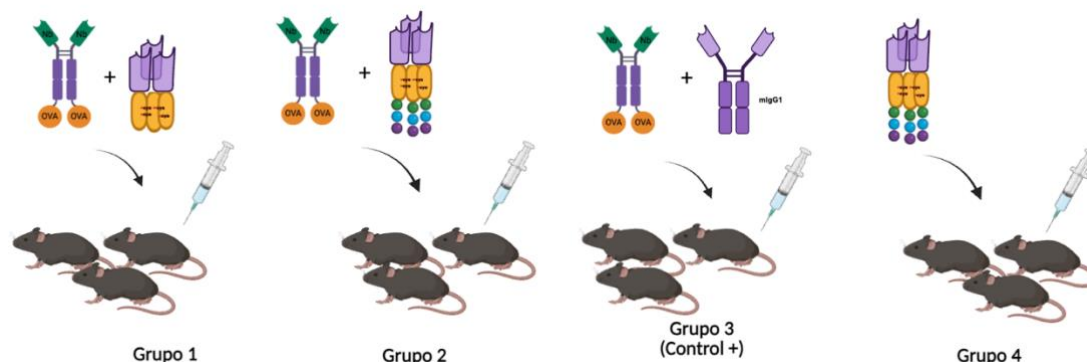


Figura 58. Esquema de inmunización para evaluación de potencial adyuvante de los nanobodies. El antígeno y los nanobodies se coadministraron por vía subcutánea en la región dorsal, de acuerdo con el esquema experimental indicado. Como antígeno se utilizó en el grupo 1, 2 y 3 una quimera anti-CD11c-OVA (NbCD11c-h1Fc-OVA), en el grupo 4 no se utilizó antígeno para evaluar la inmunogenicidad del constructo por los péptidos OT. Como adyuvante se utilizó; G1: 4-2B Foldoncyts; G2: 4-2B Foldoncyts-FcRn-OT; G3: 4-2Bm1Fc; G4: 4-2B Foldoncyts-FcRn-OT

En el modelo de inmunización utilizado en nuestro grupo, el antígeno se administra direccionado a células dendríticas CD11c⁺, lo que en ausencia de adyuvante es capaz de inducir una respuesta humoral detectable, aunque predominantemente del tipo IgG1. Antecedentes con el nanobody 4-2B m1Fc indican que, al utilizarlo como adyuvante, se observa un aumento significativo en la respuesta de anticuerpos totales (IgG) respecto a la inmunización sin adyuvante. Además, su uso induce un cambio en el perfil de subclases de inmunoglobulinas, evidenciado por la presencia de IgG2b, IgG2c e IgG3, lo que refleja una respuesta más equilibrada y funcionalmente diversa, asociada a una mayor activación de células presentadoras y señalización de CD40.

Como primer experimento exploratorio de la función *in vivo* de estas construcciones, se evaluaron dos aspectos de la respuesta inmunitaria en los ratones inmunizados: por un lado, la producción de anticuerpos anti-OVA, y por otro, la respuesta de linfocitos T específicos frente al antígeno.

Las construcciones 4-2B Foldoncys y 4-2B Foldoncys-FcRn-OT indujeron a los 7 días anticuerpos IgG anti-OVA, con un predominio de IgG1 y una marginal respuesta de IgG2c e IgG3 en comparación con el control sin adyuvante (**Figura 59**). No obstante, la magnitud de la respuesta no alcanzó la de la construcción 4-2B m1Fc, control positivo de adyuvanticidad.

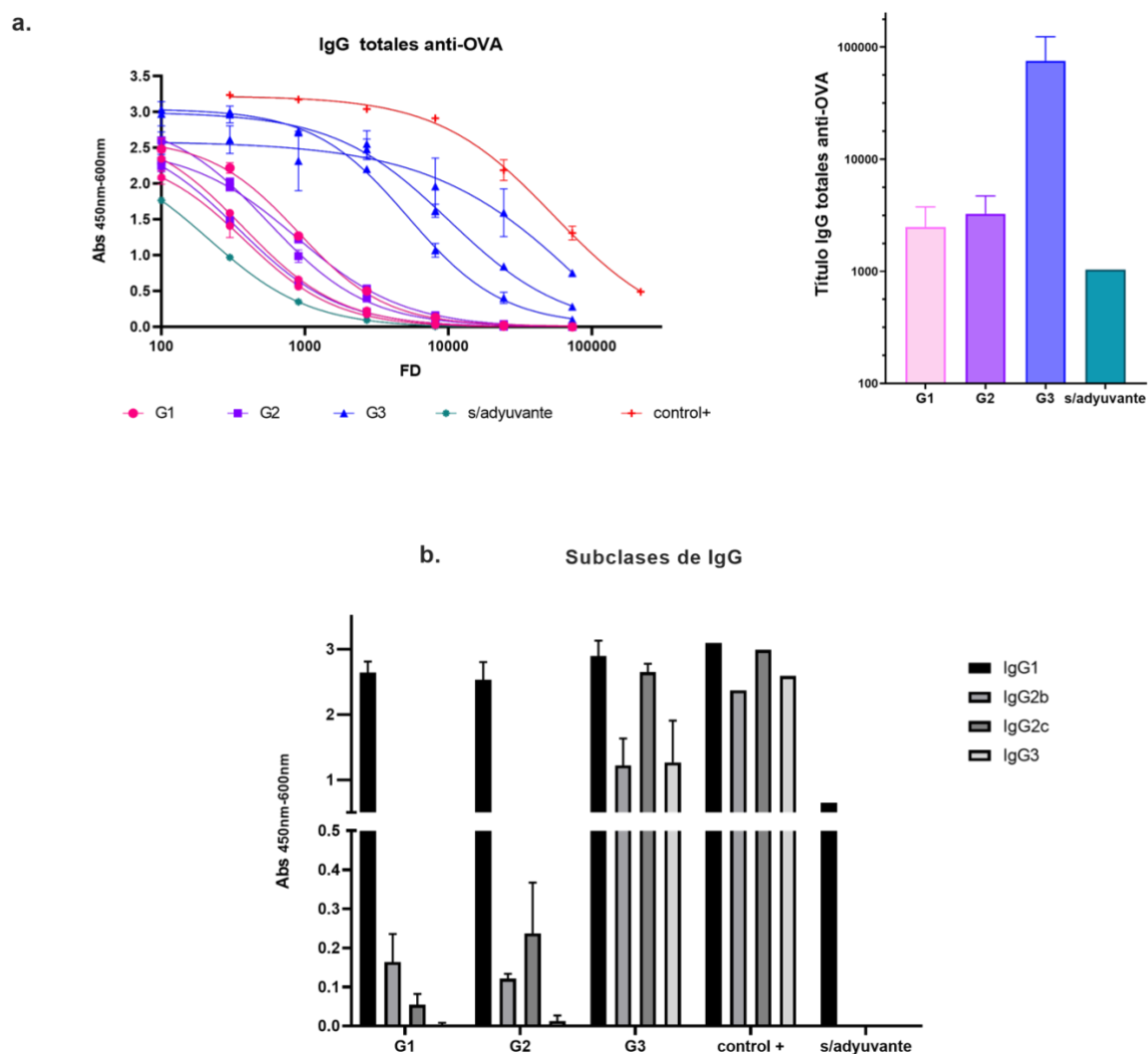


Figura 59. Respuesta de anticuerpos medida a los 7 días de ratones inmunizados medida por ELISA contra ovoalbumina. Respuesta de anticuerpos de sueros diluidos 1/100 **G1:** 4-2B Foldoncys + MR31-OVA, **G2:** 4-2B Foldoncys-FcRn-OT + NbCD11c-h1Fc-OVA, **G3:** 4-2Bm1Fc + MR31-OVA, **control+:** pool de sueros positivos de experimentos anteriores, ratones inmunizados con antígeno + 4-2B-m1Fc. **s/adyuvante:** pool de sueros inmunizados solo con antígeno de experimentos anteriores. **a.** Niveles séricos de anticuerpos IgG totales anti-OVA en los diferentes grupos de ratones inmunizados y título de IgG totales para cada grupo inmunizado. **b.** Perfil de subclases de IgG (IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3) para los distintos grupo para sueros diluidos 1/300. FD: factor de dilución del suero.

