



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

***Diseño, desarrollo y caracterización bioquímica y funcional
de nanoanticuerpos VHH monovalentes dirigidos contra las
proteínas del virus de influenza tipo A H1N1 y H3N2***

Tesis presentada para optar por el título de Doctor
de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Carla Solange Sosa Holt

Directora de Tesis: Dra. Mariana Puntel
Consejero de estudios: Dr. Luis Scolaro

Lugar de trabajo: Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar

DEDICATORIA

A mi familia, quien incondicionalmente me acompañan en el camino de ser.

AGRADECIMIENTOS

A Mariana, Vivi y Andy, por la oportunidad, el espacio, el tiempo y los aprendizajes que me llevo.

A todos mis compañeros de INCUINTA, que me acompañaron, me apoyaron, me sostuvieron y con los cuales los días fueron más amenos, cargados de aprendizajes, momentos únicos, muchas risas y muchas lágrimas.

A todas las personas del Instituto de Virología, por los aprendizajes, por sus palabras, por las charlas y abrazos de pasillos, por las preguntas, por las respuestas, por todos los momentos compartidos. Gracias por la generosidad de su gente, que comparte el conocimiento, su aliento y sus mates.

A todo INTA Castelar, con todas sus personas, su jardín, con las señas, que sostienen el trabajo cuidando a nuestros niños.

A mi Universidad, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que fue siempre un hogar, sitio del descubrimiento, con sus docentes generosos.

A mi familia, que siempre acompaña, aunque el camino se vea tortuoso.

A mis papás, por su confianza infinita.

A David, a Pablo, a Maia. Porque todo es mejor junto a ellos.

RESUMEN

El virus de la Influenza tipo A continúa siendo responsable de brotes y epidemias, además de pandemias con graves consecuencias para la salud humana. Los virus tipo H1N1 y H3N2 están establecidos en la población humana como virus estacionales, representando los subtipos prevalentes. La hemaglutinina (HA) es el antígeno inmunodominante que contiene en su dominio globular (HA1) el sitio de unión al receptor celular (RBS) que induce anticuerpos neutralizantes asociados con la protección contra la infección. En el presente trabajo se caracterizaron nanoanticuerpos (VHHs) derivados de llama inmune específicos para el virus de la Influenza tipo A, con el fin de investigar su potencial como herramienta terapéutica. Se seleccionaron 10 VHHs específicos contra H1N1. Dos VHHs (B33 y D81) mostraron unión específica contra los subtipos H1, H5 y H3, que reconocieron epítopes lineales. B33 se unió cerca del N-terminal del tallo de HA (HA2) y D81 se unió cerca del C-terminal de HA1. Debido a su amplio rango de reconocimiento, los VHH B33 y D81 podrían considerarse candidatos para complementar herramientas de diagnóstico. Cinco VHH neutralizantes (A5, D81, D91, E13 y G41) reconocieron epítopes ubicados en HA1. E13 y G41 reconocieron epítopes conformacionales en HA1, y mostraron capacidad neutralizante contra otros 6 virus de origen humano, aviar y porcino, aislados entre los años 1934 y 2018. Este último dato sugiere que el epítipo involucrado en el reconocimiento sería altamente conservado, requisito necesario para la elección de una herramienta terapéutica de aplicación universal. En el modelo ratón, VHH E13 mostró efecto profiláctico esterilizante contra los virus H1N1 (hu/Arg/09, hu/Arg/09 ma, y hu/PR8/34) en todo el rango de dosis administradas (5 mg/kg a 0,05 mg/kg), y no fue posible detectar virus en los pulmones de los animales tratados el día 4 después de la exposición. Por otro lado, G41 mostró un efecto profiláctico específico frente a la cepa hu/Arg/09 (dosis 5 mg/kg) y una protección parcial frente a la misma adaptada al ratón y frente al hu/PR8/34, logrando en el 100% de los animales el mantenimiento del peso a lo largo del ensayo. Se destaca la capacidad de E13 para controlar la infección por H1N1 en ratones, respaldando su desarrollo como un inmuno-terapéutico para la profilaxis y el tratamiento del virus Influenza. Por otro lado, se encontraron eficacias profilácticas similares para los VHHs E13 y G41 expresados en *P. Pastoris*, lo cual evidencia la factibilidad de la elaboración de estos VHHs en un sistema de expresión frecuentemente utilizado por la industria farmacéutica. A su vez, se detectó una respuesta inmune humoral disminuida en los animales que reciben tratamiento específico con E13, o con G41, sugiriendo que la inmunidad pasiva desata un menor compromiso de la respuesta inmune endógena en los individuos tratados. Adicionalmente, no se observó una respuesta específica contra los VHHs suministrados lo que agrega un dato de seguridad de los VHHs terapéuticos. Por otro lado, a través de un biopaneó se realizó la búsqueda de nanoanticuerpos específicos contra el virus H3N2 hu/Perth/09. De los 26 clones obtenidos fue posible obtener 8 clones para su futura caracterización. A su vez, en el presente estudio se presenta el trabajo de la puesta a punto del modelo cobayo de infección con virus influenza, el cual no requiere de la adaptación de los virus de origen humano, con potencial aplicación a la eficacia tanto terapéutica como profiláctica de los VHHs, como así también el estudio del bloqueo de la transmisión viral por contacto. De los resultados anteriores se desprende que la administración local de los VHHs neutralizantes, E13 y G41 otorga protección total frente a la infección viral con virus influenza H1N1, y respalda su desarrollo posterior como componente activo de inmunoterapéuticos y su transferencia a la clínica médica.

Design, development and biochemical and functional characterization of monovalent nanoantibodies against subtypes H1N1 and H3N2 of type A influenza viruses.

ABSTRACT

The Influenza A virus is responsible for outbreaks and epidemics, as well as pandemics with serious consequences for human health. The H1N1 and H3N2 virus appeared in the human population as seasonal viruses, and both have represented the prevalent subtypes. Hemagglutinin (HA) is the major immunodominant protein which contains in its globular domain (HA1) the cell receptor binding site (RBS) that induces neutralizing antibodies associated with protection against infection. In the present work, llama-derived nanobodies (VHH) specific for Influenza A virus were characterized in order to investigate their potential as a therapeutic tool. Ten H1N1-specific VHHs were selected. Two VHHs (B33 and D81) showed specific binding against subtypes H1, H5 and H3, which recognized linear epitopes. The nanobody B33 bound near the N-terminus of the HA stem (HA2) while D81 bound near the C-terminus of HA1. Due to their wide recognition range, the VHHs B33 and D81 could be considered candidates for diagnostic tools. Five neutralizing VHHs (A5, D81, D91, E13 and G41) recognized epitopes located on HA1. E13 and G41 recognized conformational epitopes on HA1 and showed neutralizing capacity against 6 other viruses of human, avian and porcine origin, isolated between 1934 and 2018. This last data suggests that the epitope involved in the recognition would be highly conserved, a necessary requirement for a therapeutic tool potentially applicable globally. In the mouse model, E13 showed a sterilizing prophylactic effect against H1N1 viruses (hu/Arg/09, hu/Arg/09 ma, and hu/PR8/34) throughout the range of administered doses (5 mg/kg to 0,05 mg/kg), and no virus was detectable in the lungs of treated animals on day 4 post-challenge. On the other hand, G41 showed a specific prophylactic effect against the hu/Arg/09 strain (dose 5 mg/kg) and partial protection against it adapted to mice and against hu/PR8/34, with no significant weight loss throughout the trial. Therefore, it is highlighted the ability of E13 to control H1N1 infection in mice, supporting its development as an immunotherapeutic for prophylaxis and treatment for influenza virus infection. Similar prophylactic efficacies were found for VHHs E13 and G41 expressed in *P. pastoris*, an expression system frequently used by the pharmaceutical industry. In addition, a reduced humoral immune response was detected for the animals treated with E13, or with G41, demonstrating that passive immunity unleashes a lower commitment of the endogenous immune response in the treated individuals. Furthermore, no specific response against the supplied VHHs was observed, which adds a safety data of the therapeutic uses of the VHHs.

Furthermore, after the selection of VHHs against H3N2 hu/Perth/09 virus 26 clones were obtained, and 8 clones are available for future characterization.

In addition, this work presents the development of the guinea pig model of influenza virus infection, which does not require the adaptation of viruses of human origin, with potential application to both therapeutic and prophylactic efficacy of VHHs, as well as the setup of the guinea pig model for future application to the study of the blocking of viral transmission by contact.

The above results, would suggest that the local administration of the neutralizing VHH, E13 gives total protection against viral infection with most H1N1 influenza viruses, and supports their subsequent development as an active component of immunotherapeutics and their translation to the clinical setting.

PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

Crowell, L.; Goodwine, C.; **Sosa-Holt, C.**; Rocha, L.; Vega, C.; Rodriguez, S.; Dalvie, N.; Tracey, M.; Puntel, M.; Wigdorovitz, A.; Parreño, V.; Love, K.; Cramer, S.; Love, C. **Development of a platform process for the production and purification of single-domain antibodies.** *Biotechnology and Bioengineering.* 2021;1–11. doi: 10.1002/bit.27724.

Patente N°20220101478. INPI. Título: **Nanoanticuerpos (VHH) que se unen al virus de la gripe y sus dominios CDR3 correspondientes, composiciones, métodos, usos y kits.** Inventores: Parreño, V.; Puntel, M.; Ibañez, I.; Garaicoechea, L.; Barbieri, E.; **Sosa Holt, C.**; Baztarrica, J.; Wigdorovitz, A. Titulares: CONICET/INTA (2022).

Barbieri, E*; **Sosa Holt, C. ***; Ibañez, L. I.; Baztarrica, J.; Garaicoechea, L.; Cáceres C.J.; Aduriz, M., Baumeister, E.; Martínez Escribano, J. A.; Wigdorovitz, A.; Parreño, V. and Puntel, M. **Monomeric nanobody against influenza A H1N1 hemagglutinin transfers sterilizing immunity against H1 subtypes after intranasal administration.** (enviado, 2022) * *Autoría compartida*

COMUNICACIONES ORIGINADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

- 2021 **XIII Congreso. Argentino de Virología 2021. Noviembre-Diciembre 2021.** *“Nanoanticuerpos específicos contra hemagglutinina, con aplicación diagnóstica y profiláctica, como una potencial herramienta para el control de infecciones contra virus influenza H1N1 origen humano y animal”.* **Carla Solange Sosa Holt**; Elena Susana Barbieri; Lorena Itatí Ibañez; Josefina Baztarrica; Lorena Garaicoechea; Claire Gay; Carlos Joaquín Cáceres; Elsa Baumeister; José Ángel Martínez Escribano; Daniel Pérez; Andrés Wigdorovitz; Gladys Viviana Parreño; Mariana Puntel.
- 2018 **XXXVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología.** Valle Hermoso, Córdoba, Argentina. Diciembre 2018. *“VHHs específicos para HA de PR8, presentan efecto profiláctico contra la infección con el aislamiento argentino H1N1 A/Argentina/017/2009 adaptado al ratón”.* **Sosa Holt, C.**; Baztarrica, J.; Barbieri, E.; Asenzo, G.; Ibañez, I.; Baumeister, E.; Wigdorovitz, A.; Parreño, V.; Puntel, M
- 2017 **XII Congreso Argentino de Virología. Sociedad Argentina de Virología.** Buenos Aires, Argentina. Septiembre 2017. *“Capacidad neutralizante contra la cepa H1N1 PR8M de nanoanticuerpos HA0 específicos”.* **Sosa-Holt, C.**; Baztarrica, J.; Barbieri, E.; Garaicoechea, L.; Asenzo, G.; Ibañez, I.; Baumeister, E.; Wigdorovitz, A.; Parreño, V.; Puntel, M.
- 2016 **XXXIII Reunión Científica Anual. Sociedad Argentina de Virología.** Buenos Aires, Argentina. Diciembre 2016. *“Nanoanticuerpos contra la proteína HA del Virus de Influenza A H1N1 con capacidad neutralizante”.* **Sosa-Holt, C.*;** Baztarrica, J.*; Puntel, M.; Barbieri, E.; Garaicoechea, L.; Baumeister, E.; Wigdorovitz, A.; Parreño, V. * *Autoría compartida*

PROYECTOS INTA Y EXTRA INTA QUE CONTRIBUYERON A LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO DE TESIS

- Becas doctorales a C.S. Sosa Holt. Directora: M. Puntel. Co-Directora: V. Parreño.
- Beca PICT 2014-1437, periodo: 2016-2019
- Beca CONICET tipo 2, periodo 2019-2022
- PICT Argentina innovadora 2020. N N°1437-2014. Nanoanticuerpos VHH mono y multivalentes contra el virus de Influenza A de aplicación profiláctica y terapéutica. IR: Dra. Parreño.
- PID 2015-2017. Universidad de Morón. Nanoanticuerpos VHH contra el virus de influenza a de potencial aplicación profiláctica y diagnostica. IR: M.Puntel.
- Beca de investigación postdoctoral a M. Puntel, cofinanciada Comision Fulbright y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas Argentina. Realizada en el laboratorio del Dr. Daniel Perez, Center of vaccines and immunology, University of Georgia, USA. 2021
- Convenio de vinculación tecnológica, INTA-ALGENEX, CVT N° 2770. Producción de anticuerpos VHH de Camélidos Sudamericanos. IRs: A. Wigdorovitz – V. Parreño – J.A. Martínez-Escribano. Autorizado, 8-2008.
- Actividad informada en el sub-módulo VHH, del Módulo Diagnóstico Molecular (responsable: I. Álvarez) dentro del Proyecto Específico PNPA-11260817 (responsable: A. Berinstein). Biotecnologías reproductivas y desarrollo de metodologías de diagnóstico, control y prevención de las enfermedades infecciosas y parasitarias que afectan la concepción, gestación y período neonatal en especies de interés zootécnico.

Los experimentos del presente trabajo se pudieron realizar gracias a la colaboración de profesionales referentes en el tema:

Principalmente la Dra. Viviana Parreño.

Dra. Lorena Garaicoechea y Dra. Elena Barbieri quienes junto a Ms. Josefina Baztarrica desarrollaron los VHHs contra H1N1, y el equipo de expertos en VHHs de INCUINTA.

Parte de los experimentos se realizaron en los laboratorios de:

Dra. Itatí Ibáñez.

Dr. Daniel Pérez, en especial al Dr. Joaquín Cáceres. Universidad de Georgia, EEUU.

Materiales de referencia cedidos por:

Dra. Elsa Baumeister. INEI, Malbrán. Virus de referencia y el aislamiento pandémico argentino.

Dr. JA Martínez- Escribano. Proteínas recombinantes HA y M2.

El seguimiento y la colaboración en la realización de este trabajo de Tesis, en INTA gracias a la dedicación de: Dra. Barrandeguy, Dra. Mongini y Dra. Rimondi; y en FCEyN, UBA con Dra. Ibáñez, Dra. Rimondi; con la tutoría y colaboración del Dr. Luis Scolaro.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABTS	[2.2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)]
ADN	Ácido desoxidorribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Ácido siálico
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albúmina de suero bovino
CPE	Efecto citopático
DICT	Dosis Infecciosas de Cultivo de Tejido
DL	Dosis Letal
DO	Densidad óptica
Dpi	Días post-infección
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> , Ensayo por inmunoadsorción ligado a Enzimas
Fab	<i>Antigen-binding Fragments</i> , Fragmentos de unión a antígenos
Fv	<i>Variable Fragments</i> , Fragmentos variables
GLC	Ganglios Linfáticos Cervicales
HA	Hemaglutinina
HCAbs	<i>Heavy Chain Antibodies</i> , Anticuerpos de cadena pesada
HEF	Proteína Hemaglutinina-Esterasa-Fusión
HPAI	<i>Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses</i> , Virus Influenza de Alta Patogenicidad
Ig/Igs	Inmunoglobulina/s
IHA	Inhibición de la hemaglutinación
In	Intranasal
Iv	Intravenoso
LN	Lavado nasal
LPAI	<i>Low Pathogenic Avian Influenza Viruses</i> , Virus Influenza de Baja Patogenicidad
M1	Proteína de matriz
M2	Canal iónico
mAbs	<i>Monoclonal Antibodies</i> , Anticuerpos monoclonales
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i> , Línea de cultivo celular Madin-Darby de riñón canino
MN	Microneutralización
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína para la exportación nuclear
NP	Nucleocápside
ON	<i>Overnight</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> , Tampón fosfato salino
RBS	<i>Receptor Binding Site</i> , Sitio de Unión al Receptor
RNP	Ribonucleoproteínas
scFv	<i>Single-chain variable fragments</i> , Segmentos variables de cadena única
t ₀	Tiempo inicial
t _f	Tiempo final
VHH	<i>Variable Heavy chain from Heavy chain antibody</i> , Cadena pesada variable del anticuerpo de cadena pesada
VIA	Virus Influenza de origen Aviar

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	15
VIRUS INFLUENZA	16
Generalidades	16
VIRUS INFLUENZA TIPO A	18
Morfología y estructura	18
Genoma y proteínas virales	19
Ciclo de replicación	20
LA HEMAGLUTININA (HA)	22
Especificidad de la HA y su unión al receptor celular	23
Sitios antígenicos de la HA	27
EVOLUCIÓN VIRAL, HUÉSPEDES Y EPIDEMIAS	29
EPIDEMIOLOGIA DE LOS VIRUS H1N1 Y H3N2	32
ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD	33
INMUNOGLOBULINAS DERIVADAS DE CAMÉLIDOS	34
Generalidades de las inmunoglobulinas	34
Inmunoglobulinas derivadas de camélidos	35
Inmunoglobulinas y tecnología VHH como herramientas terapéuticas y diagnósticas	38
RESPUESTA INMUNE A INFLUENZA	42
Tipos de inmunoglobulinas en la respuesta al virus Influenza	43
MODELOS DE ESTUDIO DEL VIRUS INFLUENZA	43
HIPÓTESIS DE TRABAJO	46
OBJETIVO GENERAL	49
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
MATERIALES Y MÉTODOS	51
CULTIVOS CELULARES	52
CEPAS VIRALES	52
STOCK VIRAL	53
Generación de stock viral en monocapas de células MDCK	53
Generación de stock viral en huevos embrionados de gallina	53
Concentración de virus Influenza por gradiente discontinuo de sacarosa	55
Concentración de virus Influenza por ultracentrifugación	55
Purificación viral por Sartobind Q	55
REACTIVOS	56

Proteínas recombinantes.....	56
Plásmidos	56
Cepas de <i>Escherichia coli</i>	56
Sueros inmunes utilizados. Suero de llama H1N1	56
Suero de animales.....	57
Obtención de glóbulos rojos de gallina.....	57
Obtención de glóbulos rojos de cobayo	57
CARACTERIZACIÓN DE STOCK VIRAL	58
Titulación viral por hemaglutinación	58
Titulación por infectividad de monocapas de células MDCK	58
Titulación por ELISA de monocapas de células MCDK infectadas con virus	59
CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE NANOANTICUERPOS.....	59
Concentración media efectiva (CE ₅₀) definida como la concentración de VHH requerida para alcanzar el 50% de la señal.....	59
Inhibición de la hemaglutinación.....	60
Arreglo de péptidos	60
ELISA en condiciones reductoras.....	61
Estudio de especificidad mediante reactividad cruzada contra cepas heterólogas por ELISA.....	61
ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE HA Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE UNIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INTERACCIÓN DE DE PROTEÍNAS	62
Extracción de RNA.....	62
Análisis de secuencias.....	62
Modelado molecular.....	62
Interacción proteína-proteína	64
Análisis filogenético de secuencias de HA de los virus utilizados	65
CARACTERIZACIÓN EN MODELO <i>IN VIVO</i> : MODELO MURINO	65
Animales.....	65
Diseño experimental.....	65
Procesamiento de pulmón y titulación viral de homogenato de pulmón.....	65
Obtención de sangre entera y sueros	66
Adaptación de la cepa H1N1 hu/Arg/09 al ratón.....	66
Eficacia profiláctica de nanoanticuerpos en el modelo ratón.....	67
Estudio de la eficacia profiláctica de nanoanticuerpos expresados en distintos sistemas de expresión (<i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i>) en el modelo ratón	67
Técnica de ELISPOT. Evaluación de la respuesta inmune frente al desafío viral y tratamientos mediados por VHHs	68

CARACTERIZACIÓN EN MODELO <i>IN VIVO</i> : MODELO COBAYO.....	69
Animales.....	69
Modelo de infección por contagio. Inoculación viral y monitoreo de los animales	70
Diseño experimental para el estudio de eficacia profiláctica de los VHHs en el modelo de infección por contagio	70
Análisis de inocuidad de los VHHs como tratamiento intranasal en el modelo cobayo	71
Lavado nasal (LN) y determinación de título viral	71
Determinación de título de anticuerpos en suero de cobayo	71
ESTADÍSTICA	72
BIOPANEAO: DISPLAY EN FAGOS Y SELECCIÓN DE NANOANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA H3N2 PERTH	72
Rondas de biopaneao	72
ELISA de fagos.....	72
Análisis de secuencias.....	72
RESULTADOS	74
CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS NANOANTICUERPOS	75
Estudio de reactividad cruzada heterosubtípica de los nanoanticuerpos mediante ELISA y neutralización viral <i>in vitro</i>	75
Mapeo de los epítomos lineales de VHH B33 y D81, con reactividad heterosubtípica mediante arreglo de péptidos e interacción de proteína-proteína	77
CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LOS NANOANTICUERPOS: MODELO RATÓN.....	85
Adaptación de la cepa H1N1 hu/Arg/09 al ratón.....	85
Estudio de eficacia profiláctica de nanoanticuerpos neutralizantes <i>in vitro</i> en el modelo ratón	88
Estudio de la dosis efectiva de los nanoanticuerpo E13 y G41 en el modelo ratón	93
Evaluación de la respuesta de anticuerpos frente al tratamiento profiláctico y al desafío viral.....	95
CARACTERIZACIÓN DIFERENCIAL DE NANOANTICUERPOS EXPRESADOS EN <i>P. PASTORIS</i> Y EN <i>E. COLI</i>	97
Caracterización diferencial <i>in vitro</i> de los nanoanticuerpos E13 y G41 expresados en <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i>	97
Estudio de la eficacia profiláctica de nanoanticuerpos E13 y G41 expresados en <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> en el modelo ratón.....	99
CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LOS NANOANTICUERPOS: MODELO COBAYO	100
Modelo de infección por contacto	100
BIOPANEAO: DISPLAY EN FAGOS Y SELECCIÓN DE NANOANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA H3N2 PERTH	105
Concentración y purificación de virus H3N2 hu/Perth/09	105

Selección de nanoanticuerpos específicos contra el virus H3N2 hu/Perth/09	109
DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES	125
REFERENCIAS	127

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

VIRUS INFLUENZA

Generalidades

El virus Influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, la cual está definida por virus envueltos que poseen genoma ARN, de sentido negativo, simple cadena y segmentado. El nombre con el que se la designa proviene del latín *Ortho*: verdadero, y *myxo*: mucus, dado por la capacidad de estos agentes virales de unirse a los residuos de ácido siálico (AS) presente en las mucoproteínas.

La familia *Orthomyxoviridae* está formada por 7 géneros, el *Alphainfluenzavirus* (Virus Influenza Tipo A), el *Betainfluenzavirus* (Virus Influenza Tipo B), el *Deltainfluenzavirus* (Virus Influenza Tipo D), *Gammainfluenzavirus* (Virus Influenza Tipo C), *Isavirus*, *Quaranjavirus* y *Thogovirus*¹ (Figura 1 y Tabla 1).

Los géneros de Influenza A, B, C y el último incorporado como D se clasifican de esta manera por diferencias antigénicas en la proteína de la nucleocápside (NP) y en la proteína de la matriz (M1)²⁻⁴, y pueden sufrir re-arreglos e intercambiar información genética entre ellos, sin embargo, no se ha reportado intercambio entre los grupos Influenza y los otros géneros presentes en la familia⁵. Lo virus Influenza causan enfermedades respiratorias, tienen un amplio rango de especies huésped (Figura 1 C) y pueden saltar las barreras interespecies⁶.

Tabla 1. Clasificación de los virus influenza en la familia *Orthomyxoviridae* por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV)

Género	Nombre común	Número de segmentos
Alphainfluenzavirus	Virus Influenza A	8
Betainfluenzavirus	Virus Influenza B	8
Gammainfluenzavirus	Virus Influenza C	7
Deltainfluenzavirus	Virus Influenza D	7

En particular el virus Influenza Tipo A es un problema importante para la salud pública, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, con la posibilidad de causar pandemias ocasionales en la población humana⁷⁻⁹. Así mismo, pueden afectar especies de relevancia en la producción, como aves, cerdos y equinos, como así también se lo ha detectado en otras especies como caninos, felinos, camélidos, murciélagos y mamíferos marinos como focas y ballenas.

El virus Influenza Tipo B fue identificado por primera vez en 1941¹⁰, afectan casi exclusivamente a humanos con epidemias anuales. Si bien se lo ha detectado en otras

especies como focas, equinos, perros y cerdos ¹¹⁻¹⁴, dado el reducido rango de especies queda limitada la generación de nuevas cepas por re-arreglos, y no se han asociado a pandemias.

El virus del género Influenza Tipo C, fue identificado en el año 1947 ¹⁵, suelen causar enfermedades respiratorias en humanos, mayormente en niños ¹⁶, pero se los ha detectado también en cerdos, perros y camélidos ^{17,18}.

