



“Producción recombinante de fragmentos derivados del receptor linfocitario CD6 y exploración de su potencial valor inmunoterapéutico”

Tesis de grado - Licenciatura en bioquímica

Gerónimo Huerta Firpo

Tutores: Dr. Gabriel Lassabe y Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin

Área Inmunología - DEP BIO - Facultad de Química
Unidad Asociada de Inmunología - IQB - Facultad de Ciencias
Laboratorio de Inmunología- Instituto de Higiene
Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

A mis tutores, Gabi y Gus que me abrieron las puertas del laboratorio, y me brindaron la libertad y la seguridad necesaria para crecer.

A los evaluadores Álvaro Pittini y Cesar Iglesias por aceptar corregir este trabajo.

A mi familia, mama, papa y cande por estar para mí siempre, acompañándome en este proceso que fue casi tan frustrante como hermoso, escuchándome y alentándome en cada momento. También a mi perrita sol, que me acompañó gran parte de la carrera y me dio momentos de infinita felicidad.

A mis amigos, Turuk, con quien he pasado más tiempo sentado en una placita tomando mate del que sería sensato admitir, gracias por compartir conmigo tantos momentos, gustos y risas. Maxi, con quien muchísimos momentos.

Mari y Vicky, con quienes la vida nunca deja de ser interesante.

A mis amigos de facultad, Facu, Pi, Joha, Jose, Fede, Bru, entre otros quienes tomaron un papel muy importante en mi vida rápidamente, y con quienes he compartido alegrías y tristezas en ámbitos tan distintos. También a Thiao, con quien cruzamos caminos en facultad y nos volvimos amigos de la vida.

Joaco y Guille, por estar siempre ahí y motivarme a ser mejor.

A mis tíos y primos, por siempre estar atentos y preocuparse por mí.

A toda la catedra de inmunología, particularmente la “casita de adelante” y la “casita del fondo” quienes tuvieron custodia compartida de mí y con quienes compartí grandes momentos.

Y a tanta otra gente que se cruzo en mi camino y fue moldeando la persona que hoy soy

Fue un gusto crecer a su lado.

Muchas Graciasss

ÍNDICE

Tabla de contenido

Agradecimientos	2
ÍNDICE	3
Resumen	6
INTRODUCCIÓN	7
1. Receptores Scavenger	7
1.1 Receptores CD5 y CD6: estructura distribución y funciones	10
2. CD6: Características genéticas, moleculares y funcionales	12
2.1 Ligandos de CD6	13
2.2 CD6: Utilidad inmunoterapéutica	17
3. Generación y selección de <i>nanobodies</i>	21
OBJETIVOS	24
1. Objetivo general	24
2. Objetivos específicos	24
REACTIVOS	25
1. Buffers y soluciones	25
1.1 Buffers y soluciones de uso general	25
1.2 Soluciones para electroforesis	25
1.3 Buffer y soluciones para cromatografía de afinidad	26
1.4 Buffer, soluciones y medios de cultivo para ensayos bacterianos	27
1.5 Buffer, soluciones y medios de cultivo para ensayos en células eucariotas	28
1.6 Soluciones peptídicas y proteicas disponibles en el laboratorio	29
MÉTODOS	30
1. Métodos generales	30
1.1 Cultivos bacterianos	30
1.2 Transformación bacteriana por electroporación	30
1.3 Extracción y purificación del ADN plasmídico	30
1.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	30

1.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	31
1.6 Cuantificación de ADN y de proteínas.....	31
1.7 Mantenimiento en cultivo de la línea celular HEK293-T	31
1.8 Mantenimiento en cultivo de la línea celular RAW264.7	32
2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	33
2.1. Características de los vectores PcDNA3.1(+) utilizados para expresión en células HEK293-T	33
2.2. Clonado de genes en vectores derivados de PcDNA3.1.....	34
2.3. Producción de proteínas recombinantes en células HEK293-T transfectadas ..	36
2.4 Purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad	37
2.5 Conjugación de biotina a rCD6.D1 y rCD6.D3	37
3. Caracterización estructural de las proteínas recombinantes.....	38
3.1 Espectrometría de Masas MALDI-TOF.....	38
3.2 Análisis <i>in silico</i> de sitios de N-glicosilación en las proteínas recombinantes	38
3.3 Calorimetría diferencial de barrido	38
4. Ensayos funcionales con las proteínas recombinantes.....	39
4.1 Ensayos de interacción con componentes bacterianos.....	39
4.2 Ensayos <i>in vitro</i> de neutralización de LPS.....	40
5. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes en ratones inmunizados.....	41
5.1 Inmunización de ratones.....	41
5.2 Evaluación de la respuesta humoral específica en ratones inmunizados	41
6. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes en una llama inmunizada	42
6.1 Inmunización de la llama	42
6.2 Evaluación de la respuesta humoral específica en llama.....	42
7. Análisis estadístico.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
1. Objetivo específico #1.....	45
1.1 Clonado de genes en vectores derivados de PcDNA 3.1.....	46

1.2 Expresión y producción recombinante de los dominios CD6.D1 y CD6.D3.....	46
2. Objetivo específico #2:.....	49
2.1 Caracterización del perfil de oligomerización de las proteínas recombinantes.....	50
2.2 Caracterización de las proteínas recombinantes mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de posibles sitios de N-glicosilación.....	52
2.3 Caracterización de la estabilidad térmica de las proteínas recombinantes mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).	55
3. Objetivo específico #3:.....	58
3.1 Reconocimiento de bacterias enteras por parte de las proteínas recombinantes.	59
3.2 Reconocimiento de LPS por parte de las proteínas recombinantes.....	62
3.3 Capacidad aglutinante de las proteínas recombinantes sobre bacterias.	64
3.4. Capacidad de bloqueo funcional de LPS por parte de las proteínas recombinantes.....	68
4. Objetivo específico #4:.....	73
4.1. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes en ratones inmunizados.....	74
4.2. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes utilizando una llama inmunizada: Respuesta de anticuerpos de cadena pesada.....	76
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

Resumen

El receptor scavenger transmembrana de tipo I CD6 se expresa principalmente en poblaciones linfocitarias T y B1a, y está compuesto por tres dominios SRCR (*scavenger receptor cysteine-rich*) en tándem; siendo CD6.D1 el dominio distal y CD6.D3 el dominio proximal. Dicho receptor ha cobrado gran relevancia en los últimos años dado que (i) reconoce una amplia gama de patrones moleculares asociados a patógenos, (ii) algunos de sus ligandos endógenos se encuentran sobre-expresados en diversos cánceres, (iii) ciertos polimorfismos de CD6 se asocian fuertemente al desarrollo de distintas enfermedades autoinmunes, y (iv) el uso de ratones *knock out* para CD6 ha mostrado fenotipos protectores en modelos de enfermedades inmunomediadas y/u oncológicas. En este contexto, se han desarrollado múltiples estrategias inmunoterapéuticas dirigidas a modular sus funciones, dentro de las cuales destacan los anticuerpos monoclonales enfocados en la eliminación directa de células blanco CD6⁺ a través de mecanismos de citotoxicidad mediada por anticuerpos o mediante modulación de sus funciones inmunoregulatoras. Asimismo, con el objetivo de bloquear la interacción entre los ligandos de CD6 y el receptor expresado en la membrana celular linfocitaria se ha explorado el uso del ectodominio recombinante soluble de CD6, y de péptidos derivados de su secuencia, en estrategias de tipo *decoy* o señuelo; las cuales han mostrado importantes niveles de eficacia en modelos murinos de enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades autoinmunes. En este sentido, cabe destacar que los ligandos endógenos de CD6 más relevantes en el desarrollo de dichas patologías, ALCAM y CD318, interaccionan con los dominios CD6.D1 y CD6.D3, respectivamente. Por ello, en el presente trabajo se generaron proteínas recombinantes correspondientes a ambos dominios, tanto en forma monomérica como dimérica a través de su fusión al fragmento Fc de IgG1 humana. Las proteínas recombinantes se produjeron eficientemente en células de mamíferos HEK293-T y se caracterizaron tanto estructuralmente como funcionalmente en términos de su capacidad de interactuar con motivos bacterianos. Asimismo, se evaluó la capacidad de los recombinantes de inducir respuestas humorales no convencionales en llama inmunizadas con los mismos, abriendo un gran abanico de posibilidades para el desarrollo futuro de *nanobodies* específicos potencialmente útiles en inmunoterapias.

INTRODUCCIÓN

1. Receptores Scavenger

Los receptores *scavenger* (RSs) constituyen un amplio grupo de glicoproteínas, secretadas o de membrana, que comparten la capacidad funcional de reconocer y mediar la endocitosis de moléculas de carga negativa.¹ Originalmente se definieron por su capacidad de unir e internalizar exclusivamente lipoproteínas modificadas. Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que reconocen una gran variedad de ligandos, tanto microbianos como endógenos. Debido a esta diversidad, se ha visto a este tipo de receptores participando en la regulación de diversos estados fisio(pato)lógicos, como la aterosclerosis, las infecciones, la inmunovigilancia y el cáncer, entre otros.²

En virtud de la amplia heterogeneidad estructural de los RS, actualmente se los clasifica en 11 clases (**Figura 1**), definidas con una nomenclatura de la A (RS-A) hasta la clase L (RS-L), según la homología parcial o total de sus secuencias aminoacídicas.³ Por ejemplo, la clase RS-A incluye receptores trimerizados con dominios tipo colágeno implicados en la captación de LDL oxidadas; los RS-B como CD36 comprenden receptores de una sola hélice transmembrana asociados al reconocimiento de ácidos grasos y PAMPS; y los RS-E agrupan proteínas secretadas con funciones en inmunidad innata, como las pentraxinas.³

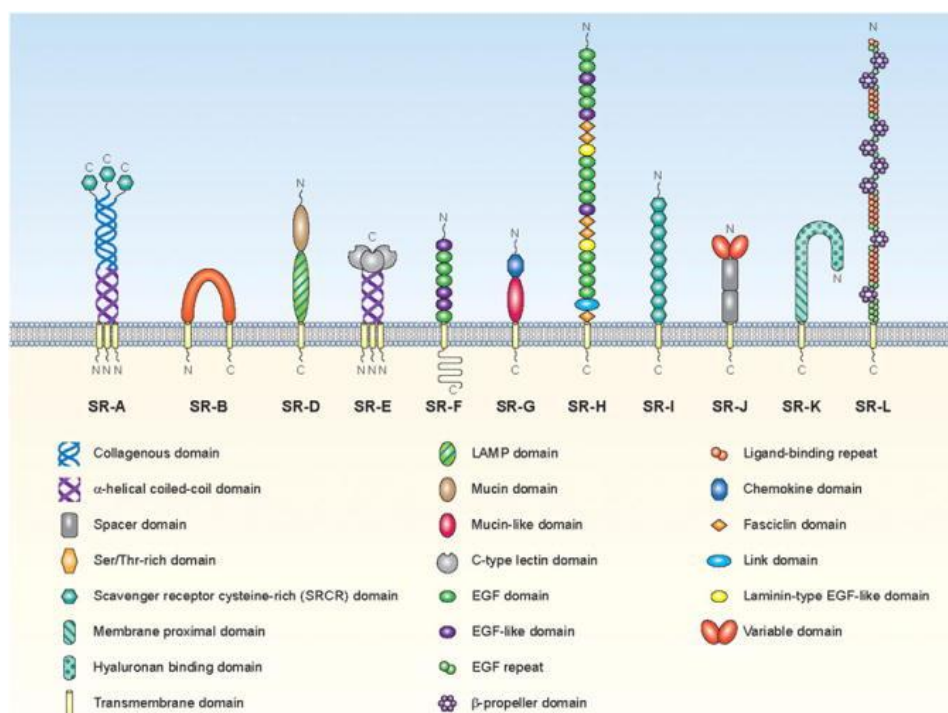


Figura 1. Representación esquemática de las diferentes clases de RS. Los RS se dividen en 12 clases. Los distintos dominios de proteínas o carbohidratos se encuentran codificados en la figura. No se representa la clase C ya que se encuentra presente únicamente en *Drosophila melanogaster*. Figura extraída [PrabhuDas et al., 2017].²

Por otro lado, por fuera de la clasificación de RS, hay otras proteínas con funciones scavenger, pero que, sin embargo, están clasificadas en la *Super-Family of Scavenger Receptor Cystein-Rich* (SF-SRCR). Esta familia de receptores fue descrita originalmente a comienzos de la década de 1990, luego de la identificación de varios receptores que contenían al menos un dominio SRCR homólogo al presente en el extremo C-terminal del receptor RS-AI en macrófagos.⁴ A diferencia de los RSs, cuyo agrupamiento es funcional, los miembros de la SF-SRCR están estrechamente relacionados desde el punto de vista estructural, aunque comparten relativamente pocas funciones. Algunos miembros de la SF-SRCR poseen actividad *scavenger*, entre ellos destacan CD5, CD6, MARCO, SALSA, entre otros,³ mientras que otros miembros de la SF-SRCR se han identificado con funciones de adhesión celular, regulación inmune y homeostasis tisular.⁵

Actualmente, la SF-SRCR incluye más de 30 proteínas, tanto secretadas como de membrana que se han identificado en variadas especies animales filogenéticamente muy distantes, lo que indica que se trata de una superfamilia muy antigua y altamente conservada.³ Los dominios SRCRs poseen secuencias típicas de 90-110 aminoácidos, caracterizadas por su alto contenido y patrón definido de cisteínas (Cys).¹ A su vez, estas proteínas pueden clasificarse en dos tipos según sus exones codificantes. Las proteínas con dominios tipo A son codificados por al menos 2 exones y presentan 6 residuos de Cys, y las proteínas con dominios de tipo B son codificados por un único exón y presentan 8 residuos de Cys. La posición relativa de estos residuos es conservada, lo que permite la formación de enlaces disulfuro, definidos en los dominios de tipo A (**Figura 2**) por Cys2-Cys7, Cys3-Cys8 y Cys 5-Cys6; mientras que en los dominios B (**Figura 3**) se agrega además el enlace Cys1-Cys4.⁶

En cuanto a sus funciones, los dominios SRCR participan principalmente en interacciones proteína-proteína, tanto homotípicas como heterotípicas.⁷ Asimismo, existen ejemplos de receptores destacados, como los CD5 y CD6, que tienen dominios SRCR capaces de reconocer PAMPs (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*),³ además de participar en el desarrollo del sistema inmune y en la regulación de respuestas inmunes innatas y adaptativas.⁸⁻¹⁰

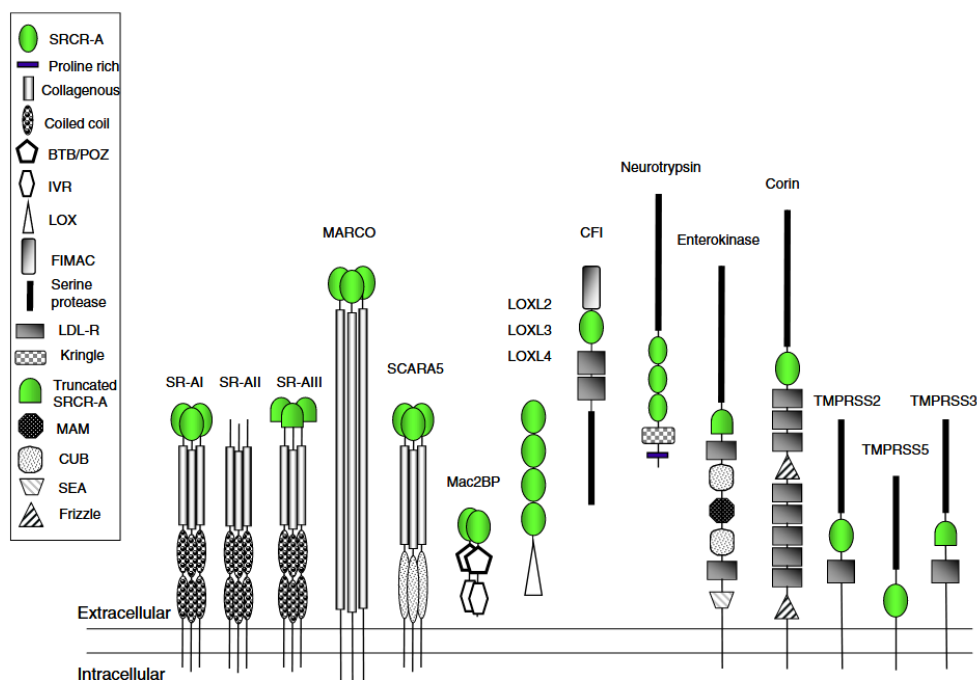


Figura 2. Representación esquemática de los SRCR de grupo A humanos. Se representan todos los SRCR de grupo A humanos. Se representan todos los SRCR de clase A humanos, los distintos dominios de proteínas o carbohidratos se encuentran representados en la imagen. Figura extraída [Martínez et al., 2011].³

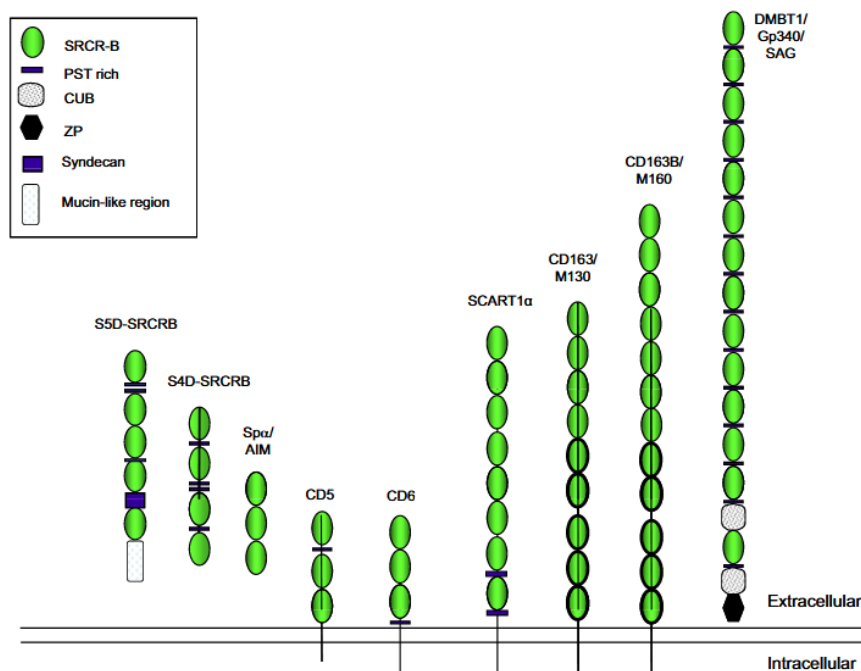


Figura 3. Representación esquemática de los SRCR de grupos B humanos. Se representan todos los SRCR de clase B humanos, los distintos dominios de proteínas o carbohidratos se encuentran representados en la imagen. Figura extraída [Martínez et al., 2011].³

1.1 Receptores CD5 y CD6: estructura distribución y funciones

Los receptores CD5 y CD6 son glicoproteínas de membrana de 67 kDa y 105-130 kDa respectivamente. Estos receptores poseen regiones extracelulares (ectodominios) compuestos exclusivamente por 3 dominios SRCRs de tipo B en serie, una región transmembrana y una cola citoplasmática encargada de mediar procesos de señalización intracelular.¹

Ambos receptores, cuyos genes están ubicados en la región homóloga del cromosoma 11 humano y 9 de ratón, comparten un alto grado de homología funcional y estructural reflejo de su origen derivado de un gen ancestral común que sufrió un evento de duplicación.^{3,11}

Sumado a esto, presentan perfiles de expresión similares, ambos se expresan en timocitos desde etapas tempranas de su maduración, en linfocitos T maduros y linfocitos B1a, por su parte CD6 también es expresado en un subconjunto de células Natural Killer (CD56^{dim}CD16⁺).^{3,12,13}

Tanto CD5, como CD6 se encuentran asociados físicamente entre sí,¹⁴ y con el complejo receptor clonotípico de las células T (TCR) y de las células B1a (BCR),^{6,15,16} permitiendo la modulación de las señales de activación y muerte de forma dependiente del antígeno y estado de maduración de las células.¹⁷ En este sentido, se ha postulado que CD5 actuaría como molécula co-estimuladora en linfocitos T maduros y como molécula de señalización negativa en timocitos y células B1a, mientras que para CD6 se ha visto cumpliendo rol como modulador fino de la señal.¹⁸⁻²⁰ Como se mencionó anteriormente ambas proteínas participan como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en el reconocimiento de PAMPs, y en este sentido, se ha demostrado que las mismas pueden reconocer componentes de bacterias, virus, hongos y parásitos.²¹⁻²⁴ Actualmente en su rol como PRRs se les atribuye una función dual de tal manera que; (i) inhibirían la activación de linfocitos autorreactivos, al reconocer débilmente antígenos propios, liberados durante la infección y (ii) optimizarían la respuesta antimicrobiana al favorecer la activación de linfocitos capaces de reconocer agentes microbianos con alta afinidad, como se muestra en la **Figura 4**.²⁵

Es por todas estas características y dado su rol fisiológico, mayormente comprendido con el desarrollo de ratones *knock out* (KO),^{18,26,27} que las proteínas CD5 y CD6 se han vuelto posibles blancos terapéuticos para variadas enfermedades infecciosas y no infecciosas.

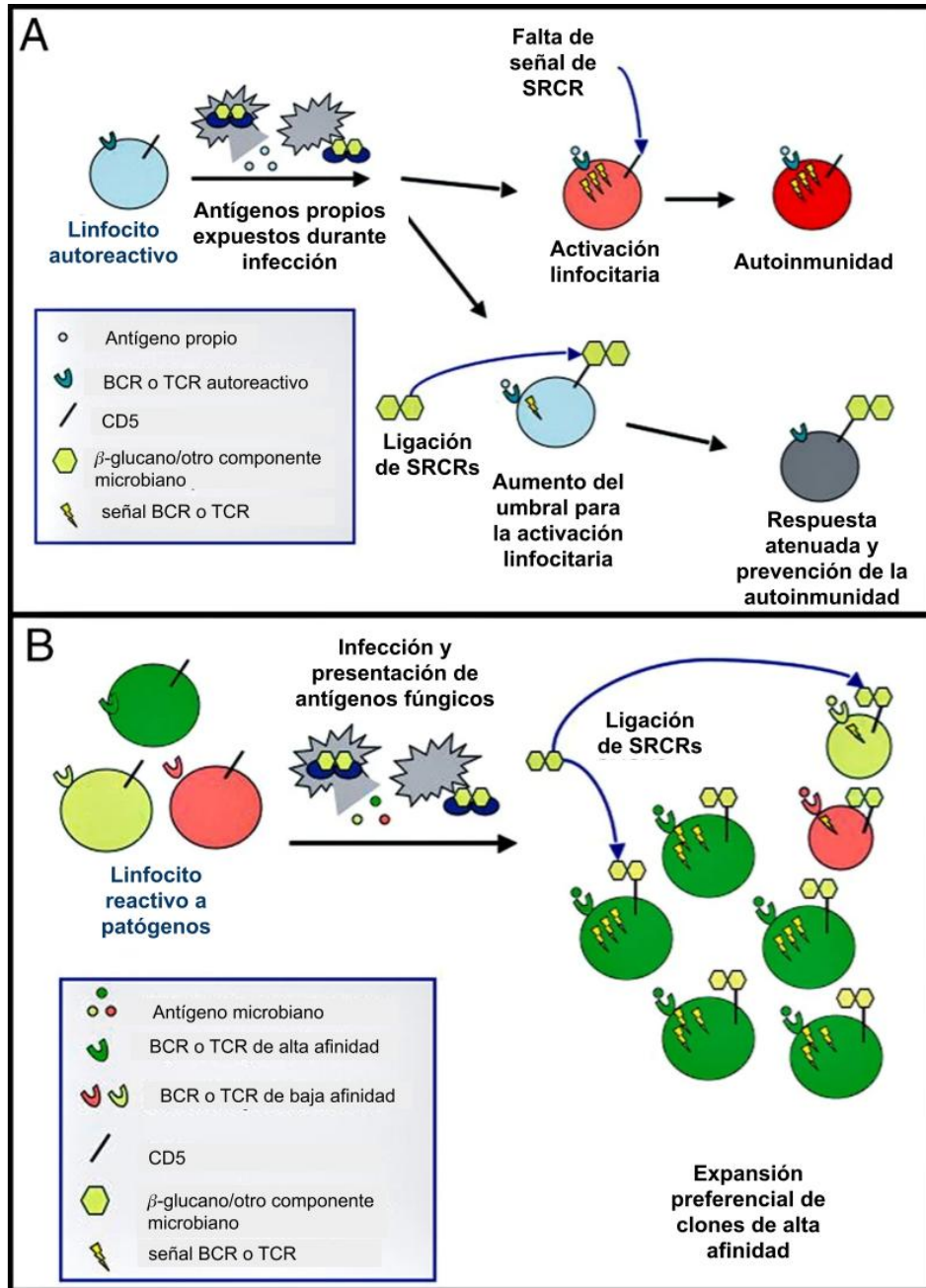


Figura 4. Posibles consecuencias inmunológicas del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos por parte de receptores SRCR en linfocitos. (A) Prevención de la autoinmunidad: La infección expone autoligandos normalmente crípticos que estimulan linfocitos anérgicos o linfocitos con baja afinidad por antígenos propios. En presencia de productos microbianos que señalizan a través de CD5 o CD6, se incrementa el umbral de activación del TCR o BCR y se atenúa la activación de linfocitos autorreactivos. **(B)** Ajuste de la respuesta T antimicrobiana: La infección conduce a la presentación de numerosos antígenos microbianos y a la activación de linfocitos con múltiples especificidades distintas. Los linfocitos con mayor reactividad frente a antígenos microbianos reciben señales más fuertes a través de su receptor, lo que les permite superar las señales negativas provenientes de CD5 u otros SRCR y, por competencia bloquea la activación de linfocitos con TCR o BCR de reactividad más débil. Figura extraída [Lenz, et al. 2009].²⁵

2. CD6: Características genéticas, moleculares y funcionales

El receptor linfocitario CD6 es codificada por el gen CD6 (**Figura 5**), localizado en el cromosoma 11q12.2, abarca aproximadamente 48,5 kb y está compuesto por 13 exones, 6 encargados de la región extracelular, 1 de la región transmembrana y otros 6 para la región intracelular, la cual permite la interacción con proteínas adaptadoras y quinasas involucradas en la señalización celular.^{17,28} La proteína canónica está conformada por una región extracelular de tres dominios SRCR en tándem, siendo CD6.D1 el dominio más distal respecto a la membrana y D3 el más proximal. Además, ocurren eventos de *splicing* alternativo que pueden derivar en la expresión de diferentes isoformas proteicas dentro de las que destacan, CD6Δ3 una forma de CD6 inducible, en la que se excluye el exón 5 y como consecuencia la proteína pierde el dominio CD6.D3.²⁹ Esta isoforma participa en la regulación negativa de la activación de linfocitos T, al perder la capacidad de unión a la proteína ALCAM (del inglés, *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*), uno de los ligandos endógenos principales involucrado en la sinapsis inmunológica que ocurre entre los linfocitos y células presentadoras de antígeno.³⁰ Otra isoforma, carente de los exones 11-13 presenta alteraciones en su cola citoplasmática y por tanto generan variaciones en la capacidad de CD6 de modular la intensidad o duración de la señal intracelular.^{14,29,31} Por otro lado, en este gen se han reportado varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que presentan relevancia clínica. Por ejemplo, la mutación rs11230563, asociada a esclerosis múltiple, genera un cambio de sentido (Arg→Trp) sobre el dominio CD6.D2, afectando la capacidad de la proteína de reconocer a ALCAM. De otra forma, el SNP rs17824933, también asociado a la esclerosis múltiple, genera un cambio en una región intrónica del gen, alterando los niveles de expresión de CD6 en la superficie celular.^{32,33}

A nivel funcional, el CD6 en linfocitos T actúa como modulador fino de las señales intracelulares generadas durante la sinapsis inmunológica, de esta forma presentan un rol dual generando señales promotoras al interactuar con el TCR o inhibitorias en respuestas T tardías y tempranas de forma ligando-independiente.^{16,34,35} Además de su forma anclada a membrana, el ectodominio de CD6 también puede encontrarse en forma soluble (sCD6) a bajas concentraciones séricas (pM-nM),^{36,37} resultado del clivaje proteolítico de la forma de membrana durante procesos intensos de activación linfocitaria. En consecuencia, se generan linfocitos con niveles bajos o nulos de CD6, lo que se asocia a menor proliferación celular y mayor sensibilidad a la apoptosis.³ En estas condiciones regula negativamente la respuesta inmunitaria de dos maneras; (i) disminuyendo la capacidad de linfocitos T de activarse y aumentando su sensibilidad a la apoptosis,³⁸ y (ii) funcionando como agente señuelo y compitiendo con el CD6 presente en membrana, evitando que se activen más linfocitos T, lo que es esencial en la regulación de contextos de autoinmunidad patológica.^{17,39}

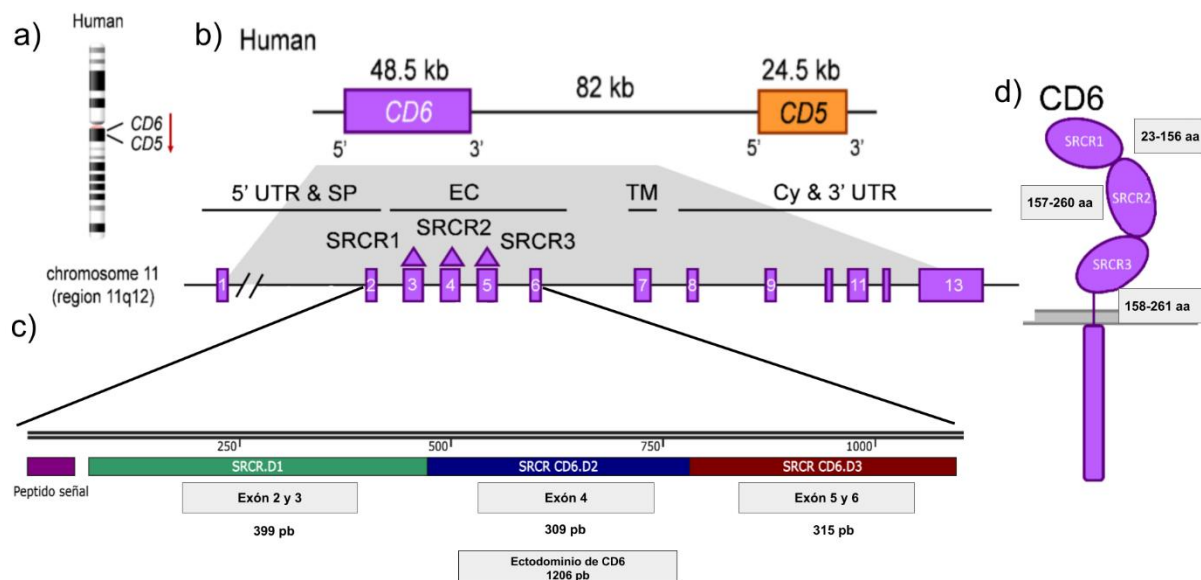


Figura 5. Ubicación y organización genómica de CD6 humano. (a) Ubicación cromosómica de los genes que codifican CD6. La flecha roja indica la orientación 5' a 3'. (b) Tamaño, orientación y distancia intergénica entre CD5 y CD6. Organización exón/intrón y regiones codificantes de proteínas de CD6, (c) Ampliación región extracelular, con los dominios SRCR diferenciados, tamaño y exón que los codifica (d) Estructura de la forma de membrana de CD6, y aminoácidos que integran cada dominio. UTR: región no traducida; EC: región extracelular, Cy: región citoplasmática; SRCR: dominio SRCR; TM: motivo similar a ITAM (motivo de activación basado en tirosina de los receptores inmunitarios). Figura adaptada [Casadó-Llombart, et al. 2021].⁴⁰

2.1 Ligandos de CD6

Como se mencionó anteriormente, los SRCRs suelen reconocer múltiples ligandos debido a sus propiedades de interacción molecular. En este sentido, CD6, al igual que otros SRCRs, es capaz de reconocer tanto ligandos de origen exógeno (principalmente derivados de patógenos), como de origen endógeno (incluyendo estructuras propias modificadas y/o receptores celulares solubles y de membrana) (**Figura 6**). Dichas interacciones con el ectodominio de CD6 pueden luego dar lugar a diversos eventos de señalización intracelular derivados de la actividad de su cola citoplasmática.