Por otro lado, se analizó la capacidad de producir IFN- γ en respuesta al péptido SIINFEKL (OVA_(257–264)) mediante un ensayo IFN- γ ELISpot utilizando esplenocitos de ratón inmunizado. Dado que el péptido SIINFEKL corresponde a un epítipo presentado por MHC clase I, la producción de IFN- γ inducida por este estímulo se atribuye principalmente a linfocitos T CD8⁺ específicos, aunque el ensayo no permite identificar de manera directa el subtipo celular productor de la citoquina.

La mayoría de los pocillos de los grupos inmunizados con constructos Nb-foldon (G1, G2 y G4) mostraron recuentos inferiores a 20 spots y similares al ratón *naive* (sin inmunizar), considerándose negativos. Por otro lado, en el grupo 4-2B m1Fc y en el control de activación policlonal (reestimulación con anti-CD3) se observaron recuentos de spots notablemente más elevados, consistentes con una activación robusta de linfocitos T específicos. La **figura 60** ilustra de manera representativa esta diferencia.

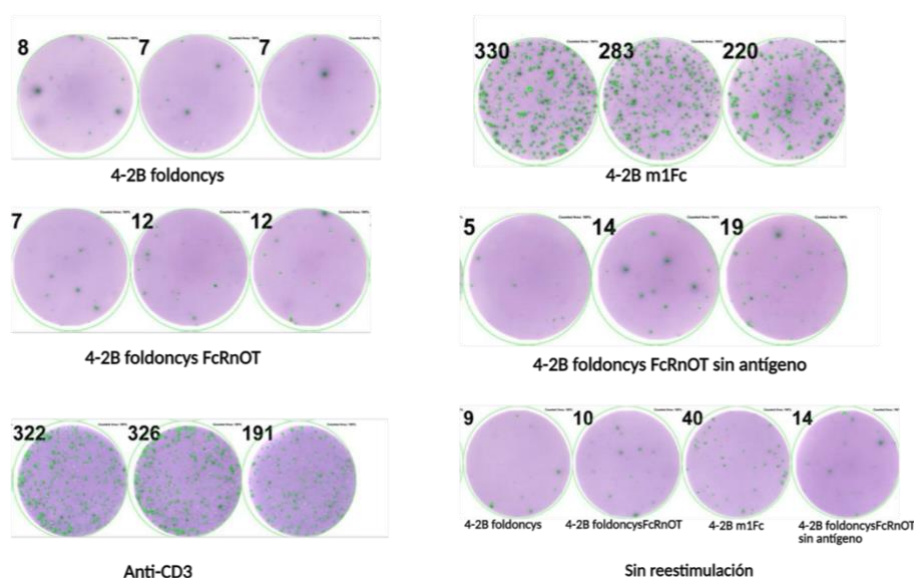


Figura 60. Ensayo ELISpot para detección de células T productoras de IFN- γ . Se muestran ejemplos representativos de tres pocillos negativos (grupos inmunizados con constructos Foldon y reestimulados con el péptido SIINFEKL, donde los recuentos fueron <20 spots/pozo, equivalentes al fondo experimental), tres pocillos positivos (grupo inmunizado con 4-2B m1Fc y reestimulado con SIINFEKL, y un control positivo de activación policlonal con anti-CD3, correspondiente a un pool de esplenocitos de varios grupos reestimulado en placa), y pocillos sin reestimulación, evidenciando una activación robusta de linfocitos T específicos. En verde se indica el conteo automatizado de spots. Se sembraron 4×10^5 células por pocillo.

En consecuencia, no es posible corresponder estos eventos a la expansión de linfocitos T específicos de OVA, sino más bien a variabilidad técnica o activación basal inespecífica. Esto contrasta con la marcada diferencia observada en el grupo 4-2B m1Fc y en el control de activación policlonal con anti-CD3, donde sí se registraron recuentos compatibles con una activación robusta. En la **figura 61** se resumen los resultados del ELISPOT y se ve reflejada la diferencia entre un comportamiento T específico (G3) y un *spotting* positivo (anti-CD3, encuadrado en rojo) y un “fondo” no diferenciable en los grupos con constructos con Foldon.

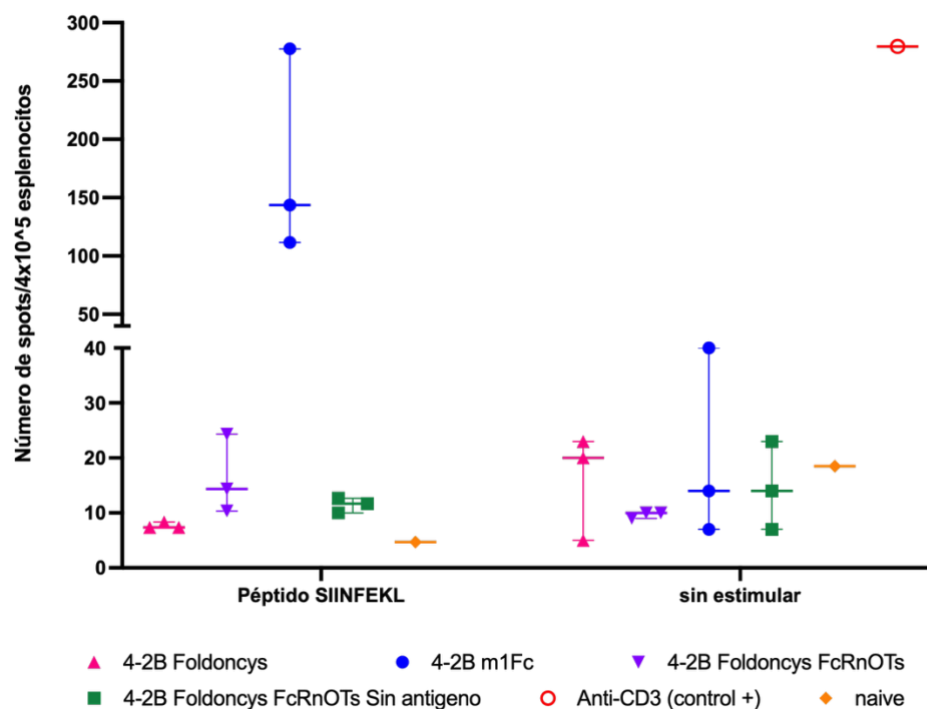


Figura 61. Número de spots por cada 4×10^5 esplenocitos determinados por ELISpot. Se compararon las distintas construcciones bajo dos condiciones: estimulación con antígeno (péptido SIINFEKL), sin estimulación (medio) y además se agregó un control positivo correspondiente a una estimulación policlonal con anti-CD3 de un pool de células de varios ratones de distintos grupos. Los controles naïve corresponden a un ratón no inmunizado.