El virus Influenza Tipo D fue el último clasificado dentro del grupo de la familia *Orthomyxoviridae*, fue identificado en cerdos, bovinos y ovejas ¹⁹. Los dos linajes que se han encontrado en circulación poseen frecuentes intercambios genómicos entre ellos, y el análisis filogenético lo posiciona cercano con los virus influenza C, sugiriendo un ancestro común entre los mismos ²⁰. Este 50% de homología con el grupo C, indica la posibilidad y la potencialidad de ocurrencia de una transmisión exitosa hacia otros mamíferos, incluido el hombre.

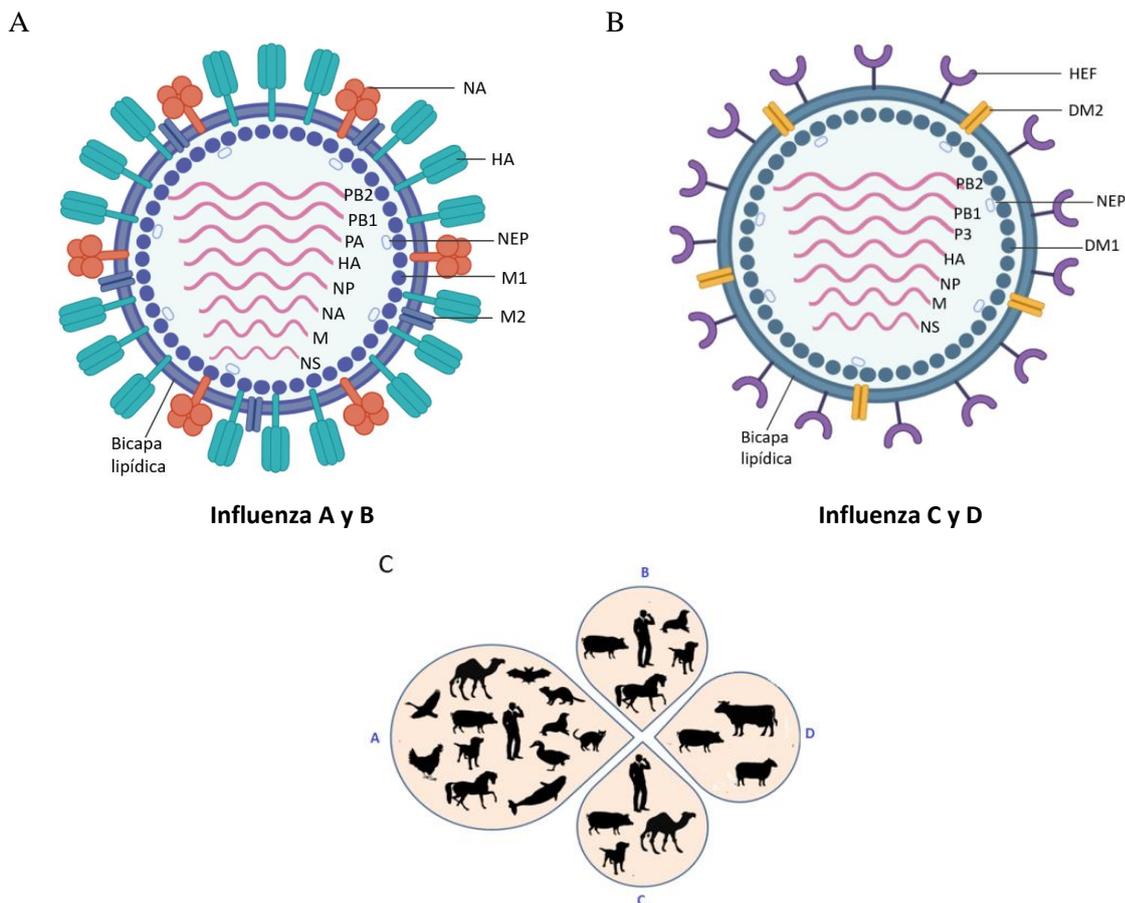


Figura 1. Esquema comparativo de los virus influenza pertenecientes a la familia *Orthomyxoviridae* del tipo A y B (A) y del C y D (B). Creado con BioRender ²¹. Referencias de las proteínas virales representadas: NA: Neuraminidasa; HA: Hemaglutinina; M1: proteína de matriz; M2: canal iónico; NEP: Proteína para la exportación Nuclear; HEF: proteína Hemaglutinina-Esterasa-Fusión; DM1: proteína de matriz; DM2: canal iónico. (C) Se presenta el amplio rango de huéspedes de los virus influenza en azul (A, B C y D). Algunas especies son susceptibles a la infección por virus pertenecientes a los 4 tipos, mientras que otras solo pueden ser infectadas por virus específicos. Modificado de ².

VIRUS INFLUENZA TIPO A

Morfología y estructura

La morfología de las partículas del virus Influenza Tipo A se caracteriza por la presencia de espículas electrodensas protruyentes de entre 10-14 nm de longitud observables mediante microscopía electrónica, formadas por las proteínas de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), con una relación aproximada de 4 moléculas de HA por cada molécula de NA. Las partículas de influenza presentan un aspecto pleomórfico, es decir gran variedad en su forma, abarcando en su mayoría partículas esféricas de aproximadamente entre 80 a 170 nm de diámetro, como así también de aspecto filamentoso con más de 300 nm de longitud ²²⁻²⁴ (Figura 2). Presenta una bicapa lipídica de 7 a 10 nm de espesor que constituye la envoltura exterior del virus en la cual se anclan las 3 proteínas transmembrana presentes en el virus, las ya mencionadas HA y NA, como así también la M2 (canal iónico). La superficie interior de la envoltura se encuentra tapizada por la proteína de matriz M1, la cual interacciona con los segmentos de las ribonucleoproteínas (RNP) que conforman el *core* viral. La bicapa lipídica del virus Influenza posee una estructura en mosaico conteniendo *lipid-raft* ricos en colesterol y zonas sin *lipid-rafts* derivadas de la membrana plasmática celular del huésped ²⁵. Tanto la HA como la NA se encuentran ancladas en los dominios *lipid-raft*, mientras que la M2 no está estrechamente asociada a los mismos ²⁶. La HA es la proteína más abundante en la envoltura viral (~80%) y forma las espículas triméricas que poseen los sitios de unión al receptor celular y los epítopes para la mayoría de los anticuerpos con características neutralizantes. La NA es la segunda proteína de la envoltura más abundante (~17%) y conforma espículas tetraméricas cumpliendo el rol de remoción de la unión al receptor celular (ácido siálico). La tercera proteína de la envoltura es la M2, siendo un componente minoritario (~16-20 moléculas/virión) y funciona como un canal iónico ²⁷. El core-viral consiste en RNPs helicoidales que contienen las cadenas de RNA de sentido negativo y las NP, junto con la proteína de exportación nuclear (NEP), las polimerasas (P), las proteínas PB1, PB2 y PA ²⁸ (Figura 2).

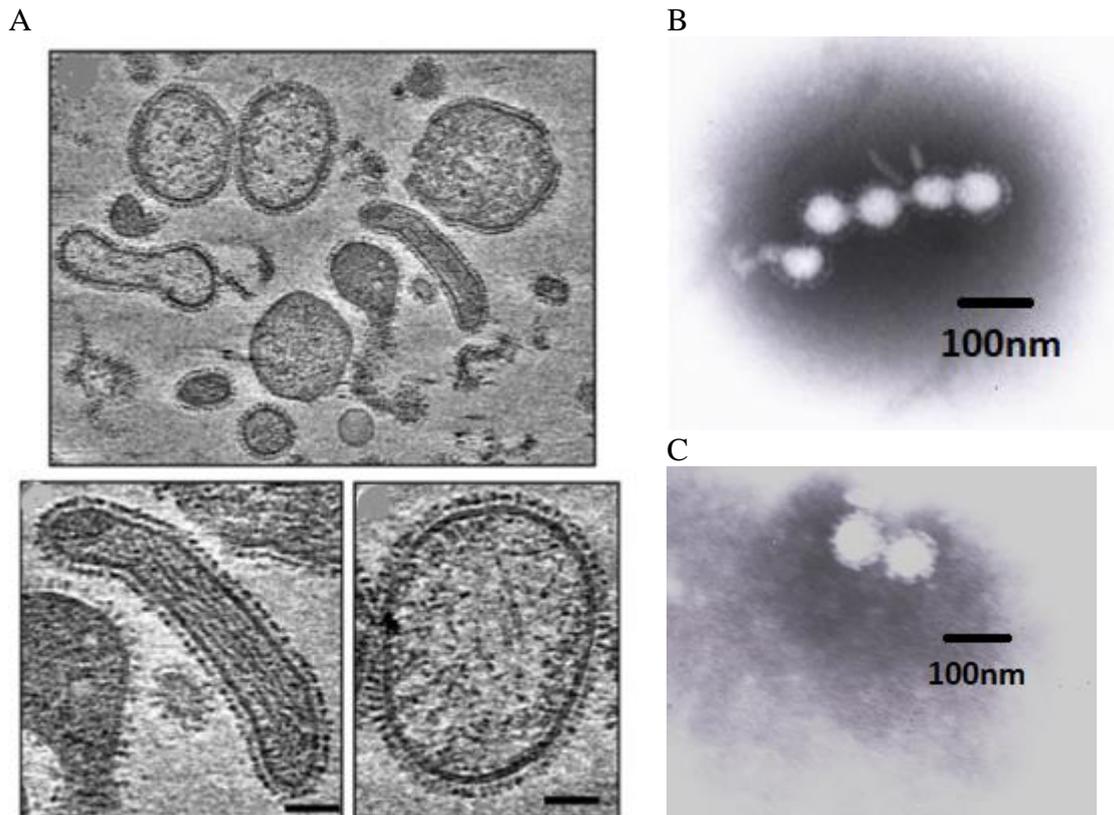


Figura 2. Estructura del virus Influenza. (A) Fotografía cryo-electrónica del virus Influenza A/PR8, se muestra la arquitectura pleomórfica de los viriones. Barra escala 50nm. (B) y (C). Fotografías de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) tomadas en el Servicio de Microscopía de INTA Castelar de una alícuota del virus Influenza Tipo A utilizado en el presente trabajo. Se observan partículas del virus Influenza con presencia de espículas características. Barra escala 100 nm.

Genoma y proteínas virales

El genoma del virus Influenza Tipo A posee 8 segmentos de ARN simple cadena de sentido negativo (ARNss), que alcanza aproximadamente 13.5 kilobases (kb). Los segmentos abarcan longitudes desde 890 a 2341 nucleótidos que codifican para un total de 12 proteínas²⁹. Los virus Influenza tipo A incrementan la capacidad codificante de sus genomas utilizando tanto *splicing* como marcos de lectura alternativos (Tabla 2). Los genes M y NS mediante *splicing* alternativo dan origen RNAm codificando a la M2 y a la NEP/NS2 respectivamente. En particular, el segmento PB1 pueden dar origen también a la PB1-F2 y a PB1-N40, aunque no todas las cepas de Influenza Tipo A codifican para estas proteínas, lo cual las convierte en proteínas accesorias^{5,30}. Cada segmento contiene una región no-codificante, tanto en el extremo 5' como en el extremo 3', los cuales son altamente conservados en los virus Influenza Tipo A, a su vez, cada segmento posee un extremo no-codificante específico.

Tabla 2. Genoma del virus Influenza Tipo A. Segmentos y proteínas codificantes.

Segmento	Proteínas codificadas	Función	Esquema	
1	PB2	Componente de la ARN polimerasa, reconocimiento del CAP		
2	PB1	Componente de la ARN polimerasa, elongación		
	PB1-F2	Actividad pro-apoptótica, antagonista de IFN		
	N40	Función desconocida, accesoria, posiblemente relacionada con la actividad de la polimerasa		
3	PA	Componente de la ARN polimerasa, actividad endonucleasa y proteasa		
4	HA	Glicoproteína de superficie, unión al receptor celular, actividad de fusión, mayor antígeno, armado y liberación de partículas virales		
5	NP	Unión al ARN, síntesis de ARN, importación de RNP nuclear		
6	NA	Glicoproteína de superficie, actividad neuraminidasa		
7	M	M1	Proteína de matriz, interacción con los RNPs y glicoproteínas, exportación del RNP nuclear, armado y liberación de la partícula viral	
	M2	Proteína de membrana, canal iónico, armado y liberación de la partícula viral		
8	NS	NS1	Actividad antagonista de los IFNs	
	NEP/NS2	Exportador del RNP nuclear, regulación de las síntesis de ARN		

Referencia: segmentos azules: ORF 0; segmentos verdes: ORF +1; Modificado de Heinrich Hoffmann en ⁵

Ciclo de replicación

Mecanismo de unión. Los virus Influenza se unen al ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico (AS) presente en la superficie de la célula hospedadora e inicia el ciclo de infección y replicación. La interacción del virus Influenza con una molécula ubicua como el ácido siálico se ve restringida por el hecho de que la HA viral presenta diferente especificidad frente a dicha molécula mediante la preferencia con diferentes uniones según la especie hospedadora del virus. Los virus Influenza humanos se unen preferencialmente al ácido siálico unido a la penúltima galactosa (Gal) mediante una unión $\alpha 2,6$ (AS $\alpha 2,6$ Gal),

mientras que los virus provenientes de aves poseen preferencia por la unión $\alpha 2,3$ al ácido siálico (AS $\alpha 2,3$ Gal). Los enlaces $\alpha 2,6$ predominan en las células epiteliales de la tráquea de los humanos, mientras que los enlaces $\alpha 2,3$ son más comunes en el epitelio intestinal de las aves, aunque puede observarse ambos tipos de uniones en los epitelios tanto humanos como aviares. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que otros factores como el tipo esqueleto de carbono, el largo y ramificación de la cadena y glicosilaciones pueden afectar la interacción con la HA ³¹.

Mecanismo de entrada. El modelo de internalización tradicional que describe la entrada del virus Influenza a la célula es la endocitosis mediada por clatrina. Posteriormente, el virus requiere un descenso del pH del endosoma para iniciar la fusión entre la envoltura viral y la membrana del endosoma. El clivaje de la HA0, formada por la HA1 y HA2 se produce por enzimas proteolíticas del tipo tripsina, las cuales se encuentran en las células epiteliales del tracto respiratorio y gastrointestinal del huésped. Dicho clivaje es fundamental para que el nuevo virión sea infeccioso. Luego de unirse al receptor en la superficie celular, se expone el péptido de fusión que se encuentra en el N-terminal de la subunidad HA2, posibilitando la interacción del mismo con la membrana del endosoma. El cambio estructural de varias moléculas de HA genera un poro en la membrana que permite la salida del contenido del virión (RNPv) hacia el citoplasma celular. Para el desnudamiento efectivo, es importante la acción de la proteína M2, mediante su actividad de canal iónico, quien permite el influjo de iones desde el endosoma hacia la partícula viral, disrumpiendo las interacciones de proteínas y liberando a las RNP de la proteína M1, de esta manera se completa el desnudamiento viral ³².

Generación de nuevas partículas virales. Las RNPv liberadas en el citoplasma son importadas al núcleo donde sirven de templado para la transcripción de nuevas proteínas virales que son sintetizadas a partir de ARNm. El genoma viral (ARNv) es replicado a través de un RNA intermediario complementario de sentido positivo (ARNc). Las nuevas RNPs virales sintetizadas son exportadas del núcleo al sitio de ensamblado en la membrana plasmática apical de la célula, donde las partículas virales son liberadas.

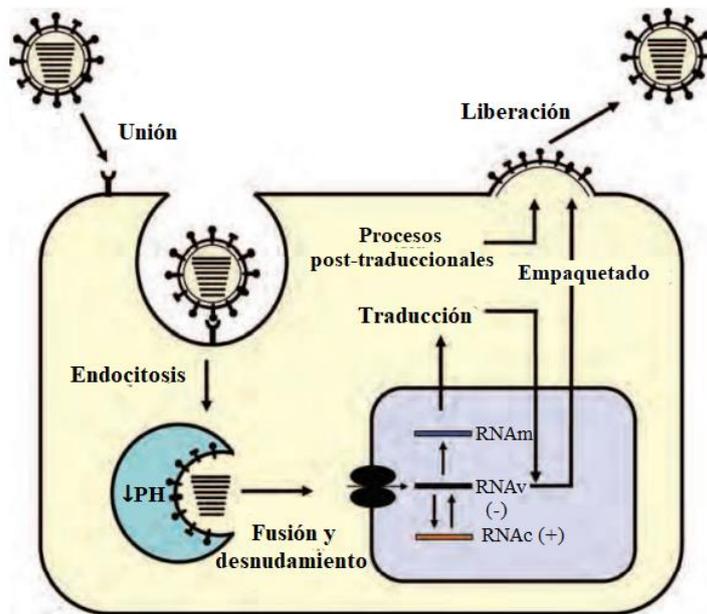


Figura 3. Esquema del ciclo de replicación del virus Influenza. Luego de unirse a la superficie celular, el virus es internalizado por endocitosis mediada por receptor. El bajo pH del endosoma desencadena la fusión de las membranas viral y endosómica, liberando las ribonucleoproteínas virales (vRNP) en el citoplasma. Luego la vRNP se importan al núcleo donde se utilizan como templado para la transcripción y se sintetizan nuevas proteínas virales a partir del ARNm viral. El genoma viral (ARNv) se replica a través de un intermediario de sentido positivo complementario (ARNc). Luego los RNP virales sintetizados se exportan desde el núcleo al lugar de ensamblado en la zona de la membrana apical, donde brotan y se liberan las partículas virales. Modificado de ⁵

LA HEMAGLUTININA (HA)

La hemaglutinina del virus Influenza es codificado por el segmento 4 del RNA viral, es una proteína de aproximadamente 220 kDa y es la más abundante en la superficie viral anclada a la membrana (Tipo 1). El virus Influenza está recubierto por dicha proteína y recibe su nombre dado su capacidad para aglutinar glóbulos rojos. Se han descrito más de 18 subtipos de la misma, numerándolas desde H1-H18. La HA juega un rol fundamental en la adsorción del virus a la célula, a través de la unión a receptores de AS y promueve la liberación de las ribonucleoproteínas al citoplasma celular al fusionar la envoltura viral con la membrana de las vesículas endocíticas, durante el proceso de ingreso del virus en la célula huésped ³³.

A partir del segmento 4 del ARNv, se transcribe y es traslocado co-transcripcionalmente a través del retículo endoplasmático rugoso (RER) para formar la proteína precursora, un homo-trímero unido no-covalentemente que se llama HA0. Cada monómero tiene un peso aproximado de 60 kDa en su forma no glicosilada, y su masa se incrementa dependiendo de la complejidad de las glicosilaciones asociadas en sus 549 residuos. La HA0 es transportada a través del Golgi hacia la membrana plasmática celular donde es clivada

por proteasas extracelulares para formar la HA1 (~327 aa) y la HA2 (~222 aa) que se mantienen unidas por un enlace disulfuro³⁴ (Figura 4).

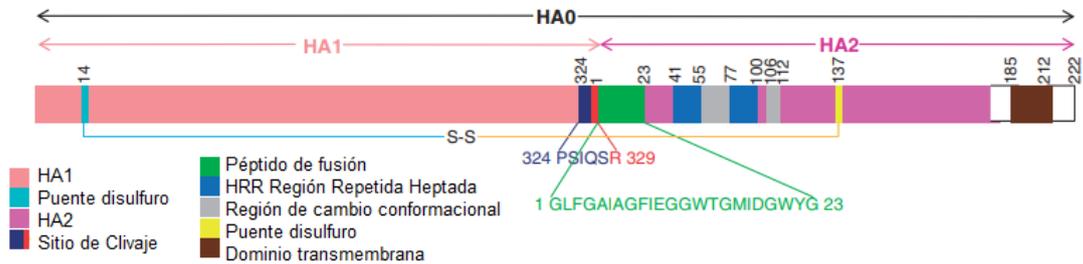


Figura 4. Estructura primaria de la HA0. Se observan diferentes estructuras que forman la HA0, como el sitio de clivaje, la zona de péptido de fusión, regiones repetitivas, la región de cambio conformacional, el dominio transmembrana, como así también un puente disulfuro que une la HA1 con la HA2³³.

Especificidad de la HA y su unión al receptor celular

Los patrones distintivos de infección dependen en gran medida de las diferencias en la especificidad de la unión virus-receptor, como así también de la distribución de la expresión del receptor en el huésped. En particular, las células de algunos epitelios, como el epitelio respiratorio y digestivo, se encuentran tapizados con oligosacáridos complejos (glicanos) ya sea unidos a glicoproteínas y glicolípidos de membrana o formando parte de los componentes extracelulares como el moco en las vías respiratorias, que cumplen un rol importante en la interacción de los patógenos. La diversidad química de los glicanos contribuye a la complejidad del rol funcional de los mismos en el control de las interacciones célula-célula, célula-patógeno y célula-medio. En los vertebrados, las células de los epitelios respiratorios y digestivos suelen tener glicanos terminados en ácidos siálicos (AS). Este monosacárido, como fue mencionado anteriormente, se une preferencialmente a la penúltima galactosa mediante una unión $\alpha 2,6$ ($AS\alpha 2,6Gal$) o una unión $\alpha 2,3$ ($AS\alpha 2,3Gal$) (Figura 5), involucrándose en la alta especificidad y regulación de las interacciones de las células, incluyendo roles de receptores, como con el virus influenza. Como ya fue descrito, en las partículas del virus Influenza las dos glicoproteínas principales en su superficie tienen funciones asociadas al AS presente en las mucosas, donde la HA interactúa con el AS presente en las terminaciones de las glicoproteínas como receptor viral, y la NA cumpliendo su actividad sialidasa al escindir dicha molécula para la liberación de las partículas virales de la superficie de la célula huésped. La química específica de los enlaces de AS influyen entonces en la especificidad tanto de la HA como la NA, y por ende en la infectividad del virus Influenza.

En la naturaleza, el AS (ácido neuramínico, Neu) puede ser estabilizado por acilaciones del grupo amino en el carbono 5, mediante el grupo acetilo (Neu5Ac) o glicol (Neu5Gc), siendo estos los tipos de AS más comunes y ambos reconocidos por los virus Influenza. La HA de virus Influenza de origen porcino muestra fuertes preferencias por la unión y la infección utilizando el Neu5Gc como receptor, sin embargo, las formas Neu5Gc son de poca relevancia en la salud humana (<0,1% del total de los AS), ya que no son sintetizados por el organismo humano y son incorporadas mediante la alimentación, por lo que el Neu5Ac cobra relevancia en la infección del virus Influenza en nuestra especie³³. Algunas otras modificaciones al AS pueden reducir o alterar la infección por esos virus, en especial las modificaciones con O-acetilos en los carbonos -4, -7, -8, y/o -9. El enlace del azúcar AS con el penúltimo residuo de galactosa (es decir tipo α 2,3 o en su defecto α 2,6) afecta la afinidad de unión de HA al AS contribuyendo a las diferencias de tropismo del huésped que pueden observarse por ejemplo entre las cepas del virus influenza aviar y humano (Figura 6).

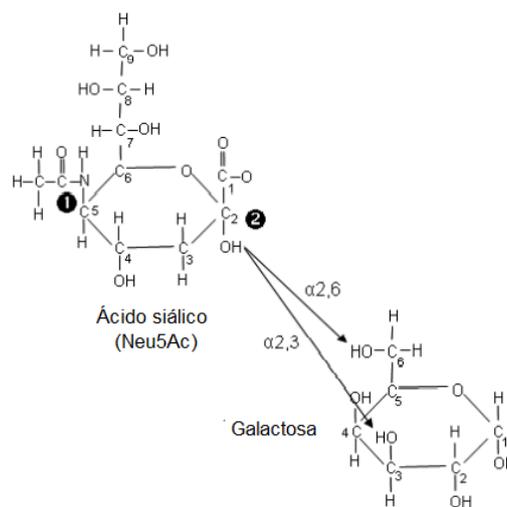


Figura 5. Estructura del ácido siálico y la unión glicosida al sacárido (galactosa) vecino. El sitio marcado con **1** corresponde al sitio de la unión N-acilación, que puede ser glicol o acetil, en este caso se presenta la acetil, que es la más abundante en humanos (Neu5Ac). El sitio **2** se corresponde con la unión a la galactosa, que puede ser del tipo α 2,3 o α 2,6, es decir al carbono 3 o 6 de la galactosa.

Por ende, resulta de vital importancia conocer no solo la distribución del AS en los tejidos de los organismos huésped, sino también los tipos de enlaces del AS en los mismos. En particular, se encuentra estudiado como es esta distribución en los huéspedes más habituales aves acuáticas, humanos, porcinos, equinos y otros pequeños mamíferos, ya que actúan como reservorio y/o vector portador del virus y por lo tanto revisten

importancia tanto en la salud pública y como en la producción, siendo relevante desde el enfoque “Una Salud”, que estimula el trabajo en colaboración de múltiples disciplinas a nivel local, nacional y mundial, para lograr una salud óptima para las personas, los animales y el ambiente ³⁵. Además, es de interés la distribución de los receptores en los animales de experimentación dado que se utilizan como modelos de estudio del virus Influenza (ratones, hurones, cobayos y perros). Por ello se presenta en la Figura 6 un estudio de la distribución de este tipo de uniones en diferentes tejidos de distintas especies animales.

