



**NANOANTICUERPOS:
PEQUEÑAS MOLÉCULAS, GRANDES POSIBILIDADES**

Adriana Pedreáñez¹, Jesús Mosquera², Nelson Muñoz³, Diego Tene⁴.

- 1. Cátedra de Inmunología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina,
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.**
- 2. Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, Facultad de
Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.**
- 3. Universidad Nacional del Chimborazo. Facultad de Ciencias de la Salud.
Riobamba. Ecuador.**
- 4. Laboratorio Clínico del Hospital General IESS. Riobamba. Ecuador.**

CORRESPONDENCIA: Dra. Adriana Pedreáñez, PhD

Apartado Postal: 23 Maracaibo 4001-A Zulia, Venezuela

Email: apedreanez@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3937-0469>



RESUMEN

Los camélidos (camellos, dromedarios, alpacas, llamas y vicuñas), contienen en su suero anticuerpos heterodiméricos convencionales, como anticuerpos que no poseen cadenas ligeras (L) en su estructura, compuestos únicamente por cadenas pesadas (H), denominados (HcAbs, por sus siglas en inglés: Heavi chain - Antibodies). Los fragmentos variables derivados de estos anticuerpos, también llamados VHH o nanoanticuerpos (en adelante NAcS). Desde su descubrimiento, los NAcS se han utilizado ampliamente en los campos de la investigación, el diagnóstico y la farmacoterapia. A pesar de tener aproximadamente una décima parte del tamaño de un anticuerpo convencional, conservan una especificidad y afinidad similares a los anticuerpos convencionales, son mucho más fáciles de clonar y manipular. Sus propiedades especiales, como tamaño pequeño, alta estabilidad, fuerte afinidad de unión a antígenos, solubilidad en agua y origen natural, los hacen adecuados para el desarrollo de biofármacos y nanoreactivos. El objetivo de esta revisión, es describir las principales características estructurales y bioquímicas de estos anticuerpos, así como proporcionar una actualización de sus aplicaciones en la investigación, la biotecnología, y la medicina. Para ello se realizó una búsqueda exhaustiva de la literatura biomédica. Para la elaboración del análisis se realizó una búsqueda de artículos publicados en las siguientes bases de datos: Medline (PubMed), Google Scholar y ScienceDirect. Se revisaron meta análisis, estudios observacionales, artículos de revisión y guías clínicas. Para evaluar la calidad de la evidencia solo se tuvieron en cuenta los artículos originales.

PALABRAS CLAVE: Anticuerpos, Camélidos, Nanotecnología



NANOANTIBODIES: SMALL MOLECULES, BIG POSSIBILITIES

ABSTRACT

The camelids (camels, dromedaries, alpacas, llamas and vicunas), contain in their serum conventional heterodimeric antibodies, like antibodies that do not possess light chains (L) in their structure, composed only by heavy chains (H), denominated (HcAbs, for their initials in English: Heavi chain - Antibodies). The variable fragments derived from these antibodies, also called HHV or nanoantibodies (NAcs. Since their discovery, NAcs have been widely used in the fields of research, diagnosis and pharmacotherapy. Despite having approximately one tenth of the size of a conventional antibody, they retain similar specificity and affinity to conventional antibodies, and are much easier to clone and manipulate. Their special properties, such as small size, high stability, strong antigen binding affinity, water solubility and natural origin, make them suitable for the development of biopharmaceuticals and nanoreagents. The objective of this review is to describe the main structural and biochemical characteristics of these antibodies, as well as to provide an update of their applications in research, biotechnology, and medicine. For this purpose, an exhaustive search of biomedical literature was carried out. For the elaboration of the analysis, a search of articles published in the following databases was carried out: Medline (PubMed), Google Scholar and ScienceDirect. Meta-analyses, observational studies, review articles and clinical guidelines were reviewed. Only original articles were considered to assess the quality of evidence.

KEY WORD: Antibodies, Camelids, Nanotechnology

En el año 1993, Hamers-Casterman y colaboradores, descubrieron de manera

INTRODUCCIÓN



casual la presencia de anticuerpos de cadena pesada de origen natural en el suero de un dromedario (1). Seguidamente, varias investigaciones lograron establecer que todos los miembros de la familia de los camélidos, es decir, dromedarios, camellos, llamas, vicuñas y alpacas, además de los anticuerpos convencionales, producen de forma natural anticuerpos compuestos únicamente por cadenas pesadas denominados (HcAbs; por sus siglas en inglés Heavy Chain Antibodies), (1,2). Posteriormente se determinó que algunos peces cartilagosos, incluidos el tiburón y las rayas, también producen inmunoglobulinas funcionales de cadena pesada, denominadas IgNAR (3,4).