Al analizar estos resultados es relevante considerar las dosis empleadas (ver sección 5.11.1), donde las construcciones foldon se administraron en una dosis molar mayor. A pesar de esto, la respuesta de los Nb-foldon fue menor que la observada para 4-2B m1Fc que tiene un gran potencial adyuvante. No obstante, no puede descartarse que el aumento de la dosis total o la repetición de la inmunización permita alcanzar una activación más robusta, especialmente si la fracción de trímeros funcionales es limitada.

Se evidenció que los nanobodies trimerizados con foldon son capaces de incrementar moderadamente la respuesta humoral inducida por el antígeno direccionado a CD11c, esencialmente del tipo IgG1, en comparación con la inmunización sin adyuvante. No obstante, la comparación se realizó con sueros de un experimento independiente (pool sin adyuvante) por lo que la magnitud exacta de dicho aumento debe interpretarse con cautela.

Paralelamente, existe una falta de respuestas celulares robustas que podría explicarse por dos fenómenos que se relacionan:

1) No toda la proteína se encuentra en forma de trímero (sección 6.4.2), lo que implica que la cantidad de nanobody trimerizado funcional disponible es considerablemente menor a la dosis administrada.

2) La presencia de especies monoméricas o sub-oligoméricas podría competir por el sitio de unión del receptor sin inducir el agrupamiento necesario para la activación, comportándose funcionalmente como antagonistas ya que bloquean sitios de unión de trímero.

Una estrategia interesante para avanzar en la caracterización de estas construcciones sería purificar selectivamente las especies triméricas covalentes mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). En trabajos previos del grupo (Anexo, **Figura A.6**), se observó mediante SEC que el formato Nb-foldon *sin cisteínas* es capaz de formar trímeros aun en ausencia de uniones covalentes, como es de esperar para el dominio foldon.

Sin embargo, este mismo resultado evidencia una limitación importante: si aplicáramos SEC nativa a la variante con cisteínas, probablemente observaríamos la coexistencia de trímeros covalentes y no covalentes migrando en el mismo volumen de elución. Por ello, la técnica no permitiría obtener exclusivamente el trímero covalente para evaluarlo de manera independiente. Este punto es crítico, considerando que el foldon no covalente no mostró actividad *in vivo* y que el objetivo de la adición de cisteínas es justamente obtener especie trimérica covalente estabilizada por enlaces disulfuro.

Por ende, si el objetivo fuera purificar exclusivamente el trímero covalente, sería necesario recurrir a una separación por SEC en condiciones desnaturalizantes, de modo de romper las interacciones no covalentes y permitir que únicamente las especies covalentemente estabilizadas eluyan en el volumen correspondiente a un trímero.

Estos hallazgos nos dan respaldo para seguir trabajando en la optimización de las construcciones y las condiciones experimentales con el fin de lograr una evidencia más clara del potencial adyuvante de las construcciones asociadas al dominio foldon.

8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se logró generar y caracterizar diferentes formatos de nanobodies agonistas de CD40, tanto en versiones trimerizadas asociadas a foldon como en constructos fusionados a Fc murino y diseños biparatópicos.

En cuanto a la expresión y purificación de las distintas variantes, a priori, la posibilidad de expresión en sistemas más sencillos y económicos, como es la expresión en *E. coli*, resultaba atractiva. Bajo esta consideración, la trimerización a través del domino foldon presentaba la ventaja de que permitía aspirar a utilizar este sistema de expresión, lo cual no es factible con diseños que incluyen la región Fc. Lamentablemente, este no fue el caso, la producción en sistemas procariotas de la construcción con el dominio foldon presentó limitaciones debido a la degradación proteica. Esta degradación observada en la expresión bacteriana podría deberse a limitaciones propias del sistema procariota. En contraste, se logró optimizar la expresión de estos constructos en células de mamífero, obteniendo proteínas en mayor cantidad, sin degradación, más estables y con buena reactividad frente a CD40.

Un hallazgo interesante fue que las versiones foldon con modificaciones (4-2Bfoldoncys y 4-2BfoldoncysFcRnOT) mostraron una mejor capacidad activadora en células B de ratón *in vitro* en comparación con el dominio foldon wild-type, incluso manteniendo actividad a concentraciones bajas. Esta diferencia podría asociarse a variaciones en la composición oligomérica de las preparaciones, cuyo impacto deberá confirmarse mediante una comparación directa de la fracción trimérica recuperada por cromatografía de exclusión molecular.

No obstante, en los estudios *in vivo*, estos constructos administrados en combinación con el direccionamiento del antígeno a CD11c, generaron respuestas humorales detectables e indicios de cambio de clase, aunque no indujeron respuestas de células T citotóxicas específicas. Estos resultados indican que, en las condiciones evaluadas, las construcciones foldon-cys no alcanzaron un nivel de activación comparable al obtenido con formatos Fc ya establecidos en este modelo.

Como siguiente paso, será necesario ajustar la dosificación en función de la proporción real de trímeros presentes en cada preparación y optimizar métodos que permitan enriquecer selectivamente la especie trimérica covalente, como el empleo de cromatografía de exclusión molecular en condiciones desnaturalizantes, para así evaluar con mayor precisión el potencial agonista y adyuvante de estas construcciones.

También es importante mencionar que la incorporación del péptido afin al receptor de Fc neonatal (FcRn) claramente no contribuyó a potenciar la actividad agonista *in vivo*. Dado que no medimos farmacocinética del Nb-Foldoncys-FcRn-OT, no podemos descartar que el módulo haya prolongado la vida media. Evaluar dicho efecto representa una perspectiva importante para

trabajos futuros. Una aproximación inicial podría consistir en realizar un ensayo ELISA utilizando los sueros del día 7 de los animales empleados en el ELISpot, a fin de comparar la detección de las distintas versiones del Nb-Foldon. Este análisis permitiría explorar de forma indirecta si las construcciones que contienen el péptido FcRn presentan mayor persistencia en circulación.

En esta instancia trabajamos con los nanobodies anti-CD40 como plataforma adyuvante para una vacuna direccionada a DCs por *targeting* a CD11c. Sería interesante evaluar el potencial de estas construcciones en esquemas combinatorios con otros inmunoestimuladores o terapias de *inhibición de puntos de control*, dado que la vía CD40 ha demostrado sinergia en modelos de inmunoterapia antitumoral (14,26).

Una importante dificultad que surgió a momento de comparar los resultados de activación de células B *in vitro* con diferentes marcadores fue la variabilidad experimental. No obstante, el patrón general respalda la estrategia de ingeniería de nanobodies multivalentes para potenciar la señal de CD40.

Si bien tanto el constructo tetravalente monoespecífico como el biparatópico presentan la misma valencia y una avidéz aparente comparable, el primero exhibió una mayor actividad agonista, lo que indica que las diferencias observadas no pueden explicarse únicamente por la multivalencia ni por la fuerza de unión. Por el contrario, la posible organización espacial más uniforme de los sitios de unión en el tetravalente monoparatópico podría favorecer la formación de complejos más estables, optimizando la activación. Nuestros resultados refuerzan la idea de que, además de la valencia, la geometría y compatibilidad de los epítopes reconocidos son determinantes clave del agonismo.

Con esto en mente, sería interesante desarrollar una versión tetravalente basada en 4-2B para compararla directamente con 1-2B y evaluar si el epítipo reconocido tiene un papel determinante en la activación. Esto cobra relevancia considerando que la misma arquitectura 1-2B/1-2B mostró mayor actividad que 1-2B/4-2B, lo que plantea la posibilidad de que la posición y accesibilidad del epítipo también influyen en el grado de agonismo.