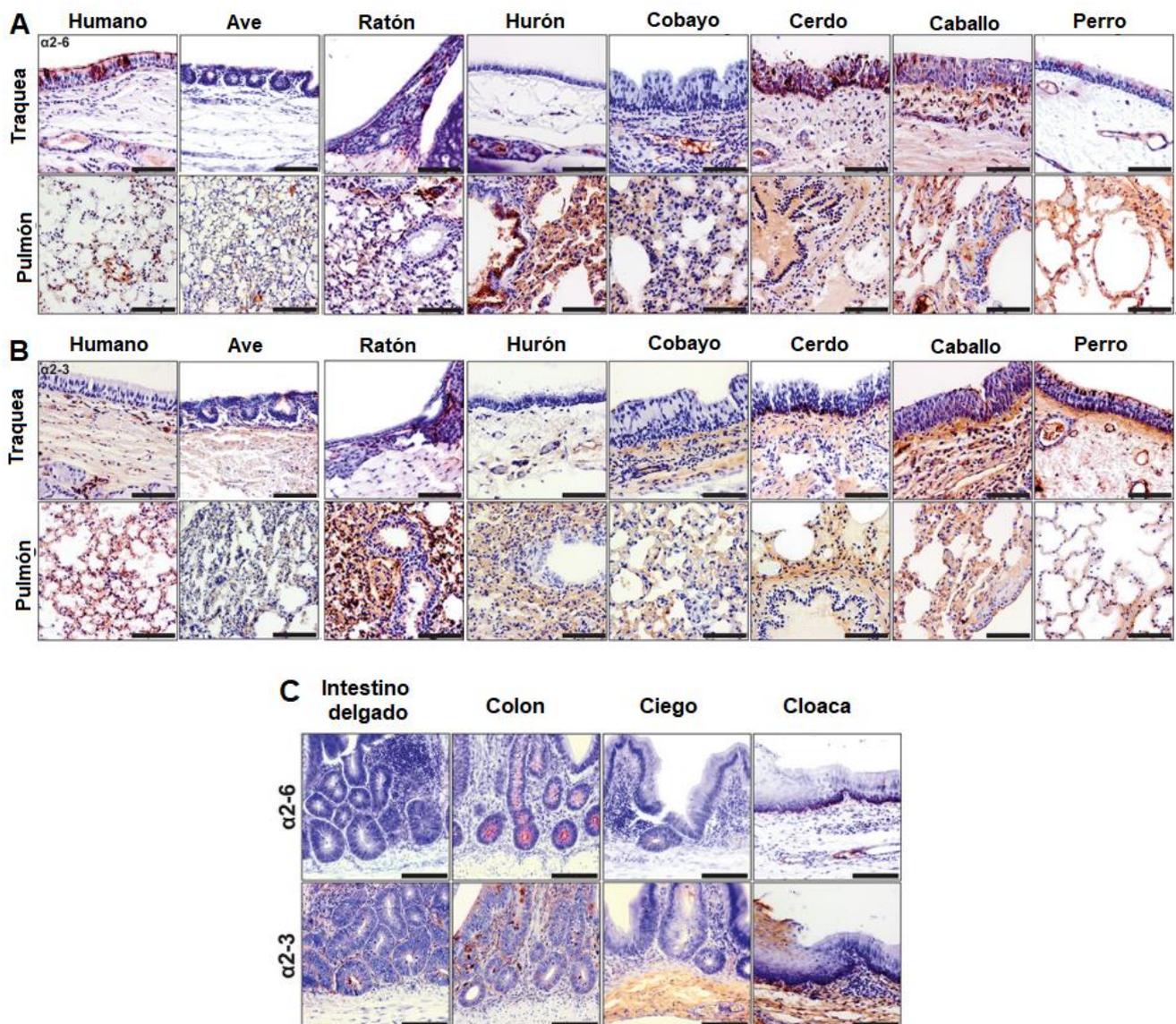


Figura 6. Análisis de la distribución de enlaces $\alpha 2,6$ (A) y $\alpha 2,3$ (B) del AS en tejidos respiratorios (tráquea y pulmón) de distintas especies de interés en la ecología del virus influenza (ratones C57BL/6), y de tejidos gastrointestinales del ave acuática (pato de pekin o pato doméstico) (C). Técnica de tinción (en rojo) mediante lectinas derivadas de plantas (SNA para $\alpha 2,6$; MAH para $\alpha 2,3$); barra: 50 μm . Modificado ³⁶

En las aves son abundantes las estructuras del AS con una unión del tipo $\alpha 2,3$ a la galactosa en las mucosas intestinales, como el intestino delgado, colon, ciego y cloaca. Por otro lado, en las vías respiratorias humanas prevalece el enlace tipo $\alpha 2,6$ en las mucosas de las vías respiratorias superiores (tráquea) y un incremento del tipo $\alpha 2,3$ en el pulmón. En las especies utilizadas como modelos animales, se observa en los ratones analizados en ese estudio (C57BL/6; otra de las cepas más utilizadas en ratones es Balb/C) una prevalencia de las uniones $\alpha 2,3$, principalmente en el pulmón, lo cual explica en parte la necesidad de adaptar las cepas humanas para utilizarlas en este modelo. En los hurones, por otro lado, prevalecen los AS de unión tipo $\alpha 2,6$ tanto en pulmón como en las glándulas submucosas de la tráquea, y la unión del tipo $\alpha 2,3$ se ve restringida al pulmón. Los cobayos por su parte, presentan ambos tipos de unión, apoyando que ambos modelos, tanto cobayos como hurones, son susceptibles a cepas de origen humano sin necesidad de adaptarlas mediante numerosos pasajes. En porcinos se observa abundancia de la unión $\alpha 2,6$ en el epitelio traqueal, y ambos tipos de uniones en el tejido subyacente al epitelio en ambos tejidos analizados (tráquea y pulmón), marcando su susceptibilidad a cepas de tropismo positivo tanto a uniones $\alpha 2,3$ como $\alpha 2,6$. En equinos se encuentran niveles equivalentes de ambos tipos de unión, y en perros se observa enriquecido por uniones del tipo $\alpha 2,3$ ³⁶.

Por otro lado, resulta relevante el estudio de la presencia de AS en cultivos de tejidos utilizados para propagación, amplificación y titulación del virus influenza *in vitro*, observándose amplia presencia de AS en la membrana externa de células MDCK (de origen canino) y presencia principalmente intracelular en líneas celulares de origen humano (A549 y HEK-293). En embriones de gallina, que son ampliamente utilizados para el estudio del virus Influenza, se observa altos niveles de AS, con prevalencia de uniones de tipo $\alpha 2,3$ ³⁶.

Los virus Influenza de origen humano, se unen preferentemente a las uniones AS del tipo $\alpha 2,6$ y se replican eficientemente en tejidos del tracto respiratorio que presentan este tipo de uniones, como la tráquea y tejidos respiratorios superiores, y con baja eficiencia en donde se encuentra mayor prevalencia de la unión del tipo $\alpha 2,3$, como en el tejido alveolar. Esto apoya las manifestaciones predominantes de enfermedad que se observan en humanos infectados con virus de origen de su misma especie, como rinitis, faringitis, traqueobronquitis, indicando la replicación viral en dichos tejidos. Por otro lado, los virus de origen aviar se unen preferentemente al AS $\alpha 2,3$, observando una alta eficiencia de infección en tejido gastrointestinal de aves, y baja eficiencia de los tejidos del tracto

superior de humanos. Virus del tipo H5 y H7, por ejemplo, han mostrado tener preferencia de unión por el tipo $\alpha 2,3$ con reportes de síntomas en humanos tanto en el tracto respiratorio inferior como en la conjuntiva ocular, y con dificultad para ser detectado en muestras nasofaríngeas. Cabe destacar la relevancia de la vía ocular de infección, donde se ha descrito AS con unión del tipo $\alpha 2,3$ en células de la conjuntiva, la córnea y la retina, señalando esta vía como potencial peligro para la introducción de virus Influenza del tipo aviar en humanos ³⁷⁻³⁹.

Sitios antigénicos de la HA

La proteína HA interactúa con los residuos del AS presentes en los glicanos de la célula huésped a través del sitio de unión al receptor (RBS, *Receptor Binding Site*), definido topográficamente como una depresión o bolsillo en la parte superior de la cabeza globular HA1 ⁴⁰. El RBS se caracteriza por cuatro elementos: 130-*loop*, la 190-alfa hélice, el 220-*loop* y una red de aminoácidos conservados con enlaces de tipo hidrógeno en las posiciones 98, 153, 183 y 195 (numeración H3). Basado en el análisis en la variación de la secuencia de la HA de aislamientos pandémicos y el análisis de HA de virus crecidos en presencia de anticuerpos monoclonales, se detectaron 5 sitios antigénicos relevantes. Dos de ellos próximos al bolsillo de unión al receptor (RBS) denominados Sa (residuos 128-129, 156-160, 162-167) y Sb (residuos 187-198), los sitios Ca1 (residuos 169-173, 206-208, 238-240) y Ca2 (residuos 140-145, 224-225) que se encuentran en la interface de los monómeros de la HA en la cabeza globular de la HA; y Cb (residuos 74-79), dentro del dominio vestigial esterasa en la base de la cabeza (numeración H3; C: común; S: cepa-específico) ^{33,41}. Asimismo, los epítopes presentes en la cabeza globular de HA de los virus H3 también se encuentran bien caracterizados, y de modo similar se agrupan en cinco sitios: A (residuos 140-146, loop protruyente), B (hélice alfa comprendida por los residuos 187-196 y los residuos cercanos 153-155), C (estructura terciaria de unión y contacto de residuos 50-54 con 275, 277, 278, 281, 286), D es una zona de interfase entre trímeros de la HA (201, 205, 207, 217, 220, 226), y E (residuos 62, 63, 78, 81, 83) ⁴²⁻⁴⁴ (Figura 7).

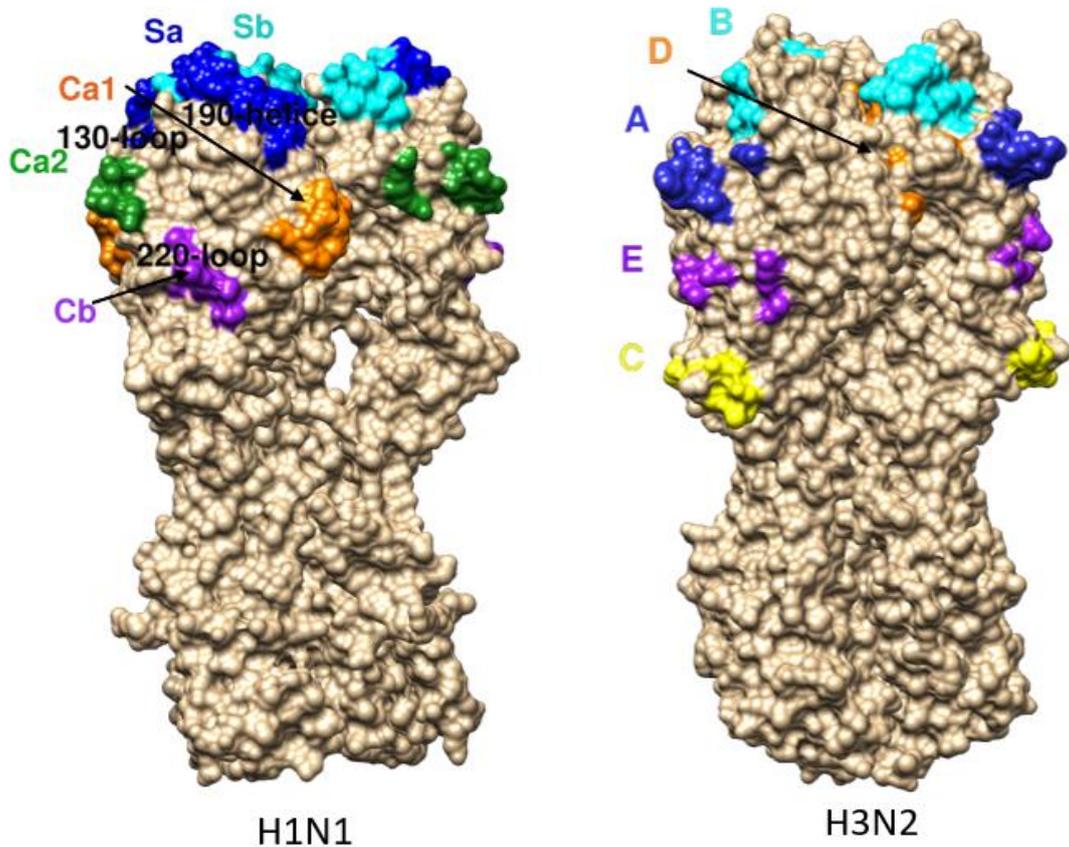


Figura 7. Sitios antigénicos en trómeros HA de H1N1 y H3N2. (A) Se marcan en colores los sitios Sa (azul), Sb (cian), Ca1 (naranja), Ca2 (verde) y Cb (violeta), señaladas en cada monómero de HA de H1N1 (PDB 1RUZ). (B) Sitios antigénicos A (azul), B (cian), C (amarillo), D (naranja), D (verde), y E (violeta) en los monómeros de la HA de H3N2 (PDB 1HA0). Virus: A/Aichi/2/1968 (H3N2); A/South Carolina/1/1918 (H1N1). Se señalan las estructuras 130-*loop*, 190-*hélice* y 220-*loop* que caracterizan al RBS en la HA de H1N1. Elaborado a partir de ^{33,42-44}.

Los anticuerpos neutralizantes generados durante la respuesta inmune del huésped, tienen como blanco mayoritario a la HA. Tienen la capacidad de bloquear la entrada del virus a la célula, y en general son seleccionados aquellos que están dirigidos a la cabeza o dominio globular de la HA. Sin embargo, la variación y diversidad en las secuencias de dicha molécula limita la eficacia protectora de estos anticuerpos. Hasta la fecha se han detectado 18 subtipos de HA que pueden ser divididos en 2 grupos filogenéticos en función de las diferencias en la secuencia aminoacídica. El grupo 1 incluye a los subtipos H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 and H18 y el grupo 2 incluye H3, H4, H7, H10, H14 y H15 ⁴⁵.

Los anticuerpos que tienen como blanco el tallo de la HA, son menos prevalentes que aquellos que son dirigidos al dominio globular dada la menor exposición de este dominio, sin embargo, se ha reportado en individuos mayores la presencia de los mismos, esto se debe a que la exposición a infecciones repetidas a lo largo de los años, favorece la

aparición de este tipo de anticuerpos dirigidos a zonas más inaccesibles de la molécula. En particular, estos anticuerpos resultan de gran interés, dado que el tallo es un dominio más conservado de la HA, por ende, estos anticuerpos podrían tener una protección heterosubtípica ⁴⁶.

EVOLUCIÓN VIRAL, HUÉSPEDES Y EPIDEMIAS

El virus Influenza Tipo A es un paradigma de los virus emergentes. Poseen un gran reservorio en las aves acuáticas salvajes, sin embargo, los Virus Influenza Aviáres (VIA) pueden cruzar la barrera de especie, afectando a otras aves como así también mamíferos. Hasta el momento se han reportado 18 subtipos de HA (HA1-HA18) y 11 NA (NA1-NA11), y los distintos subtipos de virus Influenza se enumeran en función de las HA y NA presentes en la partícula viral. De las combinaciones posibles, 16 HA y 9 NA circulan preferencialmente en aves acuáticas, que se presentan como reservorios de los virus Influenza de origen aviar. En el caso de los mamíferos, se han establecido linajes estables de los subtipos H1, H2 y H3, con combinaciones de N1 y N2 en humanos (H1N1, H2N2, H3N2), mientras que se ha observado H1N1, H1N2 y H3N2 en porcinos, y H3N8 y H7N7 en equinos. En el caso de los murciélagos, se han detectado 2 subtipos antigénicamente diferentes y predominantes, los H17N10 y H18N11, los mismos no se observan que hayan cruzado la barrera de especie hasta el momento ^{47,48} (Figura 8). Los virus Influenza de origen aviar, a su vez, pueden clasificarse en virus de patogenicidad baja (LPAI, *Low Pathogenic Avian Influenza Viruses*) o alta (HPAI, *Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses*), los cuales poseen circulación tanto en aves acuáticas como en aves de corral, generando serios problemas para la industria y la salud pública, dado que subtipos como H5N1 y H7N9 se han reportado infectar a humanos con la consecuente preocupación a nivel mundial ⁴⁹.

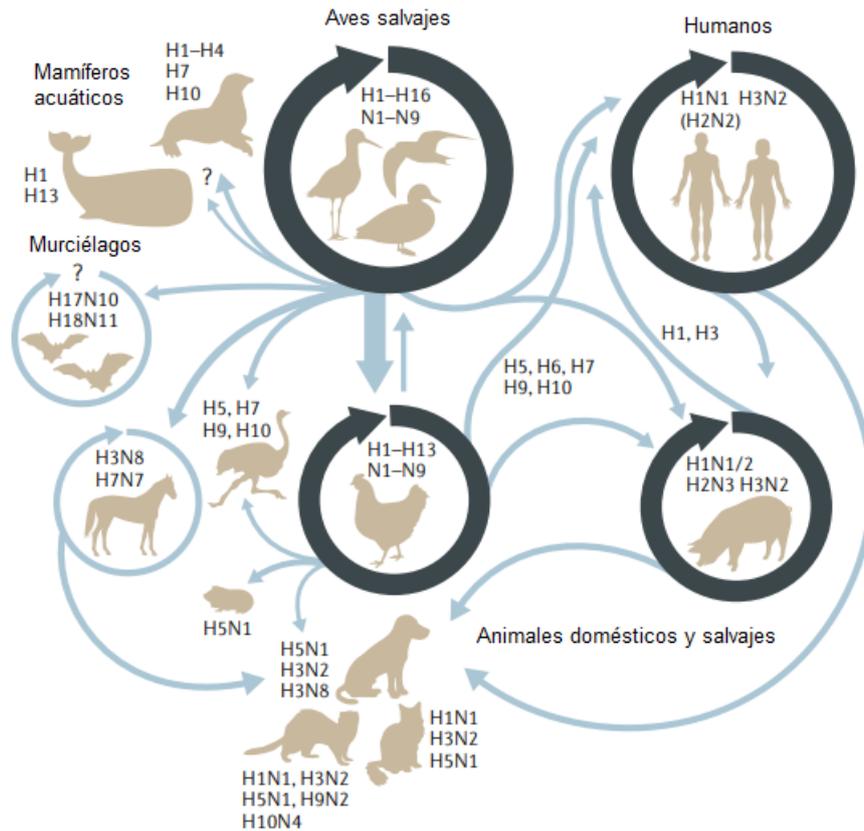


Figura 8. Ecología de los subtipos del virus Influenza tipo A. Los subtipos HA1 a HA16 circulan principalmente en los reservorios de aves silvestres, a partir del cual pueden cruzar a diferentes especies, a veces mediante huéspedes intermediarios que pueden requerir mutaciones adaptativas (flechas celestes), mientras que subtipos específicos predominan en distintas especies (flechas negras). Los virus adaptados a humanos de los subtipos H1N1 y H3N2 circulan de manera continua, mientras que el H2N2 no, siendo estos 3 subtipos también circulantes en cerdos. Los virus de origen aviar (VIAs) de subtipos H5, H6, H7, H9 y H10 han infectado humanos provenientes de la exposición e infección de aves de corral, sin transmisión humano-humano. Los subtipos H17 y H18, por el momento solo se han encontrado en murciélagos ⁵⁰.

A nivel genético, la aparición de virus emergentes relacionados con el virus Influenza está asociado con dos eventos genéticos que ocurren en dichos virus, que son el *genetic drift* y *genetic shift*.

El *genetic drift* o deriva génica se ocasiona por mutaciones puntuales debido a la alta tasa de error propia de la ARN-polimerasa viral, con un gran impacto en particular cuando estas mutaciones ocurren en genes que codifican sitios antigénicos de las proteínas HA y NA presentes en la envoltura viral. La deriva génica se observa principalmente en mutaciones en la HA, en zonas adyacentes al RBS, dado la presión ejercida por el sistema inmune, ya que la HA es el principal blanco de la respuesta inmune del huésped. Este fenómeno es relevante en la evaluación de las formulaciones anuales de las vacunas, ya que pueden generar modificaciones en la patología viral y en la respuesta inmune de los individuos de manera sostenida en el tiempo.

El *genetic shift* o cambio antigénico es el resultado de la re-asociación de segmentos cuando dos o más virus Influenza diferentes infectan una misma célula del huésped. Dada la naturaleza segmentada del genoma viral, este evento genera combinaciones nuevas de las dos proteínas de mayor abundancia en el virus, la HA y la NA. Este tipo de fenómeno resulta de gran importancia en la aparición de subtipos, con combinaciones con ventajas adaptativas que pueden ocasionar pandemias en la población humana.

Ambos cambios generan modificaciones en la partícula viral facilitando su escape a la respuesta inmune de los individuos huésped, de manera que los mismos pierdan capacidad protectora frente a la infección.

La transmisión interespecie del virus Influenza ocurre con mayor frecuencia entre aves salvajes y aves domésticas o de corral, siendo los espacios de convivencia como granjas o mercados, los lugares con condiciones óptimas para la transmisión y la posible mezcla de virus Influenza de distintos orígenes ⁴⁹. A su vez, estos lugares se ofrecen como espacios óptimos para la transmisión a mamíferos, incluidos los seres humanos. Se ha demostrado que los subtipos H5, H6, H7, H9 y H10 de virus Influenza de origen aviar (VIA) tienen la habilidad de infectar humanos ³⁷. Sin embargo, si bien la transmisión del virus Influenza entre individuos de diferentes especies puede ocurrir, el establecimiento de un nuevo subtipo con transmisión estable entre los individuos de la nueva especie no es habitual ⁵¹. Estos eventos zoonóticos ocasionales en los seres humanos, suelen tener desenlaces mortales para nuestra especie, sin una consecuente re-transmisión entre humanos. Sin embargo, la acumulación de eventos mutacionales de adaptación al huésped, pueden favorecer la replicación y transmisión eficiente, dando origen a nuevas variantes, y el nuevo virus emergente puede infectar un nuevo huésped. Por otro lado, el riesgo pandémico surge de eventos mutagénicos mayores como el intercambio de segmentos génicos completos o parciales que implican la ausencia de inmunidad en la población, y durante las primeras olas de pandemia gran parte de la población adquiere inmunidad ante el nuevo virus. Las variantes generadas por mutaciones puntuales (*antigenic drift*) harán que el virus pueda mantener circulación en la población de manera estacional, lo que genera la necesidad de mantener la vigilancia y renovar las vacunas anualmente.

Por otro lado, se han identificado a los cerdos como los principales reservorios de mezcla, dado que al co-expresar receptores $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ en el tracto superior respiratorio, pueden co-infectarse con virus Influenza tanto de origen aviar como de origen humano, favoreciendo el intercambio génico o *genetic shift*, con la consecuente posibilidad de

generar subtipos de combinaciones novedosas con capacidad de mantener una transmisión sostenida humano-humano y por ende pandemias ⁷. Otras especies como codornices y murciélagos también han presentado co-expresión de estos receptores, con la posibilidad de ser también posibles reservorios para virus emergentes ⁵².

EPIDEMIOLOGIA DE LOS VIRUS H1N1 Y H3N2

En los seres humanos, el virus Influenza replica típicamente en el epitelio del tracto respiratorio superior, tráquea y bronquios, causando una enfermedad transiente, en general sin complicaciones, con prevalencia de rinitis, faringitis y traqueítis. Mayores complicaciones sobrevienen mediante infecciones en los bronquiolos terminales y alveolos, generando neumonías severas, incluso fatales ⁵³. El virus Influenza humano estacional raramente causa enfermedades graves, sin embargo, el grupo de mayor riesgo está representado por niños, embarazadas, adultos mayores de 60 años, o personas inmunocomprometidas o con enfermedades crónicas. En particular, se lo asocia a enfermedades graves e incluso fatales en un alto porcentaje, en casos de infecciones de origen zoonótico cuando la inmunidad pre-existente es baja o nula ^{46,54,55}. El virus Influenza ha sido una amenaza para la especie humana desde hace muchos años, siendo la primera epidemia documentada la llamada gripe española de H1N1 en el año 1918. En la misma se estima que un tercio de la población del momento (~500 millones de personas) contrajeron la enfermedad, con una tasa mundial de mortalidad elevada (estimado >2,5%, comparada al <0,1% observado en otras pandemias de Influenza), alcanzando un estimado de 50 millones de muertes ⁷. Desde entonces, se sucedieron tres pandemias relacionadas al virus Influenza, la pandemia de gripe asiática (H2N2) en 1957, la pandemia de gripe de Hong Kong (H3N2) en 1968 y la pandemia de gripe porcina (H1N1) más reciente en 2009 ⁵⁶. Durante las últimas cinco décadas, los brotes estacionales han sido causados por los subtipos de Influenza A H1N1 y H3N2, y también por los dos linajes del virus de Influenza B (B/Victoria/2/87 y B/Yamagata/16/88). A menudo los virus Influenza Tipo A reciben mayor atención que los virus influenza B, dado que los primeros evolucionan más rápido, y poseen mayor morbilidad y mortalidad ⁵⁷.

A partir de su surgimiento de la pandemia del año 2009, H1N1 se estableció en la población humana como virus estacional y ha representado el subtipo prevalente en los últimos años en Europa y el continente americano ^{58,59}. Cada año los Virus Influenza Tipo A infecta a unos 100 millones de personas en todo el mundo, causando infecciones agudas

en 3 a 5 millones de personas y 250.000–500.000 muertes. Hasta el año 2019, en Argentina el subtipo H1N1 (55%) permaneció prevalente frente al H3N2 (41%)⁵⁸ (Figura 9).