En los últimos años, estos anticuerpos han recibido un elevado interés de las industrias farmacéuticas y biotecnológicas debido a sus propiedades peculiares, que incluyen tamaño pequeño, estructura robusta, alta afinidad y especificidad, accesibilidad elevada y alta penetración en

los tejidos (5). Por tal motivo el objetivo de esta revisión, es describir las principales características estructurales y bioquímicas de estos anticuerpos, así como proporcionar una actualización de sus aplicaciones en la investigación, la biotecnología, y la medicina.

Características estructurales y bioquímicas de los nanoanticuerpos

La inmunoglobulina G (IgG), uno de los cinco isotipos presentes en los seres humanos, es la inmunoglobulina que se encuentra en mayor concentración en el suero de los mamíferos y el único que atraviesa la barrera placentaria, proporciona la mayor parte de la inmunidad basada en anticuerpos y se presenta en cuatro formas: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Siendo la IgG1; la isoforma que se emplea principalmente en terapéutica, proporcionando una clara ventaja en la mejora de las funciones efectoras y ofreciendo una vida media en el suero más prolongada



(aproximadamente 21 días) (6). La estructura básica de la Inmunoglobulina G convencional, consta de dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (cadenas H) y dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (cadenas L) (7). Es decir, es una molécula heterotetramérica. La cadena H posee cuatro dominios: uno variable (VH) y tres constantes (CH1, CH2 y CH3); mientras que la cadena L consta de un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL), que están emparejados e interactúan de forma no covalente con los dominios VH y CH1, respectivamente. Estas asociaciones dan como resultado la formación de tres regiones independientes: dos porciones Fab (por sus siglas en inglés Fragment antigen binding) y un fragmento cristizable (Fc), conectados a través de un enlazador flexible en la región bisagra. Las regiones Fab son de estructura idéntica, normalmente planas o cóncavas, en las que cada una expresa un sitio de unión al antígeno específico. La región Fc es importante para ejercer otras funciones

biológicas como la activación del complemento y la opsonización. Los dominios emparejados N-terminales VH-VL constituyen el paratopo o fragmento variable (Fv). Dentro del cual, se forman regiones hipervariables (llamadas regiones determinantes de complementariedad [CDRs; por sus siglas en inglés: Complementarity Determining Region]), y hay tres en cada uno de los dominios variables VL y VH que determinan la especificidad, diversidad y afinidad de la inmunoglobulina; el resto de los dominios VH y VL poseen fragmentos denominados regiones marco que soportan o le dan estructura a los bucles moleculares (8), como se observa en la figura 1.

Una notoria excepción a esta estructura convencional de las IgG de los mamíferos se encuentra en los sueros de los camélidos (1). Estos sueros poseen anticuerpos IgG especiales, conocidos como anticuerpos de cadena pesada (HcAbs), llamados así porque no poseen cadena L y carecen del

primer dominio constante (CH1). Es decir, su estructura es homodimérica. En su región N-terminal, la cadena H de la proteína homodimérica contiene un dominio variable, referido como VHH, que sirve para asociarse con su antígeno específico, seguido por dos dominios constantes. El VHH en un HcAb es el equivalente estructural y funcional del fragmento Fab de los anticuerpos convencionales. Por lo tanto, el sitio de unión al antígeno de HcAbs está formado solo por un único dominio que está unido directamente a través de una región bisagra al dominio Fc (9) Figura 1.

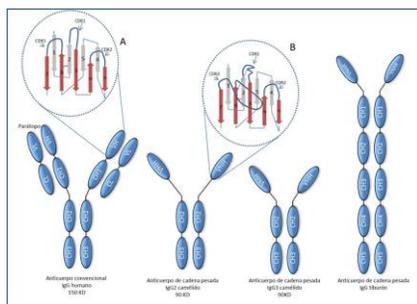


Figura 1. Anticuerpos convencionales y anticuerpos de cadena pesada

De manera similar, los anticuerpos de cadena pesada (IgNAR) descubiertos en el torrente sanguíneo del tiburón también poseen una estructura homodimérica de dos polipéptidos de cadena pesada, cada uno de los cuales comprende un solo dominio variable y cinco dominios constantes (estructura homodimérica). En estos el dominio variable recibe el nombre de VNAR (4), Figura 1.

Estos anticuerpos completamente funcionales exhiben alta especificidad, alta diversidad y capacidades de unión similares a las obtenidas por los anticuerpos convencionales, aunque carecen de la cadena ligera. Por lo tanto, un anticuerpo de cadena pesada tiene aproximadamente sólo la mitad del tamaño (75-90 kDa) de un anticuerpo convencional cuyo peso es aproximadamente (150 kDa). Por consiguiente, su menor tamaño y su arquitectura más compacta podría ser

mejor adaptado para acceder a objetivos ocultos.