Adicionalmente, podrían explorarse otros ajustes en el diseño del constructo biparatópico, ya sea alternar los clones dentro del vector (1-2B y 4-2B), modificar la longitud y flexibilidad del *linker* para optimizar la geometría de los sitios de unión, e incluso evaluar nuevas combinaciones de Nb, como la inclusión del clon D9.

Este tipo de comparaciones podrían ayudar a entender mejor cómo interactúan los distintos factores (multivalencia, epítipo y unión a FcR γ IIB) en la generación de señalización efectiva y servir de base para diseñar versiones más potentes.

La versión biparatópica LALA, independiente de FcγRIIB, mantuvo cierta actividad que fue mayor a las versiones bivalentes monoparatópicas, indicando que el clustering del receptor puede generarse al aumentar la valencia sin necesidad de interacción con receptores de Fc. Esto sugiere que es posible generar constructos con actividad intrínseca independiente de Fc, y que la multivalencia podría ser un factor clave para potenciar ese efecto. En este sentido, sería interesante diseñar constructos con mayor valencia (hexavalentes, por ejemplo) siguiendo lo reportado por **Yang et al** (56), ya que un número más alto de sitios de unión podría favorecer un agrupamiento más eficiente del receptor y aumentar la señalización sin depender del entrecruzamiento mediado por Fc. Queda abierta también la posibilidad de explorar la actividad de las distintas versiones *in vivo*, donde podrían aparecer diferencias.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que es posible diseñar y expresar nanobodies agonistas de CD40 en distintos formatos, los cuales presentan actividad biológica *in vitro*. Sin embargo, la variabilidad observada entre ensayos y la falta de reproducibilidad en ciertos sistemas resaltan la necesidad de optimizar tanto la selección de los constructos más prometedores como los modelos y condiciones experimentales empleados para su evaluación. Aun así, consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo de tesina no solo generaron conocimientos valiosos para los intentos del grupo de continuar avanzando en la ingeniería de nanobodies agonistas de CD40, sino que demostraron el potencial que presentan como herramientas para la modulación de la respuesta inmune en tumores, en particular como plataformas adyuvantes para el desarrollo de vacunas.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar AR, Devan AR, Nair B, Vinod BS, Nath LR. Harnessing the immune system against cancer: current immunotherapy approaches and therapeutic targets. *Mol Biol Rep.* 2021 Dec 20;48(12):8075–95.
2. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. Vol. 234, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 8509–21.
3. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology*, 5th ed.
4. Coulie PG, Van Den Eynde BJ, Van Der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. Vol. 14, *Nature Reviews Cancer*. 2014.
5. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. Vol. 12, *Nature Reviews Immunology*. 2012.
6. Embgenbroich M, Burgdorf S. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol.* 2018;9:1643.
7. Thaïss CA, Semmling V, Franken L, Wagner H, Kurts C. Chemokines: A new dendritic cell signal fort cell activation. *Front Immunol.* 2011;2(AUG).
8. Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol.* 2009 Oct;21(5):265–72.
9. Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Vol. 229, *Immunological Reviews*. 2009. p. 152–72.
10. Bromley SK, Iaboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, et al. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol.* 2001 Dec 19;2(12):1159–66.
11. Bullock TNJ. CD40 stimulation as a molecular adjuvant for cancer vaccines and other immunotherapies. Vol. 19, *Cellular and Molecular Immunology*. Springer Nature; 2022. p. 14–22.
12. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. *Am J Clin Oncol.* 2016 Feb;39(1):98–106.
13. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015 Aug 24;15(8):486–99.

14. Vonderheide RH. The Immune Revolution: A Case for Priming, Not Checkpoint. Vol. 33, *Cancer Cell*. Cell Press; 2018. p. 563–9.
15. Bennett SRM, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JFAP, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. 1998 Jun;393(6684):478–80.
16. Schoenberger SP, Toes REM, van der Voort EIH, Offringa R, Melief CJM. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. *Nature*. 1998 Jun;393(6684):480–3.
17. Richards DM, Sefrin JP, Gieffers C, Hill O, Merz C. Concepts for agonistic targeting of CD40 in immuno-oncology. Vol. 16, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Taylor and Francis Inc.; 2020. p. 377–87.
18. Salomon R, Dahan R. Next Generation CD40 Agonistic Antibodies for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2022 Jul 13;13.
19. Enell Smith K, Deronic A, Hägerbrand K, Norlén P, Ellmark P. Rationale and clinical development of CD40 agonistic antibodies for cancer immunotherapy. Vol. 21, *Expert Opinion on Biological Therapy*. Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 1635–46.
20. Huffman AP, Lin JH, Kim SI, Byrne KT, Vonderheide RH. CCL5 mediates CD40-driven CD4⁺ T cell tumor infiltration and immunity. *JCI Insight*. 2020 May 21;5(10).
21. Vonderheide RH. CD40 Agonist Antibodies in Cancer Immunotherapy. *Annu Rev Med*. 2020 Jan 27;71(1):47–58.
22. French RR, Chan HTC, Tutt AL, Glennie MJ. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med*. 1999 May 1;5(5):548–53.
23. Sancho D, Mourão-Sá D, Joffre OP, Schulz O, Rogers NC, Pennington DJ, et al. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *Journal of Clinical Investigation*. 2008 Jun 2;118(6):2098–110.
24. Djureinovic D, Wang M, Kluger HM. Agonistic CD40 Antibodies in Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 15;13(6):1302.
25. Zippelius A, Schreiner J, Herzig P, Müller P. Induced PD-L1 Expression Mediates Acquired Resistance to Agonistic Anti-CD40 Treatment. *Cancer Immunol Res*. 2015 Mar 1;3(3):236–44.

26. Ma HS, Poudel B, Torres ER, Sidhom JW, Robinson TM, Christmas B, et al. A CD40 Agonist and PD-1 Antagonist Antibody Reprogram the Microenvironment of Nonimmunogenic Tumors to Allow T-cell-Mediated Anticancer Activity. *Cancer Immunol Res.* 2019 Mar 1;7(3):428–42.
27. Byrne KT, Betts CB, Mick R, Sivagnanam S, Bajor DL, Laheru DA, et al. Neoadjuvant Selicrelumab, an Agonist CD40 Antibody, Induces Changes in the Tumor Microenvironment in Patients with Resectable Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2021 Aug 15;27(16):4574–86.
28. Johnson PW, Steven NM, Chowdhury F, Dobbyn J, Hall E, Ashton-Key M, et al. A Cancer Research UK phase I study evaluating safety, tolerability, and biological effects of chimeric anti-CD40 monoclonal antibody (MAb), Chi Lob 7/4. *Journal of Clinical Oncology.* 2010 May 20;28(15_suppl):2507–2507.
29. Hussein M, Berenson JR, Niesvizky R, Munshi N, Matous J, Sobecks R, et al. A phase I multidose study of dacetuzumab (SGN-40; humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with multiple myeloma. *Haematologica.* 2010 May 1;95(5):845–8.
30. Smulski CR, Beyrath J, Decossas M, Chekkat N, Wolff P, Estieu-Gionnet K, et al. Cysteine-rich domain 1 of CD40 mediates receptor self-assembly. *Journal of Biological Chemistry.* 2013 Apr 12;288(15):10914–22.
31. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF Receptor Review Superfamilies: Integrating Mammalian Biology The receptors and ligands in this superfamily have unique structural attributes that couple them directly to signaling pathways for cell proliferation, survival, and differentiation. Thus, they have assumed prominent roles in the generation of tissues and transient microen [Internet]. Vol. 104, *Cell.* 2001. Available from: <http://www.gene>.
32. Liu L, Wu Y, Ye K, Cai M, Zhuang G, Wang J. Antibody-Targeted TNFRSF Activation for Cancer Immunotherapy: The Role of FcγRIIB Cross-Linking. Vol. 13, *Frontiers in Pharmacology.* Frontiers Media S.A.; 2022.
33. Chin SM, Kimberlin CR, Roe-Zurz Z, Zhang P, Xu A, Liao-Chan S, et al. Structure of the 4-1BB/4-1BBL complex and distinct binding and functional properties of utomilumab and urelumab. *Nat Commun.* 2018 Nov 8;9(1):4679.
34. Yu X, Chan HTC, Orr CM, Dadas O, Booth SG, Dahal LN, et al. Complex Interplay between Epitope Specificity and Isotype Dictates the Biological Activity of Anti-human CD40 Antibodies. *Cancer Cell.* 2018 Apr 9;33(4):664-675.e4.