2.1.1 Ligandos exógenos

Al igual que otros SF-SRCR, CD6 reconoce ligandos exógenos en particular PAMPs destacando su unión al lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas, el ácido lipoteicoico (LTA) y el peptidoglicano de bacterias Gram-positivas.^{23,24} Lo notable de esta interacción, es la afinidad de la interacción CD6-LPS la cual, es equivalente a la reportada para CD14 el principal receptor de LPS en mamíferos.²⁴ En la misma línea, el ectodominio de CD6 demostró capacidad de inducir agregación bacteriana, capacidad que estaría implicada en la prevención del tránsito de patógenos microbianos a través de barreras

epiteliales y su eliminación de la circulación por parte de las células fagocíticas. Sumado a esto, la interacción de CD6 con estos motivos es capaz de inducir señales de activación, vía MAPK, que potencian la activación linfocitaria.^{22,24} En base a esto, se postula que la interacción de CD6 con sus ligandos microbianos, generaría efectos trascendentes en la expansión y función de linfocitos T y B1a, al modular la señalización antígeno-específica, ya que su interacción con motivos microbianos puede alterar la intensidad o calidad de estas señales (**Figura 4**). Esta función de regulación de las respuestas coincide con lo reportado para otros PRRs de linfocitos, en particular receptores de tipo TLRs.⁴¹⁻⁴³

La diversidad de reconocimiento de CD6 queda reflejada en la detección de variados componentes patógenos como proteínas virales, como es el caso de la proteína gp120 del HIV, antígenos parasitarios, como se ha demostrado en su rol de reconocimiento de estructuras de *Echinococcus granulosus*, y por último hongos, donde se ha reportado su unión a células fúngicas saprofitas.^{21,22,44}

2.1.2 Ligandos endógenos

En cuanto a los ligandos endógenos de CD6, existen reportes sobre la diversidad de los mismos, entre los que se encuentran las moléculas de membrana ALCAM, CD318, y recientemente CD44, así como las proteínas solubles galectina 1 y galectina 3.⁴⁵

Como ya se mencionó anteriormente, hasta el momento el ligando endógeno mejor caracterizado para CD6 es ALCAM, también conocido como CD166. Consiste en una molécula de adhesión de 100 kDa que forma parte de la familia IgSF y que se expresa en células presentadoras de antígenos profesionales (APCs),^{46,47} su interacción con CD6, estabiliza el contacto célula-célula durante la sinapsis inmunológica. Además, regula procesos clave como la organización del citoesqueleto de actina, el reclutamiento sostenido de TCR y correceptores, y la modulación de la señalización proximal asociada a la activación. Sumado a esto también se expresa en linfocitos T y B activados, en células epiteliales tímicas, en células endoteliales y en algunas poblaciones neuronales.^{46,47} donde cumple funciones adicionales relacionadas con adhesión, migración y organización tisular, independientes de CD6. La interacción CD6-ALCAM ocurre específicamente a través del dominio CD6.D3 con el dominio N-terminal de ALCAM.^{9,48} Bloqueos experimentales de esta interacción han demostrado una disminución en (i) la duración de la sinapsis inmunológica, (ii) la respuesta proliferativa de células T y (iii) la secreción de citoquinas, lo cual subraya la importancia funcional del eje CD6-ALCAM.⁴⁹⁻

53

Otro ligando endógeno de relevancia para CD6 es CD318, una glicoproteína transmembrana de 140 kDa expresada en células no hematopoyéticas como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales, entre otras. Esta proteína está compuesta por tres dominios extracelulares de tipo CUB, una región transmembrana y una cola citoplasmática que carece de actividad catalítica intrínseca, pero que participa de manera indirecta (mediante el reclutamiento de proteínas quinasa) en procesos de migración,

supervivencia y proliferación celular.^{54,55} La interacción CD6-CD318 fue descrita recientemente, por lo que su rol en inmuno-regulación aún no ha sido explorado en profundidad.^{26,56} Sin embargo, dado que CD318 se asocia al citoesqueleto en las uniones intercelulares, se ha hipotetizado que su función estaría relacionada con la disrupción tisular mediada por células T durante procesos inflamatorios.⁵⁵ Sumado a esto, múltiples reportes de la sobre-expresión de este receptor en diversos tipos de cáncer, lo posicionan como un ligando de interés a la hora de redireccionar respuestas T en la inmunoterapia.⁵⁷⁻⁶⁰ A diferencia de lo reportado para ALCAM, la interacción de CD318 con CD6 se da a través del dominio CD6.D1.

CD44 el cual se postuló como un posible ligando para CD6,⁵⁵ es una glicoproteína de superficie expresada en células estromales normales, células madre y en la gran mayoría de células tumorales. Se ha reportado su interacción con ligandos de la matriz extracelular, tales como el ácido hialurónico, la osteopontina, la condroitina, el colágeno, la fibronectina, entre otros.⁶¹ CD44 fue recientemente identificado utilizando etiquetado de proximidad catalizado por enzimas y enfoques biofísicos. Una de sus funciones podría estar relacionado con el mecanismo de disrupción de tejidos mediado por células T durante procesos inflamatorios, y sería llevado a cabo mediante un complejo proteico conformado por CD6-ALCAM-CD318-CD44.^{45,55}

Por último, las proteínas solubles galectina-1 y galectina-3, también han sido identificadas como ligandos endógenos de CD6.⁶² Ambas pertenecen a la familia de lectinas b-galactósido-dependientes, cuya unión a carbohidratos requiere la presencia de iones calcio para mantener su estructura terciaria funcional. Estas proteínas están presentes tanto en células inmunes como linfocitos, macrófagos y células dendríticas, como no inmunes, cumpliendo roles descritos de adhesión, migración, diferenciación, proliferación y muerte celular.⁶³⁻⁶⁵ En el contexto inmunológico, su unión a CD6 interfiere con la unión de ALCAM, modulando la formación de la sinapsis inmunológica, y derivando en fenotipos más reguladores/anérgicos. Sumado a esto, la presencia de CD6 protege a las células T de la apoptosis inducida por galectina, al unirse a ellas e impedir su interacción con otros receptores apoptóticos (ej. CD45, CD43 CD7) presentes en la célula T.⁶³

En conjunto, dada la diversidad de ligandos microbianos y celulares con los que interactúa CD6, y sus funciones importantes en la modulación de las células T, no es de extrañar que esta molécula desempeñe un papel central en la inmunoregulación, y por ende sea un blanco terapéutico de alto potencial.

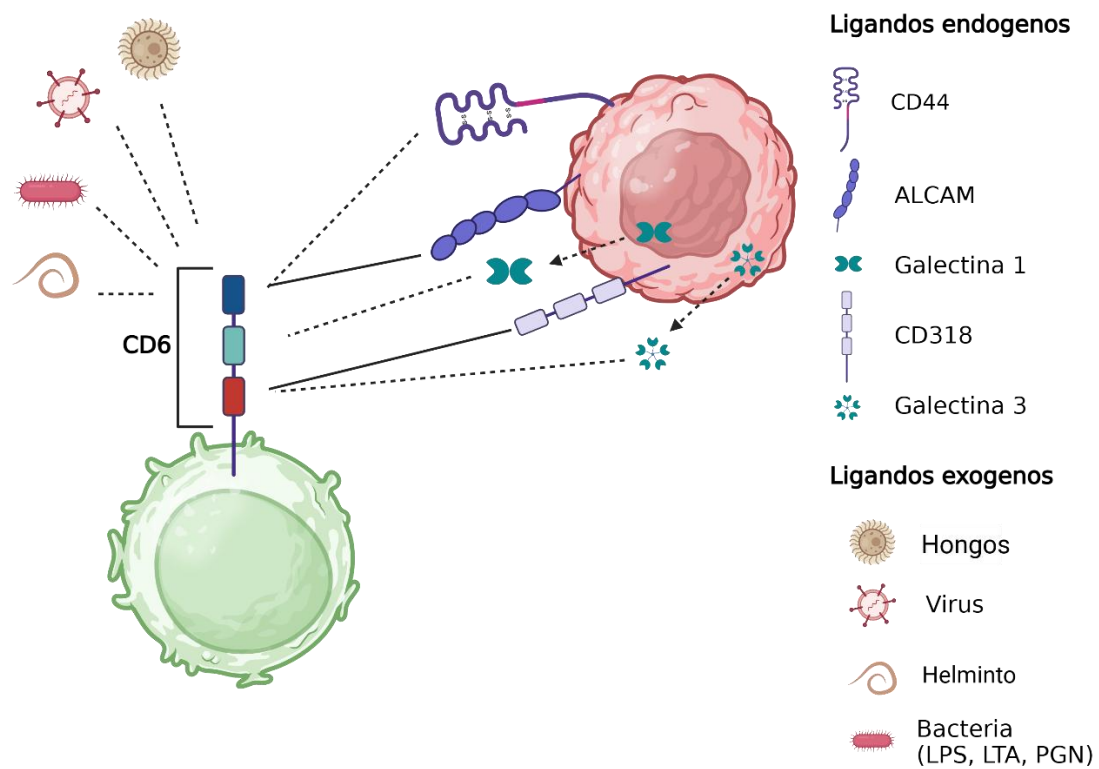


Figura 6. Representación esquemática de los ligandos de CD6. Señalado con una línea entera se encuentran los ligandos de CD6 para los cuales se conoce el dominio de unión específica, mientras que con línea punteada los que no se conoce su dominio de unión específico.

2.2 CD6: Utilidad inmunoterapéutica

En los últimos años, CD6 ha cobrado un papel relevante en el desarrollo de nuevas inmunoterapias, principalmente debido a que es capaz de reconocer una gran variedad de PAMPs, y de ligandos endógenos sobre-expresados en diversos tipos de cáncer. Además, se ha reportado que ciertos polimorfismos de CD6 están asociados fuertemente con el desarrollo de distintas enfermedades autoinmunes. Sumado a esto, el uso de ratones knock out para CD6 ha mostrado fenotipos protectores en modelos de enfermedades inmunomediadas y/u oncológicas.^{17,66} Por ello, actualmente se han evaluado distintas estrategias inmunoterapéuticas basadas en CD6: por un lado, el uso de su ectodominio recombinante soluble como agente señuelo (decoy agent) y, por otro lado, el uso de anticuerpos bloqueantes específicos, las cuales se describen a continuación y se esquematizan en la **Figura 7**.

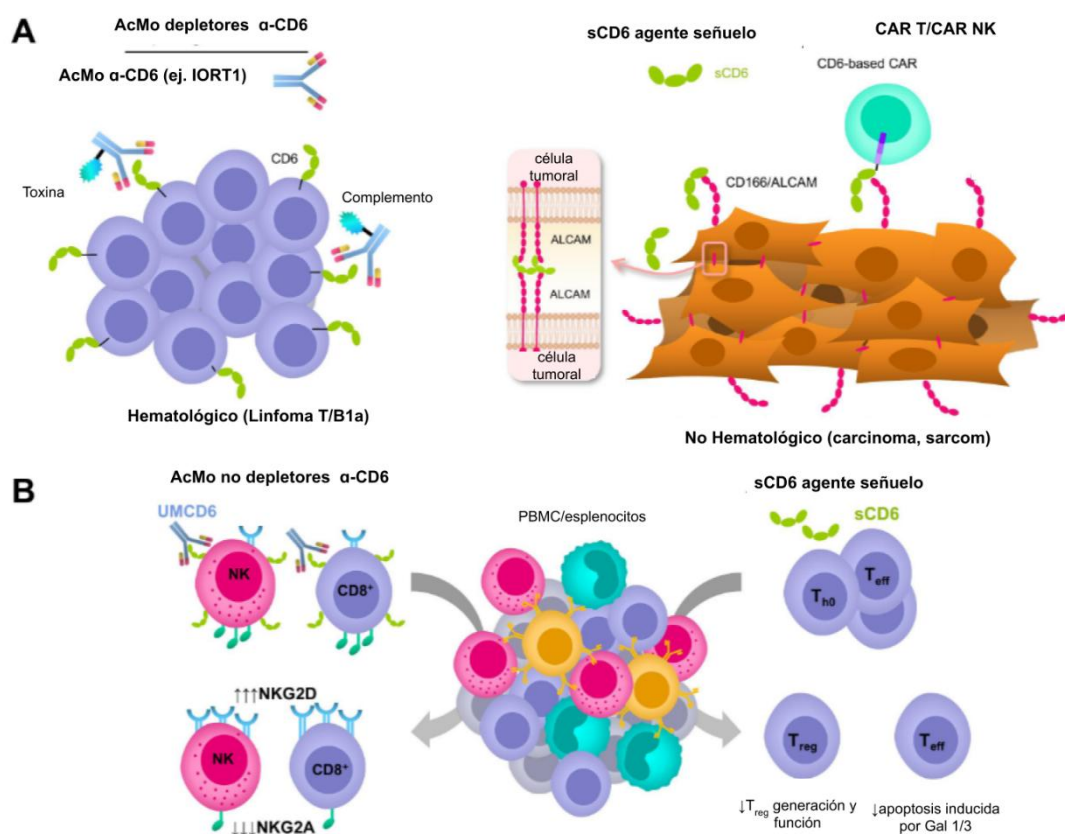


Figura 7. Representación esquemática de las distintas estrategias basadas en CD6 para inmunoterapia contra el cáncer. (A) Estrategias que involucran directamente efectos antitumorales en tumores con expresión de CD6. **(B)** Estrategias que involucran efectos antitumorales indirectos resultado de la modulación de funciones y proliferación de células inmune, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos no depletores. Figura extraída [Aragón-Serrano, et al. 2021].⁶⁷

2.2.1 CD6 como agente señuelo.

El uso del ectodominio recombinante soluble de CD6 (rshCD6) se ha evaluado como agente señuelo con el objetivo de bloquear, mediante competencia con la forma de CD6 expresada en membrana, la interacción CD6-ligando. Esta estrategia ha sido evaluada principalmente en modelos preclínicos de enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades autoinmunes. Una de las principales ventajas de esta estrategia es la capacidad de reconocimiento interespecies del eje ALCAM-CD6, lo que permite realizar estudios de CD6 humano en modelos murinos, sin necesidad de generar animales humanizados para los ligandos de CD6.⁶⁶

En cuanto a uso de CD6 como agente señuelo en infecciones, se ha reportado que la administración exógena de rshCD6 en modelos murinos de shock séptico inducido por LPS, induce un aumento en la sobrevivencia de los animales, acompañado por una reducción en la producción sistémica de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β).²⁴ Resultados similares se obtuvieron en modelos de shock séptico inducido por endotoxinas bacterianas derivadas de bacterias Gram positivas.²³ Asimismo, la administración profiláctica y terapéutica de rshCD6 mostró efectos tanto dosis-dependiente como dependientes del tiempo de administración en el modelo de peritonitis letal polimicrobiana inducida por ligadura y punción cecal (CLP), considerado el estándar de oro para la caracterización de sepsis humana.^{68,69} Por último, más recientemente se identificaron tres péptidos de 11 aminoácidos cada uno, derivados de los dominios SRCR presentes en el ectodominio de CD6, los cuales mostraron capacidad para interactuar con LPS y LTA en ensayos de aglutinación bacteriana, así como actividad profiláctica en el modelo CLP.^{70,71}

Por otro lado, en patologías oncológicas se ha demostrado la relevancia de la presencia CD6 soluble en diversos modelos tumorales murinos. En ratones genéticamente modificados para expresar altos niveles de sCD6 circulante, se observó una disminución en el crecimiento tumoral tras el desafío con líneas metastásicas (B16-F0 o RMA) que expresan altos niveles de ALCAM. En comparación con animales *wild-type* (WT), los ratones modificados presentaron menores tasas de metástasis y una mayor sobrevivencia. Estos hallazgos fueron respaldados por estudios realizados en ratones WT transfectados con adenovirus para inducir la expresión de sCD6, así como en ratones infundidos exógenamente con rshCD6, en los cuales también se observaron aumentos significativos de la sobrevivencia y una reducción del crecimiento tumoral.⁶⁷

Finalmente, la modulación mediante estrategia de señuelo con CD6 también mostró resultados alentadores en modelos murinos de enfermedades autoinmunes. En este sentido, ratones transgénicamente modificados para producir altos niveles séricos de sCD6 presentaron valores menores de *score* clínico en modelos experimentales de artritis inducida por colágeno (CIA) y de encefalomiелitis autoinmune experimental

(EAE),⁶⁷ reforzando la idea de que CD6 soluble actúa como modulador de la respuesta inmune patogénica mediante el bloqueo de la interacción con los distintos ligandos.

En conjunto, estos resultados respaldan el enorme potencial terapéutico de las estrategias basadas en el uso de CD6 soluble como agente señuelo, tanto en contextos infecciosos, como oncológicos y autoinmunes. De forma mecanística, esta aproximación actúa principalmente mediante bloqueo competitivo de las interacciones entre CD6 y sus ligandos, modulando así procesos de adhesión, activación y migración linfocitaria, relevantes en contextos de inflamación crónica e infiltración tisular. Además, la capacidad de neutralizar componentes microbianos y atenuar la activación exacerbada de la inmunidad innata, característico de los estados sépticos, posiciona el uso de CD6 soluble como una estrategia versátil para la inmunomodulación en diversos contextos.

2.2.2 Anticuerpos bloqueantes de CD6

El uso de anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos para el ectodominio de CD6 también ha sido evaluado como estrategia inmunoterapéutica, en este caso, con el objetivo general de modular la interacción CD6-ligando mediante bloqueo o antagonismo inducido por los AcMo. Esta estrategia ha sido evaluada principalmente en modelos preclínicos de enfermedades autoinmunes y oncológicas.

La sobre-expresión de ligandos endógenos para CD6 (ej. ALCAM y CD318) en ciertos tumores, dado su rol en la progresión tumoral, posicionan a CD6 como un blanco inmunoterapéutico atractivo. En este sentido, se han desarrollado y evaluado varios AcMo específicos para CD6 humano, entre los cuales IOR-T1 mostró eficacia clínica contra linfoma cutáneo de células T (CTCL),⁷² induciendo la eliminación de células tumorales mediante mecanismos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC).^{67,73} Más recientemente, un anticuerpo llamado UMCD6 ha sido caracterizado como “no depletor”, dado que no promueve la eliminación de células CD6⁺, pero es capaz de modular la activación y función de estas células.⁷⁰ Dado que es un anticuerpo murino, su uso a nivel clínico se ve limitado por la fuerte inducción del sistema inmune (respuesta HAMA), su baja vida media y su limitada interacción con receptores efectores humanos,⁷⁴ sin embargo su aplicación en modelos murinos humanizados para CD6 ha permitido entender mecanismos de acción involucrados en terapias frente a enfermedades autoinmunes y cáncer. La relevancia de UMCD6 también ha sido demostrada mediante ensayos in vitro, por ejemplo, en ensayos de co-cultivos de líneas tumorales CD318⁺ o ALCAM⁺ con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), se observó que la administración de UMCD6 potencia la eliminación de células cancerígenas mediante la internalización de CD6 en los linfocitos T CD8⁺ y NK, evadiendo las señales inhibitorias provocadas por el eje CD6/CD318 en células tumorales. Sumado a esto, UMCD6 regula negativamente la expresión de receptores inhibitorios (como PD-1 y NKG2A) y aumenta la de receptores activadores (NKG2D), lo que lo posicionan como un candidato

prometedor para futuras terapias combinadas con otros anticuerpos terapéuticos dirigidos contra dichos receptores.^{75,76}

El uso de AcMo anti-CD6 también es relevante en el contexto de enfermedades autoinmunes, donde varios polimorfismos (algunos mencionados previamente en la sección 2) para el gen codificante de CD6 humano se asocian fuertemente con activación desregulada de las respuestas de linfocitos T que desencadenan el desarrollo de enfermedades como la esclerosis múltiple, la psoriasis y el lupus eritematoso sistémico (LES).^{66,77,78}

En este sentido, se ha demostrado que la administración del AcMo Itolizumab (anti-CD6 humano) es capaz de disminuir la activación de linfocitos T autorreactivos al bloquear la interacción entre CD6 y ALCAM. El uso de este anticuerpo se encuentra actualmente en fase clínica de investigación para el tratamiento de la psoriasis y en ensayos clínicos fase 1b (abierto, de tamaño reducido) para pacientes con nefritis lúpica (LN). En este último estudio, el tratamiento con Itolizumab mostró resultados iniciales prometedores, ya que permitió la reducción en un 72 % del cociente proteína/creatina (indicador de daño renal), y a su vez permitió reducir las dosis de medicamentos corticosteroides en un 80%. Estos resultados se acompañaron de una disminución de la expresión de CD6 en superficie de células T y la reducción del recuento absoluto de linfocitos, mientras que los efectos adversos fueron en su mayoría de grado 1 o 2 (leve/moderado).^{79,80} Por otro lado, en modelos murinos de enfermedades autoinmunes (tales como EAE, CIA y uveítis autoinmune experimental - UAE), el AcMo UMCD6 promovió una reducción del infiltrado inflamatorio así como la respuesta patogénica Th1/Th17, efecto que se atribuye a una menor activación y expansión de estas subpoblaciones efectoras.^{53,81,82} En paralelo, en el modelo murino de LN, el tratamiento con el AcMo 10D12 (anti-CD6 murino), indujo la disminución del infiltrado renal de células T efectoras y producción de citoquinas proinflamatorias que conllevaron disminución en daño renal.⁷⁹

2.2.3 Terapias celulares con receptores de antígenos quiméricos

Las terapias de células T con receptores de antígenos quiméricos (conocidas por su sigla en inglés como CAR-T) son el resultado de la combinación de inmunoterapias contra el cáncer basadas en ingeniería genética junto a terapias de transferencia celular adoptiva (ACT),⁸³ y han demostrado efectividad en el tratamiento de diversos cánceres hematológicos. Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) están compuestos por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio extracelular tiene especificidad por la diana molecular expresada en la superficie de la célula blanco, y tradicionalmente está constituido por el fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un AcMo.⁸⁴ Sin embargo, se han incorporado dominios de reconocimiento alternativo, incluyendo las siguientes dos aplicaciones:

(i) Anticuerpos monodominio, también conocidos como *nanobodies* (Nb), los cuales presentan un gran número de ventajas biotecnológicas respecto a los AcMo.^{85,86} Sumado a esto, el uso de Nb en terapias CAR-T ha demostrado una baja inmunogenicidad y un aumento en la producción de citoquinas respecto al uso de scFv.^{84,87} En el caso de RS, se han desarrollado Nb específicos para la proteína CD5, específicamente contra su dominio SRCR extracelular CD5.D3, con el fin de generar CARs.⁸⁸ Así, al formar parte del CAR en células NK, en terapias conocidas como CAR-NK, los Nb específicos para CD5 mostraron un aumento en la actividad antitumoral de dichas células frente a tumores CD5⁺.⁸⁷ Por otro lado, al conjugar dichos Nb de forma biespecífica junto con Nb específicos para CD30, en terapias CAR-T, se demostró la supresión de linfomas de células T (CD5⁺), con valores superiores respecto a sus versiones individuales.^{84,89}

(ii) Regiones extracelulares completas de proteínas inmunológicas, enfoque que permite aprovechar la interacción ligando-receptor fisiológico, en lo que se conoce como diseños CAR de segunda generación. En el caso de CD6, se ha evaluado el uso de su región extracelular completa, como dominio de reconocimiento en CAR-CD6 que han sido evaluados en modelos in vitro de cáncer colorrectal con sobre-expresión simultánea de ALCAM y CD318, contra los cuales demostraron una marcada citotoxicidad celular. Al replicarse los experimentos utilizando células HEK293-T transfectadas para sobre-expresar ALCAM y CD318 por separado, se confirmó que la actividad del CAR-CD6 se correlaciona específicamente con la expresión de ALCAM.⁹⁰

Por todo lo anterior y, considerando la versatilidad con la que CD6 puede modular distintos estados fisiológicos, el desarrollo de células CAR-T o CAR-NK, basadas en nanobodies anti-CD6 o en dominios extracelulares de CD6 podrían ser una herramienta destacable en inmunoterapias que apunten a: (i) erradicar poblaciones malignas que sobre-expresan CD6, como ciertos linfomas, (ii) potenciar la actividad citotóxica frente a tumores dependientes de la interacción de CD6 con sus ligandos y (iii) atenuar la activación aberrante de linfocitos T autorreactivos en enfermedades autoinmunes.

3. Generación y selección de *nanobodies*

Los Nb son fragmentos de aproximadamente 15 kDa derivados del dominio variable (VHH) de anticuerpos IgG de cadena pesada (HCAs), un tipo de anticuerpos no convencionales que carecen de cadena liviana y que se encuentran en camélidos así como en algunas especies de peces cartilaginosos. Como se mencionó previamente, los Nb presentan numerosas ventajas tecnológicas, entre las que se destacan su tamaño pequeño, alta estabilidad, alta afinidad y facilidad para su selección mediante bibliotecas de fagos (tecnología de *phage display*).^{85,86}

Los fragmentos derivados del dominio variable pueden obtenerse a partir de bibliotecas inmunes en fagos utilizando la tecnología *phage display*. Estas bibliotecas consisten en colecciones de genes VHH obtenidos tras la inmunización de un camélido con el antígeno de interés, seguida de la extracción del ARN total del linfocito B de la

sangre. Posteriormente, el repertorio de genes VHH se amplifica y se clona en vectores fagémidos para luego permitir la expresión de estos sobre superficie de fagos.⁹¹ Contra intuitivamente, su generación no está limitada a la obtención de bibliotecas inmunes, ya que existen al menos dos estrategias adicionales: (i) Bibliotecas naïve, las cuales se caracterizan por un mayor tamaño respecto a las bibliotecas inmunes ($\sim 10^9$ - 10^{10}) y permiten la obtención de nanobodies contra antígenos sin necesidad de realizar procesos de inmunización, dado que se construyen a partir de linfocitos B de animales no inmunizados, (ii) Bibliotecas sintéticas, diseñadas artificialmente a partir de un esqueleto de VHH bien caracterizado, al cual se le introduce diversidad en las regiones hipervariables o CDRs (del inglés, *Complementarity Determining Regions*), permitiendo generar diversidad in vitro sin necesidad de inmunización.⁹¹

A nivel local, en el laboratorio de Inmunología ubicado en el instituto de Higiene, la obtención de Nb se realiza a partir de bibliotecas inmunes de fagos generadas tras inmunización de llamas (*Llama glama*). El esquema de inmunización habitual consiste en la inyección de 50-200 μ g del antígeno de interés formulado junto con un adyuvante estándar, por ejemplo, el adyuvante incompleto de Freund (AIF), siguiendo un protocolo no menor a cuatro inoculaciones a lo largo de dos meses. Al momento de cada inmunización, se extraen muestras de suero para realizar el seguimiento temporal de la respuesta humoral específica (HCAbs), que en el caso de llamas se sitúa entre el 11 y el 25% de la respuesta total.^{92,93}

Entre 5 y 7 días después de la última dosis, se extrae sangre (aproximadamente 50-100 mL) de la vena yugular, a partir de la cual se aíslan los linfocitos B para extraer su ARNm.⁶¹ Con este material, se realiza la síntesis de ADNc y posteriormente se amplifican los genes de la región VHH mediante dos reacciones de PCR sucesivas. En la primera, se amplifica la cadena pesada de todas las IgG, producto del cual se pueden asilar los VHH que presentan un menor tamaño génico (ausencia del exón CH1). Luego, estos amplicones se utilizan como molde en una segunda PCR para amplificar específicamente los VHH utilizando cebadores que contienen sitios de restricción adecuados para su clonado en vectores fagémidos que son necesarios para la expresión de los VHH en cultivos de *E. Coli*.⁹⁶ En esta etapa cobra especial relevancia la técnica mencionada anteriormente conocida como *phage display*, la cual permite presentar los VHH en la superficie de bacteriófagos filamentosos del género inovirus.⁹⁴ Esto se logra mediante la fusión de un gen que codifica la proteína pIII, con el gen VHH, dando lugar a fagos que expresan versiones quiméricas de la proteína PII. Dado que los vectores fagémidos no contienen todos los genes necesarios para el ensamblaje del fago, durante los cultivos *E. coli*, se requiere la coinfección con un fago *helper*, que aporta las funciones faltantes y permite la producción de viriones que exhiben los distintos VHH de la biblioteca.⁹⁵ Una vez construida la biblioteca, la selección de los VHH de interés se realiza mediante panning, el cual consiste en ciclos sucesivos de incubación de la biblioteca con el antígeno inmovilizado, lavado de fagos no unidos y amplificación de los que permanecen ligados.