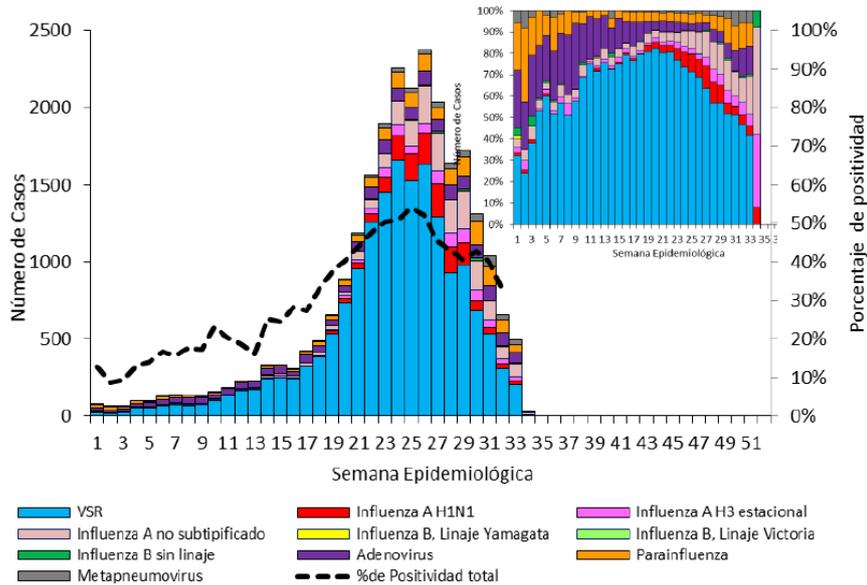


Figura 9. Distribución de virus respiratorios identificados por Semana Epidemiológica y % de positividad Acumulados a la semana 33 de 2019 en Argentina. Fuente: Área de vigilancia de la Salud de la Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud en base a información proveniente del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud.

ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Actualmente, las vacunas y las drogas antivirales son el principal método empleado para controlar la infección por el virus, sin embargo, su implementación presenta varios desafíos. Esto se debe en primer lugar, a que la vacunación es restringida a la población de riesgo, la eficacia de la vacuna no supera el 60%, y las drogas anti-influenza y las vacunas, tradicionalmente tienen como blanco proteínas expuestas en la superficie viral, como la HA, la NA y el canal iónico M2. En segundo lugar, la presión selectiva generada por los antivirales, como drogas, anticuerpos o células del sistema inmune, genera mutaciones de las proteínas de superficie como una medida de escape (*antigenic drift*), generando la evasión del sistema inmune y resistencia a drogas antivirales. Este tipo de variaciones en la secuencia en otras proteínas del virus Influenza como en la NP, pueden existir, pero en mucha menor medida que las anteriores⁶⁰. Estos fenómenos resaltan la importancia de la búsqueda y el desarrollo continuo de herramientas preventivas y terapéuticas que permitan controlar la enfermedad.

La eficacia de las vacunas contra el virus Influenza se determina a partir de la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IHA) y de anticuerpos neutralizantes.

Los anticuerpos con actividad IHA resultan específicos de cepa y actúan evitando la aglutinación de eritrocitos. Los anticuerpos neutralizantes representan un grupo más amplio que incluye a los anteriores, y que neutraliza el virus mediante diferentes mecanismos, ya sea inhibiendo la entrada o la replicación viral en células de mamíferos. Algunos de estos anticuerpos neutralizantes, por ejemplo, los dirigidos contra la región del tallo de la HA serían capaces de neutralizar a varias cepas del virus. Idealmente, una vacuna debería proteger contra todas las cepas, sin importar el cambio antigénico ⁶¹. Sin embargo, este objetivo es difícil de alcanzar en el caso del virus de Influenza debido a la alta variabilidad antigénica del virus. Por este motivo, las principales desventajas de la vacunación para la prevención de la infección viral provocada por el virus de Influenza son la necesidad de actualización permanente de las cepas vacunales en cada estación, la baja inmunogenicidad especialmente en adultos mayores, y por otro lado, que las empresas productoras no llegan a cubrir la demanda mundial, dejando regiones con baja cobertura.

La transferencia de inmunidad pasiva es una aproximación que apunta a reforzar la respuesta inmunitaria específica del individuo contra el virus. Algunas de las herramientas más estudiadas en fase clínica son basadas en anticuerpos monoclonales derivados de anticuerpos de origen humano. Por ejemplo, en el contexto de la pandemia SARS-Cov2 se han desarrollado estrategias terapéuticas basadas en la administración de anticuerpos modificados generados en equinos hiper-inmunizados ⁶⁴, o bien plasma inmune proveniente de individuos convalecientes. Otro tipo de aproximación han sido los anticuerpos de cadena pesada derivados de camélidos (VHHs) que han surgido como herramienta para el control de infecciones virales como rotavirus, coronavirus, norovirus, virus respiratorio sincicial, betacoronavirus ⁶⁵⁻⁶⁸, como así también el virus Influenza, cuyos avances en la actualidad se detallarán en la siguiente sección.

INMUNOGLOBULINAS DERIVADAS DE CAMÉLIDOS

Generalidades de las inmunoglobulinas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son moléculas proteicas generadas por el sistema inmunológico en los vertebrados y poseen la capacidad de reconocer y unirse a otras moléculas o antígenos, con una alta especificidad y afinidad. Estas moléculas son generadas por los linfocitos B y son parte de la respuesta humoral adaptativa. Su función puede ser ejercida de manera directa neutralizando una toxina o patógeno o de manera indirecta, reconociendo un agente externo y promoviendo la activación de células

efectoras del sistema inmune o de los factores del complemento para su eliminación. Las inmunoglobulinas son proteínas heterodiméricas compuestas por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), a su vez las mismas poseen dominios variables (V) que se unen a los antígenos y dominios constantes (C) que poseen funciones efectoras específicas como activación del complemento o unión a los receptores Fc que se encuentran en células efectoras del sistema inmune, como los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, y los NK ⁶⁹.

Los dominios variables se generan por eventos de re-arreglos génicos de los segmentos VDJ de los genes que los codifican, eventos de hipermutación génica y de selección clonal luego de la exposición al antígeno, que permiten la maduración de la afinidad por los que los anticuerpos adquieren mayor especificidad por su antígeno. A nivel estructural, la especificidad está determinada por una región dentro de los dominios variables denominada paratope que es el sitio del anticuerpo de reconocimiento y unión a una región complementaria presente en el antígeno, identificada como epítope. La alta especificidad y afinidad de la unión entre los mismos está dada por la complementariedad de conformaciones tridimensionales y de secuencias lineales entre ellos. En los anticuerpos, cada dominio variable puede ser separado en 3 regiones de secuencias variables, denominadas regiones de determinación de la complementariedad (*Complementarity Determining Regions*, CDR) y regiones intermediarias denominadas FR (*Frameworks*) con secuencias relativamente constantes. Las cadenas pesadas pueden tener de tres a cuatro dominios constantes (numerados de CH1 al CH4) mientras que las livianas siempre poseen un dominio constante (CL). Los dominios CH1 y CL son los que estabilizan la interacción entre la cadena liviana y pesada mediante puentes disulfuro, pero fundamentalmente por interacción hidrofóbica ⁷⁰ (Figura 10).

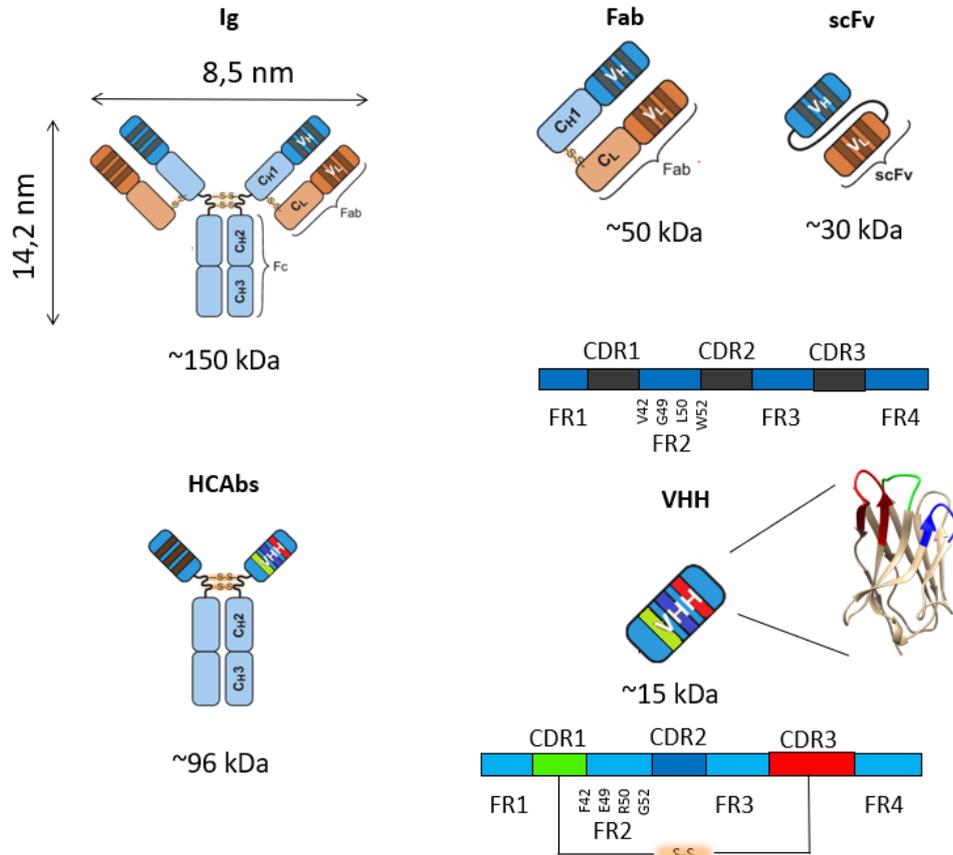
Inmunoglobulinas derivadas de camélidos

La familia de los Camélidos comprende a los camellos (*Camelus dromedarius*, *Camelus batrianus*), llamas (*Lama glama*, *Lama guanicoe*) y vicuñas (*Vicugna vicugna*, *Vicugna pacos*). *Camelidae* es la única familia en el suborden *Tylopoda*, que junto con los Rumiantes (bovinos, cabras, ovejas y antílopes) y los Suiformes (cerdos e hipopótamos) conforman en orden *Artiodactyla*. A fines de los años 80, el equipo de Raymond Hamers-Casterman descubrió una nueva subclase de anticuerpos presente en los miembros de la familia de los camélidos. Además de los anticuerpos convencionales (IgG1) conformados por 4 cadenas polipeptídicas, poseen otros dos isotipos de IgG que están naturalmente

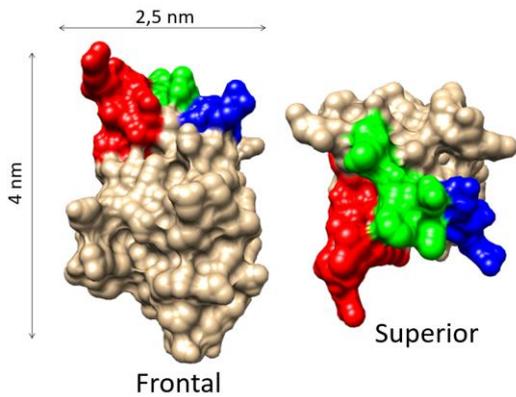
desprovistos de la cadena liviana y se los denomina anticuerpos de cadena pesada o *Heavy Chain Antibodody* (HCAb) (Figura 10). Estos nuevos tipos de anticuerpos, que están presentes en los camélidos del orden *Artiodactyla*, carecen del dominio CH1 y uno de ellos posee una región bisagra más larga mucho más larga, por lo cual se distinguen entre ellos entre los isotipos IgG2 e IgG3 ⁷¹. El porcentaje de los HCABs y las IgG convencionales en el suero de los camélidos es variable, en camellos pueden alcanzar entre el 50-80%, mientras en las especies de camélidos sudamericanos, alcanza entre el 10-25%, demostrando este porcentaje la importancia de los HCABs en la respuesta inmune de estos animales ⁷². Se ha descrito que otras especies poseen un tipo de anticuerpo similar a los anticuerpos de cadena pesada, los llamados IgNAR en el tiburón nodriza y Cos5-Ab en el pez-rata moteado. El estudio filogenético comparativo de los mismos demostró que evolucionaron de manera independiente en los 3 linajes, y que las propiedades estructurales compartidas de los HCABs se deben a una convergencia evolutiva relacionada con la limitación en la unión de la cadena liviana y la cadena pesada ⁷³.

A partir de los HCABs de camélidos, el grupo del Dr. Muyldermans produjo de manera recombinante los dominios variables o VHHs (*Variable Heavy chain from Heavy chain antibody*), generando la molécula más pequeña capaz de unir un antígeno con alta afinidad y especificidad a las cuales se denominó nanoanticuerpos ⁷⁴.

A



B



C

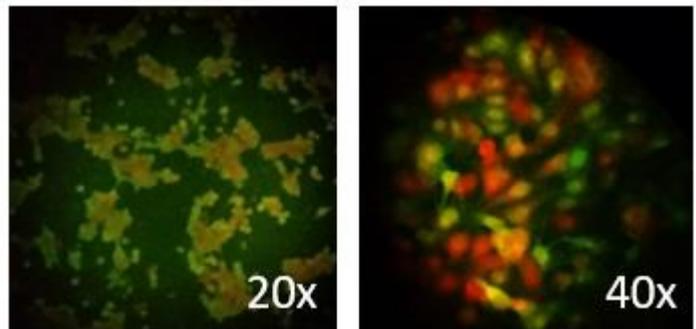


Figura 10. (A) Esquema de inmunoglobulina o anticuerpos convencionales y los anticuerpos de cadena pesada. Los anticuerpos convencionales están formados por dos cadenas livianas (naranja) y dos cadenas pesadas (celeste). Las cadenas livianas poseen un dominio constante (CL) y un dominio variable (VL) y las cadenas pesadas poseen un dominio variable (VH) y de 3 a 4 dominios constantes (CH). Los anticuerpos de cadena pesada derivados de camélidos no poseen los fragmentos variables y constantes de cadena pesada (CL y CH), como así tampoco poseen el primer fragmento constante de la cadena pesada (CH1), el sitio de unión a antígeno está formado únicamente por el dominio variable de la cadena pesada (VHH). Los VHHs se caracterizan por la sustitución de residuos de carácter hidrofílico en la región del FR2 (V→F42; G→E49; L→R50; W→G52), y poseen un puente disulfuro adicional conectando el CDR1 (camellos) o el CDR2 (llamas) con el CDR3. Modificado de ⁷⁵. (B) Modelado mediante *Chimera* del nanoanticuerpo de E13, estudiado en el presente trabajo. Se muestran en color las regiones características de los CDR1 (verde), CDR2 (azul) y CDR3 (rojo) en vista frontal y superior. (C) Detección de células infectadas con el virus H1N1 hu/Arg/09 utilizando E13 conjugado con FITC (verde) en contraste con azul de evans (rojo) en monocapas de células MDCK luego de 20 horas post-infección.

Inmunoglobulinas y tecnología VHH como herramientas terapéuticas y diagnósticas

En el año 1975 se presentó el desarrollo tecnológico que permite generar anticuerpos monoclonales (mAbs) a través de hibridomas ⁷⁶, lo cual les valió el premio Nobel en el año 1984. La técnica consiste en la fusión de linfocitos B maduros provenientes del bazo de un animal inmunizado con células de mieloma con el fin de inmortalizarlas y de potenciar la producción de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales se convirtieron en herramientas de investigación terapéuticas y diagnósticas indispensables. Sin embargo, son herramientas que pueden ser complejas y costosas para producir y pueden no ser apropiados para ciertas aplicaciones. En principio, al ser moléculas grandes (~150 kDa), se ve limitada su biodistribución como la penetración en tejidos o tumores. A su vez, pueden disparar la respuesta inmune en el paciente humano debido a su origen murino, que eventualmente llega a neutralizar su actividad, como así también limitar su uso a largo plazo. La búsqueda de soluciones a estos problemas ha llevado tanto a la generación de anticuerpos humanizados por cambios de secuencias Fc murina por la humana, y a la producción de anticuerpos monoclonales que derivan de células B humanas inmortalizadas. Dado que muchas de las limitaciones de los usos de los mAbs se relacionan con su tamaño, numerosos trabajos apuntan a reducirlo, conservando o mejorando sus propiedades farmacológicas. Esto ha llevado al desarrollo de los llamados fragmentos Fab (*antigen-binding fragments*; Fragmentos de unión a antígenos), Fv (*variable fragments*; fragmentos variables), scFV (*single-chain variable fragments*; segmentos variables de cadena simple) (Figura 10). Sin embargo, la estabilidad de estas proteínas recombinantes, tanto como su actividad se mantienen en condiciones subóptimas, comparadas con los Abs convencionales ⁷⁷.

En este sentido, surgen los nanoanticuerpos VHH con numerosas características intrínsecas ventajosas. Los VHHs poseen un tamaño aproximado de 4 nm de largo y 2,5 nm de diámetro, con un peso molecular de ~15 kDa. Su pequeño tamaño y arquitectura compacta favorecen su llegada a blancos inaccesibles para los anticuerpos convencionales (Ig) de ~150 kDa. La estructura del VHH se encuentra estabilizada por láminas beta y un puente disulfuro canónico entre el FR1 y el FR3 conservado entre los dominios variables. Cuando se compara la secuencia con las Ig convencionales, se observa que los VHHs presentan sustituciones, ya sea por residuos más pequeños y/o hidrofílicos (en general F42, E49, R50, G52), lo que les confiere la hidrosolubilidad característica (Figura 10). Por otro lado, la ausencia de las cadenas livianas permite la ausencia de los dominios hidrofóbicos de unión a la cadena pesada, favoreciendo aún más su carácter hidrosoluble,

y convierte a los VHHs en grandes herramientas biotecnológicas⁷⁸⁻⁸⁰. Adicionalmente, la ausencia de cadena liviana puede conllevar a una disminución en la diversidad de paratopes, lo que se ve en general compensado en los VHHs mediante la presencia de CDR1 y CDR3 más largos que los VHs, y que a menudo son estabilizados con un puente disulfuro extra, conectando el CDR3 con el CDR1-*loop* (frecuente en camellos), o con el CDR2-*loop* o con el FR2 (frecuente en llamas)⁷⁸. El área de contacto de los paratopes de los HCAs puede oscilar entre los 600-900 Å², mientras que en los anticuerpos convencionales suele ser de entre 300-600 Å². A su vez, se ha observado que la conformación tridimensional de los VHHs adopta una forma convexa, a diferencia de la plana o cóncava de los VHs, lo cual favorece su capacidad de reconocer sitios pequeños, cavidades o hendiduras que resultan inaccesibles para los anticuerpos convencionales⁸⁰. Los nanoanticuerpos poseen una marcada estabilidad aún en condiciones de extrema temperatura, presencia de proteasas o bajo pH^{81,82}, lo cual puede ser favorable para la administración de los mismos por la vía oral y la vía respiratoria, además de la vía parenteral. Por otro lado, se ha observado *in vivo* una buena penetración en los tejidos, sin embargo, su pequeño tamaño conlleva a un rápido *clearance* renal, lo cual puede dificultar su aplicación en el tratamiento de largo plazo⁸³. Adicionalmente, si bien no son de origen humano, los nanoanticuerpos poseen baja inmunogenicidad en nuestra especie, esto se debe al alto grado de identidad de su secuencia con los genes humanos de la familia III de VH⁸⁰. Sin embargo, se encuentran trabajos orientados a la “humanización” de los nanoanticuerpos derivados de camélidos en busca de mejorar su posibilidad de utilización en humanos⁸⁴. Por otro lado, también se ha observado en nanoanticuerpos monoméricos, que presentan baja probabilidad de formar agregados, baja activación de células dendríticas y baja activación de proliferación de células T, lo que confirma su baja capacidad inmunogénica⁸⁵.

Se han descrito aplicaciones terapéuticas de inmunidad pasiva de los nanoanticuerpos tanto como para prevenir o tratar infecciones virales para distintos virus con impacto en la producción animal y la salud humana. Entre ellos se destacan nanoanticuerpos contra el HIV, Hepatitis B, Virus Sincicial Respiratorio (RSV), rabia, fiebre aftosa (FMDV), poliovirus, rotavirus, Norovirus y el virus Influenza^{75,77}. En particular los trabajos evaluando la capacidad de los VHHs en el control de la infección con el virus Influenza se presentan en la Tabla 3.

Por otro lado, se presentan los nanoanticuerpos como herramientas para el diagnóstico ya sea de infecciones virales, cáncer u otras enfermedades vía ELISA, o *in vivo*, mediante el

diagnóstico de imágenes o la detección intracelular ⁸⁶. En particular, en nuestro país se encuentran *kits* para el diagnóstico para la detección viral en mediante el recientemente premio Innovar 2022, para la detección del Virus del mal de Rio Cuarto (MRC), la enfermedad viral más importante del maíz en la Argentina ⁸⁷, como así también para la detección de rotavirus en materia fecal humana, mediante el *kit* diagnóstico Rotadial ⁸⁸.

Tabla 3. Análisis de publicaciones relacionadas con nanoanticuerpos contra proteínas del virus Influenza tipo A

VHH	Inmunógeno	Producción	Ensayos Contra la Hemaglutinina	Observaciones	Referencia
Infl-C8 y Infl-B12	HA de A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	Llama <i>E. coli</i>	<i>In vitro</i> . Neutralización, IC ₅₀ 0003-7 nM, afinidad de 9.9 nM and 30 nM virus H5N1 del clado 1	Construcciones de bivalentes y trivalentes de Infl-C8, aumentan la capacidad neutralizante en H5N1 de 4 clados estudiados. Sin actividad cruzada frente a PR8 (H1N1) o H3N2	⁸⁹
H5-VHHb	HA de A/Vietnam/1203/2004 H5N1-HA (H5N1)	Llama <i>E. coli</i>	<i>In vivo</i> . Ratones. Intranasal, profilaxis, 0,25 µg/animal equivalente a 0,025 mg/kg. Título viral en pulmón debajo del límite de detección en terapia profiláctica.	H5N1 Como terapéutico luego 4, 24 o 48 horas del desafío viral, se observa conservación de peso, baja carga viral en pulmón. Se prueban constructos bivalentes y trivalentes	⁹⁰
aHA-7	HA1 de A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	Camello <i>E. coli</i>	<i>In vivo</i> . Ratones. Administración intranasal e intraperitoneal del VHH a las 2 o 24 horas previo del desafío con DL viral de H5N2. Sobrevida de 100% con dosis de 50 a 200 µg/animal vía intranasal y con 100-200 µg/animal vía intraperitoneal. Prueban otro VHH (aHA-8) con porcentaje de sobrevida del 100% con 200 µg/animal via intraperitoneal	Adición de una colita ILZ (<i>isoleucine zipper domain</i>) que incrementa su actividad neutralizante	⁹¹
13 VHHs	HA de A/California/07/2009 (H1N1)	Alpaca <i>E. coli</i>	<i>In vitro</i> . Afinidad por SPR de 78,8 a 0,18 a 78,8 nM. Neutralización, IC ₅₀ entre 3,2 a 212,2 nM	Reacción heterosubtípica dentro del Grupo 1 (H5N1), negativo al grupo 2. Prueban bivalentes, pero solo uno logra 18 veces aumento de afinidad	⁹²

SD36 y SD38	Vacuna Inflexal: HA de A/Brisbane/59/07 (H1N1) A/Brisbane/10/07 (H3N2) B/Brisbane/60/08 HAr (H7)	Llama <i>E. coli</i>	<i>In vivo</i> . Ratones. Administración endovenosa de los VHHs, en forma de multímeros, contra el virus Influenza H1N1, capacidad profiláctica en ratón en dosis de 1,7 a 5 mg/kg. Por otro lado, hacen administración del VHH intravenoso o expresión nasofaríngea mediante un adenovirus	Contra el tallo de la HA SD36 reconoce a subtipos del G2 (H3, H4, H7 Y H10) SD38 reconoce subtipos del G1 (H1, H2, H5) y del G2 (H3, H7 Y H10). También reconoce subtipos de VHHs específicos contra el tipo B	93
G2.3 y H1.2	HA (H5 de A/American green-winged teal/California/HKWF609/07) Vacuna Grippol® HA de virus Influenza A - H1N1 y H3N2	Alpaca <i>E. coli</i>	<i>In vivo</i> . Ratones. Administración intranasal de VHH, desafiados con virus influenza aviar (H5N2) A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 y (H1N1) /Duck/mallard/Moscow/4970/2018)	Pre-incubación de los VHHs con el virus previo al desafío viral intranasal	94
Contra otras proteínas del virus Influenza					
M2-7 ^a	M2, A/Hong Kong/8/68, (H3N2)	Camello <i>E. coli</i>	<i>In vitro</i> . Bloqueo de la actividad de flujo de protones. <i>In vivo</i> . Ratones. Protección con 60% de sobrevida frente a desafío viral con DL de PR8 (H1N1) con 200 µg del VHH		95
188 VHHs	Mezcla de virus de origen aviar conteniendo todas las NA presentes en virus Influenza (N1 a N9) descritas al momento de publicación (no incluye N10)	Llama <i>S. cerevisiae</i>	<i>In vitro</i> . En general específicos contra la NA de selección durante el biopaneo. Pero algunos VHHs presentaron actividad cruzada contra otras NA, incluso uno contra todas las NA (excepto N4)	Se destacan como posibles herramientas para diagnóstico y serología. Obtuvieron también VHHs contra HA y NP	96
α-NP-VHHs	NP Influenza tipo A	Alpaca	<i>In vitro</i> . Cultivos MDCK y A549 infectadas con Influenza Tipo A. Inhibición del tráfico nuclear.	Expresión intracelular del VHH	97
αNP-VHH1			<i>In vitro</i> . Inhibe la replicación/transcripción de segmentos largos de RNA viral. Unión a sitios no conservado de la NP relacionados con determinación del rango de huésped	Expresión intracelular del VHH. Posiblemente bloquea el rol de la NP en la elongación de la transcripción.	60
N1-VHHm	NA H5N1: N1 rec derivada de A/crested eagle/Belgium/01/2004 (H5N1)	Alpaca <i>E. coli</i>	<i>In vitro</i> . Dímeros, IC ₅₀ incrementa de 30 a 240 veces. <i>In vivo</i> . Ratones. Intranasal. Protección contra DL de H5N1, incluso resistente a Oseltamivir.	Se prueban homodímeros (bivalentes de N1-VHHm) y otro unido a la región Fc de IgG2a (N1-VHH-Fc)	98

RESPUESTA INMUNE A INFLUENZA

Tras la exposición inicial al virus, la mucosa presenta su primer contacto, mediante una capa de moco enriquecida en ácido siálico (AS), quien actúa como receptor al unirse a la HA viral. Luego de la infección a la célula huésped, se disparan respuestas mediadas por interferón y el receptor *Toll-like*. De este modo se establece la respuesta antiviral innata⁴⁶.