35. Vonderheide RH, Flaherty KT, Khalil M, Stumacher MS, Bajor DL, Hutnick NA, et al. Clinical Activity and Immune Modulation in Cancer Patients Treated With CP-870,893, a Novel CD40 Agonist Monoclonal Antibody. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 Mar 1;25(7):876–83.
36. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev*. 2015 Nov 26;268(1):25–51.
37. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3716–25.
38. Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Apr 30;11(4):311–31.
39. White AL, Chan HTC, Roghanian A, French RR, Mockridge CI, Tutt AL, et al. Interaction with Fc γ RIIB Is Critical for the Agonistic Activity of Anti-CD40 Monoclonal Antibody. *The Journal of Immunology*. 2011 Aug 15;187(4):1754–63.
40. Li F, Ravetch J V. Inhibitory Fc γ Receptor Engagement Drives Adjuvant and Anti-Tumor Activities of Agonistic CD40 Antibodies. *Science* (1979). 2011 Aug 19;333(6045):1030–4.
41. Dahan R, Barnhart BC, Li F, Yamniuk AP, Korman AJ, Ravetch J V. Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fc γ R Engagement. *Cancer Cell*. 2016 Jun 13;29(6):820–31.
42. Garriss CS, Wong JL, Ravetch J V., Knorr DA. Dendritic cell targeting with Fc-enhanced CD40 antibody agonists induces durable antitumor immunity in humanized mouse models of bladder cancer. *Sci Transl Med*. 2021 May 19;13(594).
43. Vitale LA, Thomas LJ, He LZ, O'Neill T, Widger J, Crocker A, et al. Development of CDX-1140, an agonist CD40 antibody for cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2019 Feb 31;68(2):233–45.
44. Richman L, Vonderheide R. Anti-human CD40 monoclonal antibody therapy is potent without FcR crosslinking. *Oncoimmunology*. 2014 May 29;3(5):e28610.
45. Dillon TM, Ricci MS, Vezina C, Flynn GC, Liu YD, Rehder DS, et al. Structural and Functional Characterization of Disulfide Isoforms of the Human IgG2 Subclass. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Jun;283(23):16206–15.

46. White AL, Chan HTC, French RR, Willoughby J, Mockridge CI, Roghanian A, et al. Conformation of the Human Immunoglobulin G2 Hinge Imparts Superagonistic Properties to Immunostimulatory Anticancer Antibodies. *Cancer Cell*. 2015 Jan;27(1):138–48.
47. Yu X, Orr CM, Chan HTC, James S, Penfold CA, Kim J, et al. Reducing affinity as a strategy to boost immunomodulatory antibody agonism. *Nature*. 2023 Feb 16;614(7948):539–47.
48. N, Anany M, Freidel A, Baker M, Siegmund D, Zaitseva O, et al. Genetically engineered IgG1 and nanobody oligomers acquire strong intrinsic CD40 agonism. *Bioengineered*. 2024;15(1).
49. Hong Seok Cheong, Chang JS, Park JM, Byun SM. Affinity enhancement of bispecific antibody against two different epitopes in the same antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Dec;173(3):795–800.
50. Niquille DL, Fitzgerald KM, Gera N. Biparatopic antibodies: therapeutic applications and prospects. *MAbs*. 2024 Dec 31;16(1).
51. Jähnichen S, Blanchetot C, Maussang D, Gonzalez-Pajuelo M, Chow KY, Bosch L, et al. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Nov 23;107(47):20565–70.
52. Steeland S, Vandenbroucke RE, Libert C. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today*. 2016 Jul;21(7):1076–113.
53. Harms BD, Kearns JD, Iadevaia S, Lugovskoy AA. Understanding the role of cross-arm binding efficiency in the activity of monoclonal and multispecific therapeutic antibodies. *Methods*. 2014 Jan;65(1):95–104.
54. Kast F, Schwill M, Stüber JC, Pfundstein S, Nagy-Davidescu G, Rodríguez JMM, et al. Engineering an anti-HER2 biparatopic antibody with a multimodal mechanism of action. *Nat Commun*. 2021 Jun 18;12(1):3790.
55. Rennert PD, Dufort FJ, Su L, Sanford T, Birt A, Wu L, et al. Anti-CD19 CAR T Cells That Secrete a Biparatopic Anti-CLEC12A Bridging Protein Have Potent Activity Against Highly Aggressive Acute Myeloid Leukemia *In Vitro* and *In Vivo*. *Mol Cancer Ther*. 2021 Oct 1;20(10):2071–81.
56. Yang Y, Yeh SH, Madireddi S, Matochko WL, Gu C, Pacheco Sanchez P, et al. Tetravalent biepitopic targeting enables intrinsic antibody agonism of tumor

- necrosis factor receptor superfamily members. *MAbs*. 2019 Aug 18;11(6):996–1011.
57. Siwicki M, Gort-Freitas NA, Messemaker M, Bill R, Gungabeesoon J, Engblom C, et al. Resident Kupffer cells and neutrophils drive liver toxicity in cancer immunotherapy. *Sci Immunol*. 2021 Jul 29;6(61).
 58. Bonnans C, Thomas G, He W, Jung B, Chen W, Liao M, et al. CD40 agonist-induced IL-12p40 potentiates hepatotoxicity. *J Immunother Cancer*. 2020 May 30;8(1).
 59. Knorr DA, Dahan R, Ravetch J V. Toxicity of an Fc-engineered anti-CD40 antibody is abrogated by intratumoral injection and results in durable antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Oct 23;115(43):11048–53.
 60. Naturally occurring antibodies devoid of light chains.
 61. Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*. 1995 Mar;374(6518):168–73.
 62. Blanc MR, Anouassi A, Abed MA, Tsikis G, Canepa S, Labas V, et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type γ -globulins from camelid sera. *Biotechnol Appl Biochem*. 2009 Dec 23;54(4):207–12.
 63. Muyldermans S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies. Vol. 82, *Annual Review of Biochemistry*. 2013. p. 775–97.
 64. Jovčevska I, Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs*. 2020 Feb 4;34(1):11–26.
 65. Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Mar;128(1–3):178–83.
 66. Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci*. 2001 Apr;26(4):230–5.
 67. Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LGJ, de Geus B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol*. 2000 Aug;37(10):579–90.

68. Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. NANOBODIES®: A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. Vol. 24, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
69. Nguyen VK, Desmyter A, Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in camelidae. In 2001. p. 261–96.
70. Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. Mol Immunol. 1997 Nov;34(16–17):1121–31.
71. Conrath KE, Wernery U, Muyldermans S, Nguyen VK. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. Dev Comp Immunol. 2003 Feb;27(2):87–103.
72. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Nov 18;77(1):13–22.
73. De Vos J, Devoogdt N, Lahoutte T, Muyldermans S. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical *in vivo* molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target. Expert Opin Biol Ther. 2013 Dec 16;13(8):1149–60.
74. Kunz P, Zinner K, Mücke N, Bartoschik T, Muyldermans S, Hoheisel JD. The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance. Sci Rep. 2018 May 21;8(1):7934.
75. Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. Cancer and Metastasis Reviews. 2005 Dec;24(4):501–19.
76. Kijanka M, Dorresteyn B, Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PM. Nanobody-Based Cancer Therapy of Solid Tumors. Nanomedicine. 2015 Jan 19;10(1):161–74.
77. Ackaert C, Smiejkowska N, Xavier C, Sterckx YGJ, Denies S, Stijlemans B, et al. Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies. Front Immunol. 2021 Mar 9;12.
78. Schoonooghe S, Laoui D, Van Ginderachter JA, Devoogdt N, Lahoutte T, De Baetselier P, et al. Novel applications of nanobodies for *in vivo* bio-imaging of inflamed tissues in inflammatory diseases and cancer. Immunobiology. 2012 Dec;217(12):1266–72.

79. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front Immunol.* 2017 Nov 22;8.
80. Roovers RC, Laeremans T, Huang L, De Taeye S, Verkleij AJ, Revets H, et al. Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2007 Mar 30;56(3):303–17.
81. Xavier C, Blykers A, Laoui D, Bolli E, Vaneyken I, Bridoux J, et al. Clinical Translation of [68Ga]Ga-NOTA-anti-MMR-sdAb for PET/CT Imaging of Protumorigenic Macrophages. *Mol Imaging Biol.* 2019 Oct 22;21(5):898–906.
82. Bannas P, Well L, Lenz A, Rissiek B, Haag F, Schmid J, et al. *In vivo* near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies. *Contrast Media Mol Imaging.* 2014 Mar 12;9(2):135–42.
83. Broos K, Lecocq Q, Xavier C, Bridoux J, Nguyen TT, Corthals J, et al. Evaluating a Single Domain Antibody Targeting Human PD-L1 as a Nuclear Imaging and Therapeutic Agent. *Cancers (Basel).* 2019 Jun 21;11(6):872.
84. Ingram JR, Blomberg OS, Rashidian M, Ali L, Garforth S, Fedorov E, et al. Anti-CTLA-4 therapy requires an Fc domain for efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018 Apr 10;115(15):3912–7.
85. Homayouni V, Khanahmad H, Ganjalikhani-Hakemi M, Behdani M, Ghasemi P, Rezaei A. Stimulation of Camel Polyclonal Antibody against Human T cell Immunoglobulin and Mucin 3. *Iran J Biotechnol.* 2017 Sep 27;15(3):166–71.
86. Ingram JR, Blomberg OS, Sockolosky JT, Ali L, Schmidt FI, Pishesha N, et al. Localized CD47 blockade enhances immunotherapy for murine melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017 Sep 19;114(38):10184–9.
87. Sadeghi A, Behdani M, Muyldermans S, Habibi-Anbouhi M, Kazemi-Lomedasht F. Development of a mono-specific anti-VEGF bivalent nanobody with extended plasma half-life for treatment of pathologic neovascularization. *Drug Test Anal.* 2020 Jan 12;12(1):92–100.
88. Xie YJ, Dougan M, Jaiikhani N, Ingram J, Fang T, Kummer L, et al. Nanobody-based CAR T cells that target the tumor microenvironment inhibit the growth of solid tumors in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019 Apr 16;116(16):7624–31.

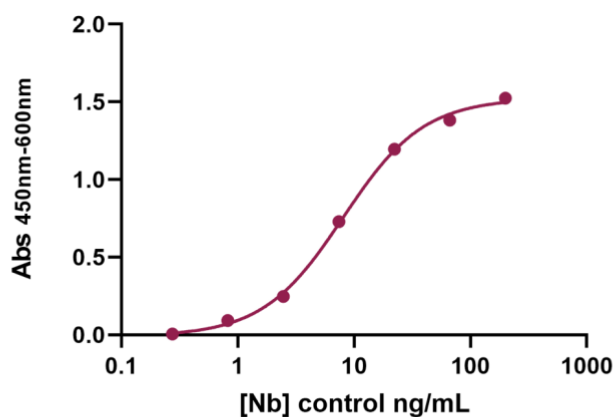
89. Li L, He P, Zhou C, Jing L, Dong B, Chen S, et al. A Novel Bispecific Antibody, S-Fab, Induces Potent Cancer Cell Killing. *Journal of Immunotherapy*. 2015 Nov;38(9):350–6.
90. Li L, He P, Zhou C, Jing L, Dong B, Chen S, et al. A Novel Bispecific Antibody, S-Fab, Induces Potent Cancer Cell Killing. *Journal of Immunotherapy*. 2015 Nov;38(9):350–6.
91. Zhao Y, Li Y, Wu X, Li L, Liu J, Wang Y, et al. Identification of anti-CD16a single domain antibodies and their application in bispecific antibodies. *Cancer Biol Ther*. 2020 Jan 2;21(1):72–80.
92. Yang EY, Shah K. Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Front Oncol*. 2020 Jul 23;10.
93. Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. Phage display—A powerful technique for immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 Dec 27;8(12):1817–28.
94. Zhao A, Tohidkia MR, Siegel DL, Coukos G, Omid Y. Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy. *Crit Rev Biotechnol*. 2016 Mar 3;36(2):276–89.
95. Gütth S, Kapinos L, Möglich A, Meier S, Grzesiek S, Kiefhaber T. Very Fast Folding and Association of a Trimerization Domain from Bacteriophage T4 Fibrin. *J Mol Biol*. 2004 Apr;337(4):905–15.
96. Shrestha A, Sadeyen JR, Lukosaityte D, Chang P, Van Hulten M, Iqbal M. Targeting Haemagglutinin Antigen of Avian Influenza Virus to Chicken Immune Cell Receptors Dec205 and CD11c Induces Differential Immune-Potentiating Responses. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jul 13;9(7):784.
97. Palomo C, Mas V, Detalle L, Depla E, Cano O, Vázquez M, et al. Trivalency of a Nanobody Specific for the Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein Drastically Enhances Virus Neutralization and Impacts Escape Mutant Selection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Nov;60(11):6498–509.
98. Dekkers G, Bentlage AEH, Stegmann TC, Howie HL, Lissenberg-Thunnissen S, Zimring J, et al. Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. *MAbs*. 2017 Jul 4;9(5):767–73.
99. Lu Y, Swartz JR. Disulfide stabilized foldon polypeptides. World Intellectual Property Organization (WIPO); WO2013177283A2Lu, Y.; Swartz, J. R., 2013.