El antígeno puede presentarse sobre superficies sólidas, esferas magnéticas o incluso células enteras (**Figura 8**).⁹⁵

Generalmente, las bibliotecas de fagos presentan una diversidad superior a 10^7 clones (medido en número de células transformados con el vector de la biblioteca), un valor adecuado para representar el repertorio máximo de VHH presentes en una muestra de sangre de 200 mL del animal.^{93,96}

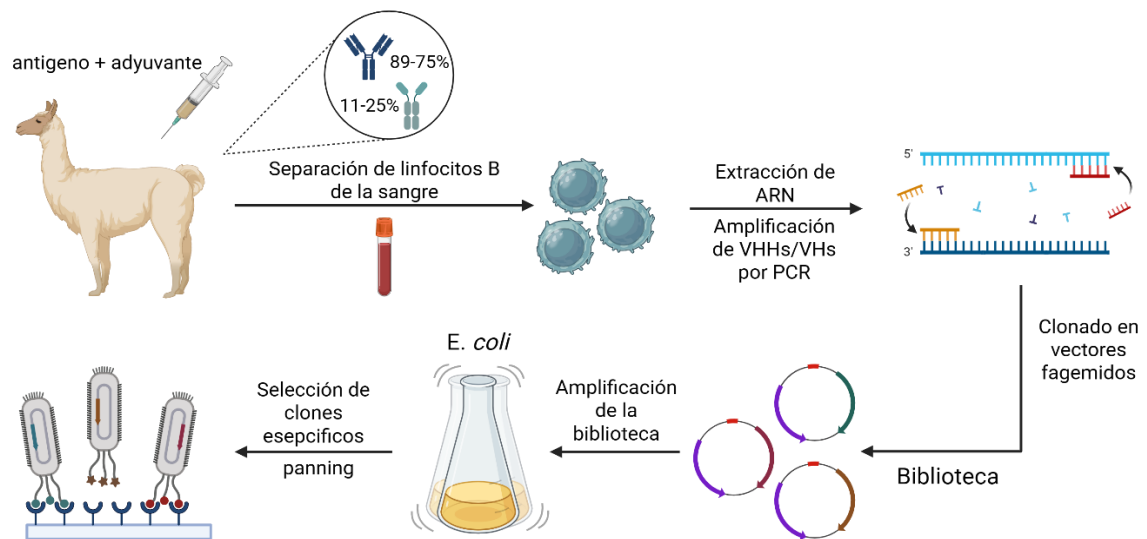


Figura 8. Representación esquemática de la generación de una biblioteca de *nanobodies*, para su selección por *phage display*. El esquema muestra las etapas principales del proceso: Inmunización de la llama, aislamiento de linfocitos B y extracción de ARN, amplificación de los VHH por PCR, clonado en vectores fagémidos, y selección de clones específicos por *panning*.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Producir en sistema eucariota distintas formas recombinantes de los dominios SRCR CD6.D1 y CD6.D3 presentes en el ectodominio de CD6 humano, y explorar su potencial valor para el desarrollo de nuevas intervenciones inmunoterapéuticas.

2. Objetivos específicos

1. Producir los dominios recombinantes rCD6.D1 y rCD6.D3 en versiones monoméricas y dimerizadas por fusión al Fc del anticuerpo IgG1 humano.
2. Caracterizar estructuralmente las proteínas recombinantes obtenidas.
3. Explorar *in vitro* el potencial uso como agentes de tipo señuelo por parte de las proteínas recombinantes obtenidas.
4. Evaluar *in vivo* la antigenicidad de las proteínas recombinantes obtenidas determinando la respuesta humoral específica inducida en animales inmunizados.

REACTIVOS

1. Buffers y soluciones

A continuación, se listan las soluciones más comúnmente usadas en el presente trabajo, las cuales, salvo que se indique lo contrario, se prepararon utilizando agua destilada.

1.1 Buffers y soluciones de uso general

Tabla 1. Buffers y soluciones de uso general. En la tabla se enlistan los nombres y recetas de buffers y soluciones de uso general y su respectiva formulación.

<i>Buffer/solución</i>	<i>Receta</i>
Buffer fosfato salino (PBS)	NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 2mM, Na_2HPO_4 10 mM, pH 7.4
Buffer carbonato	NaHCO_3 100 mM, Na_2CO_3 100 mM, pH 9.6
Buffer acetato	Ácido acético glacial 2,1 mL, dH_2O 350 mL, pH 5.5
Sustrato para la reacción colorimétrica de la enzima peroxidasa de rábano (HRP)	TMB 0.096 mg/mL y H_2O_2 0.004% en buffer acetato
Solución de lavado (PBS-Tween)	PBS 1x, Tween 0,5% (v/v)

1.2 Soluciones para electroforesis

Tabla 2. Buffers y soluciones utilizados para electroforesis. En la tabla se enlistan los nombres y recetas de buffers y soluciones utilizados para electroforesis y su respectiva formulación.

<i>Buffer/solución</i>	<i>Receta</i>
Buffer de carga reductor (6X)	Tris Base 350 mM, dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% m/v, glicerol 30%, azul bromofenol 175 μM , dicloro-difenil-tricloroetano (DTT) 100 mM
Buffer de corrida	Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% m/v
Solución colorante	Azul de Coomassie R-250 1.0 g/L, ácido acético glacial 7.5%, metanol 5%
Solución decolorante	ácido acético glacial 7.5%, metanol 5%
Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE)	Tris-acetato 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0

1.3 Buffer y soluciones para cromatografía de afinidad

Todas las soluciones utilizadas fueron filtradas por filtro 0,22 µm.

Tabla 3. Buffers y soluciones utilizados para cromatografía de afinidad. En la tabla se enlistan los nombres y recetas de buffers y soluciones utilizados para electroforesis y su respectiva formulación.

<i>Buffer/solución</i>	<i>Receta</i>
Buffer de unión	Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0
Buffer de lavado endotoxinas (PBS-tritón)	NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH ₂ PO ₄ 2 mM, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, tritón X-114 1 % pH 7.4. Para la completa disolución de triton X-114, la solución debe ser preparada y conservada en hielo.
Buffer de elución (IBA Lifesciences #2-1042-025)	Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, biotina 50 mM, pH 8.0

1.4 Buffer, soluciones y medios de cultivo para ensayos bacterianos

Tabla 4. Buffers, soluciones y medios de cultivo utilizados para ensayos bacterianos con *Escherichia coli*. En la tabla se enlistan los nombres y recetas de buffers, soluciones y medios de cultivo utilizados para ensayos bacterianos con *Escherichia coli* y su respectiva formulación.

<i>Buffer/solución/medio</i>	<i>Receta</i>
Caldo de lisogenia (LB, Sigma-Aldrich #L3522)	NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, pH 7.0
LB-agar (Sigma Aldrich #L3147)	NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extractos de levadura 5 g/L, agar 15 g/L, pH 7.0
Medio de recuperación de transformantes (<i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression</i> (SOC))	Triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L (Sigma-Aldrich), NaCl 0.5 g/L, pH 7.0. Luego de autoclavar se agrega MgCl ₂ y glucosa a concentración final 10 mM y 20 mM, respectivamente, a partir de soluciones stock esterilizadas por filtración.
Buffer de aglutinación (TTC)	Tris Base 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl ₂ ·2H ₂ O 1 mM, Tween 0.1%, pH 10.0

1.5 Buffer, soluciones y medios de cultivo para ensayos en células eucariotas

Tabla 5. Buffers, soluciones y medios de cultivo celular utilizados para células eucariotas. En la tabla se enlistan los nombres y recetas de buffers, soluciones y medios de cultivo utilizados para células eucariotas, junto a su respectiva formulación y línea celular en la que se utilizó.

<i>Buffer/solución/medio</i>	<i>Receta</i>	<i>Línea celular</i>
Medio de cultivo completo Medio <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	DMEM con glucosa 4.5 mg/mL (Capricorn #DMEM-HA), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (Capricorn #FBS-11A) y antibiótico penicilina G, estreptomicina y anfotericina B 1% (Gibco #15240-062)	Línea celular inmortalizada derivada de riñón humano (HEK293-T)
PBS 1X estéril (Capricorn #PBS-1A)	-	
Solución Tripsina-EDTA	Tripsina 12 mg/mL, EDTA 60 µM en PBS, esterilizada por filtración.	
Solución transfectante	Polietilamina 40000 Da (PEI MAX, Polyscience #24765-1) 1 mg/mL, pH 7.0, esterilizado por filtración.	
Medio de cultivo completo	DMEM con glucosa 4.5 mg/mL, suplementado con SFB 10% y antibióticos: estreptomicina 100 µg/mL y penicilina 60 µg/mL	Línea celular de macrófago murino (Raw 264.7)
Reactivo de Griess	sulfanilamida 1% m/v en ácido fosfórico 30% en agua y NEDA 0.1% m/v en ácido fosfórico 30% en agua	

1.6 Soluciones peptídicas y proteicas disponibles en el laboratorio

Tabla 6. Péptidos y proteínas disponibles en el laboratorio previo a la realización de la tesis de grado. En la tabla se enlistan el nombre y origen de las soluciones proteicas y peptídicas utilizadas durante este trabajo que ya estaban disponibles en el laboratorio,

<i>Solución</i>	<i>Origen</i>
rshCD5 ²²	Laboratorio del Fundació de Recerca Clínic Barcelona-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)
rshCD6 ²²	
rshCD6-biotina ²²	
pCD6.pD1	Sintetizados por Beijing SBS Genetech Co., Ltd., China.
pCD6.pD2	
pCD6.pD3	
pCD6.pT ^{97,98}	

MÉTODOS

1. Métodos generales

1.1 Cultivos bacterianos

Se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* según la finalidad de uso. Por un lado, la cepa DH5 α se utilizó para la construcción de plásmidos recombinantes y la amplificación de ADN plasmídico; mientras que la cepa ER2358 se utilizó para evaluar –mediante ensayos de aglutinación y ELISA - la interacción de las proteínas recombinantes obtenidas con componentes bacterianos.

Los cultivos bacterianos se realizaron utilizando matraces de vidrio conteniendo 10-20 mL de medio LB y se incubaron a 37°C durante la noche (*overnight*, ON), los mismos se iniciaron mediante el inóculo de una colonia de *E. coli* aislada proveniente de placas de LB-agar sembradas el día anterior. En particular, para la amplificación de ADN plasmídico en DH5 α , los cultivos -tanto líquidos como en placa- se realizaron en presencia de ampicilina 100 μ g/mL (BioChemica, #A0839,0100).

1.2 Transformación bacteriana por electroporación

Se mezclaron 30 μ L de células competentes con 1 μ L de ADN plasmídico y se incubaron en hielo durante 30-60 segundos. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación estéril de 2 mm (Sigma-Aldrich, #Z706086) y se sometió a pulso eléctrico de 2,5 kV con el equipo MicroPulser TM (BIO-RAD, #1652100). Inmediatamente después de electroporar, se recuperaron las células de la celda mediante adición de 1 mL de medio SOC precalentado a 37°C. Las células resuspendidas se transfirieron a tubo de polipropileno (Deltalab #401402) y se incubaron a 37°C durante 60 minutos y con agitación a 250 rpm. Finalmente, las células fueron sembradas en placas con medio LB-agar suplementado con ampicilina 100 μ g/mL, y se incubaron a 37°C ON.

1.3 Extracción y purificación del ADN plasmídico

Para la generación de ADN plasmídico se realizaron cultivos de 5 mL de *E. coli* portadoras del plásmido de interés y fueron crecidos a 37°C ON. La extracción del ADN plasmídico se realizó al día siguiente, utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN #27104) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los geles se prepararon con agarosa al 1% (m/v) en buffer TAE y en presencia del agente intercalante de ADN, GelRed (Milipore #SCT122) stock 10000X. En paralelo, las muestras se mezclaron con buffer de carga 6X (Thermo Scientific #R0611), y luego se

sembraron en el gel junto al marcador de peso molecular *MPM GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific #SM1331). Las corridas electroforéticas se realizaron a 100 V durante 30-60 minutos.

1.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las proteínas recombinantes producidas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE, usando geles de poliacrilamida al 15% (m/v), bajo condiciones reductoras o no reductoras, según los objetivos, y en presencia del detergente SDS. Previo a la carga en el gel, las muestras se mezclaron con buffer de carga 6X, con o sin agente reductor, y se incubaron a 100 °C por 5 minutos. Las muestras se sembraron en el gel junto al marcador de peso molecular *PAGE-MASTER Protein Standard* (GenScript #M000516), y, posteriormente se realizaron las corridas electroforéticas a 120 V durante 60 minutos. Finalmente, los geles se tiñeron con solución colorante azul de Coomassie durante 30 minutos a 50°C, seguido de un paso de desteñido que consistió en la incubación del gel con solución decolorante a temperatura ambiente *over night* (ON).

1.6 Cuantificación de ADN y de proteínas

Para cuantificar el ADN y las proteínas se midió la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm, respectivamente, utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific). A partir de la absorbancia y un coeficiente de extinción molar estándar para cada tipo de muestra, el equipo calcula un valor de concentración. El cual es acompañado de un espectro de absorbancia vs. longitud de onda que permite evaluar someramente la pureza de la muestra (presencia de un pico único)

1.7 Mantenimiento en cultivo de la línea celular HEK293-T

Todos los cultivos celulares de la línea HEK293-T se realizaron a 37°C en incubador con control de CO₂ atmosférico al 5% (v/v). Las manipulaciones correspondientes, incluyendo preparación y complementación/suplementación de los medios, se realizaron en cabina de flujo laminar vertical previa esterilización con luz UV durante 15 minutos. Los cultivos de células HEK293-T se iniciaron partiendo de viales de 1 mL criopreservados a -80°C en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB y 10% (v/v) de DMSO (dimetilsulfóxido). Los viales se descongelaron por inmersión directa en baño a 37°C por 1-2 minutos y se transfirieron inmediatamente a tubos cónicos de 50 mL conteniendo 10 mL de medio de cultivo completo precalentado a 37 °C. Luego, las células se centrifugaron a 300 G a temperatura ambiente durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 mL de medio completo precalentado a 37°C. A continuación, las células se sembraron en botellas de cultivo T25 (Greiner, #690160) y se incubaron hasta alcanzar una confluencia mínima al 80%.

Para el mantenimiento del cultivo, se realizaron pasajes sucesivos utilizando botellas T75 (Greiner, #658170) con un volumen máximo de 15 mL de medio de cultivo, o botellas T175 (Greiner, #66175) con un volumen máximo de 30 mL. En cada pasaje se descartó el medio de cultivo y las células adheridas se lavaron con PBS 1x estéril precalentado a 37°C agregando la mitad del volumen máximo de la botella. Inmediatamente después, se descartó la solución de lavado y se agregó solución de tripsina precalentada utilizando un décimo del volumen máximo de la botella, incubándola sobre la superficie de células adheridas durante 3 minutos a 37°C. El desprendimiento celular se detuvo mediante la adición de medio completo hasta alcanzar el volumen final máximo de la botella. Según el caso, las células se replicaron en la misma botella y/o en nuevas botellas, considerando siempre la siembra de 1-2 millones de células en botellas T75 y 3-5 millones en botellas T175.

1.8 Mantenimiento en cultivo de la línea celular RAW264.7

Todos los cultivos celulares de la línea RAW264.7 se realizaron a 37°C en incubador con control de CO₂ atmosférico al 5% (v/v). Las manipulaciones correspondientes, incluyendo preparación y complementación/suplementación de los medios, se realizaron en cabina de flujo laminar horizontal previa esterilización con luz UV durante 15 minutos.

Los cultivos de células RAW264.7 (TIB-71™) se iniciaron partiendo de viales de 1 mL criopreservados a -80°C en medio congelación 90% (v/v) de SFB y 10% (v/v) de DMSO. Los viales se descongelaron por inmersión directa en baño a 37°C por 1-2 minutos y se transfirieron inmediatamente a tubos cónicos de 50 mL conteniendo 10 mL de medio de cultivo incompleto precalentado a 37°C. Luego, las células se centrifugaron a 300g a 4°C durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 mL de medio completo. A continuación, las células se sembraron en botellas de cultivo T25 y se incubaron hasta alcanzar una confluencia mínima al 80%, realizándose cambios de medio cada 48-72 horas.

Para el mantenimiento del cultivo, se realizaron pasaje sucesivo utilizando botellas T25. En cada pasaje se descartó el medio de cultivo y las células adheridas se lavaron con PBS 1x estéril precalentado a 37°C agregando la mitad del volumen máximo de la botella. Las células que formaban la monocapa fueron desprendidas por un método físico, utilizando un *cell scraper* (Greiner, #541070), y resuspendidas en el PBS previamente agregado. Luego, las células se centrifugaron a 300 g a 4°C durante 5 minutos, se descartó el PBS y se resuspendieron las células en 1 mL de medio completo. A continuación, se contaron usando cámara de Neubauer. Finalmente, se transfirieron a nuevas botellas de cultivo considerando siempre la siembra de 1-8 millones de células y ajustando el volumen final con medio completo.

2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

2.1. Características de los vectores PcDNA3.1(+) utilizados para expresión en células HEK293-T

Para la expresión de las proteínas recombinantes en células HEK293-T se utilizó una versión modificada del plásmido comercial PcDNA3.1(+) (**Figura 9c**). Este vector está diseñado para la expresión transitoria de proteínas en líneas celulares de mamíferos, y contiene un promotor y un potenciador ambos derivados del citomegalovirus humano (hCMV). Además, posee un origen de replicación SV40 que permite la replicación episomal en células que expresan el antígeno T de SV40, y un origen bacteriano pUC (“ori”) que asegura un alto número de copias en cultivos de *E. coli*. Durante la amplificación en bacterias, los plásmidos pueden seleccionarse por resistencia a ampicilina mediante la suplementación del medio con este antibiótico. La versión modificada del vector utilizada incorpora, en el extremo 5’ del sitio de inserción del gen, una secuencia señal para secreción proteica (Ig κ leader), y en el extremo 3’, una etiqueta (tag) llamada Twin-Strep-Tag que permite la purificación por afinidad mediante el sistema comercial Streptactin-XT (IBA, Lifesciences) (**Figura 9a**). Además, entre el promotor hCMV y la secuencia señal, se introdujo un intrón (Intrón A de CMV) que potencia la expresión de la proteína mediante aumento de eficiencia de traducción de los ARNm. Partiendo del gen *CD6* humano (**Figura 5**), localizado en el cromosoma 11, el cual abarca 13 exones y se extiende desde la posición 60.971.675 hasta 61.020.377pb (aproximadamente 48,5 kb), se empleó el ensamblaje canónico ENST00000313421, para depurar los exones y aislar las regiones específicas correspondientes a los dominios extracelulares. En particular, el dominio CD6.D1 (399 pb) está constituido principalmente por el exón 3 y una porción del exón 2, mientras que el dominio CD6.D3 (315b pb deriva mayormente del exón 5, incluyendo además una región acotada del exón 6. Estas secuencias se obtuvieron por síntesis comercial en General BioSystem y se insertaron entre la secuencia señal y el tag Twin-Strep-Tag mediante digestión con la enzima *SfiI*, la cual reconoce dos sitios de restricción presentes en el vector.

Por otro lado, para generar versiones diméricas de CD6.D1 y CD6.D3, se utilizó una variante adicional del vector PcDNA3.1 que además de incluir todos los elementos mencionados anteriormente, incorpora la secuencia codificante para los dominios Cy2 y Cy3 del fragmento Fc de la inmunoglobulina humana IgG1 (**Figura 9b**). Esta secuencia se colocó en marco con el gen de interés, para dar lugar a las proteínas de fusión diméricas rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc.

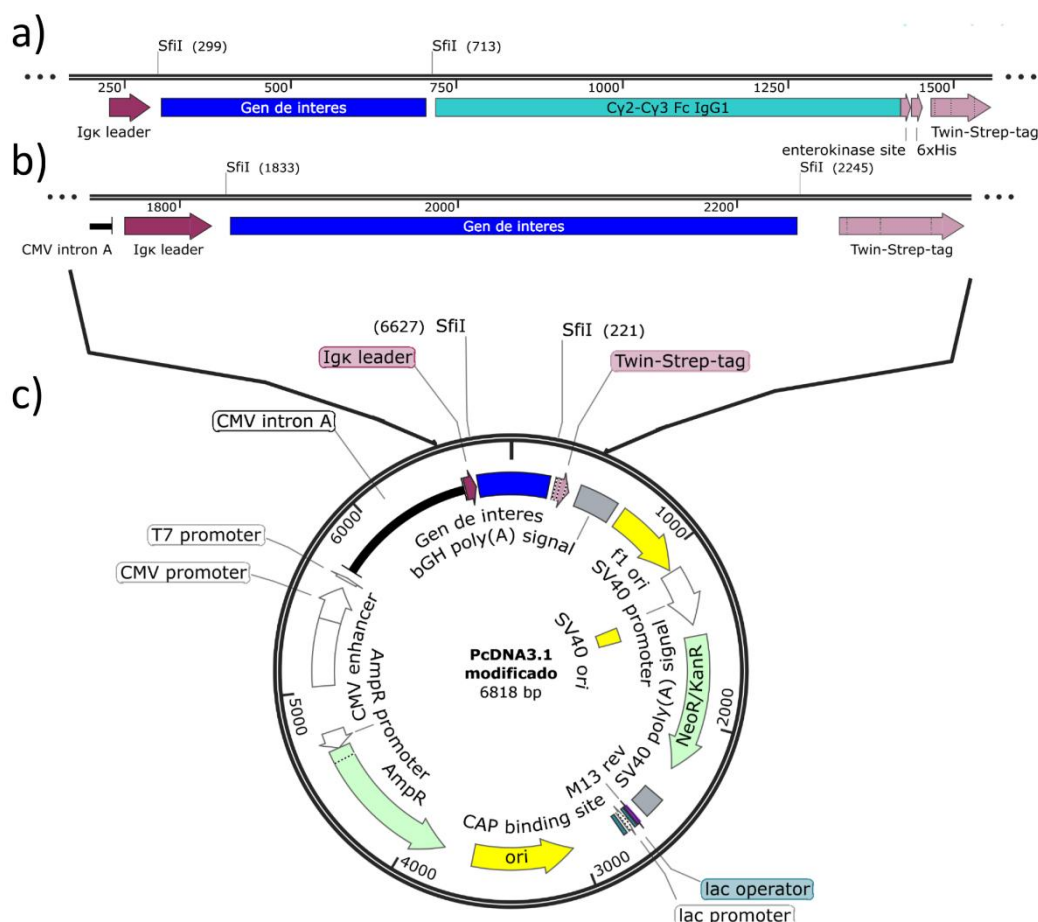


Figura 9. Representación esquemática de los constructos de expresión y del vector utilizado para la producción recombinante de los dominios de interés. (a) Casete génico para los genes de interés con la región Fc de IgG1 humana. (b) Casete génico para los genes de interés versión monomérica (c) Vector modificado PcDNA3.1(+) con el gen de interés, compuesto por el péptido señal IgK leader, el intrón A de CMV, y el tag de purificación Twin Strep tag.

2.2. Clonado de genes en vectores derivados de PcDNA3.1.

Los insertos génicos correspondientes a los dominios CD6.D1 y CD6.D3 se obtuvieron comercialmente de la empresa General Biosystem, y se clonaron en un plásmido comercial irrelevante entre dos sitios de restricción reconocidos por la enzima *SfiI*. Con este plásmido se transformaron células DH5 α , con las cuales se amplificaron las secuencias en cultivos líquidos, y finalmente se purificaron mediante extracción de ADN plasmídico por miniprep. Con el ADN obtenido se realizó una reacción de digestión plasmídica con *SfiI* siguiendo las condiciones sugeridas por el fabricante (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de digestión sugeridas por ThermoScientific para la enzima SfiI. En la tabla se enlistan las condiciones de digestión sugeridas por ThermoScientific para SfiI

ADN plasmídico	1 µg
Buffer G (BG5, ThermoScientific)	1x
<i>SfiI</i> (10U/µL, ThermoScientific #ER1821)	5 unidades
Incubación	ON, 50°C

El producto de digestión obtenido se sometió a electroforesis en geles de agarosa 1% (m/v), a partir de los cuales se extrajo la banda correspondiente a cada fragmento génico de interés y se realizó su purificación mediante el uso del kit comercial de extracción *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific #K0691). En paralelo, también se digirieron 15 µg de cada vector derivado de PcdNA3.1 con *SfiI*, respetando las condiciones y la relación ADN/enzima mencionadas previamente. El producto de ADN digerido, de conformación lineal, se aisló y purificó a partir de geles de agarosa utilizando el kit comercial *GeneJET Gel Extraction Kit* (ThermoScientific, #K0691).

Para evitar religación intramolecular, los extremos de los ADN plasmídicos purificados se desfosforilaron utilizando la enzima fosfatasa alcalina recombinante de camarón (rSAP) siguiendo las recomendaciones del fabricante (**Tabla 8**).

Tabla 8. Condiciones de desfosforilación sugeridas por NEB para la enzima rSAP. En la tabla se enlistan las condiciones de desfosforilación sugeridas por NEB para rSAP

ADN	1 picomol de extremos*
Buffer CutSmart (NEB, #B6004)	1x
rSAP (NEB#M0371S)	1 unidad
Incubación	30 min, 37°C
Inactivación	5 min, 65°C

*1 pmol de extremos de ADN corresponde a 1 µg de un plásmido de 3 kb

Finalmente, los fragmentos génicos correspondientes a CD6.D1 y CD6.D3 se clonaron en los vectores digeridos y desfosforilados mediante ligación con la enzima T4 ligasa, en una relación molar inserto:vector de 1:3, y siguiendo nuevamente las recomendaciones del fabricante (**Tabla 9**).

Tabla 9. Condiciones de ligación sugeridas por ThermoScientific para T4 ligasa. En la tabla se enlistan las condiciones de ligación sugeridas por ThermoScientific para T4 ligasa

Buffer T4 DNA Ligasa (ThermoScientific, #B69)	1x
T4 ligasa (ThermoScientific, #15224041)	1 unidad
Incubación	60 min, 22°C
Inactivación	10 min, 65°C

Por último, con los productos de ligación obtenidos se transformaron bacterias DH5 α , y, posteriormente, las mismas se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina. Luego, a partir de colonias aisladas se realizaron cultivos líquidos de 5 mL para amplificar y purificar el ADN plasmídico resultante. El clonado correcto inserto:vector se verificó por análisis de secuencia, para lo cual se solicitó la secuenciación comercial de los plásmidos a la empresa Macrogen, utilizando un cebador específico por la región IgK leader. Las secuencias obtenidas se analizaron localmente utilizando el software SnapGene Viewer (Dotmatics).

2.3. Producción de proteínas recombinantes en células HEK293-T transfectadas

Para la producción de las proteínas recombinantes se transfectaron cultivos de células HEK293-T en botellas T125 (a una confluencia del 70-90%) con el ADN plasmídico de interés. Para cada transfección (1 botella) se realizó una mezcla de 180 μ g de agente transfectante PEI MAX con 36 μ g de ADN plasmídico; respetando así una relación 5:1 (m/m) de PEI:ADN. Para ello, se diluyó, por un lado, el PEI en 5,4 mL de medio DMEM, y por otro lado, el ADN plasmídico en 2,3 mL de medio DMEM; ambos en tubos cónicos de 15 mL estériles de polipropileno. Luego, la solución de PEI se transfirió al tubo conteniendo la solución con el ADN plasmídico y la mezcla resultante se homogeneizó mediante el uso de vórtex por 30 segundos, seguido de incubación a temperatura ambiente por 30 minutos para promover la formación de complejos PEI-ADN. En paralelo, se descartó el medio de cultivo de las botellas con células HEK293-T, y se lo reemplazó por 12 mL de medio de cultivo completo fresco. A continuación, se adicionó cuidadosamente la mezcla de transfección al medio de cultivo presente en la botella con las células HEK293-T y se incubó durante 4 horas a 37°C. Luego, se realizó un recambio de medio de cultivo completo, dejando las células en un volumen final de 30 mL e incubándolas por 72 hs para dar tiempo a la expresión de las proteínas recombinantes. Finalmente, los sobrenadantes de cultivo libres de células se recolectaron para proceder con la purificación de las proteínas recombinantes.

2.4 Purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad

Todas las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad siguiendo dos protocolos distintos. Por un lado, para poder utilizar las proteínas recombinantes en ensayos funcionales *in vitro*, se realizó un protocolo de purificación en condiciones estrictamente apirógenas, dado que CD6 es capaz de unir LPS. Por otro lado, para usos menos exigentes de las proteínas (por ejemplo: ELISA, etc.), se realizó su purificación bajo condiciones convencionales. Finalmente, en ambos casos, los productos purificados se evaluaron mediante SDS-PAGE, se cuantificaron mediante absorbancia a 280 nm, y se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta su uso.