La porción variable VHH, derivada de los HcAbs de camélidos o la VNAR de los IgNAR de los peces cartilaginosos, fueron denominadas “nanocuerpos o nanoanticuerpos (NACs)” en el año 2003 (5), debido al pequeño tamaño dimensional de 2,5 nm de diámetro y 4 nm de altura, lo que representa un peso aproximado de (12-15 kDa), con el objeto enfatizar sus tamaños dimensionales más pequeños, en comparación con los tamaños moleculares más grandes de los fragmentos de unión a antígeno (Fabs; ~ 57 kDa) y los fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs; ~ 27 kDa). Los HcAbs y los IgNAR se caracterizan por una hipermutación muy alta, aparentemente en respuesta a los antígenos, esto significa una elevada tasa de variabilidad. Por lo tanto, hasta cierto punto de una manera más específica, los nanocuerpos (VHH o VNAR) son las

contrapartes estructurales y funcionales de los Fabs en las IgG convencionales (9,10), Figura 2.

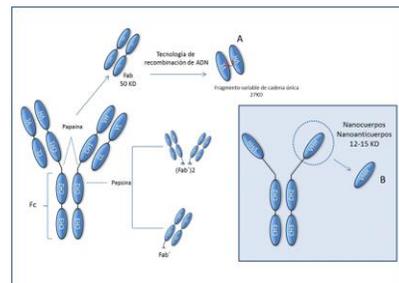


Figura 2. Nanoanticuerpos

Los nanoanticuerpos en general tienen propiedades físicas inesperadas: vida útil prolongada a $>4^{\circ}\text{C}$ y a $<20^{\circ}\text{C}$, tolerancia al aumento de temperatura ($60-80^{\circ}\text{C}$, varias semanas a 37°C), resistencia a la degradación proteolítica, exposición a pH no fisiológico (rango de pH 3.0-9.0), y desnaturizantes químicos (cloruro de guanidinio 2-3 M, urea 6-8 M), los cuales apenas dañan su capacidad de unión a antígenos (11).



Como se mencionó anteriormente en el suero de los camélidos circulan tanto anticuerpos IgG convencionales como anticuerpos de cadena pesada. La proporción de estos últimos es variable, en camellos podría oscilar entre 50 a 80%, mientras que en las especies sudamericanas podrían estar entre 10 – 25% (13). En relación a los IgNAR de tiburón la proporción es más baja, oscilando en aproximadamente 5% del total de inmunoglobulinas del torrente sanguíneo (3,11).

Aunque también se han identificado anticuerpos de cadena pesada en peces cartilaginosos (tiburones y rayas) (3), la mayoría de las investigaciones se han realizado en camélidos debido a su facilidad de manipulación e inmunización.

Producción de Nanoanticuerpos

El hecho de que los anticuerpos de cadena pesada sean más pequeños que los anticuerpos convencionales, es relevante

debido a que para muchas aplicaciones el tamaño de un anticuerpo completo es incompatible con algunas de las funciones requeridas para ellos, y por esta razón se intenta reducir las moléculas de anticuerpos a la unidad mínima que pueda reconocer al antígeno. Esto puede hacerse mediante digestión proteolítica usando papaína y/o pepsina para obtener fragmentos Fab. Los cuales conservan las propiedades de unión al antígeno, pero requieren un esfuerzo considerable para producirlos de manera adecuada. Los biólogos moleculares pueden reducir aún más estos fragmentos para crear los denominados fragmentos variables de una sola cadena (scFv), en los que las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas por un enlazador peptídico. Figura 2. El problema que a menudo surge con estos fragmentos es que no han pasado por la vía secretora de una célula eucariota y, en consecuencia, tienden a ser propensos a la agregación y pueden requerir una optimización



considerable antes de terminar con un producto estable (12).

Los anticuerpos de cadena pesada producidos por los camélidos no tienen tales desventajas porque pueden reducir el módulo de reconocimiento a sólo la región variable de la cadena pesada, y a diferencia de lo que se aplica a los anticuerpos tradicionales todas las características de la estructura requeridas para el reconocimiento específico del antígeno, se encuentran dentro de las regiones variables de la cadena pesada. Como se mencionó anteriormente, estos fragmentos VHH, también se denominan comúnmente “nanocuerpos o nanoanticuerpos”. Algunas de las propiedades que hacen que estos NAc sean tan atractivos, incluyen el hecho de que se pueden producir en bacterias con alto rendimiento, muchos de ellos no requieren ni glicosilación, ni enlaces disulfuro para su estabilidad y su pequeño tamaño permite aplicaciones para

las que incluso los scFv de una sola cadena tendrían limitaciones (13).

La clonación de un HcAb a partir de un camélido inmunizado es un proceso sencillo que requiere de un esquema de inmunización que comprende de 2 a 6 refuerzos en un periodo de 3 a 6 meses. La mayoría de las aplicaciones del mercado de los NAc dependen de una producción confiable, rentable y de gran volumen; por tanto, la clonación del repertorio de VHH de un camélido inmunizado en un vector de presentación de fagos, así como la selección de clones específicos de antígeno mediante cribado, usualmente son los métodos de elección (14).