100. Sockolosky JT, Tiffany MR, Szoka FC. Engineering neonatal Fc receptor-mediated recycling and transcytosis in recombinant proteins by short terminal peptide extensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Oct 2;109(40):16095–100.
101. Lu Y, Welsh JP, Swartz JR. Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for potentially broadly protective influenza vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Jan 7;111(1):125–30.
102. Padula Roca C. Generación de antígenos quiméricos por conjugación a nanobodies para su direccionamiento a células dendríticas. [Montevideo]: Universidad de la República; 2020.
103. Olichon A, Schweizer D, Muyldermans S, de Marco A. Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnol*. 2007 Dec 26;7(1):7.
104. Reichelt P, Schwarz C, Donzeau M. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. *Protein Expr Purif*. 2006 Apr;46(2):483–8.
105. Cytiva. MabSelect™ VH3 Affinity Resin — Product Description and Application Guide. Marlborough, MA; 2022.
106. Swiss Institute of Bioinformatics. ExPASy ProtParam Tool.
107. Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005 Mar;35(3):237–47.
108. Mariati, Ho SCL, Yap MGS, Yang Y. Evaluating post-transcriptional regulatory elements for enhancing transient gene expression levels in CHO K1 and HEK293 cells. *Protein Expr Purif*. 2010 Jan;69(1):9–15.
109. Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB, et al. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 May 9;97(10):5399–404.
110. University of Cambridge D of E. MyGels. Cambridge: University of Cambridge; 2016.
111. Arduin E, Arora S, Bamert PR, Kuiper T, Popp S, Geisse S, et al. Highly reduced binding to high and low affinity mouse Fc gamma receptors by L234A/L235A and

N297A Fc mutations engineered into mouse IgG2a. *Mol Immunol*. 2015 Feb;63(2):456–63.

112. Mayes PA, Hance KW, Hoos A. The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Jul 15;17(7):509–27.

10 ANEXO



Concentración Nb en fracción (mg/mL)	E4	E5-6	E7	E8	E9	Flow
0,5	0	0,841	0,626	0,964	0,118	
0,1	0	0,129	0,102	0,203	0	
0,02	0	0,002	0	0,017	0	
						1,561

Figura A1. Curva estándar de reactividad frente a CD40 obtenida con el nanobody 4-2B sin modificaciones en cisteínas, junto con las lecturas de absorbancia correspondientes a las fracciones de elución y flowthrough de la purificación. Las señales bajas observadas en las fracciones eluidas contrastan con la alta absorbancia del flowthrough, indicando una baja retención del constructo por parte de la columna de afinidad.

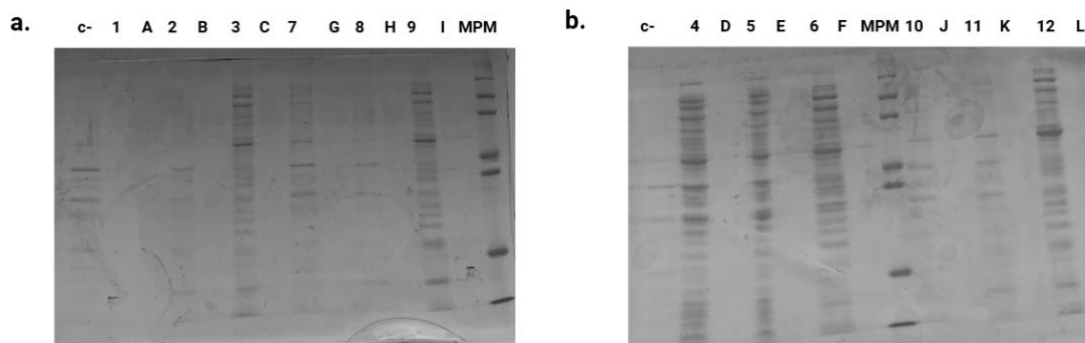


Figura A2. prueba de expresión en LB-kanamicina tanto a 28°C ON o a 37°C por 4hs a las distintas concentraciones de IPTG y lisis por Shock osmótico. **A)** inducción a 28°C overnight, **b)** a 37°C 4hs. No se ven bandas a gel 28°C Izq a der : C-,4-2BFoldoncyts 2uM s/p (sin purificar), 4-2B Foldoncyts 2uM p (purificado), 4-2B Foldoncyts 10uM s/p, 4-2B Foldoncyts 10uM p, 4-2B Foldoncyts 50uM s/p, 4-2B Foldoncyts 50uM p, 4-2B Folconcyts-FcRn 2uM s/p, 4-2B Folconcyts-FcRn 2uM p, 4-2B Folconcyts-FcRn 10uM s/p, 4-2B Folconcyts-FcRn 10uM p, 4-2B Folconcyts-FcRn 50uM s/p, 4-2B Folconcyts-FcRn 50uM p

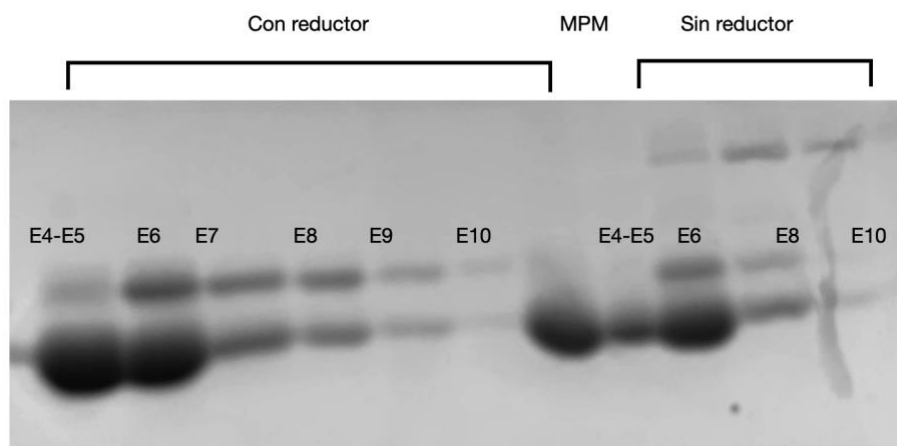


Figura A3. SDS-PAGE (12,5 %) de la construcción 4-2B Foldoncys expresada en *E. coli* (BL21 DE3).

Se muestran las fracciones E4–E10 purificadas mediante afinidad a resina **MabSelect VH3**, bajo condiciones reductoras y no reductoras. Si bien el marcador de peso molecular (MPM) no se resolvió adecuadamente, se observa el patrón de degradación característico de la construcción y la presencia de especies de mayor peso molecular en condiciones no reductoras, compatibles con formas multimerizadas.

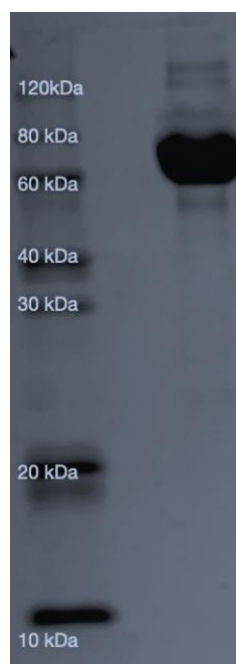


Figura A4. SDS-PAGE (12,5 %) de la construcción tetraivalente 1-2B–1-2B. Se observa una banda principal que migra a una altura compatible con su peso molecular teórico (PM \approx 56,6kDa), determinado a partir de la secuencia aminoacídica del constructo. El marcador de peso molecular (MPM, PageRuler Prestained Protein Ladder, GenScript) se incluye como referencia.