La naturaleza recurrente de la exposición frente a las epidemias, la vacunación a repetición genera un mosaico complejo de anticuerpos y células de memoria, provenientes de la respuesta inmune adaptativa, que será particular para cada individuo⁹⁹. Aquellos virus que escapen a la respuesta inmune innata serán capaces de replicar, generando un pico de título viral aproximadamente a las 24-72 horas luego de la infección, dependiendo de la dosis inicial de infección¹⁰⁰. El tiempo promedio en el cual se generan anticuerpos virales-específicos *de novo* es de aproximadamente 7 a 10 días luego de la infección¹⁰¹. Luego de la infección primaria, las exposiciones subsiguientes a otras variantes antigénicas inducen la respuesta inmune en la mucosa a epítopes previamente tomados como blanco. La inmunidad de la mucosa representada por la IgA dimérica juega un papel importante en la protección de la infección por VIA. La IgA cruza la barrera epitelial desde la sangre hasta el lumen del tracto respiratorio para unirse y neutralizar las partículas virales de Influenza, intentando evitar la infección de células huésped¹⁰².

Las superficies mucosas del tracto respiratorio cuentan con muchas proteínas de defensa naturales, como mucinas, que tienen funciones antivirales y pueden interactuar junto con anticuerpos. Los tipos de anticuerpos y los títulos de anticuerpos encontrados en las superficies mucosas son algo distintos de los que se encuentran en el suero, y además hay distinciones entre la parte superior e inferior de las vías respiratorias. El tracto respiratorio inferior es principalmente protegido por IgG (con una relación IgG:IgA de 2,5:1), que es transportado activamente allí por el Receptor Fc (FcR)^{103,104}. Se han descrito niveles de anticuerpo en el tracto respiratorio inferior, similares a los niveles de anticuerpos en el suero, mientras que la respuesta en el tracto respiratorio superior está dominada por IgA (con una relación IgG:IgA de 1:3)¹⁰³, concretamente por IgA1 dimérica, que tiene un componente secretor¹⁰⁵. Estas moléculas de IgA son producidas por células plasmáticas en el tejido linfoide asociado a la mucosa, principalmente en la lámina propia, y luego son transportados activamente a las superficies mucosas a través de interacciones con el receptor polimérico de inmunoglobulina. Con respecto a la especificidad de epítopes, la respuesta de IgA de la mucosa se dirige a antígenos similares a la respuesta de IgG, pero

podría producir anticuerpos más ampliamente reactivos, probablemente debido a la avidéz mejorada que resulta de su naturaleza dimérica ¹⁰⁶.

Tipos de inmunoglobulinas en la respuesta al virus Influenza

Las inmunoglobulinas humanas se presentan como isotipos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, con IgA, IgG, e IgM que tienen funciones importantes en la inmunidad frente a los virus de la gripe. La IgG monomérica constituye aproximadamente el 75% de los anticuerpos encontrados en suero, de los cuales hay cuatro subtipos: IgG1 (~67 % de IgG), IgG2 (~22 % de IgG), IgG3 (~7 % de IgG) e IgG4 (~4 % de IgG) ⁷⁰. La mayoría de los anticuerpos IgG dirigidos contra el virus Influenza son del subtipo IgG1, seguido en menor proporción de anticuerpos IgG3 ¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Niveles de IgG2 y los anticuerpos IgG4 contra el virus son insignificantes. IgG1 tiene una vida media sérica larga (~21 días) e interactúa fuertemente con los receptores Fcγ (FcγRs), lo que lo hace altamente eficaz en la inhibición directa del virus, así como en las funciones efectoras mediadas por FcR ¹¹¹. IgG3 se une con una afinidad aún mayor a los FcγR pero, probablemente debido a su larga y flexible región bisagra y tiene una vida media más corta, de aproximadamente 7 días¹¹¹. La interacción de IgG con FcγRs es modulada por la glicosilación del anticuerpo en N297, y la composición de este glicano modula las funciones efectoras. IgM (10 % del total de anticuerpos séricos) también tiene un papel clave, específicamente en la respuesta temprana al virus Influenza. Los anticuerpos IgM suelen ser de menor afinidad que los anticuerpos IgG, pero forman pentámeros, o más raramente hexámeros, lo que les da mayor avidéz. La IgM puede secretarse a las superficies mucosas e interactúa fuertemente con el complemento; por lo tanto, tiene un papel clave en la lucha contra el virus. IgA (15 % del total de anticuerpos séricos) existe como subtipos IgA1 e IgA2. La IgA1 forma principalmente la fracción IgA monomérica en el suero y también se secreta como un dímero en las superficies mucosas del tracto respiratorio superior, mientras que la IgA2 se encuentra principalmente como dímero secretado en las superficies mucosas del tracto gastrointestinal ¹¹². El mayor número de sitios de glicosilación en IgA que en otros isotipos de anticuerpos podrían aumentar la afinidad de IgA por la hemaglutinina (HA) a través de interacciones entre HA y el AS¹¹³.

MODELOS DE ESTUDIO DEL VIRUS INFLUENZA

El modelo ratón está ampliamente difundido para el estudio del virus Influenza, sin embargo, presenta la necesidad de adaptar la cepa al animal, además no permite el estudio

de características de la infección en humanos, como por ejemplo la transmisión entre individuos. Entre las características que se presentan para evaluar la infección en el modelo animal, se encuentra la distribución del ácido siálico (AS) en la superficie celular del hospedador, sitio al que se une la hemaglutinina del virus Influenza. En los seres humanos predomina el AS α 2,6 en el tracto superior de las vías respiratorias, siendo que el α 2-3 puede ser encontrado en seres humanos en la zona alveolar o de unión de bronquiolos-alveolos (tracto respiratorio inferior) como así también el ojo ³⁸. Las cepas de Influenza adaptadas a humanos suelen tener preferencia por el α 2,6 y las aviares por el α 2,3, de esta manera se explica la dificultad encontrada por los virus de origen aviar en infectar a los seres humanos, como así también los síntomas característicos en vías aéreas superiores que presentan los humanos tras la infección con virus Influenza de normal circulación en nuestra especie ¹¹⁴.

Para el estudio de transmisión entre individuos, se suele utilizar el hurón, cuyo tracto respiratorio y distribución de tipos de AS se asemejan al humano, permitiendo además observar manifestaciones clínicas similares a las del hombre, como fiebre, congestión y descarga nasal, anorexia y aletargamiento, conjuntamente no requiere adaptación de la cepa viral para lograr infección en los animales (Tabla 4). Sin embargo, el trabajo con esta especie acarrea la necesidad de grandes espacios para el manejo de los mismos dado su tamaño, costos elevados para la disposición de animales y escasos reactivos asociados. El modelo cobayo constituye una alternativa para el estudio de la transmisión viral en mamíferos, implica un menor costo por el tamaño y sencilla manipulación, mayor disponibilidad de reactivos específicos y por otro lado mantiene las ventajas de la susceptibilidad a virus de origen humano junto a la distribución AS en el tracto respiratorio similar al de los seres humanos ¹¹⁵⁻¹¹⁸. La infección a nivel de las vías aéreas superiores en cobayos nos permite evaluar el curso de la infección de los animales a través de la recolección de muestras nasales (lavados nasales), como así también la evaluación de la respuesta inmune a través del seguimiento de título de anticuerpos en suero de los animales ¹¹⁹. El modelo cobayo de infección con virus Influenza ha sido descrito tanto para virus Influenza Tipo A ¹²⁰, como para virus Influenza Tipo B ¹²¹. En el caso del virus Influenza Tipo A, ha sido propuesto la evaluación de efecto profiláctico de vacunas frente a la transmisión viral ¹²², como así también para la modelar la probabilidad de infección y transmisión entre humanos, de virus Influenza de origen porcino y aviar ¹¹⁸.

Tabla 4. Características clínicas compartidas por humanos y pequeños mamíferos frente a la exposición del virus Influenza.

Características clínicas en humanos	Aparición de características clínicas en el modelo animal		
	Hurón	Ratón	Cobayo
Fiebre	Presente en infecciones con cepas de Influenza humanas y aviar	No detectado	No detectado
Secreción nasal	Presente en infecciones con cepas de Influenza humanas y aviar	No detectado	No detectado
Tos	Estornudos, más frecuente en cepas altamente transmisibles	No observado	En general no detectado
Complicaciones gastrointestinales (raro)	Presente en infecciones con la cepa H1N1 2009	No detectado	No observado
Complicaciones neurológicas (raro)	Presente en infecciones con virus Influenza altamente patogénicos (HPIV)	Similar a modelo Hurón	No detectado
Pérdida de peso y/o anorexia	Presente, más predominante (>10 %) en infecciones con cepas virulentas	Similar a modelo Hurón	Mínimo (<10 %) incluso en cepas virulentas
Letargo	Presente, más predominante en infecciones con cepas virulentas	Similar a modelo Hurón	No detectado
Transmisión a contactos susceptibles	Presente en infecciones con virus humanos y no en virus de origen aviar	No detectado de manera confiable	Presente, en general similar al modelo Hurón
Distribución de ácido siálico (SA) en tracto respiratorio	Predominancia de α 2,6 en tracto respiratorio superior (similar a humanos)	Predominancia de α 2,3 (diferente a tracto respiratorio en humanos)	Predominancia de α 2,6 en tracto respiratorio superior (similar a humanos)

*Modificado*¹¹⁷

Por último, dado que los cerdos son similares a los humanos en anatomía, tamaño y fisiología de los pulmones¹²³, constituyen un modelo ideal para la prueba de terapéuticos y vacunas con foco en la medicina humana. Los cerdos infectados por vía intravenosa (iv) o bien intranasal (in) desarrollan una enfermedad pulmonar similar a la de los humanos^{124–126}. Las Igs de estos animales reconocen epítopes de HA similares a los de los humanos¹²⁷. Asimismo, el modelo ha sido utilizado para la evaluación de la eficacia de vacunas para su implementación de la clínica médica humana¹²⁸.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los anticuerpos VHH específicos contra proteínas del Virus Influenza H1N1 y H3N2, mediante el evento de neutralización viral, constituyen potenciales herramientas de aplicación terapéutica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollo y caracterización bioquímica y funcional *in vitro* e *in vivo* de nanoanticuerpos VHH contra el virus Influenza de tipo A H1N1 pandémico 2009 (hu/Arg/09) y contra el tipo A H3N2 estacional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selección de VHHs contra virus Influenza de Tipo A H1N1 pandémico 2009 (hu/Arg/09) y Tipo A H3N2 estacional mediante el biopaneamiento de una biblioteca de genes VHH generada a partir de una llama inmunizada con vacunas comerciales (monovalente y trivalente) disponibles en el mercado.
- Expresión y purificación de los nanoanticuerpos derivados de cada clon positivo y su caracterización bioquímica.
- Caracterización funcional *in vitro* de los VHH seleccionados.
- Adaptación al ratón de la cepa viral variante argentina Influenza H1N1 pandémico hu/Arg/09 (H1N1 A/Argentina/017/2009) y evaluación de los potenciales cambios genéticos.
- Optimización del modelo murino de infección por la variante argentina de Influenza H1N1 hu/Arg/09 (H1N1 A/Argentina/017/2009) y la cepa de referencia H1N1 hu/PR8/34 (H1N1 A/Puerto Rico/8/1934), cedida por la Dra. Itatí Ibañez (CEVAN, Centro de Virología Animal, César Milstein, CONICET).
- Evaluación de la eficacia de los VHHs que hayan demostrado actividad neutralizante *in vitro*, frente al desafío con virus infeccioso en el modelo ratón (sin transmisión por aerosol), utilizando la variante H1N1 hu/Arg/09 y la cepa de referencia H1N1 hu/PR8/34.
- Puesta a punto del modelo cobayo de infección por la variante argentina de Influenza H1N1 hu/Arg/09 sin adaptar.
- Evaluación de la eficacia de los VHHs que hayan demostrado actividad neutralizante *in vitro*, frente al desafío con virus infeccioso en el modelo cobayo (con transmisión por aerosol), utilizando la variante argentina de Influenza H1N1 hu/Arg/09.
- Análisis de la secuencia específica de los epítopes de HA0 mediante ELISA de péptidos y análisis de interacción entre proteínas *in silico*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

CULTIVOS CELULARES

Todas las cepas virales utilizadas fueron amplificadas en la línea celular MCDK (*Madin-Darby Canine Kidney*) (*American type culture Collection*, Cat. #ATCC CCL 34) derivadas de riñón de perro debido a su sensibilidad para multiplicar el virus Influenza¹²⁹, suministradas por el Servicio de Cultivos Celulares del CICVyA de INTA Castelar. Para el mantenimiento celular se utilizó medio MEM-D (Medio Esencial Mínimo Modificado de Dulbecco), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % (Internegocios, Argentina) y penicilina-estreptomina en 100 U/ml-100 µg/ml (Invitrogen). Las incubaciones para crecimiento de las células y multiplicación viral se realizaron a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂.

CEPAS VIRALES

Durante los ensayos se utilizaron diversos virus según se detalla en la tabla 5.

Tabla 5. Detalle de las cepas utilizadas en la realización de los diferentes ensayos.

Abreviatura	Nombre	Detalle
hu/PR8/34	A/PuertoRico/8/1934 (H1N1)	Cedido por Dr. Xavier Saelens (VIB, UGhent, Bélgica).
av/Viet/04	A/Vietnam/1203-CIP045_RG002/2004	Baja patogenicidad, virus cedido por el Dr. Daniel Pérez (University of Georgia, Athens, Estados Unidos). Obtenido por genética reversa, reasortante con HA de A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) y el resto del genoma de A/PuertoRico/8/1934 (H1N1).
hu/Arg/09	A/Argentina/017/2009 (H1N1)	Aislamiento argentino cedido por la Dra. Elsa Baumeister (INEI, Malbrán).
hu/Arg/09ma	A/Argentina/017/2009 (H1N1) adaptado al ratón	Obtenido tras la adaptación mediante 7 pasajes en el ratón de un aislamiento argentino de la pandemia del año 2009.
hu/Perth/09	A/Perth/16/2009 (H3N2)	Cedido por la Dra. Elsa Baumeister.
sw/Perth/08	A/swine/Argentina/CIP051-A2/2008) (H3N2)	Aislamiento argentino porcino ¹³⁰
eq/Arg/12	A/eq/Palermo/E-2345-1/12) (H3N8)	Aislamiento argentino equino ¹³¹
av/Arg/08	A/red-winged tinamou/Argentina/MP1/2008 (H1N1)	Aislamiento argentino de aves no migratorias silvestres ¹³²
hu/Bri/07	A/Brisbane/59/07(H1N1)	Cedido por el Dr. Daniel Perez, UGA
hu/Ca/09 ma	A/California/04/09 adaptado al ratón	Cedido por el Dr. Daniel Perez, UGA
sw/SD/18	A/swine/South Dakota/A02016893/2018 (H1N1)	Cedido por el Dr. Daniel Pérez, UGA
av/Del/09	A/Ruddy Turnstone/Delaware/300/09	Cedido por el Dr. Daniel Pérez, UGA

STOCK VIRAL

Generación de stock viral en monocapas de células MDCK

Se utilizaron monocapas de células MCDK con un 80 % de confluencia en cabina de seguridad biológica de clase 2 siguiendo los pasos que se detallan a continuación. Lavado: Se descartó el medio y se realizaron dos lavados de la monocapa con solución PBS 1X estéril. Inoculación y adsorción: se inoculó la monocapa con 0,5-1 ml del stock a amplificar, colocando gota a gota en diferentes puntos de la monocapa y luego se rotó levemente el soporte de modo tal asegurar que toda la monocapa tenga contacto con el inóculo. Luego se completó el volumen (Tabla 6) con solución de infección (MEMD; BSA 0,2 %; Tripsina TPKC 20 µg/ml; ATB 1X: penicilina-estreptomicina en 100 U/ml-100 µg/ml; HEPES 25 mM) y se incubó durante 1 hora en estufa a 37 °C y 5% de CO₂ (o cámara a 37 °C en caso de roller de 1 litro). Luego se llevó a volumen final según la tabla 6 y se evaluó diariamente en microscopio óptico hasta la observación de efecto citopático (CPE) en toda la monocapa. Luego se realizó un ciclo de congelamiento/descongelamiento para favorecer la liberación de partículas virales hacia el sobrenadante. Clarificación: se centrifugó a 3000 g, 10 minutos a 4 °C, para remover detritos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se procedió a la titulación por hemaglutinación y por infectividad de monocapas de células MDCK. Se conservó a -70 °C hasta su uso.

Tabla 6. Soporte y volúmenes utilizados para la producción de stock viral

Soporte	Lavado con PBS	Adsorción	Volumen final
T25	3 ml	3 ml	6 ml
T75	5 ml	5 ml	10 ml
Roller 1Litro	10 ml	10 ml	50 ml

Generación de stock viral en huevos embrionados de gallina

Se utilizaron huevos embrionados de gallinas de 10-12 días de desarrollo, los mismos son libres de patógenos específicos (SPF, *Specific Pathogen Free*; Provistos por Rosenbusch S.A.). Las manipulaciones que implican el manejo de virus y apertura de los huevos se realizaron en cabina de seguridad biológica tipo 2. Preparación y examinación de los huevos: los huevos se examinaron mediante iluminación con una lámpara en un ovoscopio, aquellos huevos que no están fertilizados poseen roturas, baja vascularización o cáscara muy porosa y son descartados debido a que sus condiciones no son óptimas para la propagación del virus. Los huevos se higienizaron con etanol:agua (70:30) y se posicionaron con el borde romo hacia arriba. Inoculación viral: Con un punzón se realizó

un pequeño agujero en la parte superior mediante el cual se inserta la aguja (22G) a 45 grados con el inóculo (100-200 μ l). La aguja se inserta de este modo ya que de esta manera se evita el daño y posible muerte prematura del embrión (Figura 11). Luego de retirar la aguja, se sella la obturación con pegamento tipo voligoma o esmalte de uñas. Incubación: los huevos se incuban por 48 horas en una cámara húmeda a 37 °C y con rotación automatizada de los huevos. Aquellos embriones que mueren dentro de las 24 horas son descartados dado que se considera que se debe a un error en la técnica de inoculación viral. Cosecha: Los huevos se colocaron a 4 °C ON para favorecer la contracción vascular y muerte del embrión. Luego de la limpieza del huevo con etanol al 70%, se cortó con una tijera la cascara sobre el saco aéreo, dejando al descubierto la membrana alantoidea, la cual se removió suavemente con una pinza. De este modo, se puede acceder al líquido alantoideo, el cual se recolecta con una pipeta, se obtienen entre 12-15 ml de líquido alantoideo por huevo. Clarificación: para remover exceso de sangre y tejidos se centrifugó a 2000 rpm (Beckman Coulter J-26 XP; rotor JS5.3) por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se procedió a la titulación por hemaglutinación y por infectividad de monocapas de células MDCK. Se conservó a -70 °C hasta su uso.

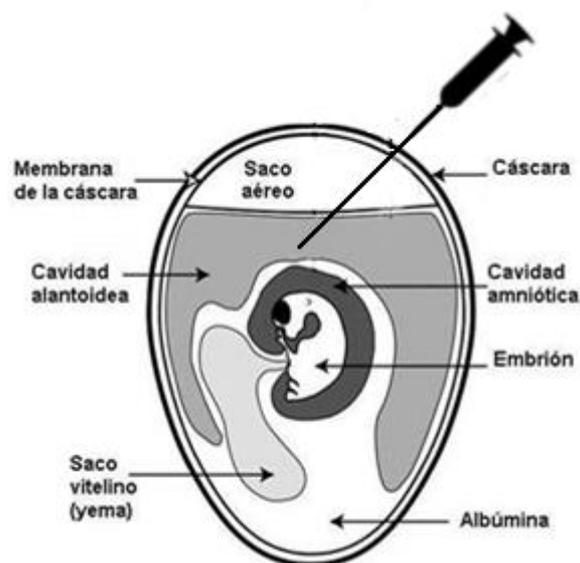


Figura 11. Inoculación en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de gallina de 10-12 días. Se detalla el ingreso de la aguja en el huevo de modo tal de poder recoger líquido de la cavidad alantoidea sin dañar al embrión.

Concentración de virus Influenza por gradiente discontinuo de sacarosa

Se utilizaron células MDCK infectadas con virus Influenza cosechadas luego de observar efecto citopático del 90-100 %. Se realizó un proceso de descongelado/congelamiento para favorecer la ruptura de las células y la liberación de partículas virales. Se clarificó a 3000g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se distribuyó en 4 tubos y se cargó sobre un gradiente discontinuo con 4ml de sacarosa 70 % p/v en buffer NET (NaCl 100 mM; Tris HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM) y 8 ml de sacarosa 20 % p/v. Se centrifugó a 25000 rpm, durante 2 horas a 4°C (Beckman, rotor SW28) y se recuperó la interfase entre las dos capas.

Concentración de virus Influenza por ultracentrifugación

Se utilizaron células MDCK infectadas con virus Influenza cosechadas luego de observar efecto citopático del 90-100 %. Se realizó un proceso de descongelado/congelamiento para favorecer la ruptura de las células y la liberación de partículas virales. Se clarificó a 3000 g por 10 minutos a 4 °C. Se centrifugó a 25000 rpm, durante 4 horas a 4 °C (Beckman, rotor SW28) y se resuspendió el pellet en 100 µl de PBS-20 % glicerol.

Purificación viral por Sartobind Q

Se utilizó una membrana de Sartobind Q con un volumen igual 1 V=1 ml y un flujo manual de aproximadamente 1V/minuto. Primero se equilibró la membrana con 30 V (30 volúmenes= 30 mililitros) de buffer de equilibrio (Tris 0,05 M; pH 7,2; EDTA 0,005 M). Luego se diluyó el virus concentrado por colchón de sacarosa llevándolo a volumen igual de 10 ml con buffer de equilibrio y se pasó por la membrana, recibiendo el eluido en un tubo cónico de 50 ml (*Flow Through*). Luego se lavó la membrana con 15V de buffer de lavado (Tris HCl 10 mM; NaCl 1 mM; EDTA 1 mM; pH 7,5) recibiendo el eluido (Lavado 1). Después se eluyó con 10V de buffer de elución (Tris 0,05 M; NaCl) de molaridad creciente de NaCl (0,3 M; 0,6 M; 0,9 M; 1,2 M), recolectando las muestras en volúmenes de 1ml y conservándolas en hielo. Finalmente se realizó un lavado con 30 V de buffer de lavado (Lavado 2), la posterior sanitización de la membrana con 30 V de NaOH 1 N (Sanitización) y el lavado final con 20 V de EtOH 20 % (Lavado final). Por último, se evaluó la presencia ARN viral mediante nanodrop y la titulación de las alícuotas por infectividad de monocapas de células MDCK y hemaglutinación.

REACTIVOS

Proteínas recombinantes

Hemaglutinina (HA0). La HA0 de PR8 H1N1 fue proporcionada por el Dr. José Ángel Escribano (ALGENEX S.L., Madrid, España). Consistía en el fragmento principal (18-529 aa) de la hemaglutinina (HA0) del virus PR8¹³³ fusionado a la etiqueta 6x histidina. La proteína se generó utilizando el sistema de expresión de larvas de insectos *Trichoplusia* infectadas con un vector de baculovirus recombinante. Después de la expresión, las larvas se homogeneizaron y la proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad de metales (IMAC) utilizando iones de cobalto cargados con HisPure® CobaltResin (*Thermo Scientific*).

Plásmidos

El fagémido pHEN4 es un derivado de pUC 119 que contiene un péptido señal PelB con un sitio SfiI interno, lo que permite clonar genes de anticuerpos como fragmentos SfiI-NotI; y una etiqueta de péptido c-myc introducida directamente después del sitio NotI, seguida de un codón stop. El vector pHEN6 es equivalente al vector pHEN4, excepto que la etiqueta HA y el gen III fueron reemplazados por una etiqueta de detección y purificación de histidina 6x.

Cepas de *Escherichia coli*

TG1: K12, Δ (lac-pro), supE, thi, hsdD5 / F'traD36, proA + B +, lacIq, lacZΔM15.
XL1Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)].