Los linfocitos purificados de sangre periférica, ganglio linfático o bazo de un animal inmunizado se obtienen típicamente 4 a 14 días después del refuerzo final, y se utilizan para el aislamiento del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la síntesis

complementaria del ácido desoxirribonucleico (ADN). Utilizando cebadores adecuados para amplificar de forma única los fragmentos de genes que codifican los VHH, se amplifican específicamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (15). Posteriormente, los productos de amplificación por PCR purificados se clonan en un vector fagémido. Luego éstos se transfectan a una cepa de *E. coli*. Después de la infección con un fago auxiliar, se recogen bibliotecas de partículas de fagos recombinantes a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos y se seleccionan los fagos que presentan los NACs de interés mediante cribado en antígeno inmovilizado en una placa. Los fagos unidos se someten a una o más rondas de selección adicionales. De tal manera que, aunque el proceso inicia con animales inmunizados con antígenos diferentes, después de varias etapas, se obtienen NACs de especificidad definida y única que luego se pueden producir en

bacterias con alto rendimiento (15), Figura 3.

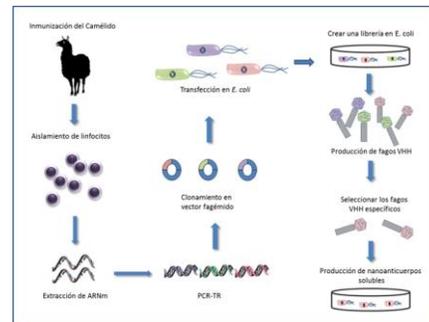


Figura 3. Producción de Nanoanticuerpos solubles

Aplicabilidad de los nanoanticuerpos

Las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas únicas de los NACs, incluyen tamaño a nanoescala, comportamiento estable y soluble en solución acuosa, elevada afinidad específica, así como una fuente sostenible. Lo que los convierten en una herramienta de investigación ideal para el desarrollo de nanobiotecnologías sofisticadas (16,17).



Dichas propiedades coinciden con los requisitos de muchas aplicaciones biomédicas y ofrecen varias ventajas en comparación al uso de anticuerpos convencionales para inmunoterapia y diagnóstico. La rápida y relativamente fácil obtención de los NAcS específicos y de alta afinidad, proporciona un amplio repertorio de moléculas de señalización intracelular, interacciones proteína-proteína y biomarcadores que pueden utilizarse en la terapia contra el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Además, los NAcS pueden clonarse fácilmente en varios formatos mediante fusión con otras proteínas o péptidos, adaptando así su utilidad para ciertas aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas. En este sentido, los NAcS se pueden fusionar con proteínas fluorescentes para producir cromocuerpos que se pueden utilizar en la localización de una sola molécula con técnicas de imágenes de superresolución (18).

Por otra parte, dado que pueden diseñarse para inducir cambios en la conformación o para discriminar entre variantes conformacionales, los NAcS pueden resultar una herramienta de investigación beneficiosa para controlar la expresión, translocación y localización subcelular de proteínas (19,20).

Los NAcS pueden personalizarse genéticamente para apuntar a enzimas, proteínas transmembrana o interacciones moleculares. Su capacidad para reconocer sitios antigénicos poco accesibles los hace especialmente interesantes y esta propiedad se ha atribuido a su tamaño más pequeño y a la capacidad del bucle CDR3 extendido para penetrar rápidamente en tales epítopos (21).

Una variedad de formatos derivados de NAcS, incluyen el nanoanticuerpo marcado con radionucleótidos o nanocuerpos marcados con colorante fluorescentes, nanocuerpos de fusión de proteína fluorescente o enzima



cromogénica, nanocuerpos bivalentes, nanocuerpos de autoensamblaje mediado por motivos homo o heteromultímeros, y nanocuerpos enlazados a nanopartículas recubiertas, entre otros, se han demostrado con éxito como potentes kits de herramientas nanobiotecnológicas para diversas aplicaciones biomédicas, incluida la administración y terapia de fármacos (22), diagnóstico de enfermedades (23), y bioimagen de altísima resolución (24).

El uso de los anticuerpos con fines terapéuticos no es nuevo. El notable éxito de los anticuerpos neutralizantes convencionales contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en la terapia de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias (25,26) ha impulsado la búsqueda de otras herramientas terapéuticas basadas en anticuerpos. Por lo tanto, se han autorizado muchos reactivos nuevos basados en anticuerpos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y alergias, así como para la terapia

inmunitaria de cánceres (27-32). Por ejemplo, la depleción de células B mediada por un anticuerpo contra CD20 (Rituximab/Rituxan), muestra efectos beneficiosos en la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades autoinmunes; se ha aprobado un anticuerpo contra IgE para el tratamiento del asma grave (Omalizumab/Xolair) y anticuerpos contra los receptores del factor de crecimiento epidérmico ErbB-1 y ErbB-2 (Cetuximab/Erbitux y Trastuzumab/Herceptin) para el tratamiento de cánceres colorrectales y de mama.