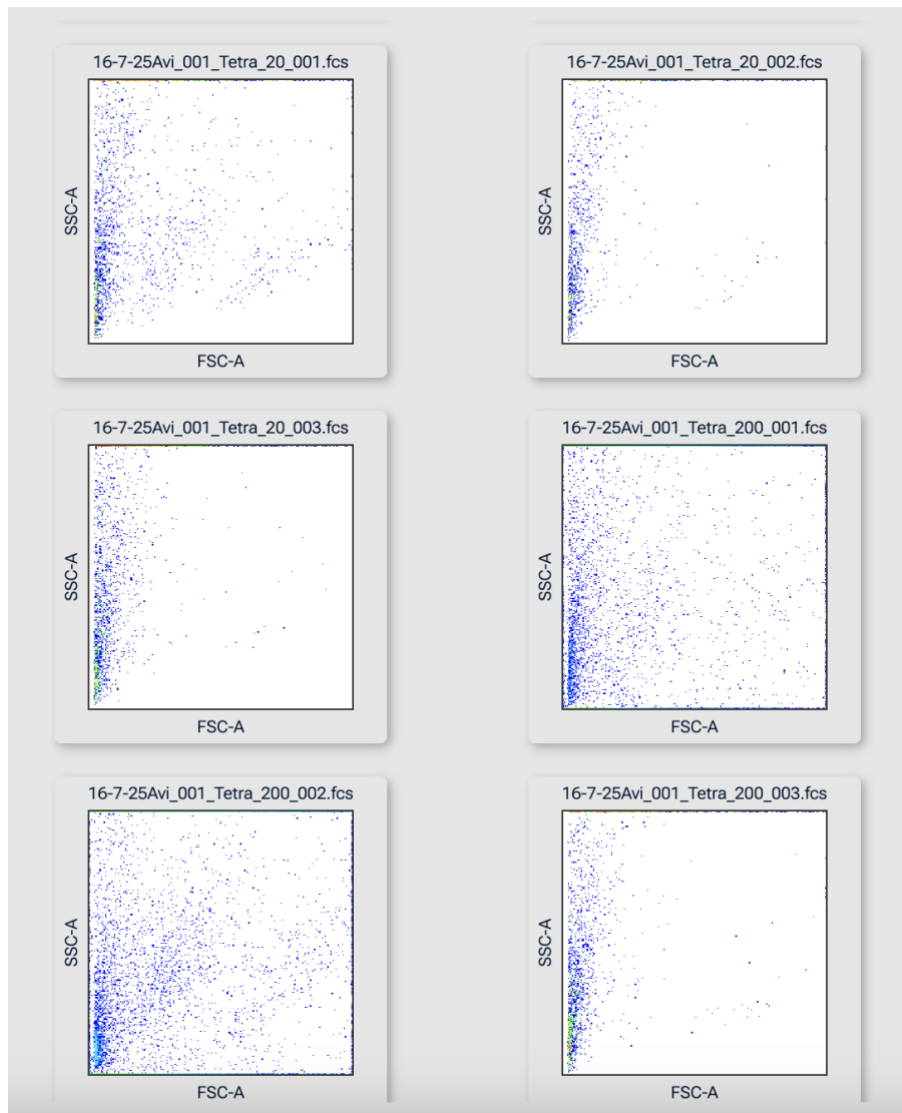


Figura A5. Dot-plot SSC vs FSC correspondientes a la construcción tetraivalente 1-2B a concentraciones de 20 μ M y 200 μ M. En ambas condiciones se observa una marcada reducción en el número de eventos detectados, evidenciando la **ausencia de poblaciones celulares definidas**, lo que impidió realizar el *gating* correspondiente durante el análisis por citometría de flujo.

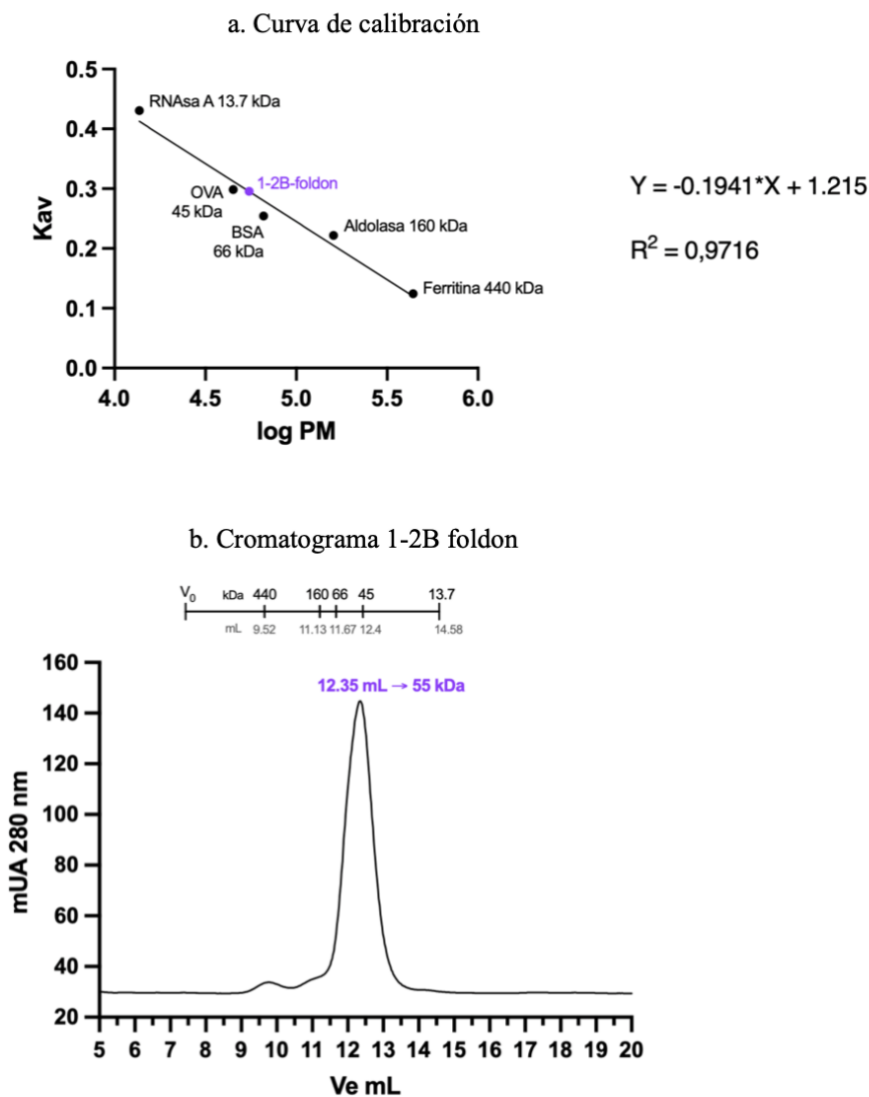


Figura A6. Análisis por cromatografía de exclusión molecular (SEC) del constructo 1-2B-foldon.
(a) Curva de calibración obtenida con estándares proteicos de pesos moleculares conocidos (RNAsa A 13,7 kDa; aldolasa 160 kDa; OVA 45 kDa; BSA 66 kDa; ferritina 440 kDa) utilizando una columna Superose 12 HR 10/30 (Cytiva) con flujo de 0,4 mL/min. Los valores de K_{av} se graficaron en función de $\log(PM)$ para generar la recta de regresión ($R^2 = 0,9716$), empleada para estimar el peso molecular aparente de la muestra. El punto correspondiente al 1-2B-foldon se indica en violeta. **(b)** Perfil de elución (cromatograma) del constructo 1-2B-foldon. El principal pico de absorbancia se observó a 12,35 mL, lo que corresponde a un peso molecular estimado de aproximadamente 55 kDa según la curva de calibración.