Por un lado, para la purificación convencional se partió de los sobrenadantes de cultivo mencionados en el punto 2.3, los cuales se centrifugaron a 300 G a 4°C durante 5 minutos para eliminar restos celulares, posteriormente se suplementaron con 3 mL de buffer de unión 10x (**Reactivos, Tabla 3**) correspondiente a la columna de afinidad Strep-Tactin-XT. La columna Strep-Tactin-XT pre-empaquetada se lavó con 5 volúmenes de agua ultra pura y se equilibró con 10 volúmenes de buffer de unión utilizando una bomba peristáltica con un flujo establecido de 1 mL/min. Sobre la columna equilibrada, y bajo las mismas condiciones de flujo, se cargó la muestra a analizar, y luego, se lavó la columna con 15 mL de PBS. Finalmente, se eluyeron las proteínas recombinantes utilizando 6 mL de buffer de elución conteniendo biotina (**Reactivos, Tabla 3**). El eluato obtenido se recolectó en fracciones de 0,5 mL a las cuales se les midió la absorbancia a 280 nm para identificar la presencia de proteínas. Las fracciones con valores de absorbancia >0,2 mg/mL se mezclaron y se dializaron extensamente contra PBS utilizando una membrana de celulosa de MC18 (Roth, USA) con un *cut off* de 14 kDa.

Por otro lado, para la purificación de las proteínas recombinantes bajo condiciones estrictamente apirógenas, se trabajó en campana de flujo horizontal y utilizando soluciones libres de pirógenos. El procedimiento de purificación fue esencialmente igual al descrito previamente, con un paso adicional luego del sembrado de la muestra en la columna. El mismo consistió en la realización de un lavado de la columna con 50 mL de PBS conteniendo tritón 0,1% (v/v), seguido de un lavado con 50 mL de PBS; posteriormente, se eluyeron las proteínas recombinantes. Las fracciones obtenidas del eluato se sometieron a un cambio de buffer, para almacenarse en PBS, mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando columnas PD10 (Grayline Medical, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5 Conjugación de biotina a rCD6.D1 y rCD6.D3

Una porción de las proteínas recombinantes rCD6.D1 y rCD6.D3 se marcó con biotina mediante conjugación química, utilizando para ello el reactivo comercial Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo Scientific, USA). Para la reacción, 200 µg de las proteínas diluidas en 500

μL de PBS se incubaron con una solución de Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo Scientific, #21335), respetando una relación molar proteína:biotina de 1:20. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave, y luego se dializó extensivamente contra PBS.

3. Caracterización estructural de las proteínas recombinantes

3.1 Espectrometría de Masas MALDI-TOF

Se utilizó espectrometría de masas MALDI-TOF para evaluar experimentalmente el peso molecular de las proteínas recombinantes. Para esto, se preparó una matriz de ácido sinapínico 0,1% (m/v), utilizando como diluyente una solución 1:1 de acetonitrilo y solución acuosa de ácido trifluoroacético 1% (v/v). Las proteínas se diluyeron 1/10 en dicho diluyente y se mezclaron sobre parafilm en proporción 1:1 con la matriz. Un procedimiento similar se realizó con la solución calibradora compuesta por varias proteínas de peso molecular conocidos. Luego, las mezclas se depositaron en una placa MSP 96 *target ground steel* (Bruker, #NC0832107) y, una vez cristalizadas, se introdujeron en el equipo MALDI-TOF Microflex LRF (Bruker). Durante las medidas del calibrador se ajustaron condiciones como la intensidad del láser y el rango masa/carga (m/z), y finalmente, se adquirieron espectros de cada muestra promediando cinco espectros por proteína analizada.

3.2 Análisis *in silico* de sitios de N-glicosilación en las proteínas recombinantes

A partir de la secuencia aminoacídica del ectodominio de CD6 humano disponible en el banco de datos de proteínas de *Protein Data Bank* (PDB#5A2E), se aplicó el predictor de glicosilaciones NetNGlyc-1.0 para identificar posibles sitios de N-glicosilación (PMID: 11928486). Dicho predictor utiliza redes neuronales artificiales entrenadas con secuencias N-glicosiladas conocidas para identificar sitios probables de N-glicosilación a partir de secuencias Asn-Xaa-Ser/Thr en la proteína y otorga un score tal que (++,+,-,--) corresponden a muy probable, probable, improbable y muy improbable, respectivamente.

3.3 Calorimetría diferencial de barrido

La termoestabilidad de las proteínas recombinantes se evaluó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando el equipo Prometheus NT.48 nanoDSF (Nanotemper Technologies) del Instituto Pasteur de Montevideo (Dr. Martín Fló). Previo al análisis de las muestras, las mismas se sometieron a 5 ciclos de congelado a -20°C y descongelado a temperatura ambiente. Cada proteína se depositó sobre capilares de vidrio que luego se introdujeron en el equipo para realizar las mediciones correspondientes. Así, se adquirieron medidas de cambios en la fluorescencia intrínseca

de la proteína generados durante una rampa térmica de 20 a 95°C con incrementos térmicos de 1°C por minuto; a partir de los cuales se obtuvo valores de temperatura de fusión (T_m).

4. Ensayos funcionales con las proteínas recombinantes

4.1 Ensayos de interacción con componentes bacterianos

4.1.1 Interacción con componentes bacterianos mediante ELISA

Para evaluar la reactividad de las proteínas recombinantes con componentes bacterianos, se realizaron ensayos en formato ELISA utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos (Greiner, #655061) sensibilizadas con una suspensión de bacterias térmicamente inactivadas o con una solución de LPS purificado. Ambos ensayos se desarrollaron de manera similar incluyendo rshCD6-biotina como control positivo, con excepción del paso inicial de sensibilización.

Por un lado, para el ensayo con bacterias, se realizaron cultivos de *E. coli* ER2738 en 15 mL de medio LB a 37°C ON con agitación constante (250 rpm). Luego, el cultivo se centrifugó a 10.000 g a 4°C durante 10 minutos, y el pellet celular obtenido se sometió a tres rondas de lavados con 10 mL de buffer carbonato (**sección Reactivos, Tabla 1**). Posteriormente, las bacterias se inactivaron por calor mediante incubación a 65 °C durante 1 hora. La solución final se diluyó en buffer carbonato a una concentración equivalente a 0,5 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta suspensión bacteriana se utilizó para sensibilizar placas incubando 100 µL por pocillo a 37°C durante 1 hora. Luego, se bloquearon las placas con 200 µL por pocillo de una solución de PBS-gelatina 1% (m/v), incubándolas a 37°C durante 30 minutos. Tras 2 lavados con solución de lavado (**sección Reactivos, Tabla 1**) 0,5%, las placas se incubaron a 4°C ON con diluciones seriadas al 1/3 de rCD6.D1-biotina, rCD6.D3-biotina, rCD6.D1-Fc o rCD6.D3-Fc en PBS-gelatina 0,1% (m/v). Luego de 5 lavados, la detección de las proteínas recombinantes biotiniladas se realizó utilizando estreptavidina conjugada a peroxidasa (HRP) diluida 1/1.000 (Thermo Scientific, #S911), mientras que para la detección de las proteínas dimerizadas se utilizó un anticuerpo específico para IgG humana conjugado a HRP diluido 1/10.000 (Abcam, #ab97225). En ambos casos, se incubaron 100 µL por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante (450 rpm) y se realizaron 5 lavados. Finalmente, la reacción de revelado se realizó incubando 50 µL por pocillo de sustrato de HRP (**sección Reactivos, Tabla 1**) a temperatura ambiente durante 5-15 minutos, y se detuvo mediante la adición de 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 2 N. La lectura de las placas se realizó a 450 nm con corrección a 620 nm utilizando un espectrofotómetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).

Por su parte, para el ensayo con LPS se procedió de igual manera que en el protocolo previamente descrito para bacterias inactivadas, pero realizando la

sensibilización inicial de las placas con una solución de LPS (Sigma, #L2654) 2 µg/mL diluido en PBS.

4.1.2 Interacción con componentes bacterianos mediante ensayos de aglutinación

Para los ensayos de aglutinación, se cultivaron bacterias *E. coli* ER2728 en 15 mL de medio LB a 37° C ON con agitación constante (250 rpm). Los cultivos se centrifugaron a 10.000g a 4°C durante 10 minutos y los pellets celulares obtenidos se lavaron tres veces con 10 mL de buffer TTC (**sección Reactivos, Tabla 4**). La suspensión bacteriana final se diluyó en TTC a una concentración equivalente a 0,5 unidades de absorbancia a 600 nm. Luego, en una placa de 96 pocillos de fondo en U (Deltalab, España) se mezclaron -en cada pocillo- 75 µL de suspensión bacteriana junto con 75 µL de soluciones conteniendo distintas concentraciones de proteínas recombinantes (incluyendo rshCD6 como control positivo) o de péptidos sintéticos. Las mezclas se incubaron a 37°C ON sin agitación. Para las proteínas recombinantes, el rango de concentraciones ensayado fue 0.6 pM - 500 nM, mientras que para los péptidos sintéticos fue 250 pM - 800 µM. Finalmente, la aglutinación bacteriana se monitoreó por inspección visual utilizando lupa, y según las características de las mallas generadas, se asignaron valores cualitativos relativos útiles para para comparar los resultados obtenidos.

4.2 Ensayos in vitro de neutralización de LPS

4.2.1 Ensayos de cultivo celular con la línea RAW264.7

A partir de cultivos de la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 (**sección 1.8**), se generó una suspensión en medio DMEM alto en glucosa (Sigma, USA) a concentración 2×10^6 células/mL, se sembraron 50 µL/pocillo de dicha suspensión en placas de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas bajo atmósfera controlada de CO₂ al 5% (v/v) para promover la adhesión celular. Luego, se prepararon soluciones de LPS 0,1 µg/mL en medio DMEM completo en presencia de dos concentraciones (5-50 µM) de proteínas recombinantes o de péptidos sintéticos, y se incubaron a 37°C durante 1 hora para favorecer su interacción. A continuación, se adicionaron 50 µL/pocillo de cada mezcla, y las placas se incubaron durante 24 horas bajo las mismas condiciones. Como controles se incluyeron: (i) células sin estimular (control negativo), (ii) células estimuladas solo con LPS (control positivo), y (iii) células incubadas solo con las proteínas/péptidos (controles de citotoxicidad).

4.2.2 Determinación de la producción de nitritos

La producción de óxido nítrico por parte de las células RAW264.7 ensayadas en el ítem 4.2.1 se realizó indirectamente mediante la determinación de la concentración de nitritos en sobrenadante utilizando para ello la reacción de Griess.⁹⁹ Para ello, se

transfirieron 50 µL del sobrenadante de cada pocillo a placas de microtitulación de 96 pocillos (fondo plano) y se adicionaron 50 µL/pocillo del reactivo de Griess (**sección Reactivos, Tabla 5**). Luego se realizaron incubaciones a temperatura ambiente de 15 minutos en oscuridad, y se tomaron medidas de absorbancia a 560 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas *Titertek Multiscan Plus* (Flow Laboratories, Helsinki, Finlandia). La cuantificación de nitritos se realizó utilizando una curva de calibración de NaNO₃ en el rango 15-1.000 nM diluido en medio de cultivo fresco.

5. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes en ratones inmunizados

5.1 Inmunización de ratones

Se realizó un ensayo de inmunización con las proteínas recombinantes rCD6.D1, rCD6.D3, rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc, utilizando ratones hembras de la cepa CD1 de 12 semanas de edad, formuladas en adyuvante alúmina (Invivogen, USA). En total se emplearon 25 animales distribuidos en cinco grupos (cada uno n=5), cuatro grupos para las distintas proteínas recombinantes, y un quinto grupo control que recibió únicamente PBS con adyuvante. Cada inmunización consistió en 20 µg de proteína diluida en 50 µL de PBS y formulada con 50 µL de alúmina. Las mezclas se incubaron a 4°C ON con agitación constante para promover la adsorción de las proteínas. Luego, las inmunizaciones se realizaron por inoculación vía subcutánea utilizando agujas estériles 27G, y siguiendo un esquema de dosis inicial (día 0, *priming*) y dos dosis de refuerzo (*boosters*) administradas en los días 14 y 30 post-*priming* (p.p.). Finalmente, todos los animales se sangraron a cero en el día 45 p.p. previa eutanasia por exceso de anestesia inhalatoria (isoflurano, Cristalia, N01AB06). Los sangrados *post mortem* se realizaron inmediatamente por punción de la vena cava inferior. Para la obtención de suero, las muestras de sangre (sin anticoagulante) se incubaron a 37°C durante 1 hora, seguido de incubación a 4°C por 2 horas y centrifugación a 12.000g sin control térmico durante 10 minutos. Finalmente, los sueros se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.2 Evaluación de la respuesta humoral específica en ratones inmunizados

Para evaluar la respuesta específica de anticuerpos en el suero de los ratones inmunizados, se realizaron ensayos de ELISA utilizando placas de 96 pocillos de fondo plano, sensibilizadas con las proteínas recombinantes rshCD6, rshCD5 rCD6.D1 y rCD6.D3. Las placas se sensibilizaron con 100 µL/pocillo de solución proteica 1 µg/mL, y se incubaron a 4°C ON. Luego, las placas se bloquearon con 200 µL/pocillo de PBS-BSA 1% (m/v) a 37°C durante 30 minutos. Las muestras de suero se analizaron realizando curvas de titulación partiendo de una dilución inicial 1:100 y continuando con series al 1:3 en PBS-BSA 0,1% (m/v), e incubando las placas a temperatura ambiente durante 1

hora con agitación continua (450 rpm). La detección de anticuerpos IgG se realizó mediante el agregado de 100 µL/pocillo de una solución de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a HRP (ThermoScientific, #31437) diluido 1:5.000 en PBS-BSA 0,1 % (m/v) con Tween-20 0,05 % (v/v), y realizando una nueva incubación en las mismas condiciones previamente descritas. Finalmente, el revelado se realizó incubando 100 µL/pocillo de sustrato de HRP (**sección Reactivos, Tabla 1**) a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación continua (450 rpm), y deteniendo la reacción con adición de 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 2 M. A lo largo del ensayo y entre las etapas de incubación posteriores a la sensibilización, se realizaron de 2 a 5 lavados de las placas con PBSTween 0,05 % (v/v). Las lecturas de la señal colorimétrica se realizaron midiendo la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro *FLUOstar OPTIMA* (BMG Labtech) con corrección a 620 nm para minimizar interferencias inespecíficas. El título de anticuerpos específicos se definió como la dilución a la que las muestras alcanzaban una absorbancia de 0,100 u.a

6. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes en una llama inmunizada

6.1 Inmunización de la llama

Se inmunizó una llama macho de 4 años de edad residente en el Parque Lecoq de la Intendencia Municipal de Montevideo. La misma recibió inoculaciones por vía subcutánea con tres dosis conteniendo 500 µg de cada una de las proteínas rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc formuladas con AIF. Las dosis se espaciaron 20-30 días entre sí, y en cada instancia de inoculación se tomaron muestras de 5 mL de sangre del animal. 3-5 días luego de la última inoculación, se extrajeron 200 mL de sangre para realizar la construcción de una biblioteca útil para la selección futura de Nb específicos. Todos los procedimientos con la llama se llevaron a cabo por funcionarios veterinarios del Parque Lecoq.

6.2 Evaluación de la respuesta humoral específica en llama

La evolución temporal de la respuesta de anticuerpos específicos en el suero de la llama inmunizada se analizó mediante dos ensayos de ELISA distintos. El primer ensayo tuvo como objetivo evaluar la respuesta específica de IgG totales frente a rhsCD6, rCD6.D1 y rCD6.D3. Para ello, se sensibilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano incubando a 37°C durante 1 hora, 100 µL por pocillo de las distintas soluciones proteicas a 1 µg/mL en PBS. Luego, las placas se bloquearon a 37°C durante 30 minutos con 200 µL/pocillo de PBS con leche descremada 5% (m/v). Los sueros se analizaron mediante curvas de titulación partiendo de una dilución inicial 1:200 y continuando con series al 1:3 en PBS-leche 1% (m/v), e incubando las placas a temperatura ambiente durante 1 con agitación constante (450 rpm). La detección de IgG

totales se realizó mediante la incubación con un suero de conejo anti-IgG de llama (producido localmente en el laboratorio) diluido 1:50.000 en PBS-leche 1% (m/v) con Tween-20 0,05% (v/v), seguido de una segunda incubación con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado a HRP (ThermoScientific, #31462) diluido 1:30.000 utilizando el mismo diluyente. En ambos casos, se incubaron 100 μ L por pocillo durante 1 hora manteniendo las mismas condiciones de temperatura y agitación. Finalmente, el revelado se realizó incubando 100 μ L por pocillo de sustrato de HRP (**sección Reactivos, Tabla 1**) (TMB) a temperatura ambiente durante 15 minutos (450 rpm), y la reacción se detuvo con la adición de 50 μ L/pocillo de H₂SO₄ 2 M. A lo largo del ensayo y entre las etapas de incubación, posteriores a la sensibilización se realizaron de 2 a 5 lavados de las placas con PBS-Tween-20 0,05% (v/v). Las lecturas de la señal colorimétrica se realizaron midiendo la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro *FLUOstar OPTIMA* (BMG Labtech), realizando correcciones a 620 nm para minimizar interferencias inespecíficas. El título de anticuerpos específicos se definió como la dilución a la que se alcanzó una absorbancia del 10% respecto a la absorbancia máxima de saturación

El segundo ensayo de ELISA se diseñó para evaluar particularmente la generación de anticuerpos específicos de cadena pesada no convencional; la clase de inmunoglobulinas a partir de la cual derivan los Nb como se comentó previamente. El procedimiento fue idéntico al ELISA para IgG totales descrito previamente, pero utilizando para la detección de anticuerpos no convencionales un AcMo anti-VHH conjugado a HRP, específico para los dominios variables de los anticuerpos de cadena pesada (GenScript, #A01861). Este anticuerpo se utilizó diluido 1:5.000 en PBS-leche descremada 1 % (m/v) con Tween-20 0,05% (v/v), y se incubó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

7. Análisis estadístico

El procesamiento general de los datos se realizó utilizando *Microsoft Office Excel*, mientras que para la construcción de gráficos y la realización de análisis estadístico se utilizó *GraphPad Prism*. Los análisis de variables no paramétricas se realizaron mediante el test de Kruskal-Wallis, mientras que las variables paramétricas se analizaron mediante One Way ANOVA o test t de Student según corresponda. En todos los casos las diferencias se consideran significativas frente a valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo general del presente trabajo consistió en producir, en sistema eucariota, distintas formas recombinantes correspondientes a los dominios SRCR CD6.D1 y CD6.D3 presentes en el ectodominio del receptor CD6 humano. Asimismo, para cada una de las proteínas recombinantes generadas, se propuso explorar su potencial valor para el desarrollo de nuevas intervenciones inmunoterapéuticas. En este sentido, para cumplir con dicho objetivo general, se plantearon cuatro objetivos específicos, cuyos resultados se describen y discuten a continuación agrupados según el objetivo específico correspondiente.

1. Objetivo específico #1

Producir los dominios recombinantes rCD6.D1 y rCD6.D3 en versiones monoméricas y dimerizadas por fusión al Fc del anticuerpo IgG1 humano.

La estrategia general de trabajo seguida para cumplir con el objetivo específico #1 consistió en obtener de manera comercial las secuencias correspondientes a los dominios SRCR CD6.D1 y CD6.D3 humanos, las cuales se ligaron en vectores que presentasen o no la secuencia Fc de IgG1 humana para transfección de células mamíferas. Estos vectores se amplificaron mediante transformación bacteriana, y se utilizaron para transfectar células HEK293-T, partiendo de los sobrenadantes de cultivo se purificaron las proteínas recombinantes producidas. Por último, la purificación de las proteínas recombinantes se realizó siguiendo dos protocolos distintos, cada una con un objetivo final diferente, y, finalmente, la pureza alcanzada se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE.

1.1 Clonado de genes en vectores derivados de PcDNA 3.1

A partir de la secuencia canónica de CD6 humano (ENST00000313421) y utilizando la base de datos PDB (número P30203), se identificaron los fragmentos correspondientes a los dominios CD6.D1 el más distal respecto a la membrana y CD6.D3 el más proximal. El dominio CD6.D1 (**Figura 5**) comprende la secuencia aminoacídica comprendida entre 23–156 ubicada inmediatamente después del péptido señal, mientras que el dominio CD6.D3 abarca la región 259–364, localizada antes de la secuencia transmembrana de la proteína.

Como punto de partida de esta tesis, se disponía de ambos genes sintetizados por la empresa General Biosystem y provistos en plásmidos independientes, flanqueados por sitios de restricción para la enzima SfiI. Los genes fueron extraídos mediante digestión con SfiI e insertados en vectores PcDNA3.1, los cuales contienen los elementos necesarios para la expresión de proteínas recombinantes en líneas de células de mamífero como HEK293-T.

Tanto CD6.D1 como CD6.D3 fueron clonados en dos versiones del vector PcDNA3.1, modificadas en el laboratorio para permitir la inserción de secuencias entre sitios SfiI y su expresión como proteínas libres o fusionadas a la región Fc de IgG humana. Asimismo, las construcciones incluyeron colas de purificación Twin-Strep-Tag, específicas para la proteína Strep-Tactin XT (**Figura 9**). Las ligaciones correspondientes a CD6.D1 y CD6.D3, con y sin Fc, fueron transformadas en *E. coli* y, desde colonias aisladas se verificó el clonado correcto mediante secuenciación de ADN. Los plásmidos confirmados se amplificaron en cultivos bacterianos para obtener cantidades suficientes destinadas a las transfecciones de las células HEK293-T para la producción de las proteínas recombinantes.

1.2 Expresión y producción recombinante de los dominios CD6.D1 y CD6.D3

Con el ADN correspondiente a cada construcción de los dominios, se realizaron transfecciones en cultivos adherentes de células HEK293-T utilizando protocolos de transfección química y condiciones de cultivo previamente optimizadas en el laboratorio. Como primera aproximación para evaluar el funcionamiento del sistema de expresión, se transfectó el constructo de rCD6.D3 en una botella T175 con 30 mL de cultivo. Cuatro días después, el sobrenadante fue sometido a purificación por afinidad utilizando columnas con resina Strep-Tactin XT, obteniéndose una fracción de elución con un pico de absorbancia a 280 nm correspondiente a 1,4 mg de proteína. Estos resultados confirmaron la capacidad del sistema para secretar el dominio CD6.D3 y permitieron avanzar hacia la expresión de las cuatro proteínas planificadas (rCD6.D1 y rCD6.D3, con y sin Fc) realizando cultivos en volúmenes de 100–150 mL.

Las proteínas recombinantes fueron purificadas empleando dos estrategias, definidas en función de los requisitos de pureza necesarios para las aplicaciones previstas. La primera correspondió a una purificación simple, que consistió en aplicar directamente el sobrenadante a la columna de afinidad, realizar lavados y eluir la proteína de interés. La segunda estrategia incorporó pasos adicionales orientados a la reducción de endotoxinas, incluyendo lavados exhaustivos de la columna con PBS-Triton X-114 antes de la elución, seguidos de un paso de filtración en gel para modificar el buffer y mejorar la limpieza del preparado. Los rendimientos obtenidos por cada 100 mL de cultivo se ubicaron en el rango de 3,3-7,3 mg para la purificación simple y 0,7-2,4 mg para la purificación con reducción de endotoxinas (**Tabla 10**), siendo esperable la disminución de rendimiento en este último caso debido a los pasos adicionales incorporados.

Tabla 10. Rendimiento de producción y purificación de las proteínas recombinantes. La tabla resume los rendimientos (miligramo de proteína obtenida cada 100 mL de sobrenadante de cultivo) obtenidos para cada una de las proteínas recombinantes expresadas en células HEK293-T comparando dos estrategias de purificación: Cromatografía de afinidad en un solo paso vs. Cromatografía de afinidad y eliminación de endotoxinas

<i>Proteína recombinante</i>	<i>Método de purificación</i>	
	<i>Cromatografía de afinidad en un solo paso</i>	<i>Cromatografía de afinidad y eliminación de endotoxinas</i>
rCD6.D1	3,3	0,7
rCD6.D1-Fc	7,3	2,4
rCD6.D3	4,9	1,0
rCD6.D3-Fc	4,5	2,2

En consecuencia, se optó por emplear proteínas purificadas mediante el método simple para aplicaciones que no requieren una pureza estricta—como ensayos ELISA, SDS-PAGE o inmunizaciones en llamas—y reservar las proteínas libres de endotoxinas para experimentos sensibles, tales como cultivos celulares, ensayos de aglutinación o ELISA orientados a evaluar interacciones con LPS. Finalmente, se observó que las versiones fusionadas a la región Fc de IgG1 humana, particularmente rCD6.D3-Fc, presentaron mayores rendimientos que sus contrapartes sin Fc, en concordancia con la mayor solubilidad y eficiencia de secreción asociadas a la fusión al dominio Fc.¹⁰⁰

En complemento con los rendimientos obtenidos, se evaluó la pureza de las preparaciones mediante electroforesis SDS-PAGE. Los resultados confirmaron que el sistema de purificación por afinidad con resina Strep-Tactin XT permitió obtener proteínas recombinantes con un alto grado de pureza. En los geles se observaron bandas definidas de aproximadamente 40 kDa y 20 kDa para los dominios rCD6.D1 y rCD6.D3, respectivamente (**Figura 10A**), mientras que las versiones fusionadas a la región Fc mostraron bandas principales cercanas a 80 kDa y 50 kDa (**Figura 10B**). En la sección siguiente se continuó con un análisis más detallado sobre los tamaños obtenidos para estas proteínas.

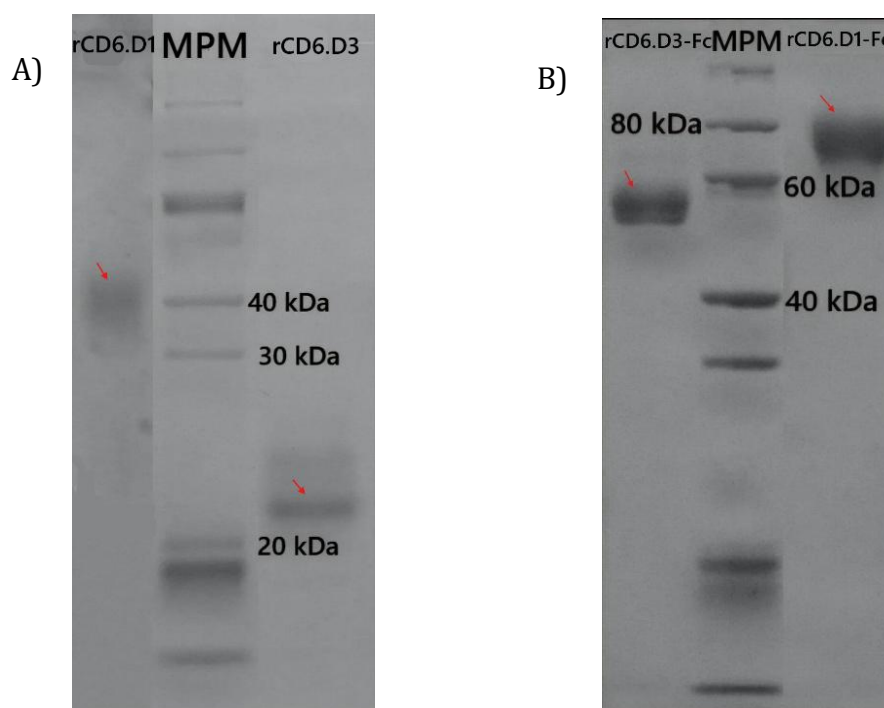


Figura 10: Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras del resultado de la purificación de las proteínas recombinantes rCD6.D1 y rCD6.D3. La purificación fue realizada por cromatografía de afinidad en una columna de Streptactin-XT, eluyendo la proteína con biotina 50 mM. **(A)** Carril rCD6.D1: fracción de elución de la purificación de la proteína CD6.D1, carril MPM: marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard (GenScript #M000516) , carril rCD6.D3: fracción de elución de la purificación de la proteína CD6.D3. **(B)** Carril rCD6.D3-Fc: fracción de elución de la purificación de la proteína CD6.D3-Fc, carril MPM: marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard (GenScript #M000516), carril rCD6.D1-Fc: fracción de elución de la purificación de la proteína CD6.D1-Fc. Las bandas correspondientes a cada proteína se indican con una flecha roja.

2. Objetivo específico #2:

Caracterizar estructuralmente las proteínas recombinantes obtenidas.

La estrategia general de trabajo seguida para cumplir con el **objetivo específico #2** consistió en realizar una serie de ensayos tendientes a evaluar distintos aspectos estructurales de las proteínas recombinantes generadas. En este sentido, se evaluaron sus perfiles de migración en geles SDS-PAGE reductores y no reductores, se caracterizaron sus espectros obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF, se estudiaron sus posibles sitios de N-glicosilación, y, finalmente, se caracterizaron sus estabilidades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido. Cabe mencionar que, en varios de estos ensayos, así como en otros posteriores, se incluyó, con fines comparativos, la proteína rshCD6,²⁴ la cual fue gentilmente cedida por el grupo de investigación “Inmunoreceptores Innatos y Adaptativos” dirigido por el Dr. Francisco Lozano y la Dra. María Velasco-De-Andrés del IDIBAPS en Barcelona (España); con quienes el grupo mantiene estrechas colaboraciones académicas.