Recientemente se aprobó el uso de un nanoanticuerpo con fines terapéuticos (33). Ablynx, la compañía Sanofi, desarrolló el Nanoanticuerpo® caplacizumab (Cablivi™) un anti-factor von Willebrand (FVW), para el tratamiento de la púrpura trombocitopénica trombótica adquirida



(PTTa). Se trata de un nanoanticuerpo que inhibe la interacción entre las plaquetas y los multímeros de muy alto peso molecular del FVW y, por lo tanto, detiene la formación y acumulación de los microcoágulos que provocan la trombocitopenia, la isquemia tisular y la disfunción orgánica en la PTTa. El tratamiento con caplacizumab se ha asociado con una normalización más rápida del recuento de plaquetas y una menor incidencia de muerte relacionada con la PTTa (34).

Un aspecto prometedor del uso terapéutico de los NAcS, es el hecho de que los mismos pueden superar la barrera hematoencefálica (35). En tal sentido, se descubrió que uno de los NAcS seleccionados de una llama que se inmunizó con células endoteliales vasculares cerebrales, experimentó transcitosis y se liberó en el lado basolateral de las células endoteliales. Los estudios in vivo demostraron que el NAc

se transportó eficazmente a través de la barrera hematoencefálica y que incluso podría utilizarse para transportar cualquier carga al cerebro, incluida la partícula completa del fago M13 (36).

Debido al pequeño tamaño y la alta afinidad de los NAcS contra varios objetivos de interés, por ejemplo, moléculas de señalización intracelular y biomarcadores de cáncer, los NAcS y sus formatos derivados utilizados como nanotrazadores versátiles se han empleado con éxito para la obtención de imágenes biológicas en células vivas, la fusión genética de una proteína fluorescente con un nanocuerpo produce cromocuerpos o fluorocuerpos útiles para rastrear la diana intracelular in vivo en varios compartimentos celulares (37-39).

Los NAcS pueden utilizarse en sistemas de administración de drogas. Pueden estar químicamente adheridos a la superficie de Nanotransportadores (NPS), que



encapsulan fármacos para su entrega activa en el sitio de interés. Este es un aspecto atractivo porque protege el cuerpo contra la toxicidad sistémica. Los fármacos hidrófilos se pueden solubilizar en estructuras, como los liposomas o las micelas y además permite la administración de dosis de drogas más grandes simultáneamente, lo que podría reducir la frecuencia de administración y la inmunogenicidad (40).

Nanoanticuerpos en la terapia contra el cáncer.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) y los productos biológicos derivados de anticuerpos son herramientas esenciales para la investigación y la terapia del cáncer (41). Los anticuerpos se pueden usar para inhibir la proliferación de células tumorales y como grupos diana de dominios efectores. Muchos mAb dirigidos contra las proteínas de la superficie de las células tumorales interfieren con la función de sus proteínas

diana, por ejemplo, bloqueando la señalización a través de un receptor de factor de crecimiento o induciendo apoptosis. Al opsonizar la célula tumoral, los anticuerpos también pueden marcar las células tumorales para el ataque del sistema del complemento, las células NK y los macrófagos (42). Sin embargo, ciertas propiedades estructurales inherentes limitan la aplicabilidad de mAbs y productos biológicos derivados de anticuerpos para la terapia de tumores. El gran tamaño de los mAb (cuatro cadenas polipeptídicas, 150 kD) puede dificultar el acceso a las células tumorales. Debido a que los NAc combinan las propiedades beneficiosas de moléculas pequeñas y anticuerpos monoclonales, son agentes atractivos para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Su pequeño tamaño los hace útiles para atacar antígenos que residen en tejidos que están débilmente vascularizados y son poco accesibles. Estas moléculas muestran una mejor extravasación y penetración tisular



que los anticuerpos monoclonales clásicos, lo que obviamente es crucial para aplicaciones terapéuticas (43). El crecimiento de tumores sólidos depende de la formación de nuevos vasos sanguíneos (es decir, angiogénesis) y se han generado muchos NAc para interferir con esta vascularización (44,45).

Hasta ahora, los objetivos potenciales para las terapias basadas en NAc son los objetivos extracelulares, como los receptores de ligandos o las proteínas transmembrana con expresión diferencial en las células de interés. Con este fin, se han desarrollado NAc contra los receptores del factor de crecimiento transmembrana tipo 1 y 2 (TGRF1 y TGRF2), Receptor para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), Receptor de tirosin Kinasa (c-Met) y el receptor de quimiocinas tipo 7 (CXCR7) (46). Estos receptores se han relacionado con diferentes neoplasias. Por ejemplo, se ha encontrado VEGFR expresado en

diferentes cánceres que incluyen cáncer de cerebro, pulmón, mama y colon; c-Met está implicado en cánceres de colon, mama y ovario y neoplasias malignas hematológicas; y la sobreexpresión de CXCR7 se correlaciona con los cánceres de mama y pulmón (47,48). También se han desarrollado NAc contra objetivos extracelulares como el Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y las quimiocinas (49).

Uso de nanoanticuerpos en enfermedades virales y perspectivas en la lucha contra el SARS-CoV-2.