Sueros inmunes utilizados. Suero de llama H1N1

Se obtuvo con el fin de analizar el curso de la respuesta inmune específica, tomando una muestra de sangre (5 ml) justo antes de cada inmunización de la llama de la cual se generó la biblioteca de VHHs. La evaluación de la respuesta inmune específica al H1N1 a lo largo del curso temporal de la inmunización se evaluó en suero mediante: ELISA HA0, en placas recubiertas con proteína HA0 recombinante (5 μg/ml); ELISA H1N1, en placas recubiertas con virus H1N1 (32 UHA/pocillo), mediante ensayo de inhibición de la hemaglutinación H1N1 hu/Arg/09; y ensayo de microneutralización (MN) (Dra. Elena Barbieri).

Suero de animales

Suero conejo H1N1. Se obtuvo suero de conejo inmunológico después de tres inmunizaciones intramusculares secuenciales (días 0, 15 y 21) de 0,5 ml / dosis de la misma vacuna trivalente comercial (Novartis®) que contiene A/California/07/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2) y B/Brisbane/60/2008, utilizados para la inmunización de llamas. Se recogió suero de control negativo del mismo animal antes de iniciar el esquema de inmunización (Dra. Elena Barbieri). **Suero de ratón H1N1.** Se obtuvo suero inmunitario de ratón (α -H1N1) después de la administración subcutánea de una dosis de la vacuna experimental descrita anteriormente, formulada con adyuvante incompleto de Freund. Se administró una dosis de 100 μ l a una hembra BALB/c de 8 semanas de edad (n=14). El sangrado final se realizó 21 días después de la inmunización. Se analizó el nivel de anticuerpos para cada muestra individualmente mediante ELISA HA0 y ELISA H1N1, se combinaron las muestras con títulos de ELISA superiores a 1:2048 (MS Josefina Bazterrica). Estas muestras de sangre se procesaron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, después de 30 minutos de incubación a 37 °C, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Obtención de glóbulos rojos de gallina

Se extrajo sangre por punción de vena del ala en proporción 1:1 con solución de Alsever. Se homogeneizó por inversión la sangre obtenida. Se llevó a hasta volumen de 10 ml con PBS 1X y se mezcló suavemente por inversión. Luego se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4 °C (Beckman Coulter J-26 XP; rotor JS5.3), se descartó el SN suavemente por pipeteo, se completó a volumen de 10 ml con PBS 1X y se resuspendió el pellet suavemente. Este paso de lavado se repite al menos 2 veces o hasta que el SN quede límpido y transparente. Luego del último lavado se descarta SN y se prepara la solución final de trabajo en proporción 0,5 % en PBS 1X. Se utiliza fresca, como máximo 72 horas dentro de la extracción.

Obtención de glóbulos rojos de cobayo

Se extrajo sangre por punción de vena de miembro inferior en proporción 1:1 con solución Alsever. Se homogeneizó por inversión la sangre obtenida. Se llevó a hasta volumen de 10 ml con PBS 1X y se mezcló suavemente por inversión. Luego se centrifugó a 1500 rpm durante 7 minutos a 4 °C (Beckman Coulter J-26 XP; rotor JS5.3), se descartó el SN

suavemente por pipeteo, se completó a volumen de 10 ml con PBS 1X y se resuspendió el pellet suavemente. Luego se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se descartó SN. Este paso de lavado se repite al menos 2 veces o hasta que el SN quede límpido y transparente. Luego del último lavado se descarta SN y se prepara la solución final de trabajo en proporción 0,83 % en PBS 1X (dilución seriada 1:4 y luego 1:30 en PBS 1X). Se utiliza fresca, como máximo 72 horas dentro de la extracción.

CARACTERIZACIÓN DE STOCK VIRAL

Titulación viral por hemaglutinación

Se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en U. Se agregaron 50 µl de PBS 1X en cada pocillo, incluyendo los pocillos control. Luego de agregaron 50 µl de virus y se realizó dilución seriada al medio, pasando 50 µl (se descartan los últimos 50 µl). Luego se agregaron 50 µl de solución de final de trabajo de glóbulos rojos (GR) de gallina o cobayo tanto en los pocillos con muestra como en los controles. Se incubó a TA hasta la formación de botón en el control de GR (aproximadamente 30 minutos con GR de gallina; 40-60 minutos GR de cobayo). Se registró el resultado como la inversa de la dilución máxima que es capaz de hemaglutinar la suspensión de glóbulos rojos en 50 µl (UHA/50 µl).

Titulación por infectividad de monocapas de células MDCK

Solución de células MDCK: Se descartó el medio de cultivo y se lavó la monocapa con PBS 1X para descartar el SFB presente (ya que inhibe la actividad enzimática de la tripsina). Se adicionó tripsina a 37 °C y se incubó durante 1-3 minutos a 37 °C hasta la visualización de la disgregación de la monocapa. Se agregó 3ml de medio, se levantaron las células y se centrifugó 3 minutos a 1800 rpm a 4 °C (Beckman Coulter J-26 XP; rotor JS5.3). El *pellet* celular se suspendió en 1 ml de medio y se contabilizaron las misma utilizando una cámara de Neubauer al microscopio óptico. Se generó una suspensión de trabajo de células MDCK 1×10^5 cel/ml. Infección: se utilizaron placas para cultivo celular de 96 pocillos. Se agregaron 100 µl de medio de infección (MEM-D; 0,2 % BSA; Tripsina TPKC 20 µl/ml; HEPES 25 mM; Antibiótico-Antimicótico 1 %) a todas las columnas. Se agregó 11 µl de virus en la primera fila (por duplicado) y se realizó una dilución seriada base 10. Luego se agregó 100 µl/pocillo de la suspensión celular y se incubó durante 48h en estufa de CO₂ a 37 °C. Finalmente se evaluó el efecto citopático al microscopio óptico.

Se tomaron 50 µl del SN y se confirmó por hemaglutinación con glóbulos rojos la presencia de partículas virales.

Titulación por ELISA de monocapas de células MCDK infectadas con virus

Se descartó el SN de la placa con la monocapa de células MDCK infectadas y se fijaron las células con 150 µl/pocillo de acetona al 70 % durante 10-12 minutos. Luego se lavó 3 veces con PBST 0,1 %. Luego se agregó 100 µl/pocillo de suero de conejo anti-H1N1 (dil 1:1000) y se incubó 1 hora a 37 °C en la estufa de CO₂. Se lavó 4 veces con PBST y se agregó 100 µl/pocillo de suero anti-conejo POD (dil 1:2000) y se incubó 1 hora a 37 °C. Luego se lavó 3 veces con PBST y una vez con PBS. Se reveló con 100 µl/pocillo de solución ABTS/H₂O₂ y se frenó con 50 µl de solución de frenado (SDS al 5 %). Se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector ELISA (Multiskan EX, *Thermo Scientific*).

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE NANOANTICUERPOS

Concentración media efectiva (CE₅₀) definida como la concentración de VHH requerida para alcanzar el 50% de la señal

La CE₅₀ se determinó después de representar gráficamente el logaritmo de la dilución de los nanoanticuerpos frente a la lectura de absorbancia a 405 nm. Los controles incluyeron suero inmune de conejo (positivo) y suero de conejo no inmune y un VHH no relacionado (nr-VHH) (negativo) mediante la utilización del programa GraphPad Prism 8.0.1.

Ensayo de microneutralización. Los títulos de neutralización de VHH se determinaron mediante ensayos de microneutralización (MN) realizados en células MDCK. Las muestras de VHH se diluyeron en buffer PBS (rango de 12,5 µg a 7,5 ng) en diluciones seriadas al medio, se incubaron 50 µl de cada dilución con 100 DICT₅₀ de virus en placas de cultivo celular de 96 pocillos durante 1 hora a 37 °C. A cada pocillo se le añadieron 100 µl de células MDCK (2x10⁵ células/ml) y se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Las células se fijaron con acetona al 70 % durante 15 minutos y se detectó la presencia de infección viral mediante ELISA. Para ello, se añadió a cada pocillo suero de conejo anti-virus Influenza A (dilución 1:8000). Después de la incubación a 37 °C durante 1 hora, las placas se lavaron con PBST y la unión se detectó con un conjugado de HRP de IgG anti-conejo de cabra (1:2000) (KPL). Luego de 1 hora de incubación a 37 °C, las placas se lavaron con PBST y se reveló mediante ABTS/H₂O₂ (100 µl/pocillo). La absorbancia a 405 nm se leyó en un lector ELISA (Multiskan EX, *Thermo Scientific*). El título de Ab neutralizante se expresó como inversa de la dilución más alta que inhibe la infección viral.

El valor de corte se calculó restando la absorbancia media obtenida de las células de control.

Inhibición de la hemaglutinación

Se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en U siguiendo los lineamientos de la WHO con algunas modificaciones¹²⁹. Los VHHs se diluyeron en PBS en diluciones seriadas en base 2 comenzando por una concentración de 1 µg/µl, en un volumen final de 25 µl. Se utilizaron además como controles el suero de conejo anti-H1N1, suero de llama inmunizada y una columna como control de glóbulos rojos. Se agregaron 25 µl de virus por pocillo (8 UHA/pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se agregó la suspensión de glóbulos rojos en todos los pocillos y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la placa evaluando la presencia/ausencia del botón rojo. Se tomó como punto final de la actividad del VHH como la inversa de la máxima dilución (mínima concentración de VHH) en la que el fenómeno de hemaglutinación fue inhibido completamente y el botón formó una lágrima al colocar la placa en ángulo vertical.

Arreglo de péptidos

El arreglo está representado por una serie de péptidos que representan la hemaglutinina en 139 péptidos de una longitud de 14-15 aminoácidos con solapamientos de 11 aminoácidos de la proteína Hemaglutinina de un aislamiento del virus H1N1 pandémico 2009 (H1N1 A/California/04/2009) (NR-15433, BEI Resources; GenPept: ACQ76318), se analizaron los sitios de unión de los nanoanticuerpos a dicha proteína. La técnica consistió en la realización de un ELISA, en el cual los péptidos fueron inmovilizados y fue analizada la unión de los distintos nanoanticuerpos de interés. Para la realización del ELISA, los péptidos fueron resuspendidos siguiendo las indicaciones del proveedor, y los mismos se inmovilizaron en una placa de 96 pocillos (400 ng/pocillo de cada péptido) ON a 37 °C, el bloqueó se realizó con leche descremada 3 % en PBS durante 1 hora a 37 °C. Los VHHs de interés se diluyeron en solución de bloqueo, colocando 20-40 ng/pocillo, y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se utilizó un suero de conejo α-VHH (1:5000), el que nuevamente se incubó 1 hora a 37 °C. Los anticuerpos unidos fueron detectados con un conjugado HRP de cabra α-conejo (1:2000), que luego de 1 hora a 37 °C fue revelado con solución TMB, se utilizó un lector de ELISA para leer la absorbancia a 450 nm. Los lavados fueron realizados con agua de canilla.

ELISA en condiciones reductoras

Se utilizaron placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp), en las cuales fueron inmovilizado con virus o sobrenadante de células MDCK como control negativo, a 4 °C ON (*overnight*). Las placas se bloquearon con leche descremada al 3% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Luego se lavaron 2 veces con PBST y se incubaron con una solución buffer a pH 5,5 (ácido cítrico 15 mM; NaCl 150 mM) por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de 2 lavados con PBST 0,1 %, se adicionó una solución de ditioneitol (DTT) para reducir el enlace disulfuro que conecta las HA1 y la HA2, de modo tal de remover la subunidad globular de la HA1. Se lavaron las placas 3 veces, se adicionaron los VHHs en una dilución seriada 1:5, comenzando con la concentración 40 µl/pocillo y se incubó 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó tres veces, se añadió 50 µl/pocillo de anti-6xhistidina-HRP y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Luego del lavado se adicionó TMB para determinar la unión específica de los VHHs, la reacción se frenó con H₂SO₄ 1M. Por último, las placas se leyeron en un lector de ELISA a 450 nm. Se definió unión positiva como el recíproco de la dilución más alta con una densidad óptica a 450 nm (DO₄₅₀) que es al menos el doble de la DO₄₅₀ de los pocillos de los controles negativos.

Estudio de especificidad mediante reactividad cruzada contra cepas heterólogas por ELISA

Se realizó un ELISA con 32 UHA de cada virus (hu/Arg/09; hu/Arg/09ma; av/Arg/08; hu/Perth/09; sw/Arg/08; eq/Arg/12; av/Viet/04) y 10 µl/ml de cada VHH en una única dilución (500 ng/pocillo). Como control positivo se utilizó suero de conejo inmunizado (dilución 1/1000) y como control negativo se utilizó un VHH no relacionado (VHHnr). Un valor de OD₄₀₅<0,01 fue considerado como falta de unión del VHH frente al virus. Las cepas utilizadas para el estudio de la reactividad cruzada incluyeron ambos grupos filogenéticos en los cuales se divide a las HA en función de su secuencia aminoacídica y que a su vez resultan de interés dado su impacto en la salud humana, animales de producción y/o compañía. Brevemente, el ELISA consistió en el *coating* de 32 UHA/pocillo en placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp), ON a 4 °C, del virus de interés. Se utilizó como solución de bloqueo 2 % BSA en PBST a 37 °C durante una hora. Los distintos VHHs (500 ng/pocillo) se incubaron a 37 °C por 1 hora. Se incubaron las placas con suero de conejo anti-VHH (1:5000) durante 1 hora a 37 °C para detectar la presencia

de VHH unido al virus. Se utilizó suero de cabra anti-conejo conjugado con POD (1:2000) el cual se incubó durante 1 hora a 37 °C. Todos los lavados se realizaron con PBST 0.01 %. El revelado se realizó con H₂O₂/ABTS y se midió finalmente la absorbancia con un lector de ELISA a 405 nm.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE HA Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE UNIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INTERACCIÓN DE DE PROTEÍNAS

Extracción de RNA

Se extrajo el ARN viral total del sobrenadante de células MDCK infectadas usando el *kit* NucleoSpin RNA Virus (Macherey-Nagel, cat 740956.250) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADNc correspondiente a los segmentos de ARN viral (ARNv) de HA y NA se generó usando el *kit* de síntesis de ADNc *Transcriptor First Strand* (Roche, cat 04897030001). Los segmentos de Influenza se amplificaron mediante PCR utilizando *primers* específicos del segmento y CloneAmp HiFi PCR Premix (ClonTech, cat 639298). Se enviaron al menos 3 muestras de cada segmento para secuenciar y analizar para determinar la presencia de mutaciones. Paralelamente, se analizó la secuencia del segmento 7 altamente conservado, que codifica las proteínas M1 y M2, como control interno de la cepa.

Análisis de secuencias

La evaluación de las sustituciones aminoacídicas se analizó utilizando el método Clustal Wallis en Bioedit 7.2, utilizando la numeración H1 ¹³⁴.

Modelado molecular

Para el modelado de la HA se utilizó el modelado por homología con el SWISS-MODEL, que permitía la construcción de trímeros y para el modelado de los nanoanticuerpos se utilizó *Modeller* (a través del *Chimera*) cuya principal ventaja es la posibilidad de seleccionar varios templados para la construcción del modelo por homología ¹³⁵. En la Tabla 7 se muestra las moléculas modeladas, programas y templados utilizados en cada caso.

Tabla 7. Moléculas modeladas. Detalle de programas y plantados utilizados.

Molécula	Programa	Plantados	Estructura obtenida
HA H1N1 hu/Arg/09	ProMod3 3.1.1 (SWISS-MODEL)	6N41	Trímero
HA H1N1 hu/Arg/09ma	ProMod3 3.1.1 (SWISS-MODEL)	6N41	Trímero
B33	Modeller (a través de chimera)	5F1K_C 6GS1_H 4WEU_D	-
D81	Modeller (a través de chimera)	5VXK_B 6UL4_B 5JAB_B 6GWN_C 6GWP_C	-
E13	Modeller (a través de chimera)	6H7L_C 5HVG_B 6H7J_C	-
G41	Modeller (a través de quimera)	5XLV_C 5JQH_C 4H3J_A	-

Para la construcción del modelo de la HA con SWISS-MODEL¹³⁶, la búsqueda del plantado se basa en una búsqueda por BLAST a través de la secuencia aminoacídica primaria. En ambos casos el plantado con mayor posición en ranking fue el PDB 6N41 (A/Netherlands/002P1/1951 (H1N1)) dado su alta identidad de secuencia, porcentaje de cobertura y alta resolución, lo cual generaba en ambos casos un estimador de calidad del modelado dentro de los parámetros esperados (QSQE: *quaternary structure quality estimate* > 0,7). Este parámetro, el QSQE, refleja la precisión de los contactos intercadena, basados en el modelo construido y su plantado. Otros parámetros importantes que fueron evaluados y se obtuvieron valores esperados, son el QMQE (*quaternary model quality estimate*) que estima la precisión/calidad de la estructura terciaria del modelo, este sólo se computariza si es posible construir un modelo, y sólo para los plantados de mayor ranking (valores esperados entre 0-1); y por último el QMEAN, el cual es un estimador compuesto, basado en diferentes propiedades geométricas, el mismo provee una estimación absoluta tanto a nivel global (toda la estructura) como local (por residuo), los valores cercanos a 0 (tanto positivos como negativos) son considerados buenos estimadores. También se realizó en modelado de los nanoanticuerpos B33, D81, E13 y G41. Para ello se utilizó el modelado por homología utilizando Modeller, su ventaja por sobre SWISS-MODEL radica en la posibilidad de utilizar múltiples plantados para la realización del modelo, lo cual resulta de provechoso dada el bajo porcentaje de identidad (~65%) y cobertura de las secuencias de los VHHs en las bases de datos de PDB, lo cual

resulta lógico dado que su funcionalidad radica en su variabilidad de secuencia sobre todo en las zonas de reconocimiento y unión a antígenos. A su vez, mediante la base de datos de IMGT^{137,138}, se determinaron las 3 regiones variables de los nanoanticuerpos, denominadas CDR (*Complementarity Determining Region*) y sus respectivas zonas flanqueantes, más conservadas entre los VHHs, denominadas FR (*frameworks*). Estos datos fueron relevantes para la realización de la interacción proteína-proteína, teniendo en cuenta que los CDR están involucrados en el reconocimiento e interacción con los antígenos.

Interacción proteína-proteína

La interacción de proteínas se realizó utilizando el web-server ClusPro, que funciona realizando una interacción sobre un cuerpo rígido y estima la energía de todas las conformaciones producidas utilizando un programa denominado PIPER. Para ello sitúa a la proteína elegida como receptor en el origen de coordenadas y mueve a la proteína elegida como ligando alrededor, trasladando al ligando a lo largo de una grilla tridimensional de tamaño de paso de 1 Å, y para cada posición en la grilla de traslación realiza 70000 rotaciones sobre el eje del ligando, dando como resultado, aproximadamente de 10^9 a 10^{10} conformaciones para el complejo estudiado. Luego, las 1000 conformaciones de menor energía son agrupadas en clústers en función de la similitud entre ellas (estimadas por iRMSD, una medida de alineamiento de secuencias en función de datos estructurales). El programa produce un máximo de 30 clústeres y realiza una minimización de la energía entre las conformaciones en cada uno de ellos. Finalmente, el programa devuelve el modelo central (es decir el más cercano al promedio de los modelos de dicho clúster) con su energía asociada, y los mismos son rankeados en función del tamaño del clúster (cantidad de miembros pertenecientes al mismo), de modo tal que el clúster de mayor tamaño posee la mayor cantidad de miembros, es decir asociado a una mayor probabilidad de que la conformación del modelo sea similar a una conformación nativa del complejo.

El análisis se realizó utilizando el PDB de la HA cristalizada del aislamiento H1N1 hu/Cal/09 (3LZG). Para la realización del estudio de interacción, se realiza una máscara (*Masking*) de las moléculas, tanto receptor como ligando, que especifican las zonas de atracción y repulsión entre las proteínas para dirigir el algoritmo de búsqueda de conformaciones más estables hacia regiones de interés. En nuestro caso, se realizó un

masking utilizando información de los CDRs de los nanoanticuerpos como así también sobre la HA^{139,140}

Análisis filogenético de secuencias de HA de los virus utilizados

Se utilizó la herramienta provista por el IRD (*Influenza Research Database*) para la generación de un árbol filogenético como así también para el estudio de clados de las secuencias analizadas (<https://www.fludb.org/>).

CARACTERIZACIÓN EN MODELO *IN VIVO*: MODELO MURINO

Animales

Los procedimientos realizados en animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Experimentación (CICUAE) del CICVyA de INTA Castelar (22-2014; 23-2014; 24-2014; 26-2018). Los procedimientos fueron realizados en laboratorios del Nivel de Seguridad 2 del Instituto de Virología del CICVyA de INTA Castelar. Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad provistos por el Bioterio de INTA Castelar, los mismos fueron alojados en jaulas en grupos de 5 animales y recibieron alimento balanceado y agua *ad libitum*, en un ambiente con temperatura controlada.

Diseño experimental

Tanto la administración de nanoanticuerpos como de inóculo viral se realizó vía intranasal (in) bajo anestesia intraperitoneal (ip) de xilacina (5 mg/kg) y ketamina (50 mg/kg). La administración de los tratamientos se realizó 4 horas previas a la administración del inóculo viral. Se realizó el seguimiento diario de peso y la observación de signos de estrés durante 12-14 días y la titulación viral de homogenato de pulmón al 4 dpi. Aquellos los animales que presentaron un 30% de pérdida de peso fueron anestesiados vía inhalatoria utilizando isoflorano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter) y eutanasiados por dislocación cervical.

Procesamiento de pulmón y titulación viral de homogenato de pulmón

Se extrajeron los pulmones de los ratones y se lavaron secuencialmente en dos tubos de 50 ml con PBS 1X-ATB 1X (Gibco) hasta eliminar rastros de sangre. Luego se realizó un proceso de congelamiento/descongelamiento (-70°C) para favorecer la lisis celular y liberación de partículas virales en tubos *ependorf* de 1,5 ml. Se agregaron trazas de arena estéril y se realizó la homogenización con un mortero estéril y utilizando 300 µl de PBS

1X-Anti-Anti 2X (Gibco) hasta lograr la homogenización del tejido. Luego se centrifugó a 3000 g por 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Las muestras se almacenan a -70 °C hasta la realización de la titulación viral de sobrenadante (SN). El título viral de los homogenatos de pulmón fue determinado mediante la infección de monocapas de células MDCK. Para ello se realizaron diluciones seriadas en base 10 de los homogenatos en medio de infección (MEM-D suplementado con BSA (0,2 %), Tripsina TPKC (20 µg/ml) y HEPES (25 mM)). El título viral fue calculado mediante el método Reed y Muench ¹⁴¹ y expresado como 50% Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos por mililitro (DICT₅₀/ml), luego de 48 horas de incubación mediante la observación de efecto citopático (CPE), titulación por hemaglutinación directa de los sobrenadantes y ELISA sobre monocapas de células MDCK.

Obtención de sangre entera y sueros

Las muestras de sangre recogidas después del sangrado final intracardiaca bajo sedación profunda y posterior dislocación cervical. Se incubaron durante 30 minutos, y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos (Beckman Coulter J-26 XP; rotor JS5.3). Se almacenaron a -20 ° C hasta su uso.

Adaptación de la cepa H1N1 hu/Arg/09 al ratón

Para la adaptación del virus H1N1 hu/Arg/09 al ratón, se inocularon ratones (n=5) con una dosis inicial de 1×10^6 DICT₅₀/ml diluido en PBS (1:10). Los animales se controlaron de manera diaria, controlando el peso y signos de estrés general. Cuatro días posterior a la inoculación viral se sacrificaron los ratones bajo anestesia, se extrajeron los pulmones y se procesaron para su posterior titulación. El título del virus en homogenato de pulmón se controló a lo largo de los distintos pasajes mediante infección de monocapas de células MDCK y aquel con mayor título fue utilizado como inóculo para el siguiente pasaje (CICUAE 22-14). Luego de un total de 7 pasajes, se seleccionó el homogenato de pulmón con mayor título y se clonó para la generación de un *stock* de trabajo mediante tres rondas por dilución de punto final en células MDCK. El stock viral fue titulado por infectividad de monocapas de células MDCK, hemaglutinación, como así también se determinó la Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratones, definiéndola como la dosis en la que el 50 % de los ratones infectados exhibieron una pérdida de peso del 30 % o muerte entre 5 y 10 dpi.