2.1 Caracterización del perfil de oligomerización de las proteínas recombinantes.

En el marco de la evaluación de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE (sección anterior), en esta sección se analizó con mayor profundidad el tamaño molecular de las proteínas recombinantes y su comportamiento migratorio en condiciones no reductoras. En la **Figura 11** se comparó la migración de las proteínas rCD6.D1 y rCD6.D3 en SDS-PAGE en condiciones reductoras **(A)** y no reductoras **(B)**. En ambos geles se observó que ninguna de las proteínas modificó su patrón de migración cuando los puentes disulfuro permanecieron formados, indicando que no coexisten poblaciones oligoméricas mediadas por puentes disulfuro intermoleculares. De esta forma ambos análisis permitieron determinar una migración aparente de aproximadamente 40 kDa para rCD6.D1 y 22 kDa para rCD6.D3.

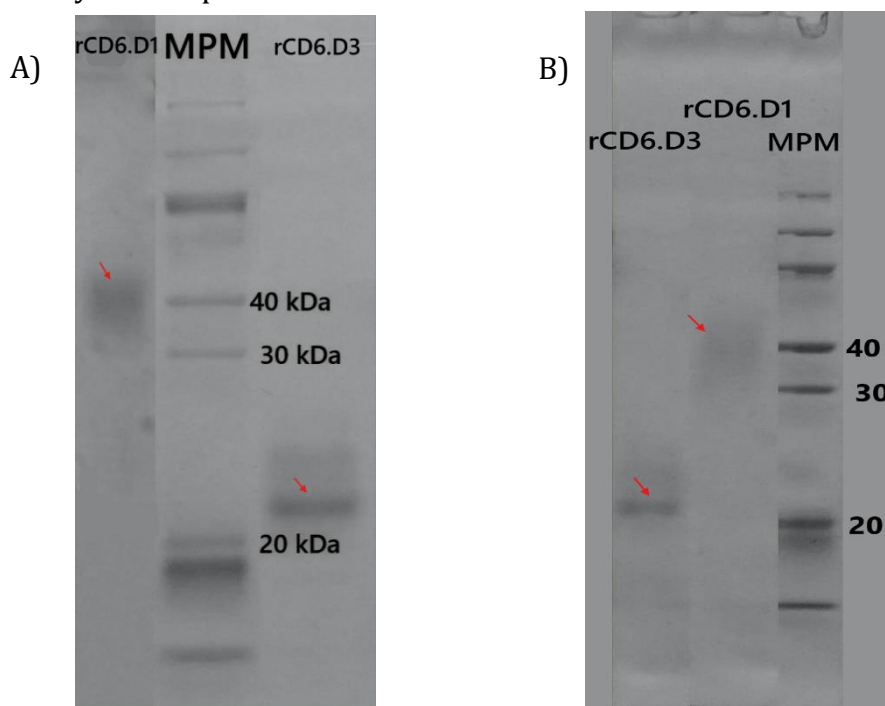


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas recombinantes rCD6.D1 y rCD6.D3 en condiciones reductoras y no reductoras. (A) SDS-PAGE en condiciones reductoras correspondiente a las fracciones de elución, mostrado previamente en la Figura 10. **(B)** SDS-PAGE en condiciones no reductoras realizado a partir de alícuotas de las proteínas conservadas en PBS. En ambos casos se incluyen los carriles correspondientes a ambas proteínas y el marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Las bandas correspondientes a cada proteína se indican con una flecha roja.

Estos valores resultan superiores a los pesos moleculares teóricos estimados a partir de sus secuencias aminoacídicas, los cuales, según herramientas informáticas como SnapGene, corresponden a 14 kDa para rCD6.D1 y 12 kDa para rCD6.D3. Este aumento aparente en el SDS-PAGE, fenómeno también reportado para el ectodominio completo de CD6, que migra alrededor de 42 kDa a pesar de tener un peso teórico de 80 kDa (GeneScript, Z04027-100), es probablemente atribuible a un elevado grado de glicosilación (como se discute al final de esta sección). Las modificaciones glicosiladas no

solo incrementan el tamaño aparente de las proteínas, sino que también aumentan la heterogeneidad poblacional en cada preparación, lo cual se refleja en la presencia de bandas difusas o menos definidas en los geles.

Por otro lado, los resultados obtenidos para rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc (**Figura 12**) mostraron diferencias en sus patrones de migración. Ambas proteínas no lograron “ingresar” al gel en condiciones no reductoras (**B**), sugiriendo valores de peso molecular >120 kDa, mientras que en condiciones reductoras rCD6.D1-Fc mostró una única banda de 70 kDa y rCD6.D3-Fc una de 50 kDa (**A**). Nuevamente, los valores de los monómeros a partir de la secuencia aminoacídica (40 kDa para rCD6.D1-Fc y 32 kDa para rCD6.D3) no coinciden con el peso molecular teórico calculado, por su parte los patrones de migración en el gel no reductor serían consistentes con la formación de dímeros debido a las características del dominio Fc de IgG1 humana, los cuales permanecerían unidos mediante enlaces disulfuro. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos, no es posible descartar la formación nativa de estructuras multiméricas mayores.

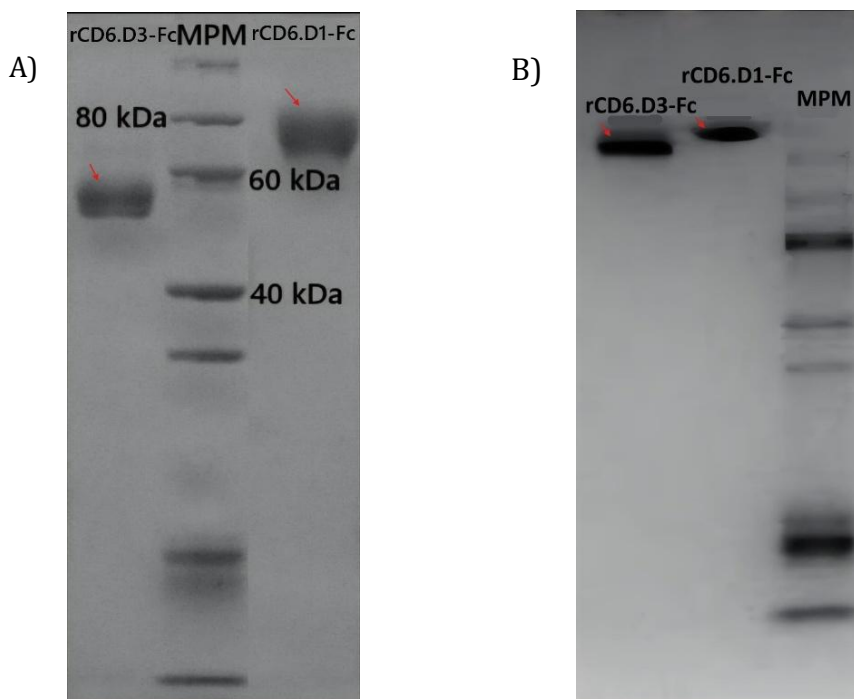


Figura 12. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas recombinantes rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc en condiciones reductoras y no reductoras. (A) SDS-PAGE en condiciones reductoras correspondiente a las fracciones de elución, mostrado previamente en la Figura 10 B. **(B)** SDS-PAGE en condiciones no reductoras realizado a partir de alícuotas de las proteínas conservadas en PBS. En ambos casos se incluyen los carriles correspondientes a ambas proteínas y el marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Las bandas correspondientes a cada proteína se indican con una flecha roja.

2.2 Caracterización de las proteínas recombinantes mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de posibles sitios de N-glicosilación.

La caracterización del perfil de migración nativo de proteínas de alto peso molecular presenta limitaciones técnicas inherentes, por lo que se realizaron caracterizaciones adicionales mediante espectrometría de masas MALDI-TOF para complementar el estudio. En la **Figura 13** se muestran los espectros obtenidos tanto para rCD6.D1 como para rCD6.D3, donde ambas proteínas mostraron dos picos claramente diferenciados. En el caso de rCD6.D1, el pico principal en términos de abundancia relativa presentó un peso molecular de 27,0 kDa, mientras que el pico secundario presentó un peso molecular de 55,0 kDa. Por su parte, en el caso de rCD6.D3 se observaron picos análogos correspondientes a 19,6 kDa y 39,5 kDa, respectivamente.

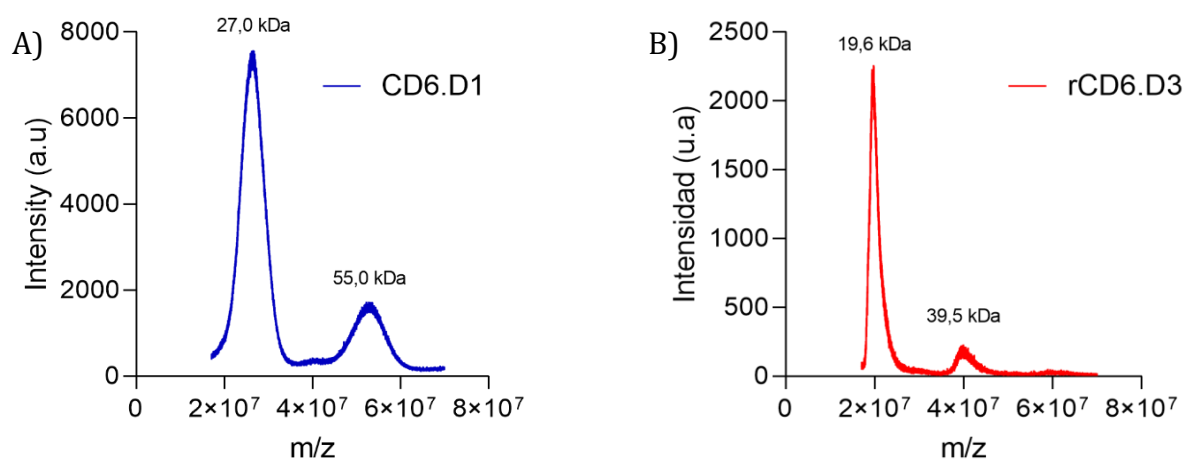


Figura 13. MALDI-TOF de las proteínas recombinantes. Los espectros observados corresponden al promedio de cinco espectros por proteína analizada. Sobre los picos se observa el peso molecular asociado al mismo, en ambos se observan dos subpoblaciones **(A)** rCD6.D1 y **(B)** rCD6.D3.

La resolución del equipo MALDI-TOF utilizado no permitió identificar picos correspondientes a posibles formas di-cargadas de rCD6.D1 y rCD6.D3. Asimismo, en base a la abundancia relativa de cada pico en el espectro, se observó que, para ambas proteínas, el pico principal correspondería a la forma nativa de la proteína en estado monomérico, ya que el segundo pico en ambos casos se ubicó en valores aproximadamente dobles de peso molecular respecto del pico más abundante. Así, los resultados sugerirían que rCD6.D1 y rCD6.D3 coexistirían en formas predominantemente monoméricas, pero con presencia de estructuras homodiméricas; las cuales, dadas sus bajas abundancias relativas, no se observarían en los geles SDS-PAGE nativos.

Por último, al comparar entre sí los picos obtenidos en los espectros de ambas proteínas se observa que rCD6.D3 presentó picos mejor resueltos respecto a rCD6.D1, sugiriendo la presencia diferencial de glicosilaciones, y por ende de glicoisofomas, entre ambas proteínas.

Por otro lado, en la **Figura 14** se muestran los espectros correspondientes a rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc. De forma análoga a los resultados previamente discutidos, ambas proteínas presentaron dos picos en sus espectros; en el caso de rCD6.D1-Fc, el pico principal en términos de abundancia relativa presentó un peso molecular de 105,0 kDa, mientras que el pico secundario presentó un peso molecular de 58,0 kDa. Por su parte, en el caso de rCD6.D3-Fc se observaron picos análogos correspondientes a 92,0 kDa y 49,0 kDa, respectivamente.

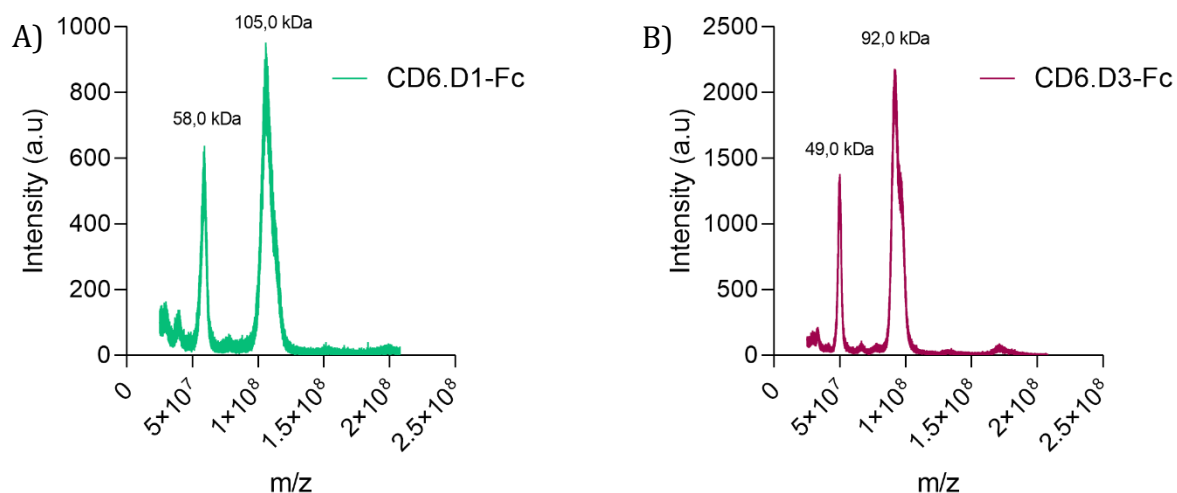


Figura 14. MALDI-TOF de las proteínas quiméricas. Los espectros observados corresponden al promedio de cinco espectros por proteína analizada. Sobre los picos se observa el peso molecular asociado al mismo, en ambos se observan dos subpoblaciones. **(A)** rCD6.D1-Fc y **(B)** rCD6.D3-Fc

En base a la abundancia relativa de cada pico en el espectro, se observó que, para ambas proteínas, el pico principal correspondería a la forma nativa de la proteína en estado dimerico, y que el segundo pico, con una abundancia relativa considerable (a diferencia de lo observado en la **(Figura 13)** ubicado en ambos casos en valores aproximadamente al medio respecto al pico más abundante, reflejaría dos subpoblaciones. Una subpoblación correspondiente a las formas monoméricas; las cuales, dada su baja abundancia, no se observarían en los geles SDS-PAGE nativo, y otra a las proteínas nativas di-cargadas, de esta manera explicando la alta abundancia relativa total del pico.

En la **Tabla 11** se resume toda la información obtenida en relación al peso molecular de las proteínas recombinantes, ya sea obtenida por cálculos teóricos, geles SDS-PAGE desnaturalizantes y espectrometría de masas MALDI-TOF. Como se observa, todas las proteínas presentaron variaciones en el valor de su peso molecular según el método utilizado para su obtención. En todos los casos, los valores experimentales fueron significativamente mayores a los pesos moleculares teóricos calculados simplemente a partir de la secuencia aminoacídica de cada proteína. Por su parte, al comparar los valores obtenidos por MALDI-TOF y por SDS-PAGE se observaron diferencias atribuibles a la sensibilidad y precisión de cada técnica.

Tabla 11. Peso molecular de las proteínas recombinantes. En la tabla se resumen los pesos moleculares (kDa) de las distintas proteínas recombinantes en forma monomérica obtenidos a partir de cálculos teóricos, electroforesis SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF.

<i>Proteína recombinante (monómero)</i>	<i>Valor teórico</i>	<i>SDS-PAGE</i>	<i>MALDI-TOF</i>
rCD6.D1	14	40	27
rCD6.D1-Fc	40	70	58
rCD6.D3	12	22	20
rCD6.D3-Fc	34	55	49

El hecho que los valores teóricos de peso molecular fueron sistemáticamente inferiores a los obtenidos experimentalmente, sugeriría que las proteínas recombinantes presentan modificaciones postraduccionales. Esto estaría en consonancia con la conocida presencia de glicosilaciones en el ectodominio de CD6 y con el uso de un sistema mamífero para la producción de las proteínas recombinantes (células HEK293-T).⁹ Por ello, se analizó la presencia de posibles sitios de N-glicosilaciones en CD6.D1 y CD6.D3, tanto por inspección sobre la estructura experimental de CD6 depositada en PDB como por predicción *in silico* sobre la secuencia de cada dominio utilizando el *software* NetNGlyc v01. Los resultados presentes en la **Tabla 12** muestran que ambos dominios SRCR derivados del ectodominio de CD6 humano presentarían sitios de N-glicosilación, los cuales explicarían al menos parcialmente las variaciones observadas entre valores teóricos y experimentales de peso molecular (**Tabla 11**).

Tabla 12. Número y sitio de posible N-Glicosilaciones de CD6.D1 y CD6.D3. En la tabla se enlistan el número y sitio de posibles N-Glicosilaciones de las proteínas CD6.D1 y CD6.D3 a partir de base de datos y predictores de secuencia, junto a un *score* (++,+,-,--), según la probabilidad real de glicosilación.

<i>Dominio SRCR</i>	<i>PDB</i> <i>Nº de sitios (ubicación)</i>	<i>NetNGlyc – 1.0</i> <i>Nº de sitios</i> <i>(ubicación y score)</i>
CD6.D1	3 (49,112,118)	2 ++ (49,112), 1 + (118)
CD6.D3	2 (339,345)	1 - (339) 2 - (345)

Por otro lado, al comparar las variaciones entre valores de peso molecular de cada proteína con su número de posibles sitios de N-glicosilación, se observó que las diferencias más marcadas corresponden a las proteínas que contienen el dominio CD6.D1, el cual presentaría un mayor número de N-glicosilaciones que CD6.D3. Estas observaciones estarían en línea con el patrón más difuminado observado en los geles SDS-PAGE (**Figura 11**) y la mayor amplitud en los picos obtenidos por MALDI-TOF (**Figura 13**) para rCD6.D1. Por lo tanto, las proteínas recombinantes que incluyen CD6.D1 serían estructuralmente más heterogéneas que las que contienen CD6.D3 a causa de un mayor número de posibles glicoisoformas distintas. Asimismo, las proteínas con Fc fusionado presentarían una capa de complejidad adicional en términos de glicoisoformas posibles dado que el Fc de los anticuerpos presenta sitios propios de N-glicosilación.¹⁰¹

Si bien todos estos resultados apoyan la presencia de glicosilaciones, su naturaleza no pudo ser confirmada experimentalmente en esta etapa. Por lo que, en trabajos posteriores se planea completar este análisis mediante tinciones específicas para glucoproteínas (por ej. PAS) y ensayos de des-glicosilación con enzimas específicas (por ej. PNGasa F), lo que permitiría validar la contribución de las N-glicosilaciones al comportamiento observado en SDS-PAGE y MALDI.

2.3 Caracterización de la estabilidad térmica de las proteínas recombinantes mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La estabilidad térmica de proteínas recombinantes potencialmente útiles para diseñar estrategias inmunoterapéuticas es de relevancia y su determinación es necesaria como parte de la caracterización. Por ello, se realizó calorimetría diferencial de barrido (DSC), para cada una de las proteínas recombinantes producidas. La estabilidad térmica medida fue comparada con la de rshCD6, dado que como ya se mencionó, dicha proteína ha mostrado gran valor inmunoterapéutico.¹⁷

En la **Figura 15** se observa el perfil de desnaturalización térmica obtenido para rshCD6, rCD6.D1 y rCD6.D3. Los resultados obtenidos demostraron que rCD6.D3 presentó un único pico de desnaturalización aproximadamente a 60°C, mientras que rCD6.D1 lo exhibió cercano a 80°C, sugiriéndose así que rCD6.D1 sería más estable que rCD6.D3. Por su parte, rshCD6 mostró dos picos de desnaturalización: uno primario en torno a 60°C (similar a rCD6.D3) y uno secundario sobre 80°C (similar a rCD6.D1). Como se describió previamente, rshCD6 está conformada por los tres dominios SRCR presentes en el ectodominio de CD6, por lo que *a priori*, se esperaría que su perfil de desnaturalización térmica mostrara tres picos diferentes: uno por cada dominio SRCR. Así, los resultados obtenidos sugerían que el perfil de desnaturalización térmica de CD6.D2 sería muy similar, sino idéntico, a alguno de los otros dos dominios SRCR (CD6.D1 o CD6.D3), por lo que se solaparía en el perfil global.

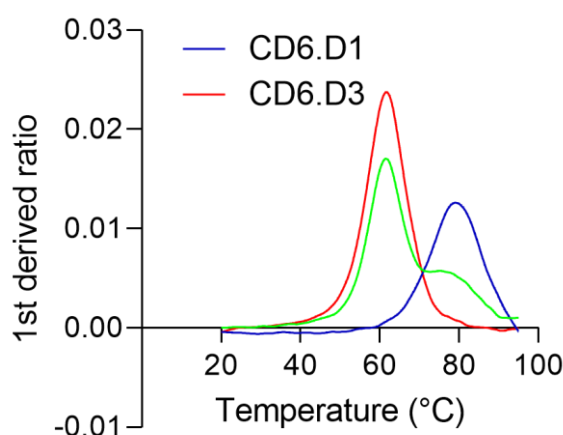


Figura 15. Calorimetría diferencial de barrido de las proteínas recombinantes rCD6.D1 y rCD6.D3. Se tomaron medidas de cambios de fluorescencia intrínseca generados durante una rampa térmica de 20 a 95°C.

Por su parte, en el caso de las proteínas conjugadas al dominio Fc de IgG1 humana, se observó un mayor número de picos en los perfiles de desnaturalización térmica correspondientes (**Figura 16**). Por un lado, rCD6.D3-Fc mostró un primer pico cercano a 60°C (similar a rCD6.D3), junto a dos picos adicionales a temperaturas aproximadas de 70°C y 80°C, ambos también presentes en el perfil de rCD6.D1-Fc. Además, esta última proteína mostró la formación de un incipiente pico de desnaturalización cercano a 100°C, temperatura a la que el agua se evapora, y, por ende, el equipo detiene la toma de medidas confiables. Los picos observados aproximadamente a 70°C y 80°C en ambas proteínas recombinantes fusionadas al Fc muy probablemente se deban a la desnaturalización de los dominios Cy2 y Cy3 de la IgG1 humana, respectivamente, ya que se ha reportado que

los mismos pueden sufrir eventos independientes de desnaturalización a temperaturas similares.⁶⁶

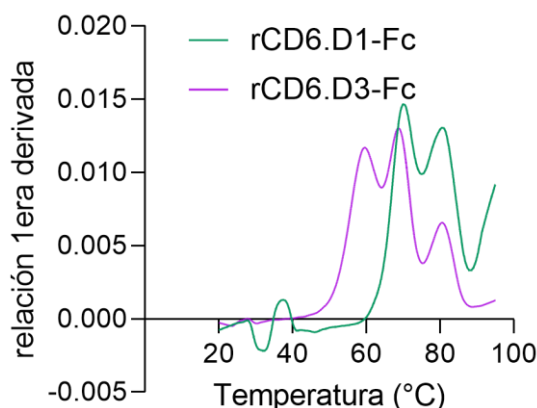


Figura 16: Calorimetría diferencial de barrido de las proteínas recombinantes rCD6.D-Fc y rCD6.D3-Fc. Se tomaron medidas de cambios de fluorescencia intrínseca generados durante una rampa térmica de 20 a 95°C.

Por otro lado, el perfil de desnaturalización térmica de rCD6.D3-Fc (**Figura 16**) sugiere que la fusión del dominio Fc a rCD6.D3 no alteró su estabilidad térmica individual, ya que se mantuvo un comportamiento similar al de rCD6.D3 (**Figura 15**). Por su parte, el perfil de desnaturalización térmica de rCD6.D1-Fc (**Figura 16**) sugiere que la desnaturalización de CD6.D1 quede enmascarada por el pico de desnaturalización de 80°C atribuido a la desnaturalización del dominio C γ 3.

En suma, los resultados obtenidos mediante DSC sugieren que todas las proteínas recombinantes producidas, al igual que rshCD6, presentan una alta estabilidad térmica. Esta información fue de gran utilidad para conservar y utilizar distintas alícuotas almacenadas con el respaldo de que la integridad de las proteínas recombinantes no se vería comprometida.

3. Objetivo específico #3:

Explorar in vitro el potencial uso como agentes de tipo señuelo por parte de las proteínas recombinantes obtenidas.

Como se mencionó previamente, el receptor CD6 presenta ciertos ligandos exógenos de origen bacteriano; motivo por el cual el uso de su forma recombinante soluble (rshCD6) ha demostrado utilidad para modular la respuesta inmune frente a diversos tipos de bacterias. Por ello, la estrategia general de trabajo seguida para cumplir con el **objetivo específico #3** consistió en realizar una serie de ensayos tendientes a evaluar el potencial uso de las proteínas recombinantes generadas en cuanto agentes de tipo señuelo para modular la respuesta inmune frente a bacterias Gram negativas. En este sentido, se evaluó entonces la capacidad de las proteínas recombinantes obtenidas de reconocer componentes bacterianos, a la vez que su actividad aglutinante. Luego, mediante ensayos *in vitro* de cultivo celular, se exploró la capacidad de dichas proteínas de bloquear la respuesta inflamatoria temprana inducida por LPS sobre una línea celular de macrófagos murinos. Nuevamente, se incluyó a rshCD6 dentro de los ensayos realizados, como una referencia para poder comparar las distintas proteínas recombinantes obtenidas a partir de su secuencia.

3.1 Reconocimiento de bacterias enteras por parte de las proteínas recombinantes.

Con el objetivo de evaluar la unión a bacterias Gram-negativas por parte de las proteínas recombinantes obtenidas, se diseñó una estrategia de tipo ELISA utilizando placas de microtitulación sensibilizadas con una suspensión de *E. coli* (cepa ER2738) inactivadas. Luego se incubaron las proteínas en estudio, a distintas concentraciones, para finalmente revelarlas según sus características; es decir, la unión de las proteínas recombinantes biotiniladas se detectó mediante el uso de estreptavidina conjugada a peroxidasa (stp-HRP), mientras que para las proteínas fusionadas a Fc se utilizó un anticuerpos anti-Fc conjugado a HRP. En primer lugar, se validó el ensayo utilizando la proteína rshCD6 (biotinilada), la cual exhibió un comportamiento de reconocimiento dosis-dependiente (**Figura 17**), en concordancia con reportes previos.¹²

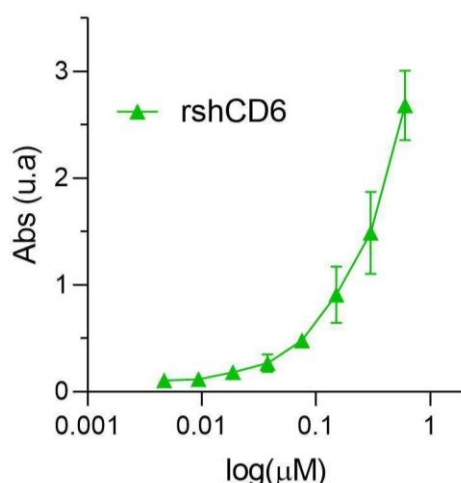


Figura 17. Evaluación de la unión de rshCD6-biotina a bacterias gram negativas. revelado con estreptavidina-HRP. Los valores se normalizaron con respecto a la absorbancia del control con bloqueante.

Posteriormente se analizaron las proteínas rCD6.D1 y rCD6.D3 (ambas biotiniladas), y, como se observa en la **Figura 18**, ambas presentaron un comportamiento dosis-dependiente de unión a bacterias. Con el objetivo de estimar la sensibilidad de dicho reconocimiento se evaluó la concentración mínima de unión detectable por encima de la señal de fondo, siendo esta 18,8 nM para rCD6.D1 y 75,0 nM para rCD6.D3. Además, se observaron diferencias significativas en el perfil de unión entre ambas proteínas a concentraciones >18,8 nM, sugiriéndose así que rCD6.D1 presentaría mayor afinidad global de unión a *E. coli* que rCD6.D3.

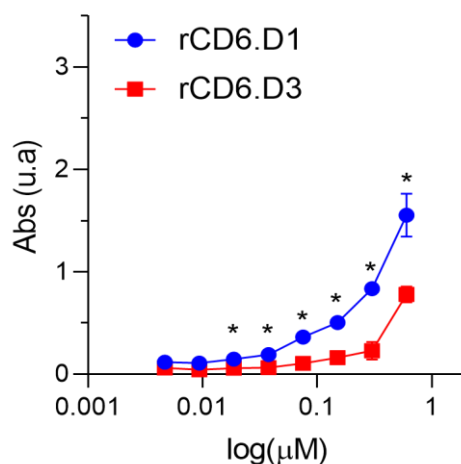


Figura 18: Evaluación de la unión a bacterias gram negativas a rCD6.D1-biotina y rCD6.D3-biotina. revelado con stp-HRP. Los valores se normalizaron con respecto a la absorbancia del control con bloqueante. Los asteriscos indican un valor $P < 0,05$ entre los valores de rCD6.D1 y rCD6.D3 para esa concentración utilizando el test t de Student.

Por otro lado, los resultados obtenidos para las proteínas rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc también mostraron comportamientos dosis-dependiente para su unión a bacterias, con una concentración mínima de unión detectable de 18,8 nM para ambas proteínas. Nuevamente observándose diferencias significativas, en este caso a concentraciones $> 0,15 \mu\text{M}$ (**Figura 19**). Estos resultados sugerirían, nuevamente, que el dominio CD6.D1 de CD6 presentaría mayor afinidad global de unión a *E. coli* que el dominio CD6.D3.

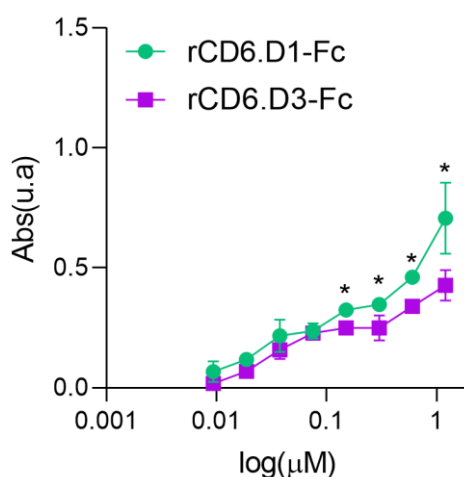


Figura 19. Evaluación de la unión de las quimeras rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc a bacterias gram negativas. El ensayo fue revelado con anti-Fc conjugado a HRP. Los valores se normalizaron con respecto a la absorbancia del control con bloqueante. Los asteriscos indican un valor $P < 0,05$ entre ambas proteínas para esa concentración utilizando el test t de Student.