Para combatir los virus y prevenir su propagación, los NAc pueden interferir en diferentes niveles del ciclo de multiplicación viral, por ejemplo, al prevenir la unión del virus a las células, la entrada del virus y su posterior replicación (50). Los NAc también pueden utilizarse para ampliar nuestra comprensión de la transmisión de partículas virales. Por



ejemplo, la administración intranasal de NAcS neutralizantes puede proteger contra diferentes tipos de virus de la gripe (por ejemplo, H5N1 o H5N2) al impedir la adhesión del virus a las células del huésped y la subsiguiente replicación viral (51).

En este contexto, el SARS-CoV-2 ingresa a las células huésped a través de una interacción entre la glicoproteína de la espiga y el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2). La prevención directa de esta interacción presenta una posibilidad atractiva para suprimir la replicación del virus. En este sentido, Hanke y Colaboradores (52,53) lograron el aislamiento y caracterización de un fragmento VHH de anticuerpo de dominio único derivado de la alpaca, el cual denominaron Ty1, dirigido específicamente contra un dominio globular situado en la superficie distal de la proteína de la espiga de SARS-CoV-2, previniendo directamente su unión a ECA-2. Ty1 es un nanoanticuerpo de 12,8 kDa,

puede expresarse en grandes cantidades en bacterias, lo que representa una gran oportunidad para su fabricación a gran escala y lo convierte en un excelente candidato como intervención contra la COVID-19.

Recientemente se ha informado que los anticuerpos de neutralización amplia, como 47D11, S309 y VHH-72, se dirigen a una región conservada en el dominio de unión al receptor (RBD) de la subunidad S1 de la proteína de la espícula. Debido a su pequeño tamaño y alta estabilidad, los anticuerpos de dominio único podrían tener la capacidad de ser administrados utilizando un inhalador, lo que los convierte en terapias potencialmente atractivas para las infecciones respiratorias (54).

CONCLUSIÓN

Desde el descubrimiento de anticuerpos de cadena pesada de origen natural en sueros de camélidos y el desarrollo de tecnologías



para clonar e identificar sus fragmentos de unión a antígenos, conocidos como NAcS, el número y la gama de posibles aplicaciones con NAcS parecen haberse disparado. Respaldados por propiedades bioquímicas y biofísicas beneficiosas intrínsecas, los NAcS son una entidad de orientación robusta que se ensambla o incorpora fácilmente en construcciones más complejas. Incluso en ausencia de un efecto terapéutico intrínseco, su conjugación con agentes quimioterapéuticos genera compuestos de administración de fármacos muy prometedores. Aunque los nanoanticuerpos monoméricos pequeños suelen ser superiores a los anticuerpos clásicos para aplicaciones terapéuticas, todavía tienen sus propios inconvenientes, como un aclaramiento renal rápido que evita una carga elevada en el tejido enfermo e induce toxicidad renal. Sin embargo, hay herramientas y estrategias disponibles para diseñar los NAcS en construcciones de próxima generación de

mayor eficacia y con menos efectos secundarios.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993;363(6428):446-448. doi:10.1038/363446a0.
2. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol*. 2001;74(4):277-302. doi:10.1016/s1389-0352(01)00021-6.
3. Zielonka S, Empting M, Grzeschik J, Könnig D, Barelle CJ, Kolmar H. Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *MAbs*. 2015;7(1):15-25. doi:10.4161/19420862.2015.989032.
4. Shao CY, Secombes CJ, Porter AJ. Rapid isolation of IgNAR variable single-



domain antibody fragments from a shark synthetic library. *Mol Immunol.* 2007;44(4):656-665.

doi:10.1016/j.molimm.2006.01.010.

5. Jovčevska I, Muyltermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs.* 2020 Feb;34(1):11-26. doi: 10.1007/s40259-019-00392-z.

6. Elbakri A, Nelson PN, Abu Odeh RO. The state of antibody therapy. *Hum Immunol.* 2010;71(12):1243-1250. doi:10.1016/j.humimm.2010.09.007.

7. Conroy PJ, Law RH, Caradoc-Davies TT, Whisstock JC. Antibodies: From novel repertoires to defining and refining the structure of biologically important targets. *Methods.* 2017;116:12-22. doi:10.1016/j.ymeth.2017.01.003.

8. Chiu ML, Gilliland GL. Engineering antibody therapeutics. *Curr Opin Struct Biol.* 2016 Jun;38:163-73. doi: 10.1016/j.sbi.2016.07.012. Epub 2016 Aug 12. PMID: 27525816.

9. Khodabakhsh F, Behdani M, Rami A, Kazemi-Lomedasht F. Single-Domain

Antibodies or Nanobodies: A Class of Next-Generation Antibodies. *Int Rev Immunol.* 2018;37(6):316-322. doi: 10.1080/08830185.2018.1526932. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30741045.