Eficacia profiláctica de nanoanticuerpos en el modelo ratón

Con el fin de estudiar los VHHs candidatos dado la capacidad neutralizante *in vitro*, se estudió la eficacia profiláctica *in vivo* de los nanoanticuerpos utilizando 5 mg/kg frente al desafío viral con 2 DL₅₀ del virus H1N1 hu/Arg/09ma. Luego se utilizaron los VHHs E13 y G41 y se estudió su eficacia frente a 4 DL₅₀ tanto del virus H1N1 hu/Arg/09ma como H1N1 hu/PR8/34, se controló la evolución del peso corporal a lo largo de los 12-14 días del ensayo (n=5) como así también el título viral alcanzado al 4 dpi (n=5). A su vez, se estudió la dosis efectiva de los mismos, probando E13 con dosis que variaban de 100 a 1 µg por ratón (n = 5) (5 a 0,05 mg/kg) o G41 con dosis de 200 µg y 100 µg por ratón (10 y 5 mg/kg) 4 horas antes del desafío viral (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen de los ensayos de eficacia profiláctica realizados

Ensayo	Tratamiento		Desafío	
	VHHs	Dosis	Virus	Dosis DL50/ DICT50
Screening de los VHHs candidatos	A5	5 mg/kg	H1N1 hu/Arg/09ma	2 DL ₅₀ / 10 ^{6,81}
	B33			
	D81			
	D91			
	E13			
	G41			
Eficacia profiláctica específica a virus	E13	5 mg/kg	H1N1 hu/Arg/09	na/ 10 ^{4,58}
	G41		H1N1 hu/Arg/09ma	4 DL ₅₀ / 10 ^{7,12}
			H1N1 hu/PR8/34	4 DL ₅₀ / 10 ^{5,11}
Dosis efectiva	E13	5 mg/kg	H1N1 hu/Arg/09ma	4 DL ₅₀ / 10 ^{7,12}
		1,25 mg/kg		
		0,5 mg/kg		
		0,05 mg/kg		
	G41	10 mg/kg		
		5 mg/kg		

na: no aplica

Estudio de la eficacia profiláctica de nanoanticuerpos expresados en distintos sistemas de expresión (*P. pastoris* y *E. coli*) en el modelo ratón

Con el fin de estudiar la eficacia profiláctica de los VHHs E13 y G41 expresados en *P. pastoris* y en *E. coli*, se estudió la eficacia profiláctica *in vivo* de los mismos utilizando 5 mg/kg (100 µg/animal) frente al desafío viral con 2 DL₅₀ del virus H1N1 hu/Arg/09ma. Tanto la administración de nanoanticuerpos como de inóculo viral se realizó vía intranasal (in) bajo anestesia intraperitoneal (ip) de xilacina (5 mg/kg) y ketamina (50 mg/kg). La administración de los tratamientos se realizó 4 horas previas a la administración del

inóculo viral. Se realizó el seguimiento diario de peso (n=5) y la observación de signos de estrés durante 12-14 días, y la titulación viral de homogenato de pulmón al 4 dpi (n=5).

Técnica de ELISPOT. Evaluación de la respuesta inmune frente al desafío viral y tratamientos mediados por VHHs

Diseño experimental. Se evaluó la respuesta específica de los isotipos IgA, IgM e IgG contra el virus H1N1 hu/Arg/09, HA0r (recombinante de PR8/1934) y los VHH E13 y G41 en animales tratados con E13 (grupos con 100 µg; 50 µg y 25 µg dosis por animal), G41 (200 µg y 100 µg), un grupo control negativo (tratado con PBS) y un grupo control positivo (suero α-H1N1), 4 horas previas al desafío viral con 2 DL₅₀/50 µl de la cepa H1N1 hu/PR8/34 (n=5 por grupo). Luego de 28 días post-infección (dpi) se sacrificaron los animales, y se extrajeron pulmón, bazo y ganglios linfáticos cervicales (GLC). Se purificaron las células mononucleares provenientes de los distintos órganos y se evaluó la presencia de células productoras de anticuerpos mediante la técnica ELISPOT. Se contaron los números de *spot*/pocillo, indicadores de la presencia de una célula secretora y se expresaron como número de células secretoras cada 10000 células sembradas.

Generación de placas para la evaluación de respuesta específica. Para la respuesta específica contra el virus, se puso a punto un sistema de monocapas de células MDCK infectadas con H1N1 hu/Arg/09 buscando condiciones de focos aislados en placas de 96 pocillos. Se infectó con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 (10⁴ DICT₅₀/pocillo), se fijaron con acetona luego de 24 horas post-infección, se bloqueó con PBST-OVA 1 % y se reveló con el nanoanticuerpo E13 marcado con FITC (generado en nuestro laboratorio por el Dr. Gustavo Asenzo) en una dilución 1:50 en azul de Evans (1:200 en PBS), revelando la presencia de focos abundantes y aislados. Para la evaluación de la respuesta específica contra la HA0r y contra los VHHs se utilizaron 0,5 µg/pocillo de cada antígeno en 100 µl de buffer carbonato-bicarbonato (pH=9,6) ON a 4 °C en placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp). Luego de descartar el contenido se hicieron 3 lavados con PBST 0,01 %. Se bloqueó durante 1 hora a 37 °C con agitación con 100 µl/pocillo de una solución de PBST 0,1 %-2 % BSA. Se lavó 4 veces con PBST 0,1 % y luego del secado se dejaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

Obtención de células mononucleares de pulmón, bazo y GLC. Se sacrificaron los animales a los 28 dpi y se extrajeron pulmón, bazo y GLC de cada animal. Un pulmón se utilizó para la realización del ELISPOT y otra para titulación viral. Las muestras se mantienen en hielo. Se armaron *pooles* de los 5 animales de cada grupo de cada tejido en

buffer de lavado (1000 ml MEM E+D; 10 ml de HEPES; 20 ml Anti-Anti). Se lavaron 2 veces por inversión en 20 ml de *buffer* de lavado y luego se disectó en trozos pequeños utilizando tijera y removiendo los restos de tejido conectivo. Los trozos de tejido se incubaron en placas de Petri conteniendo medio de digestión (500 ml MEM/RPMI; 75 ml de SFB; 5 ml L-Glutamina; 12,5 ml de Hepes; 5 ml de ATB, 250 U/ml de colagenasa; 2 % Anti-Anti) a 37 °C por 45 minutos con agitación. Luego de pasaron las muestras por una malla metálica, repitiendo el pasaje por la misma al menos 3 veces y luego se recolectó la muestra en un tubo cónico de 50 ml. Luego se centrifugaron por 20 minutos a 4 °C a 550 g, se descartó el SN y se resuspendió en 5 ml de *buffer* de lavado. Luego se agregaron 13,5 ml de Percoll 90 % en cada tubo, se llevó a 50 ml con *buffer* de lavado y se mezcló por inversión. Se centrifugó 30 minutos a 4 °C a 2200 g, se descartó el SN y se resuspendió el *pellet* con 7 ml de Percoll 43 % y se sembró la suspensión celular sobre 5 ml de Percoll 70 %. Se centrifugó a 3000 g por 20 minutos a 4 °C sin freno. Se recolectó la interfase y se transfirió a un tubo de 15 ml, donde se completó el volumen hasta 14 ml con *buffer* de lavado y se centrifugó durante 20 minutos a 2200 g a 4 °C y se descartó el SN. Se repitió este paso y se resuspendió el *pellet* en medio de cultivo para linfocitos (500 ml MEM/RPMI; 50 ml de SFB; 5 ml L-Glutamina; 12,5 ml HEPES, 20 ml Anti-Anti; 0,5 ml 50 uM de betaMercapto; 5 ml de piruvato de sodio). Luego se contó en hematocitómetro en una dilución con azul tripan (1:50) y se calculó la dilución que contenía una concentración de células igual a 5×10^6 /ml.

ELISPOT. Se colocaron 100 μ l/pocillo de la dilución de linfocitos 5×10^6 /ml y diluciones seriadas de la misma en base 5 (500000; 100000; 20000; 4000 células totales por pocillo). Se centrifugaron las placas a 500 g durante 5 minutos a 22 °C. Luego se incubó a 37 °C en estufa con CO₂ durante 14-18 horas. Luego de 6 lavados con PBST 0,1 % se incubó 90 minutos a temperatura ambiente con 100 μ l de anticuerpo de cabra anti-IgG+IgM (1:1000), anti-IgA (1:1000) o anti IgG (1:1500) de ratón marcado con peroxidasa. Luego de 3 lavados con PBST y 1 lavado con PBS, se reveló con 50 μ l de TMB y se dejó en reposo durante 30 minutos, luego de los cuales se realizó la lectura de los *spots* en microscopio óptico.

CARACTERIZACIÓN EN MODELO *IN VIVO*: MODELO COBAYO

Animales

Los procedimientos realizados en animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Experimentación (CICUAE) del CICVyA de INTA

Castelar (11-2018; 15-2018). Los procedimientos fueron realizados en laboratorios del nivel de seguridad 2 del Instituto de Virología del CICVyA de INTA Castelar. Se utilizaron cobayos hembras (*Cavia porcellus*) de 300-350 gramos provistos por el Bioterio de INTA Castelar y el Laboratorio Azul. Los animales fueron alojados en jaulas con agua y comida *ad libitum*, suplementada con ácido ascórbico, condiciones de luz y temperatura controladas. Durante los ensayos de infección por contagio los animales fueron manipulados siguiendo estrictas medidas para prevenir la contaminación cruzada no deseada entre individuos.

Modelo de infección por contagio. Inoculación viral y monitoreo de los animales

Se utilizaron 3 grupos de animales que fueron desafiados con 10, 100 y 1000 DICT₅₀/ml del virus H1N1 hu/Arg/09 vía in respectivamente. Cada grupo consistió en un conjunto de 6 animales inoculados con virus más 1 animal inoculado con PBS (animal contacto) en contacto directo durante todo el ensayo con los individuos inoculados (n=7) en jaulas de 0,5 m x 0,5 m. Se introdujo un cuarto grupo como control, inoculado con PBS (n=3) que fue ubicado a una distancia de al menos 3 metros de los grupos inoculados con virus. Todos los grupos fueron inoculados con 300 µl/animal (150 µl por nostril) bajo anestesia ip con xilacina-ketamina (2-30 mg/kg). Se realizó el seguimiento de peso durante y LN bajo anestesia ip de xilacina-ketamina (1,3-20 mg/kg) en los 3, 5, 7 y 10 dpi. En el 10 dpi, los animales fueron sacrificados y se realizó la extracción pulmonar.

Diseño experimental para el estudio de eficacia profiláctica de los VHHs en el modelo de infección por contagio

Para la búsqueda del diseño experimental que permitiera el estudio de la eficacia profiláctica de los nanoanticuerpos E13, G41 y sus respectivos controles (suero α-H1N1 y PBS como tratamientos) se realizó un grupo de 6 animales (n=6) en los cuales 2 animales fueron inoculados con 1 ml de 1000 DICT₅₀/ml del virus H1N1 hu/Arg/09 y vía in y 4 animales fueron inoculados con PBS (contactos) y fueron colocados en contacto directo durante todo el ensayo con los individuos inoculados en jaulas de 0,6 m x 1 m. Todos los animales fueron inoculados con 300 µl/animal (150 µl por nostril) bajo anestesia ip con xilacina-ketamina (2-30 mg/kg). Se realizó el seguimiento de peso durante y LN bajo anestesia ip de xilacina-ketamina (1,3-20 mg/kg) en los 0, 3, 5, 7 y 11 dpi. En el 11 dpi, los animales fueron sacrificados y se realizó la extracción pulmonar.

Análisis de inocuidad de los VHHs como tratamiento intranasal en el modelo cobayo

A fin de evaluar la inocuidad de los nanoanticuerpos en los animales, se administraron distintas dosis de los mismos (100 µg/animal; 10 µg/animal) de los VHHs E13 y G41, como así también los controles (suero α-H1N1 y PBS) 4h previas al desafío viral con una dosis baja de virus (10 DICT₅₀/ml). Todos los animales fueron inoculados con 300 µl/animal (150 µl por nostril) bajo anestesia ip con xilacina-ketamina (2-30 mg/kg). Se realizó el seguimiento de peso durante y lavados nasales (LN) bajo anestesia ip de xilacina-ketamina (1,3-20 mg/kg) en los 0, 1, 3, 5, 7, 9 y 11 dpi. En el 11 dpi, los animales fueron sacrificados y se realizó la extracción pulmonar.

Lavado nasal (LN) y determinación de título viral

Para la determinación del título viral en el tracto respiratorio superior se realizó el LN bajo anestesia ip mediante la infusión por goteo intranasal con 1 ml de una solución estéril de PBS-2 % BSA y permitiendo el drenaje por vuelco del mismo en una placa de Petri. Las muestras fueron recolectadas en tubos eppendorf de 1,5 ml, centrifugadas por 5 minutos a 2000 g a 4 °C; los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta la determinación del título viral. Para ello se realizaron diluciones seriadas en base 10 de los LN en medio de infección (MEM-D suplementado con BSA (0,2 %), Tripsina TPKC (20 µg/ml) y HEPES (25 mM). El título viral fue calculado mediante el método Reed y Muench ¹⁴¹ y expresado como DICT₅₀/ml, luego de 48 horas de incubación mediante la observación de efecto citopático (CPE) y titulación por hemaglutinación directa de los sobrenadantes.

Determinación de título de anticuerpos en suero de cobayo

Con los sueros obtenidos en el día previo al desafío viral (t₀= tiempo inicial) y los obtenidos en el último día de la experiencia (t_f= tiempo final) se realizó un ELISA con el fin de evaluar el título de anticuerpos específicos previo y posterior a la exposición viral. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp), se inmovilizaron 32 UHA/pocillo del virus H1N1 hu/Arg/09 en *buffer coating* y se incubó ON a 4 °C, y como control se utilizó SN de células MDCK sin infectar (*Mock*). Se realizaron 4 lavados con PBST 0,1 % y se bloqueó durante 1 hora a 37 °C con 120 µl/pocillo de OVA 1 % en PBST 0,1 %. Luego se diluyeron los sueros de los animales en base 10, se colocaron 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron 4 lavados con PBST 0,1 % y se colocaron 100 µl/pocillo de anticuerpos de cabra marcado con POD anti-cobayo (dil 1:3000), luego de una incubación de 1 hora a 37 °C se lavó 4 veces con PBST 0,1 % y se

reveló con una solución de ABTS/H₂O₂. Finalmente se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific).

ESTADÍSTICA

Se utilizó el software GraphPad Prism 8 (versión 8.0.1) para el análisis estadístico. Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante ANOVA de un factor ($p < 0.05$) y un análisis *a posteriori* utilizando los test de Tukey o Dunnet según el caso. El análisis de seguimiento de peso de los animales se realizó comparando todos los tratamientos contra el grupo control tratado con solución salina en el día 7 post-inoculación. Se realizaron las curvas Kaplan-Meier para el análisis y evaluación de supervivencia de los animales.

BIOPANEOS: DISPLAY EN FAGOS Y SELECCIÓN DE NANOANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA H3N2 PERTH

Rondas de biopaneos

Se realizó a partir de la biblioteca generada por la Dra Elena Barbieri tras la inmunización de una llama con una vacuna trivalente comercial (Novartis®) que contiene A/California/07/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2) y B/Brisbane/60/2008. Para ello se utilizó el virus H3N2 hu/Perth/09 concentrado por gradiente discontinuo de sacarosa y purificado por membrana Sartobind Q. Se partió de 250 µl de la biblioteca en 250 ml de medio hasta alcanzar una DO de 0,924. Como antígeno de placa en las 3 rondas se utilizaron 64 UHA (5120 UHA/ml) de virus en un volumen final de 100 µl de *buffer coating*, ON a 4 °C.

ELISA de fagos

Para el mismo se utilizaron las colonias provenientes de la dilución -4 y -3 de la segunda ronda y la dilución -3; -4 y -5 de la tercera ronda. Como antígeno de placa se utilizaron 20 UHA/pocillo del virus H3N2 hu/Perth/09 concentrado por gradiente discontinuo de sacarosa y purificado por membrana Sartobind Q para la evaluación de clones positivos. Como controles se utilizó una placa con sobrenadante de células MDCK y otra placa con líquido alantoideo de huevo embrionado de gallina inoculado con PBS.

Análisis de secuencias

La secuenciación del ADN se realizó en el *Sequencing Facility* (Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar) utilizando ADN miniprep purificado QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) y oligonucleótido M13Rev. Todas las secuencias fueron alineadas por

ClustalW con Mega 6.06 y la alineación fue editada usando BioEdit 7.2. Para el análisis de la diversidad de las secuencias se utilizó además la elaboración de un árbol de guía mediante la herramienta de Clustal Omega ¹⁴², lo cual facilitó la identificación de grupos en función de las variaciones aminoacídicas entre los distintos clones analizados.

RESULTADOS

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LOS NANOANTICUERPOS

Estudio de reactividad cruzada heterosubtípica de los nanoanticuerpos mediante ELISA y neutralización viral *in vitro*

Se profundizó el estudio de los VHHs específicos contra la hemaglutinina recombinante de PR8 (HA0rec) con capacidad de reconocer un aislamiento argentino H1N1 de la pandemia del año 2009 (hu/Arg/09). Los mismos fueron obtenidos mediante la selección específica a partir de una biblioteca de nanoanticuerpos generada mediante la inmunización de una llama con dos vacunas comerciales inactivadas de uso en humanos, según se detalla en Materiales y Métodos.

Mediante la técnica de ELISA se analizó la reactividad específica no sólo frente a la cepa H1N1 hu/Arg/09, sino también frente a otras cepas de interés dado su impacto en la salud humana, como así también que afectan animales de interés productivo. Para el análisis de especificidad se incluyeron cepas de ambos grupos filogenéticos en los cuales se clasifica según la variabilidad en sus residuos a la HA, el grupo 1, con el subtipo H1 representado por los H1N1 hu/Arg/09, hu/Arg/09 ma, hu/PR8/34 y av/Arg/08; y el subtipo H5 estuvo representado por el H5N1 av/Viet/04; y el grupo 2 representado por el subtipo H3 con los virus H3N2 hu/Perth/09, y sw/Arg/08, y el H3N8 eq/Arg/12 (Figura 12).

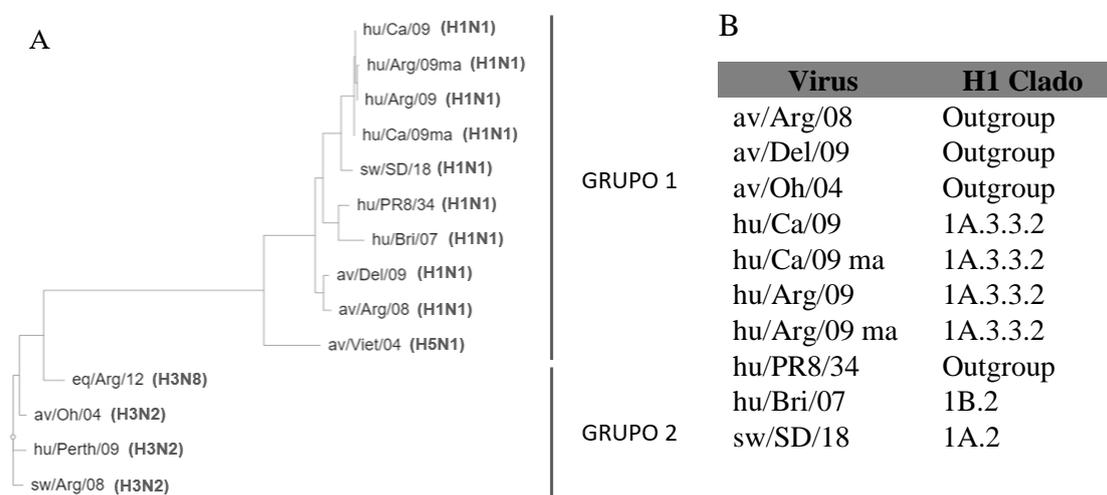


Figura 12. Análisis filogenético de los virus utilizados para el estudio de la reactividad cruzada de los nanoanticuerpos seleccionados mediante biopaneó. (A) Se observa en el árbol guía que los mismos se presentan en 2 grupos, como indica la bibliografía y en (B) se muestran los clados de H1 a los que pertenecen los virus H1N1. Generado a partir de IRD (*Influenza Research Database*)

El análisis de la afinidad y especificidad de los nanoanticuerpos mostró que todos poseen especificidad hacia el virus H1N1 hu/Arg/09 como así también frente al mismo adaptado al ratón (hu/Arg/09ma), y al virus H1N1 de referencia hu/PR8/34. Los nanoanticuerpos

B33 y D81 presentaron además afinidad contra la cepa H5N1 (av/Viet/04) también del grupo 1, como así también frente a los virus del grupo 2 estudiados (H3N2 hu/Perth/09 y sw/Arg/08; H3N8 eq/Arg/12). Estos resultados sugerirían una amplia reactividad de los mismos frente a estos subtipos del virus Influenza Tipo A (Tabla 9). Otros nanoanticuerpos que reconocieron también a H5N1 fueron A5, A32 y B11, pero estos no reconocieron a los virus del grupo 2 evaluados.

Tabla 9. Estudio de especificidad *in vitro* de los VHHs frente a cepas Influenza de interés

VHH	Especificidad (OD405)									Actividad neutralizante (μM)								HI (μM)		
	Grupo 1					Grupo 2				Grupo 1						Grupo 2		H1N1		
	H1				H5	H3			H1N1						H3					
	hu/Arg/09	hu/Arg/09ma	hu/PR8/34	av/Arg/08	av/Viet/04	hu/Perth/09	sw/Arg/08	eq/Arg/12	hu/Arg/09	hu/Arg/09ma	hu/PR8/34	hu/Bri/07	hu/Ca/09ma	av/Del/09	sw/SD/18	sw/Arg/08	eq/Arg/12	hu/Arg/09	hu/Arg/09ma	hu/PR8/34
A5	0.57	0.79	0.15	-	0.31	-	-	-	14.21								-	-	-	
A32	0.59	0.42	-	-	0.1	-	-	-	-						-	-	-	-	-	
B11	0.37	0.12	-	-	0.33	-	-	-	-											
B33	0.62	0.70	0.22	0.12	0.83	0.17	0.15	0.15	-											
B93	0.19	0.53	-	-	0.18	-	-	-	-											
D81	0.67	0.56	0.25	0.19	0.20	0.27	0.22	0.21	2.34	0.1	0.43									
D91	0.57	0.37	-	-	-	-	-	-	2.30	0.21	0.05									
E13	0.43	0.51	0.11	-	-	-	0.11	-	0.08	0.06	0.01	0.04	0.04	0.01	0.04	-	-	-	-	
E101	0.33	0.13	-	-	-	-	-	-	-											
G41	0.51	0.39	-	-	-	-	-	-	0.04	0.24	0.94	0.04	0.02	0.04	-	-	-	0.05	-	

Referencias: av: aviar; eq: equino; hu: humano; sw: porcino

El estudio de actividad neutralizante reveló que 5 nanoanticuerpos (A5, D81, D91, E13 y G41) poseen actividad neutralizante no sólo contra la cepa hu/Arg/09, sino también contra la variante adaptada al ratón (hu/Arg/09ma), y también frente al virus hu/PR8/34. Ninguno de los VHHs logró neutralizar *in vitro* a los virus del grupo 2 analizados. E13 y G41 mostraron la actividad neutralizante más alta frente a hu/Arg/09 con títulos de 0,08 μM y 0,04 μM respectivamente frente al virus hu/Arg/09. Se analizó también la eficacia neutralizante de E13 y G41, frente a otros virus H1N1 de origen humano y animal, incluyendo en el estudio al virus a hu/Ca/09ma, hu/Bris/07, av/Del/09 y sw/SD/18. El nanoanticuerpo G41, mostró resultados similares con valores de neutralización en el intervalo de 0,01 μM a 0,94 μM . Llamativamente, G41 no pudo neutralizar sw/SD/18, aunque esta muestra mayor similitud de secuencia de HA mediante el análisis filogenético con los virus pandémicos (clado 1A3.3.2), sw/SD/18 (clado 1A.2), a diferencia con los pre-pandémicos hu/PR8/34 y hu/Bri/07 (clado 1B.2) (Figura 12). A su vez, este nanoanticuerpo se caracterizó por su capacidad de inhibición de la hemaglutinación frente

al virus hu/Arg/09 (Tabla 9). Por su lado, E13 mostró capacidad de reconocimiento a virus H1 del grupo 1 (hu/Arg/09; hu/Arg/09ma; hu/PR8/34) como a uno del grupo 2 (sw/Arg/08) y actividad neutralizante frente a los virus H1 del grupo 1 estudiados (hu/Arg/09; hu/Arg/09ma; hu/PR8/34; hu/Bri/07; hu/Ca/09ma; av/Del/09; sw/SD/18) (Tabla 9), por lo que E13 se erige como un nanoanticuerpo de afinidad pan-H1.

Mapeo de los epítomos lineales de VHH B33 y D81, con reactividad heterosubtípica mediante arreglo de péptidos e interacción de proteína-proteína

Debido a su amplio rango de reconocimiento entre los virus de los grupos 1 y 2, se analizó la capacidad de B33 y D81 para reconocer epítomos lineales utilizando una biblioteca de péptidos de HA superpuestos. El arreglo de H1N1 hu/Ca/09 consta de 139 péptidos de 14 aminoácidos de longitud cada uno, con 11 aminoácidos superpuestos. Cuando se analizó el nanoanticuerpo B33, se obtuvo una reactividad positiva para los péptidos correspondientes a los aminoácidos ubicados en HA2 que cubren las posiciones 384-398 (EKMNTQFTAVGKEFN), 388-402 (TQFTAVGKEFNHLEK) y 392-406 (AVGKEFNHLEKRIEN). Estos datos sugirieron que los residuos KEFNHLEKRIEN serían críticos para la unión del epítomo con B33 en las condiciones del ensayo (Figura 13. A). Por otro lado, el análisis de variabilidad de secuencias entre los grupos 1 y 2, señaló que los residuos KEF se encuentran altamente conservados entre las secuencias de HA de los virus estudiados (Figura 13. B y C). Además, se realizó un ELISA en condiciones reductoras para evaluar la unión de VHH a la HA, y observar si efectivamente esta unión ocurría con el dominio globular HA1 o con el tallo HA2. Para el estudio se utilizaron virus H1N1 hu/Arg/09, hu/Arg09ma y el hu/PR8/34. El tratamiento con un medio ácido y la posterior aplicación de DTT induce en la HA la pérdida del dominio globular HA1, de este modo, se pudo observar que el VHH B33 mostró una unión más alta a la HA luego del tratamiento en un medio ácido en comparación con el virus hu/PR8/34 no tratado, indicando su unión con el dominio HA2 (Figura 13. D). Con respecto al virus hu/Arg/09 y el adaptado al ratón, ambos mostraron mayor unión en los que recibieron tratamiento ácido en las concentraciones más altas del VHH respecto a los no tratados, lo que sugiere que nuevamente que B33 se une a un epítomo localizado en HA2, confirmando lo observado en el ELISA de péptidos (Figura 13. D). A su vez, se analizó la unión del VHH B33 a la hemaglutinina mediante interacción de proteína-proteína. En primera instancia se probó la interacción de proteínas utilizando la HA de H1N1 hu/Ca/09 (PDB 3LZG) completo, incluyendo tanto la HA1 como la HA2, pero no

se obtuvo un modelo que presentara unión entre el VHH y la secuencia señalada por ELISA de péptidos. Por ello, se realizó nuevamente el análisis de interacción utilizando sólo la HA2. En dicho estudio, el modelo con mayor probabilidad (123 miembros) y con menor energía (-175,9), mostró que los 8 residuos KEFNHLE (posición 395-401) serían críticos para unirse a HA2, y esta interacción sería establecida por los tres dominios CDR, e incluye la interacción del VHH con el monómero contiguo de la HA tanto con el CDR1 como con el CDR3 (Figura 13. E, F y G).