En suma, los resultados aquí obtenidos confirmaron que los dominios individuales D1 y D3 de CD6 son capaces de reconocer bacterias *E. coli* de forma análoga a rshCD6. Además, las diferencias significativas en el perfil de unión de rCD6.D1 y rCD6.D3 sugeriría que el dominio CD6.D1 tendría una mayor afinidad de reconocimiento global por *E. coli*. La interpretación de estos resultados podría verse afectada por diferencias en la biotinilación entre las proteínas, un posible artefacto que puede evidenciarse mediante ELISA o MALDI-TOF. Sin embargo, la similitud en el comportamiento observado para rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc, ambas con la misma porción Fc de IgG1 humana, reforzó la hipótesis sobre la mayor afinidad de interacción con componentes bacterianos por parte del dominio D1 de CD6 respecto del dominio CD6.D3.

3.2 Reconocimiento de LPS por parte de las proteínas recombinantes.

Una vez confirmada la unión dosis-dependiente a *E. coli* por parte de las proteínas recombinantes obtenidas, se realizó un ensayo análogo utilizando LPS como agente sensibilizante de las placas de microtitulación, y relevando las interacciones de igual forma a la detallada previamente. En la **Figura 20** se muestran los resultados obtenidos inicialmente de la validación del ensayo utilizando rshCD6 (biotinilada), donde se observó una interacción dosis-dependiente concordante con reportes previos sobre la interacción del ectodominio de CD6 con LPS.²⁴

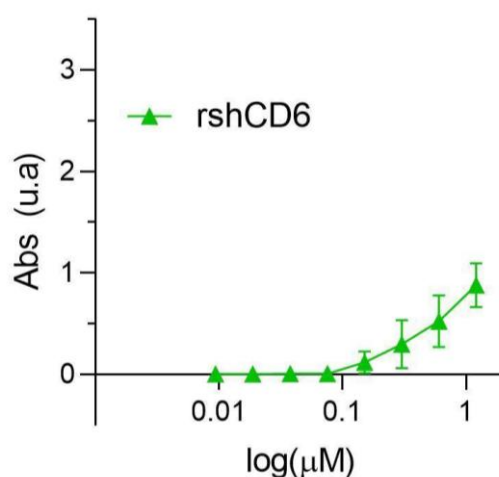


Figura 20. Evaluación de la unión de LPS y la proteína rshCD6-biotina. El ensayo fue revelado con stp-HRP. Los valores se normalizaron con respecto a la absorbancia del control con bloqueante.

Luego, se evaluó la interacción de rCD6.D1 y rCD6.D3 con LPS (**Figura 21**), observándose que ambas proteínas recombinantes mostraron capacidad de unir LPS de manera dosis-dependiente, con una concentración mínima de unión detectable de 18,8 nM para rCD6.D1 y 75,0 nM para rCD6.D3. De manera análoga a lo observado previamente para *E. coli* (**Figura 18**), se observó significancia estadística en el perfil de unión a LPS entre ambas proteínas a concentraciones >37,5 nM, nuevamente con rCD6.D1 mostrando mayores valores de interacción que rCD6.D3 (**Figura 21**).

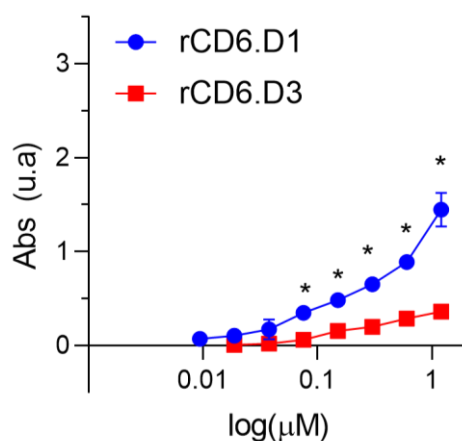


Figura 21. Evaluación de la interacción de las proteínas rCD6.D1 y rCD6.D3 con LPS. El ensayo fue revelado con stp-HRP. Los valores se normalizaron con respecto a la absorbancia del control con bloqueante. Los asteriscos indican un valor $P < 0,05$ entre ambas proteínas para esa concentración utilizando el test t de Student.

En paralelo, se evaluó la unión de rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc a LPS (**Figura 22**), observándose en este caso que solamente rCD6.D1-Fc mostró una clara capacidad de interacción dosis dependiente con LPS, con una concentración mínima de unión detectable de $0,15 \mu\text{M}$ para rCD6.D1-Fc, mientras que rCD6.D3-Fc mostró unión a su máxima concentración analizada correspondiente a $1,2 \mu\text{M}$. Se observó significancia estadística en el perfil de unión a LPS al comparar ambas proteínas a concentraciones $> 0,15 \mu\text{M}$, nuevamente con rCD6.D1-Fc mostrando mayores valores de interacción.

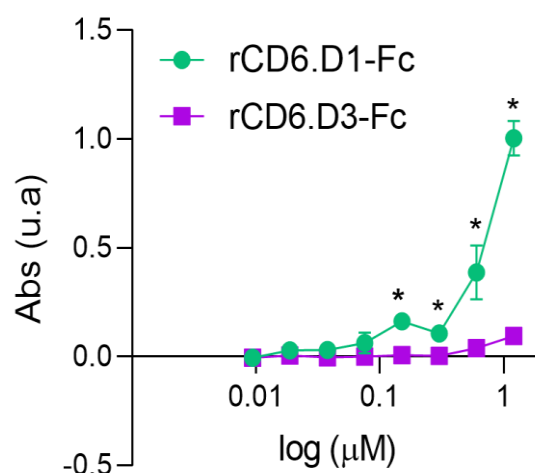


Figura 22. Evaluación de la unión de las quimeras rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc a LPS. El ensayo fue revelado con anti-human IgG. Los valores se normalizaron con respecto a la absorbancia del control con bloqueante. Los asteriscos indican un valor $P < 0,05$ entre ambas proteínas para esa concentración utilizando el test t de Student.

En suma, los resultados aquí obtenidos sugieren que la interacción de los dominios D1 y D3 de CD6 con bacterias se debe, al menos parcialmente, a su reconocimiento de LPS; ampliando así su capacidad de interacción a otras especies y cepas bacterianas más allá de *E. coli* ER2738. Asimismo, las diferencias significativas observadas en los patrones de interacción de rCD6.D1 y rCD6.D3, reforzaron la hipótesis sobre el papel principal y secundario que jugarían ambos dominios, respectivamente, en la función PRR de CD6 frente a PAMPs bacterianos. Por último, cabe destacar que la fusión del Fc a rCD6.D1 no aumentó su capacidad de interacción con LPS, e incluso pareció afectarla negativamente para rCD6.D3. Estos resultados merecerían mayor análisis a futuro dado que ambas formas fusionadas a Fc están dimerizadas, y, por lo tanto, se esperaría *a priori* que su avidéz de interacción se viera reforzada en vez de disminuida.

3.3 Capacidad aglutinante de las proteínas recombinantes sobre bacterias.

Los ensayos previos de interacción de las proteínas recombinantes obtenidas con componentes bacterianos se realizaron en fase sólida (ELISA), por lo que dichos estudios se complementaron con ensayos de aglutinación bacteriana, utilizando una suspensión de *E. coli* ER2738 viables, con el fin de obtener información relevante a la hora de proponer su posible uso inmunoterapéutico de tipo señuelo. En este caso, nuevamente se utilizó rshCD6 como proteína de referencia, definiéndose con la misma un *score* cualitativo de aglutinación (+++, ++, +, +/-, -) que se aplicó luego de forma comparativa sobre el rango de diluciones ensayado para cada proteína. En la **Figura 23** se muestran los resultados de aglutinación obtenidos para rshCD6 y el *score* de aglutinación definido con la misma.

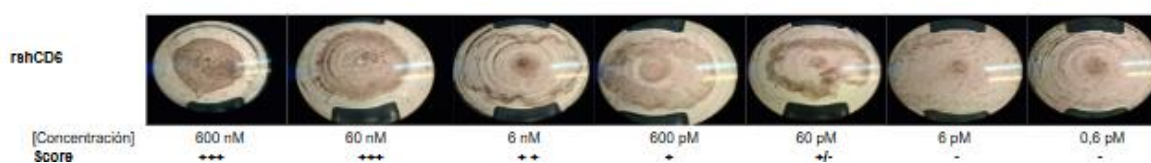


Figura 23. Ensayos de aglutinación de bacterias gram negativas para la proteína rshCD6. Se observan diluciones al décimo de derecha a izquierda, cada imagen presenta la concentración de la proteína ensayada y se define un SCORE (+++, ++, +, +/-, -) según la formación de una maya y presencia ausencia de botón.

Luego, se realizaron los ensayos de aglutinación con las proteínas recombinantes obtenidas, en todos los casos partiendo de la mayor concentración posible para cada una. Como se observa en la **Figura 24**, rCD6.D1 y rCD6.D3 mostraron muy baja actividad aglutinante a su máxima concentración; la cual desapareció rápidamente en la primera dilución ensayada. Por su parte, rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc mostraron mejores actividades aglutinantes respecto a las formas monoméricas de sus dominios CD6, aunque igualmente muy inferiores a la observada para rshCD6.

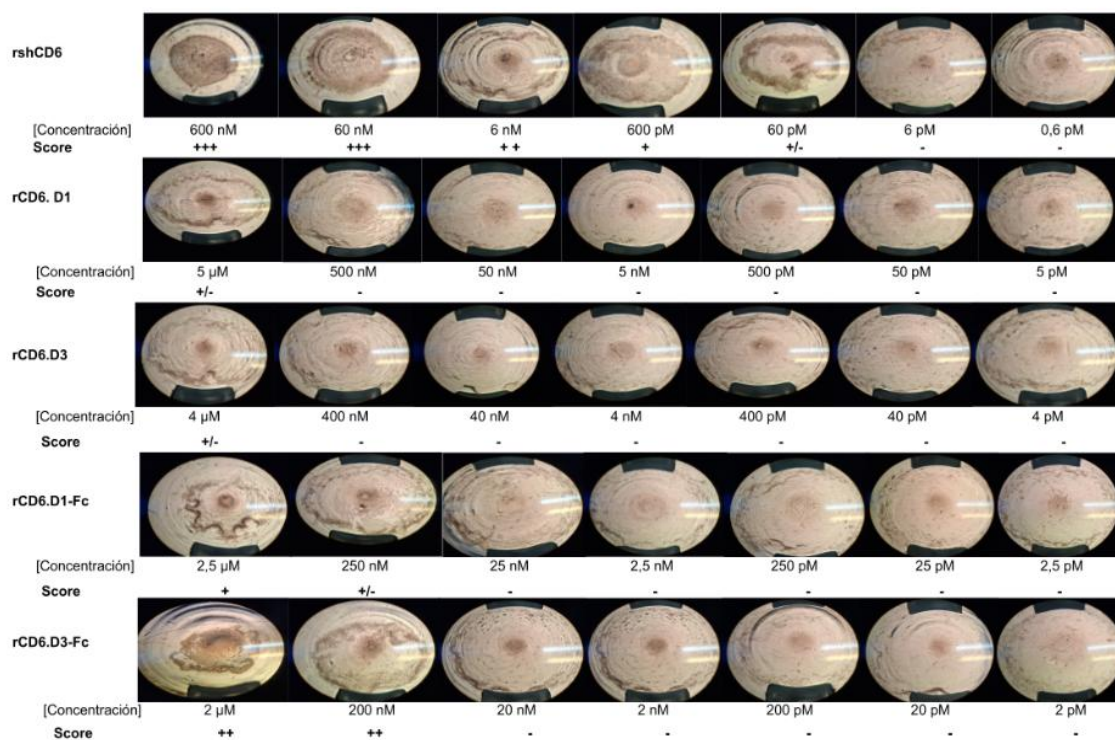


Figura 24. Ensayo de aglutinación para las proteínas recombinantes, Las proteínas recombinantes (cada una definida a la izquierda) generadas en el laboratorio, se analizaron en diluciones seriadas al décimo, se señala la concentración y el SCORE correspondiente a cada una debajo. Se utilizó como referencia rshCD6.

Estos resultados sugerirían que la dimerización genera un efecto positivo sobre la actividad aglutinante de los dominios SRCR de CD6 en forma monomérica. Así, la dimerización aumentaría la avidéz de la proteína por sus ligandos bacterianos al aumentar el número de posibles sitios de interacción sobre la superficie de las bacterias. Por su parte, la alta actividad aglutinante observada para rshCD6 sugeriría la existencia de sitios de unión complementarios, ausentes en los dominios SRCR CD6.D1 y CD6.D3, y/o un efecto aditivo/sinérgico en la unión a bacterias al coexistir todos los dominios SRCR en una única conformación molecular en tándem. Para valorar preliminarmente dicha hipótesis, se ensayó adicionalmente la actividad aglutinante de péptidos sintéticos derivados de cada uno de los dominios SRCR de CD6.

En ese sentido, se trabajó con péptidos sintéticos 11-mer obtenidos comercialmente en alta pureza, derivados de los dominios D1 (CD6.pD1), D2 (CD6.pD2) y D3 (CD6.pD3) de CD6, originalmente reportados por retener, aunque con distinto grado, la capacidad de interacción con componentes bacterianos.⁶⁸ Adicionalmente, se evaluó un péptido 35-mer (CD6.pT) diseñado por el grupo de trabajo para potenciar la interacción de dichos péptidos al estar todos presentes en una misma molécula y con una conformación en tándem lineal, de manera análoga a lo que ocurre con los dominios SRCR en el ectodominio de CD6. De esta forma, y en dirección N-terminal a C-terminal, CD6.pT

está conformado por CD6.pD1 seguido por CD6.pD2, y, finalmente CD6.pD3, con un residuo de prolina en la unión CD6.pD1-CD6.pD2 y otro en la unión CD6.pD2-CD6.pD3. Originalmente, se optó por el uso de prolina como aminoácido “espaciador” dadas sus propiedades geométricas que impiden la alteración de la estructura tridimensional adquirida por cada una de las secuencias 11-mer presentes en CD6.pT.^{93,94} Los resultados de aglutinación bacteriana obtenidos con los péptidos sintéticos se muestran en la **Figura 25**, observándose que todos ellos mostraron una capacidad de unión a bacterias muy superior a la observada con los dominios CD6.D1 y CD6.D3 recombinantes (tanto monoméricos como dimerizados vía Fc) (**Figura 24**); y en particular, se destacó CD6.pT por presentar una actividad aglutinante similar a la observada para rshCD6.

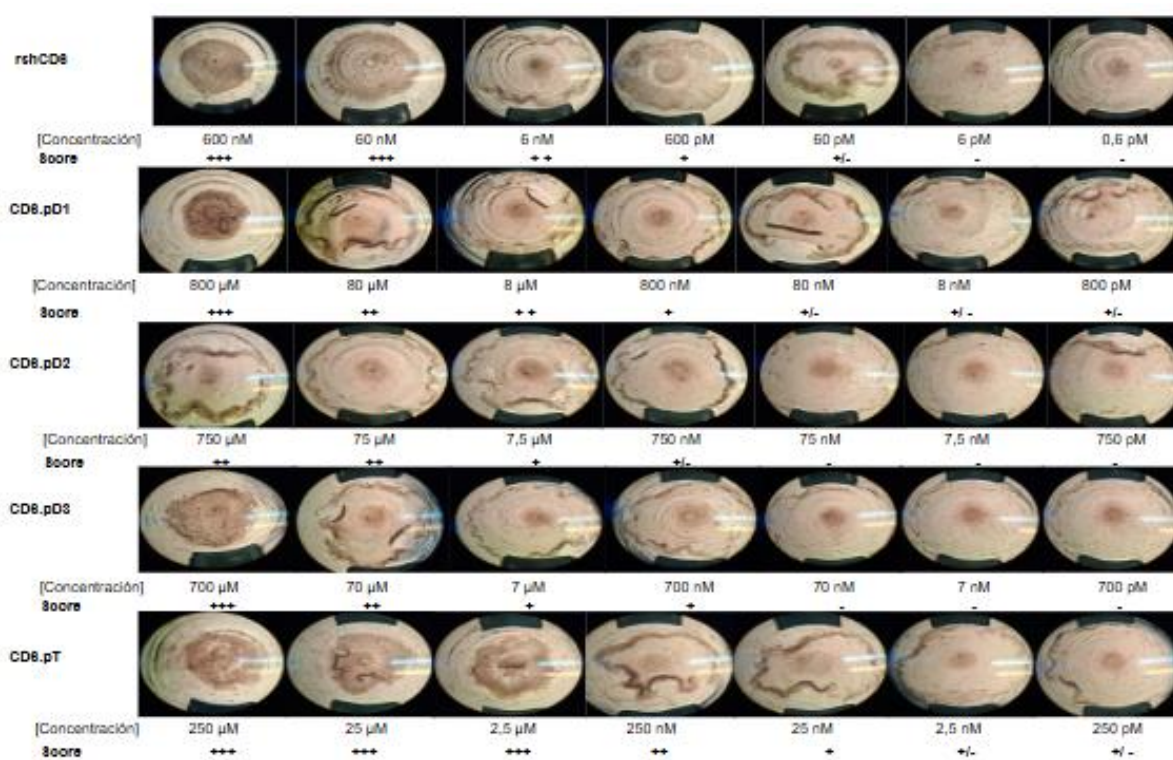


Figura 25. Ensayo de aglutinación para los péptidos sintéticos. Los péptidos (diferenciados a la izquierda), se analizaron en diluciones seriadas al décimo y con la concentración y el SCORE correspondiente a cada una debajo. Se utilizó como referencia rshCD6.

Para facilitar la lectura global de los resultados de aglutinación obtenidos, en la **Tabla 13** se resumen todas las proteínas y los péptidos ensayados. En particular, se destacan los valores de concentración mínima, evaluada en cada caso, a la cual se observó aglutinación; y en base a estos valores, se generó el siguiente orden de actividad aglutinante:

$rshCD6 \approx CD6.pT > CD6.pD1 > rCD6.D1-Fc \approx rCD6.D3-Fc > CD6.pD2 \approx CD6.pD3 > rCD6.D1 \approx rCD6.D3$.

Tabla 13. Aglutinación bacteriana generada por las proteínas recombinantes y los péptidos. Recopilación de los resultados obtenidos en los ensayos de aglutinación, En cada entrada de la tabla se informa la proteína ensayada, la concentración y el SCORE correspondiente a esa concentración. Se informa en **negrita** la concentración más baja a la que se observó aglutinación.

rshCD6	Concentración	600 nM	60 nM	6 nM	600 pM	60 pM	6 pM	0,6 pM
	SCORE	+++	+++	++	+	+/-	-	-
rCD6.D1	Concentración	5 µM	500 nM	50 nM	5 nM	500 pM	50 pM	5 pM
	SCORE	+/-	-	-	-	-	-	-
rCD6.D3	Concentración	6 µM	500 nM	50 nM	5 nM	500 pM	50 pM	5 pM
	SCORE	+/-	-	-	-	-	-	-
rCD6.D1-Fc	Concentración	2,5 µM	250 nM	25 nM	2,5 nM	250 pM	25 pM	2,5 pM
	SCORE	+	+/-	-	-	-	-	-
rCD6.D3-Fc	Concentración	2 µM	200 nM	20 nM	2 nM	200 pM	20 pM	2 pM
	SCORE	++	++	-	-	-	-	-
CD6.pD1	Concentración	800 µM	80 µM	8 µM	800 nM	80 nM	8 nM	800 pM
	SCORE	+++	++	++	+	+/-	+/-	+/-
CD6.pD2	Concentración	750 µM	75 µM	7,5 µM	750 nM	75 nM	7,5 nM	750 pM

	SCORE	++	++	+	+/-	-	-	-
CD6.pD3	Concentración	700 μ M	70 μ M	7 μ M	700 nM	70 nM	7 nM	700 pM
	SCORE	+++	++	+	+	-	-	-
CD6.pT	Concentración	250 μ M	25 μ M	2,5 μ M	250 nM	25 nM	2,5 nM	250 pM
	SCORE	+++	+++	+++	++	+	+/-	+/-

Por último, si bien las causas que expliquen la mayor actividad aglutinante observada para los péptidos sintéticos respecto de las proteínas recombinantes obtenidas en el presente trabajo pueden ser múltiples (por ejemplo: posible desenmascaramiento de secuencias de interacción, menor tamaño favorecedor de interacciones, etc.), el hecho que entre los péptidos sintéticos destaque CD6.pT en particular reforzaría la hipótesis propuesta para explicar la gran actividad aglutinante de rshCD6 respecto de sus dominios recombinantes ensayados. Este hecho abriría a futuro una interesante posibilidad para generar nuevas proteínas recombinantes conteniendo distintos dominios y/o conformando homo-multímeros lineales.

3.4. Capacidad de bloqueo funcional de LPS por parte de las proteínas recombinantes.

Una vez demostrada la capacidad de las distintas proteínas recombinantes obtenidas de reconocer efectivamente con LPS bacteriano, se evaluó si dicha interacción es capaz de traducirse en un efecto de neutralización funcional. En este sentido, existen reportes sobre la capacidad de rshCD6 para neutralizar/bloquear LPS y, así, atenuar la respuesta inmune en modelos murinos de sepsis bacteriana y polimicrobiana.^{12,40} Por ello, en colaboración con el Dr. Claudio Rodríguez-Camejo, se diseñó un ensayo *in vitro* utilizando la línea celular de macrófagos murinos RAW264,7 estimulada con LPS y detectando su activación mediante la cuantificación de nitritos (especie estable derivada del óxido nítrico) en sobrenadante a través de la reacción de Griess. Dichos ensayos se realizaron en presencia/ausencia de las proteínas recombinantes en estudio, así como utilizando los péptidos sintéticos previamente descritos. En la **Figura 26** se muestran los resultados obtenidos para las proteínas recombinantes obtenidas y para rshCD6 (control positivo de neutralización), en todos los casos ensayadas a 5 μ M y 50 μ M; observándose

prácticamente ausencia de efecto sobre la producción de nitritos inducida por LPS, inclusive en presencia de rshCD6.

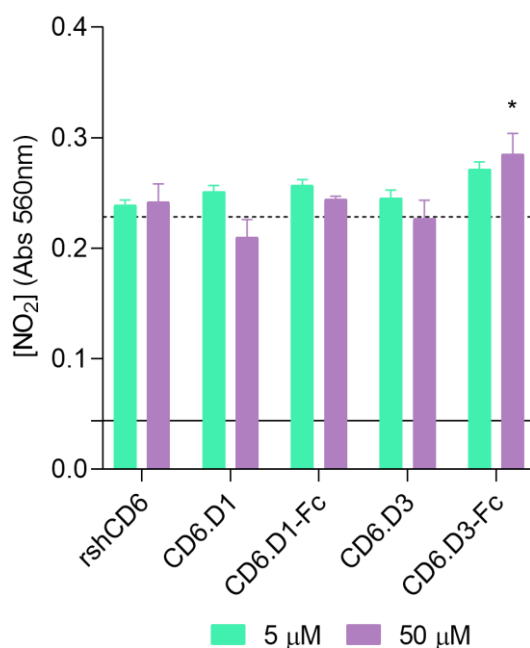


Figura 26. Ensayos de inhibición de activación de macrófagos RAW264.7, con las proteínas recombinantes generadas en el laboratorio y rshCD6, ensayados a dos concentraciones. La línea punteada indica la media de la concentración de nitritos liberada por los macrófagos al ser expuestos a LPS a la concentración ensayada, mientras que la línea sólida la media de concentración de nitritos liberadas por los macrófagos, en condiciones basales. Los asteriscos indican valores de $P < 0,05$ respecto al valor de nitritos liberados por la condición de LPS, utilizando un test One Way ANOVA.

Los ensayos realizados deben considerarse muy preliminares, ya que, por motivos de disponibilidad de materiales y de tiempo, no pudieron repetirse de manera adecuada. De hecho, la ausencia de efecto por parte de rshCD6 sugiere fuertemente que quizás el marcador de activación evaluado (nitritos como medida de óxido nítrico) y/o el tipo celular ensayado (macrófagos RAW264,7), podrían no haber sido adecuados. En este sentido, los reportes sobre la capacidad neutralizante de LPS por parte de rshCD6 mencionados previamente, se basan en la detección de citoquinas proinflamatorias utilizando cultivos primarios de esplenocitos estimulados con LPS;^{24,68} y nunca se evaluó su efecto sobre la producción de óxido nítrico utilizando líneas celulares de macrófagos. Sin embargo, el hecho que las proteínas recombinantes obtenidas no activaran *per se* las células RAW264,7 (**Figura 27**), resulta una evidencia prometedora para volver a optimizar el ensayo en diversas condiciones.

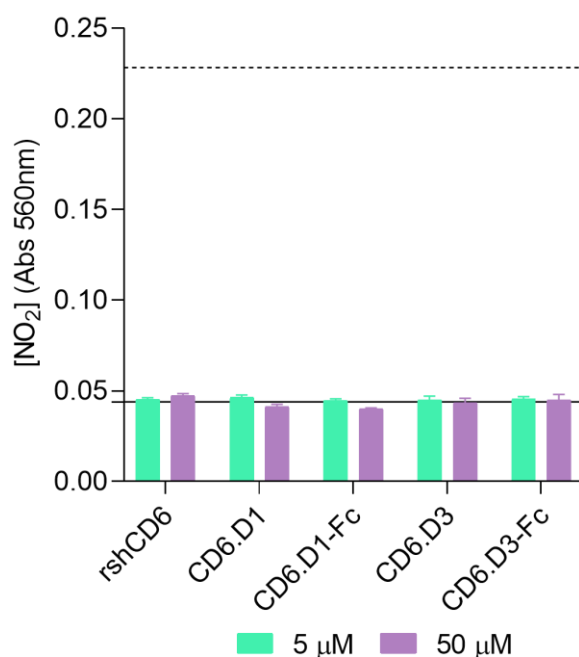


Figura 27. Ensayos de inhibición de activación de macrófagos RAW264.7, evaluación de la activación *per se* con las proteínas recombinantes, ensayado a dos concentraciones. La línea punteada indica la media de la concentración de nitritos liberada por los macrófagos al ser expuestos a LPS a la concentración ensayada, mientras que la línea sólida la media de concentración de nitritos liberadas por los macrófagos, en condiciones basales.

Por su parte, la evaluación de los péptidos sintéticos derivados de CD6 mostró resultados más auspiciosos en términos de bloqueo funcional de LPS. Como se observa en la **Figura 28**, salvo CD6.pD2, los péptidos sintéticos mostraron reducir la producción de nitritos inducida por LPS en macrófagos RAW264,7; destacándose nuevamente CD6.pT por hacerlo a ambas concentraciones ensayadas y de manera significativamente dosis-dependiente. Por su parte, y al igual que los resultados obtenidos para las proteínas recombinantes, ninguno de los péptidos sintéticos induje *per se* la activación de los macrófagos (**Figura 29**).

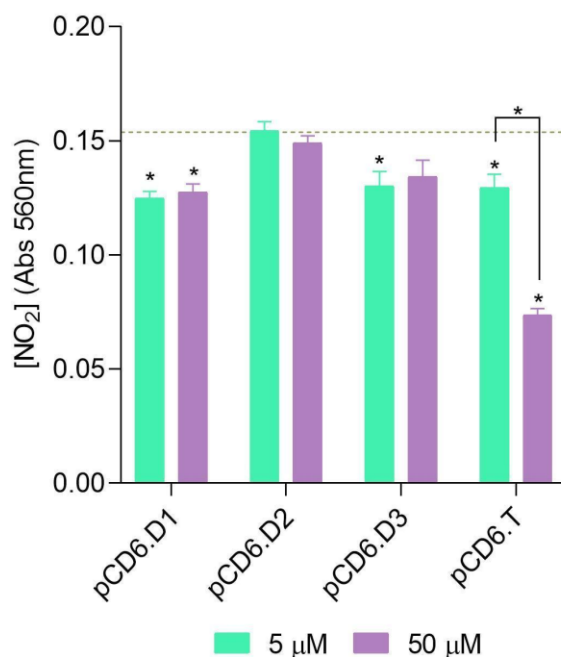


Figura 28. Ensayos de inhibición de activación de macrófagos RAW264.7, con los péptidos sintéticos, ensayados a dos concentraciones. La línea punteada indica la media de la concentración de nitritos liberada por los macrófagos al ser expuestos a LPS a la concentración ensayada, mientras que la media de concentración de nitritos liberadas por los macrófagos corresponde a señal 0,0, en condiciones basales. Los asteriscos indican valores de $P < 0,05$ respecto al valor de nitritos liberados por la condición de LPS, o entre las dos condiciones señaladas por la flecha utilizando un test One Way ANOVA

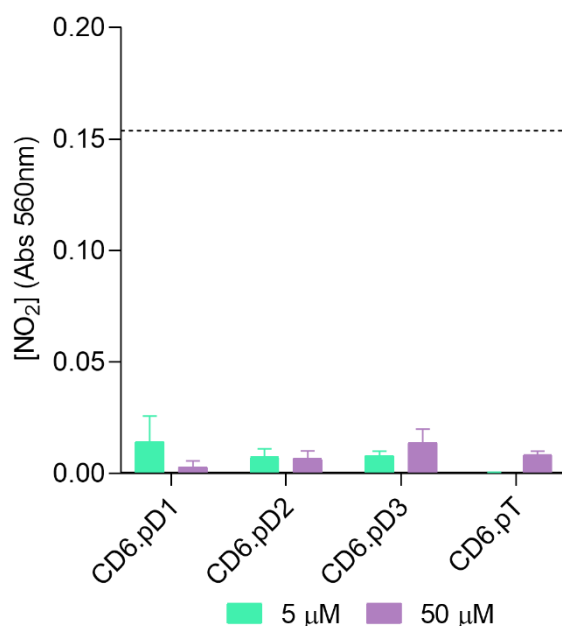


Figura 29. Ensayos de inhibición de activación de macrófagos RAW264.7, evaluación de la activación *per se* con los péptidos sintéticos. La línea punteada indica la media de la concentración de nitritos liberada por los macrófagos al ser expuestos a LPS a la concentración ensayada, la media de concentración de nitritos liberadas por los macrófagos corresponde a la señal 0,0, en condiciones basales.