10. Liu Y, Huang H. Expression of single-domain antibody in different systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 Jan;102(2):539-551. doi: 10.1007/s00253-017-8644-3. Epub 2017 Nov 25. PMID: 29177623.

11. Henry KA, MacKenzie CR. Antigen recognition by single-domain antibodies: structural latitudes and constraints. *MAbs.* 2018 Aug/Sep;10(6):815-826. doi: 10.1080/19420862.2018.1489633. Epub 2018 Aug 15. PMID: 29916758; PMCID: PMC6260137.

12. Ingram JR, Schmidt FI, Ploegh HL. Exploiting Nanobodies' Singular Traits. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:695-715. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053327.

12. Harmsen MM, De Haard HJ Properties, production, and applications of



camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007, 77(1):13–22. doi:10.1007/s00253-007-1142-2.

14. Reader RH, Workman RG, Maddison BC, Gough KC. Advances in the Production and Batch Reformatting of Phage Antibody Libraries. *Mol Biotechnol.* 2019 Nov;61(11):801-815. doi: 10.1007/s12033-019-00207-0. PMID: 31468301; PMCID: PMC6785589.

15. Schoonooghe S, Laoui D, Van Ginderachter JA, et al. Novel applications of nanobodies for in vivo bio-imaging of inflamed tissues in inflammatory diseases and cancer. *Immunobiology.* 2012;217(12):1266-1272. doi:10.1016/j.imbio.2012.07.009.

16. Muyltermans S, Baral TN, Retamozzo VC, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128(1-3):178-183. doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.299.

17. Huang L, Muyltermans S, Saerens D. Nanobodies®: proficient tools in

diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10(6):777-785.

doi:10.1586/erm.10.62.

18. Prole DL, Taylor CW. A genetically encoded toolkit of functionalized nanobodies against fluorescent proteins for visualizing and manipulating intracellular signalling. *BMC Biol.* 2019 May 23;17(1):41. doi: 10.1186/s12915-019-0662-4. PMID: 31122229; PMCID: PMC6533734.

19. Farrants H, Tarnawski M, Müller TG, Otsuka S, Hiblot J, Koch B, Kueblbeck M, Kräusslich HG, Ellenberg J, Johnsson K. Chemogenetic Control of Nanobodies. *Nat Methods.* 2020 Mar;17(3):279-282. doi: 10.1038/s41592-020-0746-7. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32066961.

20. Kirchhofer A, Helma J, Schmidthals K, et al. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(1):133-138. doi:10.1038/nsmb.1727.

21. Ariotti N, Rae J, Giles N, Martel N, Sierceki E, Gambin Y, Hall TE, Parton



- RG. Ultrastructural localisation of protein interactions using conditionally stable nanobodies. *PLoS Biol.* 2018 Apr 5;16(4):e2005473. doi: 10.1371/journal.pbio.2005473. PMID: 29621251; PMCID: PMC5903671.
22. de Marco A. Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microb Cell Fact.* 2011;10:44. Published 2011 Jun 9. doi:10.1186/1475-2859-10-44.
23. De Meyer T, Muyldermans S, Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol.* 2014;32(5):263-270. doi:10.1016/j.tibtech.2014.03.001.
24. Schumacher D, Helma J, Schneider AFL, Leonhardt H, Hackenberger CPR. Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2018 Feb 23;57(9):2314-2333. doi: 10.1002/anie.201708459. Epub 2018 Jan 26. PMID: 28913971; PMCID: PMC5838514.
25. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):364-371. doi:10.1038/nri802.
26. Bek S, Bojesen AB, Nielsen JV, et al. Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* 2017;17(5):403-411. doi:10.1038/tpj.2017.26.
27. Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(4):450-459. doi:10.1016/j.coi.2008.06.004.
28. Katz SC, Burga RA, McCormack E, et al. Phase I Hepatic Immunotherapy for Metastases Study of Intra-Arterial Chimeric Antigen Receptor-Modified T-cell Therapy for CEA+ Liver Metastases. *Clin Cancer Res.* 2015;21(14):3149-3159. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1421.
29. Zhandossov O, Kaussova G, Koten A. Combined treatment for gastric cancer: Immunological approach. *Turk J*



- Gastroenterol. 2018;29(2):151-156.
doi:10.5152/tjg.2018.17398.
30. Granier C, Karaki S, Roussel H, et al. Immunothérapie des cancers : rationnel et avancées récentes [Cancer immunotherapy: Rational and recent breakthroughs]. Rev Med Interne. 2016;37(10):694-700.
doi:10.1016/j.revmed.2016.05.023.
31. Odunsi K. Immunotherapy in ovarian cancer. Ann Oncol. 2017;28(suppl_8):viii1-viii7.
doi:10.1093/annonc/mdx444.
32. Morrison AH, Byrne KT, Vonderheide RH. Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. Trends Cancer. 2018;4(6):418-428.
doi:10.1016/j.trecan.2018.04.001.
33. Duggan S. Caplacizumab: First Global Approval [published correction appears in Drugs. 2018 Dec;78(18):1955]. Drugs. 2018;78(15):1639-1642.
doi:10.1007/s40265-018-0989-0.
34. Scully M, Cataland SR, Peyvandi F, et al. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. N Engl J Med. 2019;380(4):335-346.
doi:10.1056/NEJMoa1806311.
35. Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. FASEB J. 2002;16(2):240-242. doi:10.1096/fj.01-0343fje.
36. Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D. The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. J Neurochem. 2005;95(4):1201-1214.
doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03463.x.
37. Debie P, Devoogdt N, Hernot S. Targeted Nanobody-Based Molecular Tracers for Nuclear Imaging and Image-Guided Surgery. Antibodies (Basel). 2019;8(1):12. Published 2019 Jan 11.
doi:10.3390/antib8010012.