Los resultados de neutralización funcional de LPS obtenidos con los péptidos sintéticos validarían en principio el ensayo *in vitro* diseñado, aunque la extrapolación técnica sobre la obtención de dichos resultados no necesariamente debe aplicar al trabajo con proteínas recombinantes, en particular con rshCD6, ya que otros fenómenos podrían estar involucrados (por ejemplo: solubilidad, interacción con componentes del suero fetal bovino, etc.). Por su parte, los resultados obtenidos con CD6.pT destacan la potencialidad de dicho péptido a futuro, y vuelven a sugerir la importancia de la aidez de la interacción con los componentes bacterianos, ya que reflejarían, al menos parcialmente, los resultados obtenidos en los ensayos de actividad aglutinante de bacterias (**Tabla 13**).

4. Objetivo específico #4:

Evaluar in vivo la antigenicidad de las proteínas recombinantes obtenidas determinando la respuesta humoral específica inducida en animales inmunizados.

El receptor linfocitario CD6 se ha convertido en un blanco de gran interés para el desarrollo de nuevas inmunoterapias, incluyendo la generación de anticuerpos específicos con actividad bloqueante y/o antagonista. Asimismo, los distintos dominios SRCR presentes en el ectodominio de CD6 tienen ligandos endógenos particulares, por lo que contar con anticuerpos dirigidos contra dominios de interés ampliaría la posible utilidad inmunoterapéutica de los mismos. Por ello, como estrategia general de trabajo para cumplir con el **objetivo específico #4** se evaluó la antigenicidad de las proteínas recombinantes obtenidas mediante la caracterización de la respuesta de anticuerpos inducida en animales inmunizados. Así, en primer lugar, se inmunizaron ratones con las distintas proteínas recombinantes para evaluar su antigenicidad intrínseca y la generación de anticuerpos con reactividad cruzada entre los dominios. En segundo lugar, se inmunizó una llama con las proteínas recombinantes fusionadas a Fc para evaluar la generación de anticuerpos de cadena pesada (no convencionales) potencialmente útiles para el desarrollo futuro de Nb específicos para los distintos dominios SRCR de CD6.

4.1. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes en ratones inmunizados.

Para caracterizar la respuesta de anticuerpos en ratones inmunizados con las distintas proteínas recombinantes obtenidas, se evaluó en primer lugar la reactividad de todos los sueros contra las proteínas rshCD5 y rshCD6, de forma tal que se evidenciara la especificidad de reconocimiento entre dos proteínas con alta homología, a la vez que se observara si los anticuerpos inducidos retienen la capacidad de reconocer los dominios SRCR presentes en el ectodominio completo de CD6. Como se observa en la **Figura 30**, ninguno de los sueros mostró reactividad significativa contra rshCD5 (**Figura 30A**), mientras que sí lo hicieron contra rshCD6 (**Figura 30B**). La ausencia de reactividad frente a la proteína de alta homología rshCD5 indica que los anticuerpos generados presentan alta especificidad. Por otro lado, la reactividad contra la proteína rshCD6, proporciona evidencia sobre el correcto plegamiento de los dominios de CD6 presentes en las proteínas recombinantes obtenidas dado que los anticuerpos generados fueron capaces de reconocer el ectodominio completo de CD6.

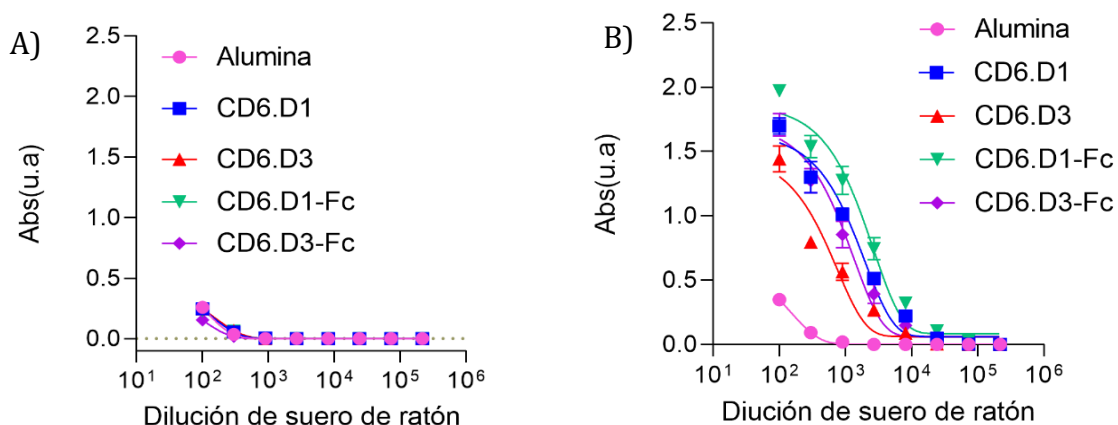


Figura 30. Titulación de anticuerpos en sueros de ratones al ser inmunizados con las distintas proteínas recombinantes. Todas las formulaciones, incluyendo el control negativo fueron realizadas con alúmina como vehículo y administradas en tres dosis separadas por 15 días. Se realizó un ajuste no lineal de decaimiento de una fase **(A)** Titulación de anticuerpos contra la proteína recombinante rshCD5 **(B)** Titulación de anticuerpos contra la proteína recombinante rshCD6.

Posteriormente, se analizó la reactividad de todos los sueros frente a las proteínas sin Fc rCD6.D1 y rCD6.D3, evitando así la detección de anticuerpos potencialmente inducidos con especificidad por el dominio Fc de IgG1 humana. En todos los casos, los títulos de anticuerpos específicos se definieron de forma arbitraria como el valor de dilución de suero que alcanzó una absorbancia de 0,5 u.a.

En la **Figura 31** se muestran los títulos específicos para rCD6.D1, observándose valores significativamente mayores al grupo control (ratones inmunizados con el adyuvante alúmina) solamente en el suero de los animales inmunizados con rCD6.D1 o con rCD6.D1-Fc. Cabe destacar que si bien los sueros obtenidos de ratones inmunizados con rCD6.D3 o con rCD6.D3-Fc mostraron valores apreciables de anticuerpos con reactividad cruzada frente a rCD6.D1, los mismos no fueron significativamente mayores al grupo control.

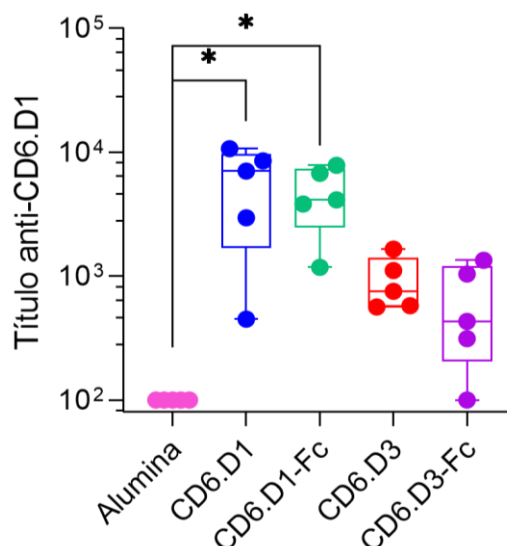


Figura 31. Título de anticuerpos totales en los distintos sueros obtenidos de los ratones inmunizados contra la proteína rCD6.D1 a una absorbancia de 0,5 u.a. Todas las formulaciones, incluyendo el control negativo fueron realizadas con alúmina como vehículo y administradas en tres dosis separadas por 15 días. Los títulos fueron estimados a partir de las curvas de titulación con un ajuste no lineal de decaimiento de una fase. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre los valores que señala la flecha ($P < 0,05\%$) calculados mediante el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis.

Estos resultados indican que las proteínas recombinantes derivadas de CD6.D1 fueron antigénicas en ratones, y, por lo tanto, indujeron altos niveles de anticuerpos específicos, independientemente de la presencia/ausencia de Fc de IgG1 humana fusionado. Sin embargo, y pese a no ser estadísticamente significativos, la inducción de anticuerpos reactivos contra rCD6.D1 en ratones inmunizados con las distintas proteínas recombinantes de CD6.D3 sugiere la presencia de un nivel no despreciable de posible reactividad cruzada en los anticuerpos generados. Resta a futuro valorar si dicha reactividad cruzada se debe a la presencia de N-glicosilaciones compartidas entre todas las proteínas recombinantes obtenidas.

Por su parte, en la **Figura 32** se muestran los resultados obtenidos para la detección de anticuerpos específicos contra rCD6.D3, donde solamente se observaron diferencias significativas respecto al grupo control en los sueros de ratones inmunizados con rCD6.D3; con valores importantes, aunque no significativos, en los ratones inmunizados con rCD6.D3-Fc. Sin embargo, y a diferencia de lo observado al titular la

respuesta de anticuerpos específicos para rCD6.D1 (**Figura 31**), no se observaron valores apreciables de anticuerpos específicos para rCD6.D3 en el suero de los ratones inmunizados con rCD6.D1 o con rCD6.D1-Fc (**Figura 32**). Así, los resultados obtenidos indican que las proteínas rCD6.D3 y rCD6.D3-Fc son antigénicas en ratones, y que, a diferencia de las proteínas conteniendo CD6.D1, no inducen niveles apreciables de anticuerpos con reactividad cruzada. Esta información podría ser de utilidad a la hora de intentar seleccionar anticuerpos sin reactividad cruzada. Asimismo, podría sugerir que la reactividad cruzada inducida tras inmunización con las proteínas conteniendo CD6.D1 podría estar asociada, al menos parcialmente, con el mayor número de N-glicosilaciones presentes en las mismas respecto de sus contrapartes conteniendo CD6.D3 (**Tabla 12**).

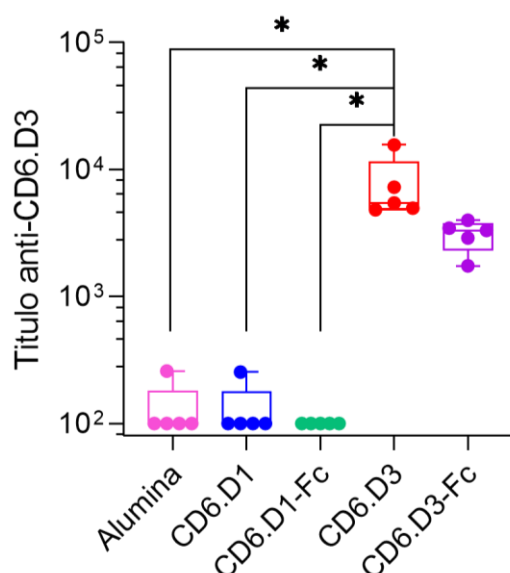


Figura 32. Título de anticuerpos totales en los distintos sueros obtenidos de los ratones inmunizados contra la proteína rCD6.D3 a una absorbancia de 0,5 u.a. Todas las formulaciones, incluyendo el control negativo fueron realizadas con alúmina como vehículo y administradas en tres dosis separadas por 15 días. Los títulos fueron estimados a partir de las curvas de titulación con un ajuste no lineal de decaimiento de una fase. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre los valores que señala la flecha ($P < 0,05\%$) calculados mediante el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis.

4.2. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes utilizando una llama inmunizada

A nivel inmunotecnológico, una de las motivaciones para conjugar antígenos de interés a cadenas pesadas de anticuerpos humanos es aumentar su inmunogenicidad y prolongar su vida media en circulación mediante su interacción con el receptor FcRn, lo cual se suele traducir en respuestas humores de mayor magnitud y duración.⁶⁷ Por ello, para la inmunización de una llama se optó por utilizar las proteínas recombinantes generadas con Fc de IgG1 humana fusionado, y por motivos de disponibilidad de animales, ambas proteínas se administraron conjuntamente en un único individuo.

A diferencia del análisis de anticuerpos en ratones inmunizados que se realizó a punto final, en el caso de la llama inmunizada se obtuvieron muestras de suero en distintos

puntos temporales a medida que progresaba el número de inmunizaciones. Así, a partir de los sueros de la llama inmunizada con rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc se evaluó la respuesta de anticuerpos totales (de cadenas pesadas y livianas) y específicamente de anticuerpos no convencionales (de cadena pesada); estos últimos encargados de proveer del repertorio de Nb en futuras bibliotecas construidas. Se evaluó la reactividad contra rCD6.D1 (**Figura 33**) y rCD6.D3 (**Figura 34**), utilizando las proteínas monoméricas como antígeno de captura para garantizar que la señal correspondiera exclusivamente a los dominios CD6 y no a la región Fc de IgG1 humana. Asimismo, se empleó una proteína irrelevante con los mismos tags de purificación para discriminar la respuesta de anticuerpos dirigidas contra esta región inespecífica. En ambos casos, se observó un aumento en el título de anticuerpos totales contra las proteínas al aumentar el número de boosters (**Figura 33A y 34A**). De manera similar, los anticuerpos no convencionales también aumentaron su título con el número de boosters (**Figura 33B y Figura 34B**).

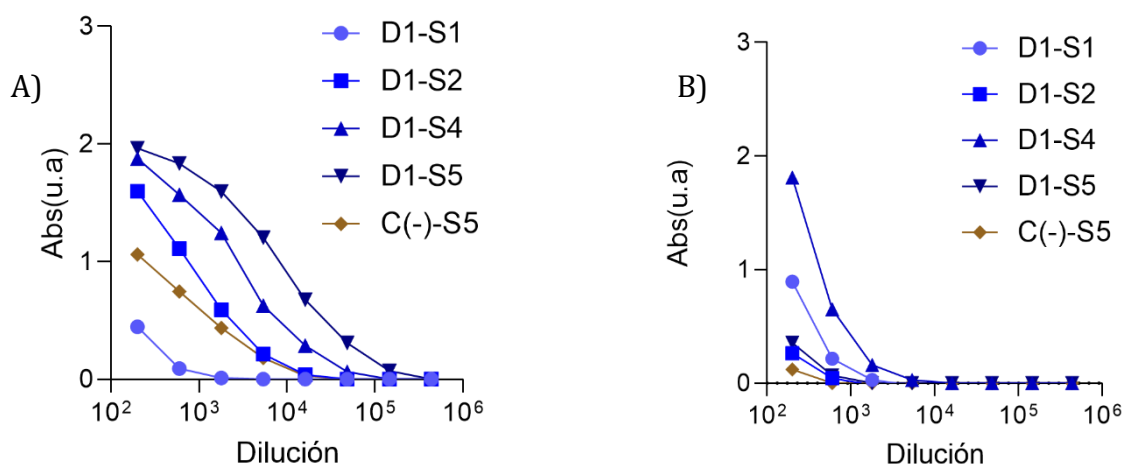


Figura 33. Curvas de titulación de anticuerpos contra la proteína rCD6.D1 a partir de distintos sueros de una llama inmunizada con rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc. Se evaluaron los sueros obtenidos a lo largo del proceso de inmunización (S1-día 0, S2-día 25, S4-día 50, S5-día 75) y con los cuales se realizaron dos tipos de ensayos de ELISA de titulación. **(A)** Titulación de anticuerpos totales mediante revelado del ELISA utilizando un suero de conejo anti-IgG de llama, seguido de un anti-conejo conjugado a HRP. **(B)** Titulación de anticuerpos no convencionales mediante revelado del ELISA utilizando anti-VHH conjugado a HRP. En ambos ELISA se realizó un control negativo que evaluó el suero 5 contra una proteína irrelevante evaluada en el suero número 5 (C(-)-S5).

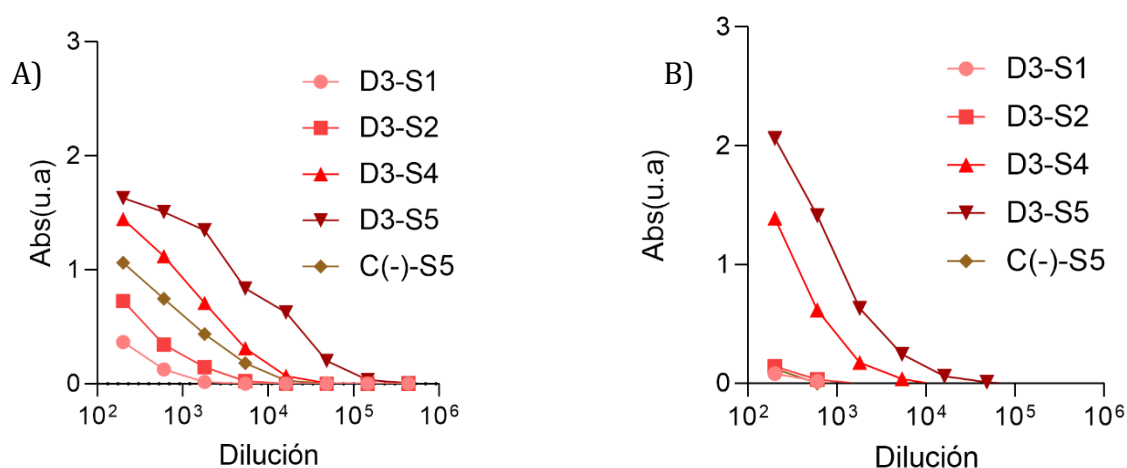


Figura 34. Curvas de titulación de anticuerpos contra la proteína rCD6.D3 a partir de distintos sueros de una llama inmunizada con rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc. Se evaluaron sueros obtenidos a lo largo del proceso de inmunización (S1-día 0, S2-día 25, S4-día 50, S5-día 75) y con los cuales se realizaron dos tipos de ensayos de ELISA de titulación. (A) Titulación de anticuerpos totales mediante revelado del ELISA utilizando un suero de conejo anti-IgG de llama, seguido de un anti-conejo conjugado a HRP. (B) Titulación de anticuerpos no convencionales mediante revelado del ELISA utilizando anti VHH conjugado a HRP. En ambos ELISA se realizó un control negativo que evaluó el suero 5 contra una proteína irrelevante evaluada en el suero número 5 (C(-)-S5).

Posteriormente, en la **Figura 35** se muestran los resultados de la reactividad de los sueros frente a la proteína rshCD6. En este caso, se evaluó únicamente la muestra correspondiente al suero final, debido a limitaciones en la disponibilidad del reactivo rshCD6, observándose que la respuesta humoral total (**Figura 35A**), así como no convencional (**Figura 35B**) evidenció un buen título de anticuerpos a tiempo final.

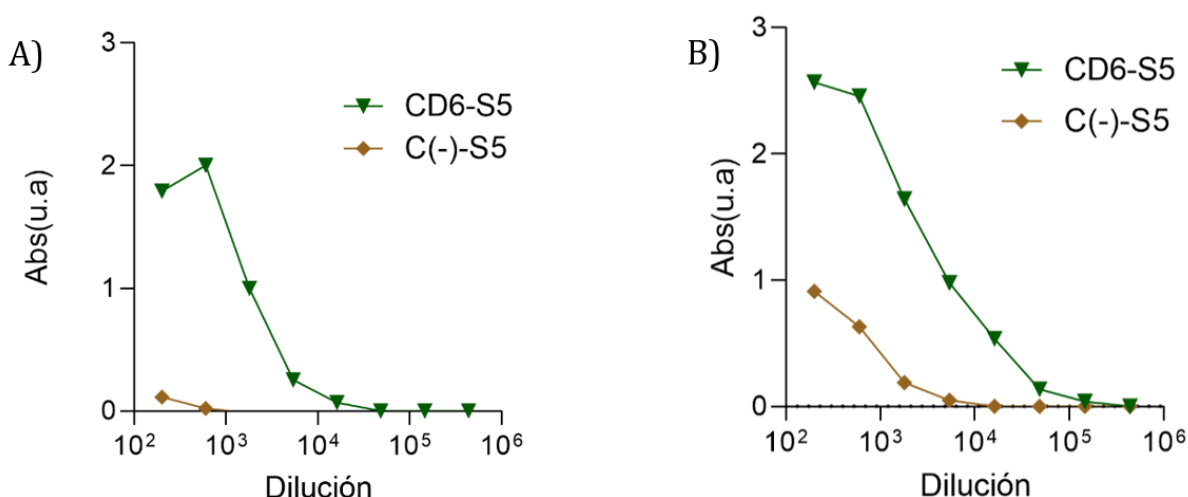


Figura 35. Curvas de titulación de anticuerpos en el suero de llama (S5) inmunizado con rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc evaluados mediante ELISA frente a la proteína recombinante rshCD6 (CDS6-S5). En ambos casos se incluyó una titulación frente a una proteína irrelevante como control negativo (C(-)-S5). (A) Titulación de anticuerpos totales mediante revelado del ELISA utilizando un suero de conejo anti-IgG de llama seguido de un anti-conejo conjugado a HRP. (B) Titulación de anticuerpos no convencionales mediante revelado de ELISA utilizando anti-VHH conjugado a HRP.

En suma, los resultados obtenidos permitieron concluir que tanto rCD6.D1-Fc como rCD6.D3-Fc son altamente antigénicos en llama, siendo capaces de inducir respuestas humorales las cuales incluyen la respuesta de anticuerpos no convencionales. Asimismo, los anticuerpos mostraron especificidad tanto por las rCD6.D1 y rCD6.D3, y son capaces de reconocer dichos dominios incluidos dentro del ectodominio completo de CD6. En su conjunto, estos resultados preliminares son prometedores para construir una biblioteca de Nb útil para seleccionar clones capaces de reconocer los dominios CD6.D1 o CD6.D3 de manera específica; abriendo grandes puertas en el futuro próximo para la exploración nuevas estrategias de inmunoterapia con CD6 como blanco.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se logró la producción exitosa en sistema eucariota de dos variantes recombinantes correspondientes a los dominios SRCR D1 y D3 del receptor linfocitario CD6: en forma monomérica (rCD6.D1 y rCD6.D3) y dimerizadas en versión fusionada al Fc de IgG1 humana (rCD6.D1-Fc y rCD6.D3-Fc). Asimismo, se establecieron protocolos de purificación eficientes y reproducibles, capaces de generar altos rendimientos proteicos adecuados para su implementación en ensayos de ELISA y para futuras estrategias de panning orientadas al aislamiento de Nb. Paralelamente, se desarrolló una vía de purificación libre de endotoxinas, indispensable para estudios funcionales *in vitro* e *in vivo*. Finalmente, el análisis estructural confirmó que las proteínas obtenidas presentan las características deseadas, sugiriéndose fuertemente la presencia de N-glicosilaciones, un predominio de formas nativas monoméricas, así como una gran estabilidad térmica generalizada

A nivel funcional, las proteínas recombinantes obtenidas mantuvieron, al menos parcialmente, la capacidad del ectodominio completo de CD6 de interactuar con bacterias Gram negativas, y de reconocer LPS de las mismas; sugiriéndose que el dominio CD6.D1 sería el principal involucrado en esta función de CD6. Por otro lado, se determinó que las versiones dimerizadas de ambos dominios mejoran su actividad aglutinante de bacterias respecto de las formas monoméricas. En cuanto a la neutralización funcional de LPS, si bien los resultados preliminares obtenidos con las proteínas recombinantes no resultaron prometedores, el uso de péptidos sintéticos derivados de CD6 permitió validar parcialmente el ensayo, a la vez que confirmar la presencia de secuencias aminoacídicas con capacidad neutralizante dentro de las proteínas recombinantes.

Por último, se demostró que las proteínas recombinantes obtenidas fueron antigénicas tanto en ratones como en una llama inmunizada, mostrando la inducción de respuestas de anticuerpos altamente específicas, pero con particularidades en términos de reactividad cruzada; a la vez que utilidad para desarrollar respuestas de anticuerpos no convencionales potencialmente útiles para seleccionar Nb específicos.

Los resultados obtenidos permitieron sentar bases sólidas para, a futuro, explorar con mayor profundidad el potencial uso de las proteínas recombinantes obtenidas para diseñar nuevas estrategias inmunoterapéuticas de tipo señuelo, tanto frente a infecciones bacterianas severas y/o multirresistentes, como para modulación de la respuesta de células T en contextos inmunopatológicos. Asimismo, a partir del material generado tras

la inmunización de una llama con las proteínas recombinantes producidas, se podrá construir una biblioteca de calidad para la selección de Nb dirigidos específicamente contra los dominios SRCR del ectodominio de CD6 actualmente con mayor relevancia inmunoterapéutica (CD6.D1 y CD6.D3). Estos Nb podrán luego ser evaluados como nuevas intervenciones para la modulación de respuestas de células T.

En suma, los resultados obtenidos en la presente tesis de grado contribuirán fuertemente al desarrollo de una nueva línea de trabajo local relacionada con el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas diversas basadas en el receptor linfocitario CD6 humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Sarrias, M. R.; Grønlund, J.; Padilla, O.; Madsen, J.; Holmskov, U.; Lozano, F. The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) Domain: An Ancient and Highly Conserved Protein Module of the Innate Immune System. *Crit. Rev. Immunol.* **2004**, *24* (1), 1–37. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v24.i1.10>.
- (2) PrabhuDas, M. R.; Baldwin, C. L.; Bollyky, P. L.; Bowdish, D. M. E.; Drickamer, K.; Febbraio, M.; Herz, J.; Kobzik, L.; Krieger, M.; Loike, J.; McVicker, B.; Means, T. K.; Moestrup, S. K.; Post, S. R.; Sawamura, T.; Silverstein, S.; Speth, R. C.; Telfer, J. C.; Thiele, G. M.; Wang, X.-Y.; Wright, S. D.; El Khoury, J. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J. Immunol.* **2017**, *198* (10), 3775–3789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700373>.
- (3) Martínez, V. G.; Moestrup, S. K.; Holmskov, U.; Mollenhauer, J.; Lozano, F. The Conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63* (4), 967–1000. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004523>.
- (4) Freeman, M.; Ashkenas, J.; Rees, D. J.; Kingsley, D. M.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Krieger, M. An Ancient, Highly Conserved Family of Cysteine-Rich Protein Domains Revealed by Cloning Type I and Type II Murine Macrophage Scavenger Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87* (22), 8810–8814. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.22.8810>.
- (5) Gough, P. J.; Gordon, S. The Role of Scavenger Receptors in the Innate Immune System. *Microbes Infect.* **2000**, *2* (3), 305–311. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00297-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00297-5).
- (6) Resnick, D.; Chatterton, J. E.; Schwartz, K.; Slayter, H.; Krieger, M. Structures of Class A Macrophage Scavenger Receptors. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (43), 26924–26930. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.43.26924>.
- (7) Bowdish, D. M. E.; Gordon, S. Conserved Domains of the Class A Scavenger Receptors: Evolution and Function. *Immunol. Rev.* **2009**, *227* (1), 19–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00728.x>.
- (8) Aruffo, A.; Bowen, M. A.; Patel, D. D.; Haynes, B. F.; Starling, G. C.; Gebe, J. A.; Bajorath, J. CD6-Ligand Interactions: A Paradigm for SRCR Domain Function? *Immunol. Today* **1997**, *18* (10), 498–504. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(97\)01130-4](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(97)01130-4).
- (9) Chappell, P. E.; Garner, L. I.; Yan, J.; Metcalfe, C.; Hatherley, D.; Johnson, S.; Robinson, C. V.; Lea, S. M.; Brown, M. H. Structures of CD6 and Its Ligand CD166 Give Insight into Their Interaction. *Structure* **2015**, *23* (8), 1426–1436. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.05.019>.
- (10) Sanjurjo, L.; Aran, G.; Roher, N.; Valledor, A. F.; Sarrias, M.-R. AIM/CD5L: A Key Protein in the Control of Immune Homeostasis and Inflammatory Disease. *J. Leukoc. Biol.* **2015**, *98* (2), 173–184. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0215-074R>.