38. Beghein E, Gettemans J. Nanobody Technology: A Versatile Toolkit for Microscopic Imaging, Protein-Protein Interaction Analysis, and Protein Function Exploration. *Front Immunol.* 2017;8:771. Published 2017 Jul 4. doi:10.3389/fimmu.2017.00771.
39. Traenkle B, Rothbauer U. Under the Microscope: Single-Domain Antibodies for Live-Cell Imaging and Super-Resolution Microscopy. *Front Immunol.* 2017;8:1030. Published 2017 Aug 24. doi:10.3389/fimmu.2017.01030.
40. Muhammad F, Nguyen TDT, Raza A, Akhtar B, Aryal S. A review on nanoparticle-based technologies for biotransformation. *Drug Chem Toxicol.* 2017;40(4):489-497. doi:10.1080/01480545.2016.1277736.
41. Strohl WR. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein Cell.* 2018;9(1):86-120. doi:10.1007/s13238-017-0457-8.
42. Arezumand R, Alibakhshi A, Ranjbari J, Ramazani A, Muyldermans S. Nanobodies As Novel Agents for Targeting Angiogenesis in Solid Cancers. *Front Immunol.* 2017;8:1746. Published 2017 Dec 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01746.
43. Nikooharf A, Arezumand R, Mansouri K, Khoshi AH, Namdar Ahmadabad H. Development of a Recombinant Monospecific Anti-PLGF Bivalent Nanobody and Evaluation of it in Angiogenesis Modulation. *Mol Biotechnol.* 2020;62(11-12):580-588. doi:10.1007/s12033-020-00275-7.
44. Arezumand R, Mahdian R, Zeinali S, et al. Identification and characterization of a novel nanobody against human placental growth factor to modulate angiogenesis. *Mol Immunol.* 2016;78:183-192. doi:10.1016/j.molimm.2016.09.012.
45. Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Bagheri KP, et al. Inhibition of angiogenesis in human endothelial cell using VEGF specific nanobody. *Mol Immunol.* 2015;65(1):58-67. doi:10.1016/j.molimm.2015.01.010.



46. Kijanka M, Dorresteyn B, Oliveira S, van Bergen and Henegouwen PM. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine (Lond)*. 2015; 10 (1): 161–174. doi: 10.2217 / nmm.14.178.
47. Moradi A, Pourseif MM, Jafari B, Parvizpour S, Omidi Y. Nanobody-based therapeutics against colorectal cancer: Precision therapies based on the personal mutanome profile and tumor neoantigens. *Pharmacol Res*. 2020;156:104790. doi:10.1016/j.phrs.2020.104790.
48. Hu Y, Liu C, Muyldermans S. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. *Front Immunol*. 2017;8:1442. Published 2017 Nov 2. doi:10.3389/fimmu.2017.01442.
49. Vosjan MJ, Vercammen J, Kolkman JA, Stigter-van Walsum M, Revets H, van Dongen GA. Nanobodies targeting the hepatocyte growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(4):1017–1025. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0891.
50. Schotte L, Strauss M, Thys B, et al. Mechanism of action and capsid-stabilizing properties of VHHs with an in vitro antipoliioviral activity. *J Virol*. 2014;88(8):4403-4413. doi:10.1128/JVI.03402-13.
51. Cardoso FM, Ibañez LI, Van den Hoecke S, et al. Single-domain antibodies targeting neuraminidase protect against an H5N1 influenza virus challenge. *J Virol*. 2014;88(15):8278-8296. doi:10.1128/JVI.03178-13.
52. Hanke L, Vidakovics Perez L, Sheward DJ, et al. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. *Nat Commun*. 2020;11(1):4420. Published 2020 Sep 4. doi:10.1038/s41467-020-18174-5.
53. Ezzikouri S, Nourlil J, Tsukiyama-Kohara K, et al. Nanobodies: an unexplored opportunity to combat COVID-19 [published online ahead of print, 2020 Nov 10]. *J Biomol Struct Dyn*. 2020;1-3. doi:10.1080/07391102.2020.1845801



54. Ho M. Perspectives on the development of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Antib Ther.* 2020;3(2):109-114.
doi:10.1093/abt/tbaa009