-
- (11) Lecomte, O.; Bock, J. B.; Birren, B. W.; Vollrath, D.; Parnes, J. R. Molecular Linkage of the Mouse CD5 and CD6 Genes. *Immunogenetics* **1996**, *44* (5), 385–390. <https://doi.org/10.1007/BF02602784>.
- (12) Braun, M.; Müller, B.; Ter Meer, D.; Raffegerst, S.; Simm, B.; Wilde, S.; Spranger, S.; Ellwart, J.; Mosetter, B.; Umansky, L.; Lerchl, T.; Schendel, D. J.; Falk, C. S. The CD6 Scavenger Receptor Is Differentially Expressed on a CD56^{dim} Natural Killer Cell Subpopulation and Contributes to Natural Killer-Derived Cytokine and Chemokine Secretion. *J. Innate Immun.* **2011**, *3* (4), 420–434. <https://doi.org/10.1159/000322720>.
- (13) Kamoun, M.; Kadin, M. E.; Martin, P. J.; Nettleton, J.; Hansen, J. A. A Novel Human T Cell Antigen Preferentially Expressed on Mature T Cells and Shared by Both Well and Poorly Differentiated B Cell Leukemias and Lymphomas. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **1981**, *127* (3), 987–991.
- (14) Gimferrer, I.; Farnós, M.; Calvo, M.; Mittelbrunn, M.; Enrich, C.; Sánchez-Madrid, F.; Vives, J.; Lozano, F. The Accessory Molecules CD5 and CD6 Associate on the Membrane of Lymphoid T Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (10), 8564–8571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209591200>.
- (15) Beyers, A. D.; Spruyt, L. L.; Williams, A. F. Multimolecular Associations of the T-Cell Antigen Receptor. *Trends Cell Biol.* **1992**, *2* (9), 253–255. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(92\)90190-X](https://doi.org/10.1016/0962-8924(92)90190-X).
- (16) Gimferrer, I.; Calvo, M.; Mittelbrunn, M.; Farnós, M.; Sarrias, M. R.; Enrich, C.; Vives, J.; Sánchez-Madrid, F.; Lozano, F. Relevance of CD6-Mediated Interactions in T Cell Activation and Proliferation. *J. Immunol.* **2004**, *173* (4), 2262–2270. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2262>.
- (17) Velasco-de Andrés, M.; Casadó-Llombart, S.; Català, C.; Leyton-Pereira, A.; Lozano, F.; Aranda, F. Soluble CD5 and CD6: Lymphocytic Class I Scavenger Receptors as Immunotherapeutic Agents. *Cells* **2020**, *9* (12), 2589. <https://doi.org/10.3390/cells9122589>.
- (18) Tarakhovsky, A.; Kanner, S. B.; Hombach, J.; Ledbetter, J. A.; Müller, W.; Killeen, N.; Rajewsky, K. A Role for CD5 in TCR-Mediated Signal Transduction and Thymocyte Selection. *Science* **1995**, *269* (5223), 535–537. <https://doi.org/10.1126/science.7542801>.
- (19) Bikah, G.; Carey, J.; Ciallella, J. R.; Tarakhovsky, A.; Bondada, S. CD5-Mediated Negative Regulation of Antigen Receptor-Induced Growth Signals in B-1 B Cells. *Science* **1996**, *274* (5294), 1906–1909. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1906>.
- (20) Lozano, F.; Simarro, M.; Calvo, J.; Vilà, J. M.; Padilla, O.; Bowen, M. A.; Campbell, K. S. CD5 Signal Transduction: Positive or Negative Modulation of Antigen Receptor Signaling. *Crit. Rev. Immunol.* **2000**, *20* (4), 347–358.
- (21) Mourglia-Ettlin, G.; Miles, S.; Velasco-De-Andrés, M.; Armiger-Borràs, N.; Cucher, M.; Dematteis, S.; Lozano, F. The Ectodomains of the Lymphocyte Scavenger Receptors CD5 and CD6 Interact with Tegumental Antigens from *Echinococcus Granulosus*

- Sensu Lato and Protect Mice against Secondary Cystic Echinococcosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, 12 (11), e0006891. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006891>.
- (22) Vera, J.; Fenutría, R.; Cañadas, O.; Figueras, M.; Mota, R.; Sarrias, M.-R.; Williams, D. L.; Casals, C.; Yelamos, J.; Lozano, F. The CD5 Ectodomain Interacts with Conserved Fungal Cell Wall Components and Protects from Zymosan-Induced Septic Shock-like Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106 (5), 1506–1511. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805846106>.
- (23) Martínez-Florensa, M.; Consuegra-Fernández, M.; Martínez, V. G.; Cañadas, O.; Armiger-Borràs, N.; Bonet-Roselló, L.; Farrán, A.; Vila, J.; Casals, C.; Lozano, F. Targeting of Key Pathogenic Factors From Gram-Positive Bacteria by the Soluble Ectodomain of the Scavenger-Like Lymphocyte Receptor CD6. *J. Infect. Dis.* **2014**, 209 (7), 1077–1086. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit624>.
- (24) Sarrias, M.-R.; Farnós, M.; Mota, R.; Sánchez-Barbero, F.; Ibáñez, A.; Gimferrer, I.; Vera, J.; Fenutría, R.; Casals, C.; Yelamos, J.; Lozano, F. CD6 Binds to Pathogen-Associated Molecular Patterns and Protects from LPS-Induced Septic Shock. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104 (28), 11724–11729. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702815104>.
- (25) Lenz, L. L. CD5 Sweetens Lymphocyte Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106 (5), 1303–1304. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812579106>.
- (26) Enyindah-Asonye, G.; Li, Y.; Ruth, J. H.; Spassov, D. S.; Hebron, K. E.; Zijlstra, A.; Moasser, M. M.; Wang, B.; Singer, N. G.; Cui, H.; Ohara, R. A.; Rasmussen, S. M.; Fox, D. A.; Lin, F. CD318 Is a Ligand for CD6. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, 114 (33). <https://doi.org/10.1073/pnas.1704008114>.
- (27) Orta-Mascaró, M.; Consuegra-Fernández, M.; Carreras, E.; Roncagalli, R.; Carreras-Sureda, A.; Alvarez, P.; Girard, L.; Simões, I.; Martínez-Florensa, M.; Aranda, F.; Merino, R.; Martínez, V.-G.; Vicente, R.; Merino, J.; Sarukhan, A.; Malissen, M.; Malissen, B.; Lozano, F. CD6 Modulates Thymocyte Selection and Peripheral T Cell Homeostasis. *J. Exp. Med.* **2016**, 213 (8), 1387–1397. <https://doi.org/10.1084/jem.20151785>.
- (28) Bowen, M. A.; Whitney, G. S.; Neubauer, M.; Starling, G. C.; Palmer, D.; Zhang, J.; Nowak, N. J.; Shows, T. B.; Aruffo, A. Structure and Chromosomal Location of the Human CD6 Gene: Detection of Five Human CD6 Isoforms. *J. Immunol. Baltim. Md* **1990**, 150 (3), 1149–1156.
- (29) Castro, M. A. A.; Oliveira, M. I.; Nunes, R. J.; Fabre, S.; Barbosa, R.; Peixoto, A.; Brown, M. H.; Parnes, J. R.; Bismuth, G.; Moreira, A.; Rocha, B.; Carmo, A. M. Extracellular Isoforms of CD6 Generated by Alternative Splicing Regulate Targeting of CD6 to the Immunological Synapse. *J. Immunol.* **2007**, 178 (7), 4351–4361. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4351>.
- (30) Kim, Y. S.; Kim, M. N.; Lee, K. E.; Hong, J. Y.; Oh, M. S.; Kim, S. Y.; Kim, K. W.; Sohn, M. H. Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166) Regulates T Cell Responses in a Murine Model of Food Allergy. *Clin. Exp. Immunol.* **2018**, 192 (2), 151–164. <https://doi.org/10.1111/cei.13104>.

- (31) Santos, R. F.; Oliveira, L.; Brown, M. H.; Carmo, A. M. Domain-Specific CD6 Monoclonal Antibodies Identify CD6 Isoforms Generated by Alternative-Splicing. *Immunology* **2019**, *157* (4), 296–303. <https://doi.org/10.1111/imm.13087>.
- (32) Wagner, M.; Bilinska, M.; Pokryszko-Dragan, A.; Sobczynski, M.; Cyrul, M.; Kusnierczyk, P.; Jasek, M. ALCAM and CD6 — Multiple Sclerosis Risk Factors. *J. Neuroimmunol.* **2014**, *276* (1–2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.08.621>.
- (33) Consuegra-Fernández, M.; Julià, M.; Martínez-Florensa, M.; Aranda, F.; Català, C.; Armiger-Borràs, N.; Arias, M.-T.; Santiago, F.; Guilabert, A.; Esteve, A.; Muñoz, C.; Ferrándiz, C.; Carrascosa, J.-M.; Pedrosa, E.; Romaní, J.; Alsina, M.; Mascaró-Galy, J.-M.; Lozano, F. Genetic and Experimental Evidence for the Involvement of the CD6 Lymphocyte Receptor in Psoriasis. *Cell. Mol. Immunol.* **2018**, *15* (10), 898–906. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.119>.
- (34) Oliveira, M. I.; Gonçalves, C. M.; Pinto, M.; Fabre, S.; Santos, A. M.; Lee, S. F.; Castro, M. A. A.; Nunes, R. J.; Barbosa, R. R.; Parnes, J. R.; Yu, C.; Davis, S. J.; Moreira, A.; Bismuth, G.; Carmo, A. M. CD6 Attenuates Early and Late Signaling Events, Setting Thresholds for T-Cell Activation. *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42* (1), 195–205. <https://doi.org/10.1002/eji.201040528>.
- (35) Henriques, S. N.; Oliveira, L.; Santos, R. F.; Carmo, A. M. CD6-Mediated Inhibition of T Cell Activation via Modulation of Ras. *Cell Commun. Signal. CCS* **2022**, *20* (1), 184. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00998-x>.
- (36) Ramos-Casals, M.; Font, J.; García-Carrasco, M.; Calvo, J.; Places, L.; Padilla, O.; Cervera, R.; Bowen, M. A.; Lozano, F.; Ingelmo, M. High Circulating Levels of Soluble Scavenger Receptors (sCD5 and sCD6) in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Rheumatology* **2001**, *40* (9), 1056–1059. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.9.1056>.
- (37) Aibar, J.; Martínez-Florensa, M.; Castro, P.; Carrasco, E.; Escoda-Ferran, C.; Fernández, S.; Butjosa, M.; Hernández, C.; Rinaudo, M.; Lozano, F.; Nicolás, J. M. Pattern of Soluble CD5 and CD6 Lymphocyte Receptors in Critically Ill Patients with Septic Syndromes. *J. Crit. Care* **2015**, *30* (5), 914–919. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.04.120>.
- (38) Carrasco, E.; Escoda-Ferran, C.; Climent, N.; Miró-Julià, C.; Simões, I. T.; Martínez-Florensa, M.; Sarukhan, A.; Carreras, E.; Lozano, F. Human CD6 Down-Modulation Following T-Cell Activation Compromises Lymphocyte Survival and Proliferative Responses. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 769. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00769>.
- (39) (2018) REVIEW_Clinical and Experimental Evidence for Targeting CD6 in Immune-Based Disorders (1).Pdf.
- (40) Casadó-Llombart, S.; Velasco-de Andrés, M.; Català, C.; Leyton-Pereira, A.; Lozano, F.; Bosch, E. Contribution of Evolutionary Selected Immune Gene Polymorphism to Immune-Related Disorders: The Case of Lymphocyte Scavenger Receptors CD5 and CD6. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (10), 5315. <https://doi.org/10.3390/ijms22105315>.

- (41) Yanaba, K.; Bouaziz, J.-D.; Matsushita, T.; Tsubata, T.; Tedder, T. F. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2009**, *182* (12), 7459–7472. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900270>.
- (42) Caron, G.; Duluc, D.; Frémaux, I.; Jeannin, P.; David, C.; Gascan, H.; Delneste, Y. Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 up-Regulate Proliferation and IFN-Gamma Production by Memory CD4+ T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2005**, *175* (3), 1551–1557. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1551>.
- (43) Lampropoulou, V.; Hoehlig, K.; Roch, T.; Neves, P.; Calderón Gómez, E.; Sweenie, C. H.; Hao, Y.; Freitas, A. A.; Steinhoff, U.; Anderton, S. M.; Fillatreau, S. TLR-Activated B Cells Suppress T Cell-Mediated Autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2008**, *180* (7), 4763–4773. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4763>.
- (44) Sarukhan, A.; Martinez-Florensa, M.; Escoda-Ferran, C.; Carrasco, E.; Carreras, E.; Lozano, F. Pattern Recognition by CD6: A Scavenger-Like Lymphocyte Receptor. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17* (6), 640–650. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150316224308>.
- (45) Gurrea-Rubio, M.; Lin, F.; Wicha, M. S.; Mao-Draayer, Y.; Fox, D. A. Ligands of CD6: Roles in the Pathogenesis and Treatment of Cancer. *Front. Immunol.* **2025**, *15*, 1528478. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1528478>.
- (46) Bowen, M. A.; Patel, D. D.; Li, X.; Modrell, B.; Malacko, A. R.; Wang, W. C.; Marquardt, H.; Neubauer, M.; Pesando, J. M.; Francke, U. Cloning, Mapping, and Characterization of Activated Leukocyte-Cell Adhesion Molecule (ALCAM), a CD6 Ligand. *J. Exp. Med.* **1995**, *181* (6), 2213–2220. <https://doi.org/10.1084/jem.181.6.2213>.
- (47) Patel, D. D.; Wee, S. F.; Whichard, L. P.; Bowen, M. A.; Pesando, J. M.; Aruffo, A.; Haynes, B. F. Identification and Characterization of a 100-kD Ligand for CD6 on Human Thymic Epithelial Cells. *J. Exp. Med.* **1995**, *181* (4), 1563–1568. <https://doi.org/10.1084/jem.181.4.1563>.
- (48) Bowen, M. A.; Bajorath, J.; Siadak, A. W.; Modrell, B.; Malacko, A. R.; Marquardt, H.; Nadler, S. G.; Aruffo, A. The Amino-Terminal Immunoglobulin-like Domain of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule Binds Specifically to the Membrane-Proximal Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain of CD6 with a 1:1 Stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (29), 17390–17396. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17390>.
- (49) Hassan, N. J.; Barclay, A. N.; Brown, M. H. Frontline: Optimal T Cell Activation Requires the Engagement of CD6 and CD166. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34* (4), 930–940. <https://doi.org/10.1002/eji.200424856>.
- (50) Zimmerman, A. W.; Joosten, B.; Torensma, R.; Parnes, J. R.; van Leeuwen, F. N.; Figdor, C. G. Long-Term Engagement of CD6 and ALCAM Is Essential for T-Cell Proliferation Induced by Dendritic Cells. *Blood* **2006**, *107* (8), 3212–3220. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3881>.
- (51) *The T cell CD6 receptor operates a multitask signalosome with opposite functions in T cell activation* | Journal of Experimental Medicine | Rockefeller University Press.

- https://rupress.org/jem/article/218/2/e20201011/211516/The-T-cell-CD6-receptor-operates-a-multitask?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-11-17).
- (52) Te Riet, J.; Helenius, J.; Strohmeyer, N.; Cambi, A.; Figdor, C. G.; Müller, D. J. Dynamic Coupling of ALCAM to the Actin Cortex Strengthens Cell Adhesion to CD6. *J. Cell Sci.* **2014**, *127* (Pt 7), 1595–1606. <https://doi.org/10.1242/jcs.141077>.
- (53) Li, Y.; Singer, N. G.; Whitbred, J.; Bowen, M. A.; Fox, D. A.; Lin, F. CD6 as a Potential Target for Treating Multiple Sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (10), 2687–2692. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615253114>.
- (54) Casar, B.; Rimann, I.; Kato, H.; Shattil, S. J.; Quigley, J. P.; Deryugina, E. I. In Vivo Cleaved CDCP1 Promotes Early Tumor Dissemination via Complexing with Activated B1 Integrin and Induction of FAK/PI3K/Akt Motility Signaling. *Oncogene* **2014**, *33* (2), 255–268. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.547>.
- (55) Borjini, N.; Lun, Y.; Jang, G.-F.; Crabb, J.; Chen, Y.; Crabb, J.; Fox, D. A.; Ivanov, A. I.; Lin, F. CD6 Triggers Actomyosin Cytoskeleton Remodeling after Binding to Its Receptor Complex. *J. Leukoc. Biol.* **2024**, *115* (3), 450–462. <https://doi.org/10.1093/jleuko/qiad124>.
- (56) Saifullah, M. K.; Fox, D. A.; Sarkar, S.; Abidi, S. M. A.; Endres, J.; Piktel, J.; Haqqi, T. M.; Singer, N. G. Expression and Characterization of a Novel CD6 Ligand in Cells Derived from Joint and Epithelial Tissues1. *J. Immunol.* **2004**, *173* (10), 6125–6133. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6125>.
- (57) Scherl-Mostageer, M.; Sommergruber, W.; Abseher, R.; Hauptmann, R.; Ambros, P.; Schweifer, N. Identification of a Novel Gene, CDCP1, Overexpressed in Human Colorectal Cancer. *Oncogene* **2001**, *20* (32), 4402–4408. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204566>.
- (58) Uekita, T.; Tanaka, M.; Takigahira, M.; Miyazawa, Y.; Nakanishi, Y.; Kanai, Y.; Yanagihara, K.; Sakai, R. CUB-Domain-Containing Protein 1 Regulates Peritoneal Dissemination of Gastric Scirrhous Carcinoma. *Am. J. Pathol.* **2008**, *172* (6), 1729–1739. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070981>.
- (59) Awakura, Y.; Nakamura, E.; Takahashi, T.; Kotani, H.; Mikami, Y.; Kadowaki, T.; Myoumoto, A.; Akiyama, H.; Ito, N.; Kamoto, T.; Manabe, T.; Nobumasa, H.; Tsujimoto, G.; Ogawa, O. Microarray-Based Identification of CUB-Domain Containing Protein 1 as a Potential Prognostic Marker in Conventional Renal Cell Carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2008**, *134* (12), 1363–1369. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0412-4>.
- (60) Razorenova, O. V.; Finger, E. C.; Colavitti, R.; Chernikova, S. B.; Boiko, A. D.; Chan, C. K. F.; Krieg, A.; Bedogni, B.; LaGory, E.; Weissman, I. L.; Broome-Powell, M.; Giaccia, A. J. VHL Loss in Renal Cell Carcinoma Leads to Up-Regulation of CUB Domain-Containing Protein 1 to Stimulate PKC{delta}-Driven Migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (5), 1931–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011777108>.
- (61) Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P. A. CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>.

- (62) Stillman, B. N.; Hsu, D. K.; Pang, M.; Brewer, C. F.; Johnson, P.; Liu, F.-T.; Baum, L. G. Galectin-3 and Galectin-1 Bind Distinct Cell Surface Glycoprotein Receptors to Induce T Cell Death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2006**, 176 (2), 778–789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.2.778>.
- (63) Escoda-Ferran, C.; Carrasco, E.; Caballero-Baños, M.; Miró-Julià, C.; Martínez-Florensa, M.; Consuegra-Fernández, M.; Martínez, V. G.; Liu, F.-T.; Lozano, F. Modulation of CD6 Function through Interaction with Galectin-1 and -3. *FEBS Lett.* **2014**, 588 (17), 2805–2813. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.064>.
- (64) Chiariotti, L.; Salvatore, P.; Frunzio, R.; Bruni, C. B. Galectin Genes: Regulation of Expression. *Glycoconj. J.* **2002**, 19 (7–9), 441–449. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014073.23096.3a>.
- (65) Liu, F.-T.; Rabinovich, G. A. Galectins as Modulators of Tumour Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5 (1), 29–41. <https://doi.org/10.1038/nrc1527>.
- (66) Consuegra-Fernández, M.; Lin, F.; Fox, D. A.; Lozano, F. Clinical and Experimental Evidence for Targeting CD6 in Immune-Based Disorders. *Autoimmun. Rev.* **2018**, 17 (5), 493–503. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.12.004>.
- (67) Aragón-Serrano, L.; Carrillo-Serradell, L.; Planells-Romeo, V.; Isamat, M.; Velasco-de Andrés, M.; Lozano, F. CD6 and Its Interacting Partners: Newcomers to the Block of Cancer Immunotherapies. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24 (24), 17510. <https://doi.org/10.3390/ijms242417510>.
- (68) Dejager, L.; Pinheiro, I.; Dejonckheere, E.; Libert, C. Cecal Ligation and Puncture: The Gold Standard Model for Polymicrobial Sepsis? *Trends Microbiol.* **2011**, 19 (4), 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.001>.
- (69) Martínez-Florensa, M.; Consuegra-Fernández, M.; Aranda, F.; Armiger-Borràs, N.; Di Scala, M.; Carrasco, E.; Pachón, J.; Vila, J.; González-Aseguinolaza, G.; Lozano, F. Protective Effects of Human and Mouse Soluble Scavenger-Like CD6 Lymphocyte Receptor in a Lethal Model of Polymicrobial Sepsis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, 61 (1), e01391-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01391-16>.
- (70) Bikker, F. J.; Ligtenberg, A. J. M.; End, C.; Renner, M.; Blaich, S.; Lyer, S.; Wittig, R.; Van'T Hof, W.; Veerman, E. C. I.; Nazmi, K.; De Blicke-Hogervorst, J. M. A.; Kioschis, P.; Amerongen, A. V. N.; Poustka, A.; Mollenhauer, J. Bacteria Binding by DMBT1/SAG/Gp-340 Is Confined to the VEVLXXXXW Motif in Its Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domains. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (46), 47699–47703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406095200>.
- (71) Martínez-Florensa, M.; Català, C.; Velasco-de Andrés, M.; Cañadas, O.; Fraile-Ágreda, V.; Casadó-Llombart, S.; Armiger-Borràs, N.; Consuegra-Fernández, M.; Casals, C.; Lozano, F. Conserved Bacterial-Binding Peptides of the Scavenger-Like Human Lymphocyte Receptor CD6 Protect From Mouse Experimental Sepsis. *Front. Immunol.* **2018**, 9, 627. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00627>.
- (72) Hernández, P.; Moreno, E.; Aira, L. E.; Rodríguez, P. C. Therapeutic Targeting of CD6 in Autoimmune Diseases: A Review of Cuban Clinical Studies with the Antibodies IOR-T1 and Itolizumab. *Curr. Drug Targets* **2016**, 17 (6), 666–677. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160201114308>.

- (73) Reinherz, E. L.; Geha, R.; Rapoport, J. M.; Wilson, M.; Penta, A. C.; Hussey, R. E.; Fitzgerald, K. A.; Daley, J. F.; Levine, H.; Rosen, F. S.; Schlossman, S. F. Reconstitution after Transplantation with T-Lymphocyte-Depleted HLA Haplotype-Mismatched Bone Marrow for Severe Combined Immunodeficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, 79 (19), 6047–6051. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.19.6047>.
- (74) Newsome, B. W.; Ernstoff, M. S. The Clinical Pharmacology of Therapeutic Monoclonal Antibodies in the Treatment of Malignancy; Have the Magic Bullets Arrived? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2008**, 66 (1), 6–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03187.x>.
- (75) Ruth, J. H.; Gurrea-Rubio, M.; Athukorala, K. S.; Rasmussen, S. M.; Weber, D. P.; Randon, P. M.; Gedert, R. J.; Lind, M. E.; Amin, M. A.; Campbell, P. L.; Tsou, P.-S.; Mao-Draayer, Y.; Wu, Q.; Lanigan, T. M.; Keshamouni, V. G.; Singer, N. G.; Lin, F.; Fox, D. A. CD6 Is a Target for Cancer Immunotherapy. *JCI Insight* **2021**, 6 (5), e145662. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.145662>.
- (76) González Muñoz, C.; Álvarez Arzola, R.; Calvo Pérez, A.; Frometa Campanón, M. D. L. C.; Hernández Casaña, P.; Fernández-Calienes Valdés, A.; Lorenzo-Luaces, P.; Mazorra Herrera, Z.; Crombet Ramos, T.; Labrada Mon, M. Itolizumab Regulates Activating and Inhibitory Signals on Effector Cells, Improving Their Cytotoxicity against CD318+ Tumor Cell Lines. *Front. Immunol.* **2025**, 16, 1585597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1585597>.
- (77) Wagner, M.; Sobczyński, M.; Wiśniewski, A.; Matusiak, Ł.; Kuśnierczyk, P.; Jasek, M. Polymorphisms in the CD6-ALCAM Axis May Modulate Psoriasis Risk and Outcomes. *Hum. Immunol.* **2024**, 85 (3), 110797. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2024.110797>.
- (78) Kofler, D. M.; Farkas, A.; von Bergwelt-Baildon, M.; Hafler, D. A. The Link Between CD6 and Autoimmunity: Genetic and Cellular Associations. *Curr. Drug Targets* **2016**, 17 (6), 651–665. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160201105934>.
- (79) Chalmers, S. A.; Ayilam Ramachandran, R.; Garcia, S. J.; Der, E.; Herlitz, L.; Ampudia, J.; Chu, D.; Jordan, N.; Zhang, T.; Parodis, I.; Gunnarsson, I.; Ding, H.; Shen, N.; Petri, M.; Mok, C. C.; Saxena, R.; Polu, K. R.; Connelly, S.; Ng, C. T.; Mohan, C.; Putterman, C. The CD6/ALCAM Pathway Promotes Lupus Nephritis via T Cell-Mediated Responses. *J. Clin. Invest.* **2022**, 132 (1), e147334. <https://doi.org/10.1172/JCI147334>.
- (80) Equillium. *A Phase 1b Multiple Ascending-Dose Study of EQ001 in Subjects With Systemic Lupus Erythematosus With or Without Active Proliferative Lupus Nephritis*; Clinical trial registration NCT04128579; clinicaltrials.gov, 2025. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04128579> (accessed 2025-11-17).
- (81) Zhang, L.; Li, Y.; Qiu, W.; Bell, B. A.; Dvorina, N.; Baldwin, W. M.; Singer, N.; Kern, T.; Caspi, R. R.; Fox, D. A.; Lin, F. Targeting CD6 for the Treatment of Experimental Autoimmune Uveitis. *J. Autoimmun.* **2018**, 90, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.02.004>.
- (82) Li, Y.; Ruth, J. H.; Rasmussen, S. M.; Athukorala, K. S.; Weber, D. P.; Amin, M. A.; Campbell, P. L.; Singer, N. G.; Fox, D. A.; Lin, F. Attenuation of Murine Collagen-Induced Arthritis by Targeting CD 6. *Arthritis Rheumatol.* **2020**, 72 (9), 1505–1513. <https://doi.org/10.1002/art.41288>.

- (83) June, C. H.; O'Connor, R. S.; Kawalekar, O. U.; Ghassemi, S.; Milone, M. C. CAR T Cell Immunotherapy for Human Cancer. *Science* **2018**, 359 (6382), 1361–1365. <https://doi.org/10.1126/science.aar6711>.
- (84) Xia, B.; Lin, K.; Wang, X.; Chen, F.; Zhou, M.; Li, Y.; Lin, Y.; Qiao, Y.; Li, R.; Zhang, W.; He, X.; Zou, F.; Li, L.; Lu, L.; Chen, C.; Li, W.; Zhang, H.; Liu, B. Nanobody-Derived Bispecific CAR-T Cell Therapy Enhances the Anti-Tumor Efficacy of T Cell Lymphoma Treatment. *Mol. Ther. - Oncolytics* **2023**, 30, 86–102. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2023.07.007>.
- (85) Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, 82 (1), 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
- (86) Gonzalez-Sapienza, G.; Rossotti, M. A.; Tabares-da Rosa, S. Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. *Front. Immunol.* **2017**, 8, 977. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00977>.
- (87) Xie, Y. J.; Dougan, M.; Ingram, J. R.; Pishesha, N.; Fang, T.; Momin, N.; Ploegh, H. L. Improved Antitumor Efficacy of Chimeric Antigen Receptor T Cells That Secrete Single-Domain Antibody Fragments. *Cancer Immunol. Res.* **2020**, 8 (4), 518–529. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0734>.
- (88) Zu, Y.; Ren, Q.; Zhang, J.; Su, H.; Lu, Q.; Song, Y.; Zhou, J. Targeting CD5 Chimeric Antigen Receptor-Engineered Natural Killer Cells against T-Cell Malignancies. *Exp. Hematol. Oncol.* **2024**, 13 (1), 104. <https://doi.org/10.1186/s40164-024-00577-5>.
- (89) Li, H.; Zhou, Q.; Cao, N.; Hu, C.; Wang, J.; He, Y.; Jiang, S.; Li, Q.; Chen, M.; Gong, L.; Luo, M.; Deng, X.; Luo, Z. Nanobodies and Their Derivatives: Pioneering the Future of Cancer Immunotherapy. *Cell Commun. Signal.* **2025**, 23 (1), 271. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02270-4>.
- (90) He, S.; Li, S.; Guo, J.; Zeng, X.; Liang, D.; Zhu, Y.; Li, Y.; Yang, D.; Zhao, X. CD166-Specific CAR-T Cells Potently Target Colorectal Cancer Cells. *Transl. Oncol.* **2023**, 27, 101575. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101575>.
- (91) Muyldermans, S. A Guide to: Generation and Design of Nanobodies. *FEBS J.* **2021**, 288 (7), 2084–2102. <https://doi.org/10.1111/febs.15515>.
- (92) De Genst, E.; Saerens, D.; Muyldermans, S.; Conrath, K. Antibody Repertoire Development in Camelids. *Dev. Comp. Immunol.* **2006**, 30 (1–2), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.010>.
- (93) Nguyen, V. K.; Desmyter, A.; Muyldermans, S. Functional Heavy-Chain Antibodies in Camelidae. *Adv. Immunol.* **2001**, 79, 261–296. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(01\)79006-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(01)79006-2).
- (94) Smith, G. P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Sci. New Ser.* **1985**, 228 (4705), 1315–1317.
- (95) Bazan, J.; Całkosiński, I.; Gamian, A. Phage Display—A Powerful Technique for Immunotherapy: 1. Introduction and Potential of Therapeutic Applications. *Hum. Vaccines Immunother.* **2012**, 8 (12), 1817–1828. <https://doi.org/10.4161/hv.21703>.

-
- (96) Blanc, M. R.; Anouassi, A.; Abed, M. A.; Tsikis, G.; Canepa, S.; Labas, V.; Belghazi, M.; Bruneau, G. 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**, *54* (4), 207–212. <https://doi.org/10.1042/BA20090208>.
- (97) Mourglia-Ettlin, G.; González-Porcile, M. C.; Planells-Romeo, V.; Long-Albín, A.; Carrillo-Serradell, L.; Miles, S.; Lozano, F.; Velasco-de-Andrés, M. In Vitro Analysis of Tandem Peptides from Human CD5 and CD6 Scavenger Receptors as Potential Anti-Cryptococcal Agents. *J. Fungi* **2024**, *10* (10), 667. <https://doi.org/10.3390/jof10100667>.
- (98) González-Porcile, María Clara (2024). “Diseño y evaluación de péptidos sintéticos derivados de receptores scavenger como potenciales agentes antiparasitarios” Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- (99) Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N]Nitrate in Biological Fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126* (1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X).
- (100) Czajkowsky, D. M.; Hu, J.; Shao, Z.; Pleass, R. J. Fc-fusion Proteins: New Developments and Future Perspectives. *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4* (10), 1015–1028. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201379>.
- (101) Jefferís, R.; Lund, J. Glycosylation of Antibody Molecules: Structural and Functional Significance.