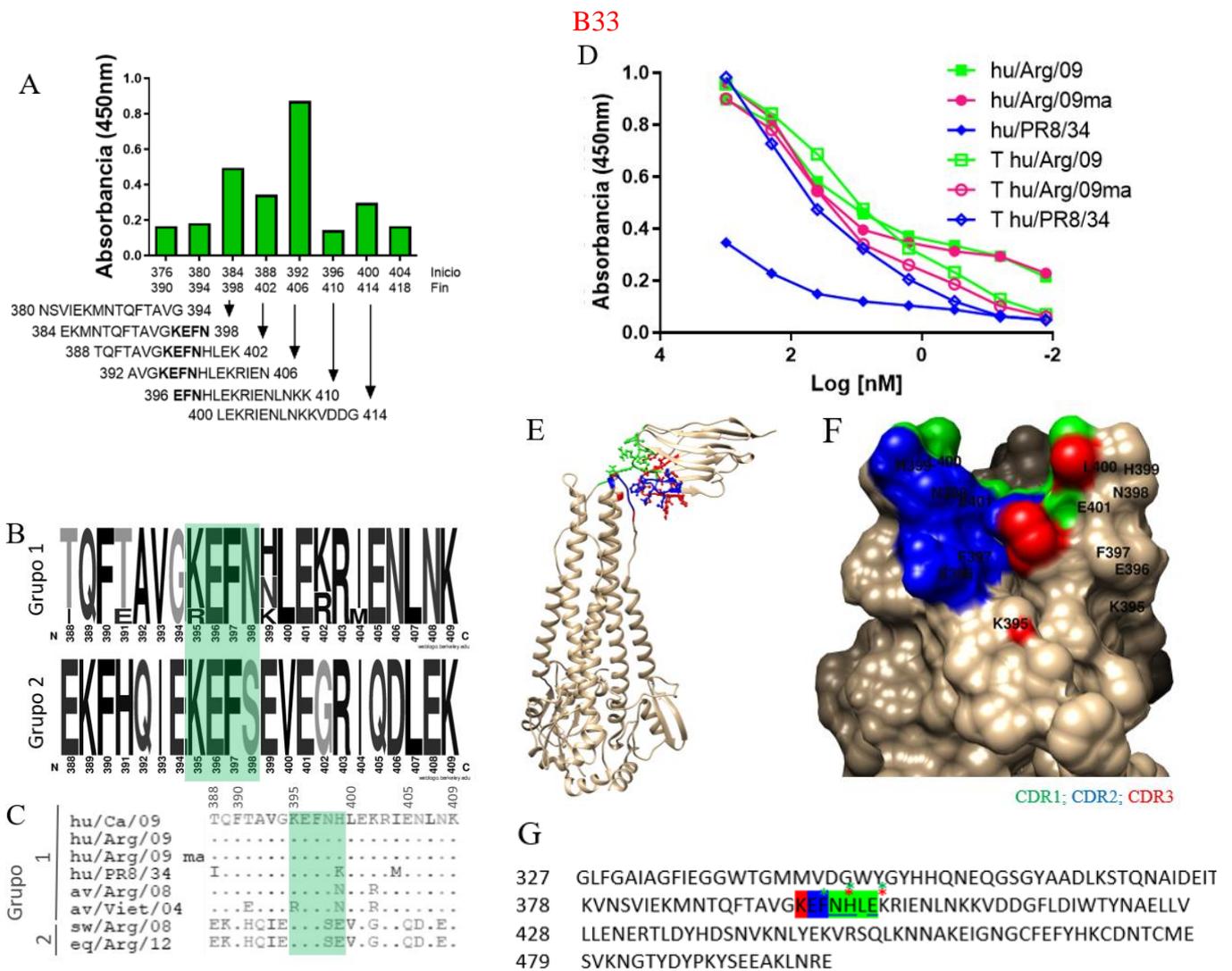


Figura 13. Nanoanticuerpo B33. (A) Elisa de péptidos utilizando la HA de hu/Ca/09, se presentan los valores de absorbancia a 450 nm detallando la zona donde se observó señal positiva. (B) Detalle de la secuencia de señal positiva en el ELISA de péptidos, mostrando la variabilidad de las secuencias analizadas mediante LOGOS, se utilizan las secuencias de las HA de los virus de los grupos 1 (hu/Ca/09; hu/Arg/09; hu/Arg/09ma; hu/PR8/34; av/Arg/08; av/Viet/04) y del grupo 2 (sw/Arg/08; eq/Arg/12) utilizados en el estudio de neutralización y en (C) se detalla el sector de las secuencias utilizadas y su respectivo alineamiento. (D) ELISA con cambio inducido por pH (Dra. Itatí Ibañez), en el mismo se señalan las absorbancias observadas y se detallan los virus en los cuales se realizó el tratamiento mediante un medio ácido con una letra T. (E) Estructura más probable del complejo VHH-HA obtenida mediante interacción proteína-proteína. (F) Detalle de las zonas de contacto de la HA con los CDR del VHH (CDR1: verde; CDR2: azul; CDR3: rojo) y (G) Detalle de la secuencia de HA del

PDB 3LZG utilizado para la interacción de proteínas con los colores de los CDR del VHH que interaccionan con los distintos residuos de la HA. Los residuos coloreados y subrayados indican interacción tanto con los CDR1 (verde) como el CDR2 (azul); los * indican interacción con los mismos residuos del monómero contiguo de la HA con su respectivo color en función del CDR como se indicó anteriormente.

Por otro lado, el VHH D81 mostró señal positiva para la secuencia ubicada en la HA1 entre las posiciones 84-98 (SSDNGTCYPGDFIDY) mientras que no se observó reactividad para los péptidos solapantes flanqueantes (Figura 14. A). El análisis de variabilidad de secuencias entre los grupos 1 y 2 mediante LOGOS en dicha zona mostró gran variabilidad, con una conservación solapada en ambos grupos en la posición 81 con un ácido glutámico (E), una alta probabilidad de presencia de dos serinas contiguas (SS) en las posiciones 83 y 84, la presencia de CYP en las posiciones 90-92 y de una tirosina (Y) en la posición 98 (Figura 14. B y C). El análisis de la unión del VHH D81 a la HA mediante interacción de proteína-proteína, arrojó un modelo con mayor probabilidad (136 miembros) y menor energía (-124,9), en el cual los 7 residuos de la secuencia lineal ETPSSDN (posiciones 81-87) serían críticos para unirse a HA1, junto a los residuos K54, R92, R221 e I267, y esta interacción se establecería exclusivamente por el dominio CDR3 (Figura 14. D, E y F). Como lo reflejan los resultados de MN, la unión de D81 a HA impide parcialmente la infección viral, dado que las posiciones de contacto serían proximales a los residuos que se señalan como críticos del RBS para la unión de la HA al ácido siálico (posiciones W150, H180, L191, Y192).

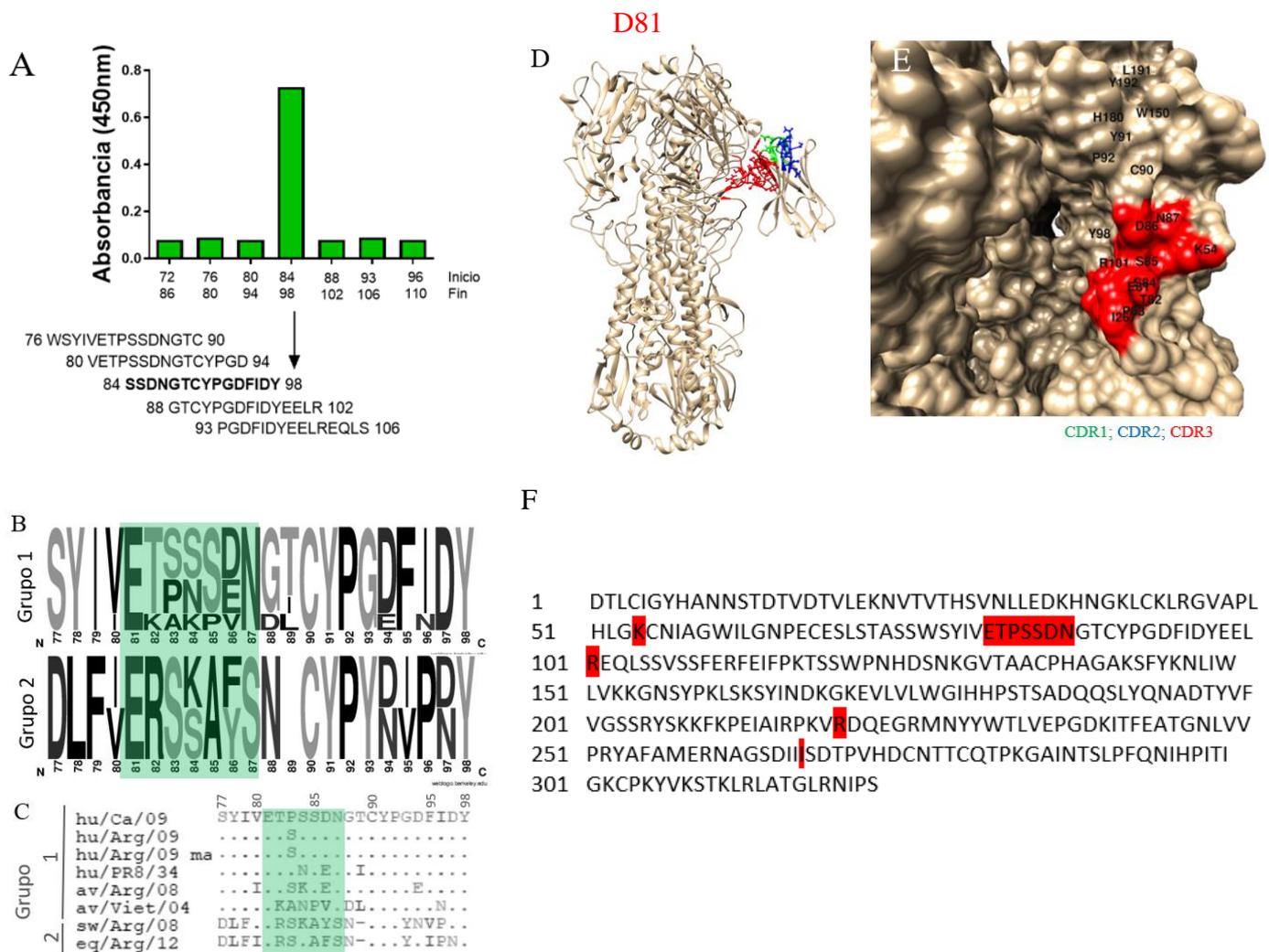


Figura 14. Nanoanticuerpo D81. (A) Elisa de péptidos utilizando la HA de hu/Ca/09, se presentan los valores de absorbancia a 450 nm de la zona en la que se observó el péptido con señal positiva. (B) Detalle de la secuencia de señal positiva en el ELISA de péptidos, mostrando la variabilidad de las secuencias analizadas mediante LOGOS utilizando las secuencias de las HA de los virus de los grupos 1 (hu/Ca/09; hu/Arg/09; hu/Arg/09ma; hu/PR8/34; av/Arg/08; av/Viet/04) y del grupo 2 (sw/Arg/08; eq/Arg/12) en el estudio de neutralización, en (C) se detalla el sector de las secuencias utilizadas y su respectivo alineamiento. (D) Estructura más probable del complejo VHH-HA obtenida mediante interacción proteína-proteína. (E) Detalle de las zonas de contacto de la HA con los CDR del VHH (CDR1: verde; CDR2: azul; CDR3: rojo), se marcan además los residuos críticos para la unión del Acido Siálico (AS), en las posiciones W150, H180, L191 e Y192. (F) Detalle de la secuencia de HA del PDB 3LZG utilizado para la interacción de proteínas con el color rojo, dado que es el CDR3 del VHH el que interacciona con dichos residuos de la HA.

Mapeo de los epítopes conformacionales de los VHH E13 y G41 con fuerte actividad neutralizante contra los virus del subtipo H1N1 mediante interacción de proteína-proteína.

A partir de resultados previos, se concluyó que el VHH E13 reconoce un epítopo conformacional, por lo cual no se logró observar señal positiva para ninguno de los péptidos del arreglo, sí se logró una señal positiva para el control en el cual se utilizó el

virus H1N1 hu/Arg/09 (Figura 14. A). Mediante el análisis de ELISA de cambio conformacional de la HA utilizando los virus H1N1 hu/Arg/09, hu/Arg/09ma y hu/PR8/34, se evidenció que la unión del VHH E13 disminuyó significativamente después del tratamiento ácido en los 3 virus analizados, señalando que el epítipo estaría localizado en el dominio globular HA1 (Figura 15. D). Por otro lado, el estudio del nanoanticuerpo E13 mediante interacción de proteínas con la HA, utilizando el virus H1N1 hu/Ca/09 (PDB 3LZG), arrojó un modelo cuya probabilidad de unión poseía un grupo de 106 miembros cuyo menor nivel de energía fue igual a -140,9.

El análisis de dicho modelo mostró que E13 se uniría a un total de 24 residuos distribuidos en dos monómeros de HA0. De ellos, 20 residuos distribuidos a lo largo de 92 residuos del RBS en un monómero de HA0 y 4 residuos de un monómero vecino de HA0. Los residuos críticos para la interacción serían AACPHAGAK (134-142) en Ca2, ST (183,184) en Sb, AD (195,196) en la 190-hélice, KVRDQEG (219-225) en 220-loop y residuos EPGD (238-241) en Ca1 del monómero HA0 vecino (Figura 15. B, D, E y F). El epítipo para E13 mapearía un dominio de residuos con forma de C, ocluyendo parcialmente el acceso al RBS de la HA (Figura 15. E) en un monómero HA0 y se extendería a cuatro residuos (EPGD) del monómero vecino, lo cual podría potencialmente estabilizar el complejo VHH-HA (Figura 15. E y F). Según este análisis, no participarían de estas interacciones las posiciones 152 y 216 de HA1 en que fueron sujeto de sustitución producto de la adaptación del virus H1N1 hu/Arg/09 al ratón (hu/Arg/09ma) y se encuentran señaladas con flechas rojas en las Figuras 15. B, E y F.

Figura 15. Nanoanticuerpo E13. (A) Elisa de péptidos utilizando la HA de hu/Ca/09, se presentan los valores de absorbancia a 450 nm, y como control el virus H1N1 hu/Arg/09. (B). Detalle de la secuencia de aminoácidos relacionada con los residuos involucrados en la unión VHH-HA, mostrando la variabilidad de las secuencias analizadas del grupo 1 (hu/Ca/09ma; hu/Arg/09; hu/Arg/09ma; hu/PR8/34; hu/Bri/07; av/Del/09; sw/SD/18 y la secuencia de hu/Ca/09 utilizado en el ELISA de péptidos) mediante LOGOS: en rosa los residuos involucrados en la interacción con E13, como así también estructuras relevantes antigénicas y del RBS. En (C) se detalla las secuencias utilizadas para la realización del LOGOS y su respectivo alineamiento. (D) ELISA con cambio inducido por pH, en el mismo se señalan aquellos virus en los cuales se realizó el tratamiento mediante un medio ácido con una letra T. (E) y (F). Estructura más probable del complejo VHH-HA obtenida mediante el análisis interacción de proteínas para E13 y detalle de los residuos involucrados, se señalan a su vez estructuras importantes del dominio RBS como el 220-*loop*, 130-*loop* y 190-hélice. (G) Detalle de la secuencia de HA del PDB 3LZG utilizado para el análisis interacción de proteínas con los colores de los CDR del VHH que interaccionan con los distintos residuos de la HA. Los residuos coloreados y subrayados indican interacción tanto con los CDR1 (verde) como el CDR2 (azul); los * indican interacción con los mismos residuos del monómero contiguo de la HA con su respectivo color en función del CDR como se indicó anteriormente. En (B), (E) y (F) se señalan mediante una flecha roja los residuos involucrados en los cambios en la adaptación del virus hu/Arg/09 al ratón.

Por otro lado, el nanoanticuerpo G41, al igual que E13, demostró mediante análisis previos reconocer un epítipo conformacional, por lo cual tampoco se logró observar señal positiva para ninguno de los péptidos del arreglo, pero sí se observó señal positiva para el control (Figura 16. A). En cuanto al análisis mediante de interacción de proteína-proteína, el modelo con la probabilidad más alta pertenecía a un grupo de 232 miembros, en comparación con otros con 209, 67 o menos miembros. El nanoanticuerpo G41 reconocería un total de 24 residuos distribuidos a lo largo de 93 residuos de aminoácidos del RBS en el mismo monómero de HA0. Las posiciones críticas para la interacción serían las posiciones KGVT (130-133) en 130-*loop*, los residuos K e Y (142, 145) en Ca2, VKKGN (152-156) en Sa, STSAD (183-187) en Sb, QSLY (189-192) en 190-hélice, residuo I (216) y K (219), y DQE (222-224) en 220-*loop* (Figura 16. B, C y E). Estas interacciones mostraron la participación directa de residuos en las posiciones 152 y 216, que después de la adaptación al ratón del virus H1N1 hu/Arg/09 han mostrado la sustitución en sus residuos (señalados en la Figura 16. B, D y E). El epítipo de G41 mapearía en un dominio en forma de O que establecería contacto directo con los residuos de los dominios estructurales de RBS, ocluyendo así completamente el acceso al RBS (Figura 16. D).

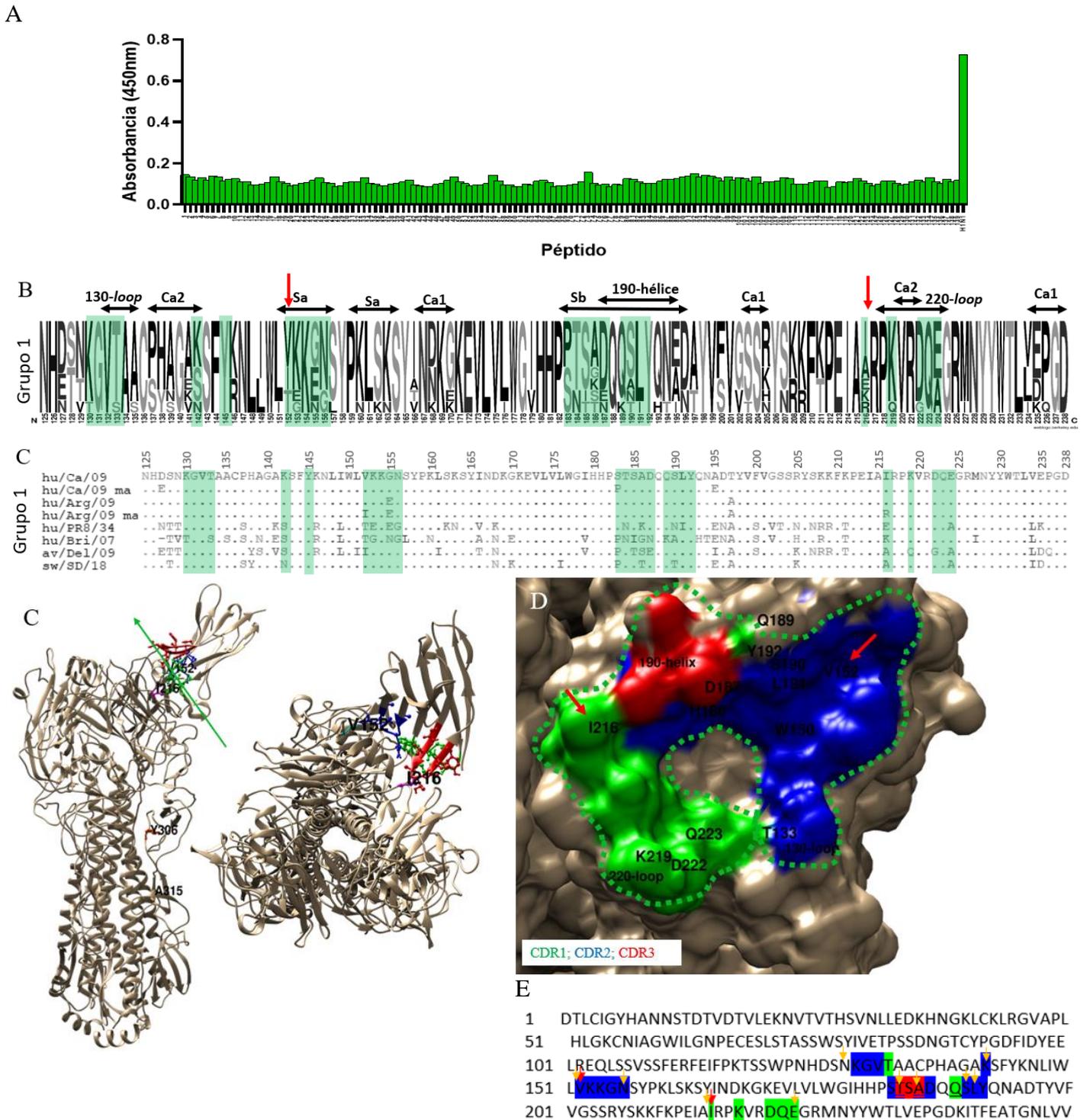


Figura 16. Nanoanticuerpo G41. (A) Elisa de péptidos utilizando la HA de hu/Ca/09, se presentan los valores de absorbancia a 450 nm, y como control el virus H1N1 hu/Arg/09. (B) Detalle de la secuencia de aminoácidos relacionada con los residuos involucrados en la unión VHH-HA, mostrando la variabilidad de las secuencias analizadas del grupo 1 (hu/Ca/09; hu/Arg/09; hu/Arg/09ma; hu/PR8/34; av/Arg/08; av/Viet/04) mediante LOGOS en el estudio de neutralización viral *in vitro*; se señalan: en verde los residuos de la HA involucrados en la interacción con G41, como así también estructuras relevantes antigénicas y del RBS. (C) y (D). Estructura más probable del complejo VHH-HA obtenida mediante interacción de proteínas para G41 y detalle de los residuos involucrados; se señalan a su vez estructuras importantes del dominio RBS como el 220-loop, 130-loop y 190-hélice. (E) Detalle de la secuencia de HA del PDB 3LZG utilizado para la interacción de proteínas con los colores de los CDR del VHH que interactúan con los distintos residuos de la HA. Los residuos coloreados y subrayados indican interacción tanto con los CDR1 (verde) como el CDR2 (azul). En (B), (D) y (E) se señalan los residuos involucrados en los cambios en la adaptación del virus hu/Arg/09 al ratón mediante una flecha roja, como así también cambios en el H1N1 hu/PR8/34 con una flecha amarilla, en residuos señalados como críticos para la unión G41 a la HA.

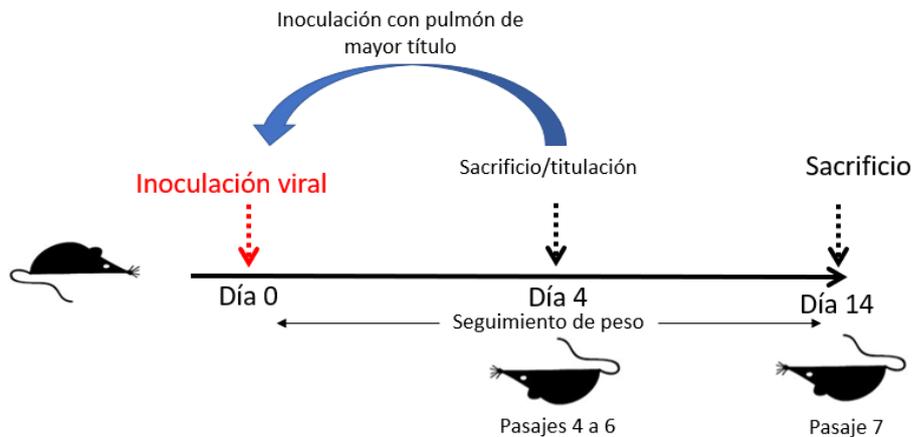
CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DE LOS NANOANTICUERPOS: MODELO RATÓN

Adaptación de la cepa H1N1 hu/Arg/09 al ratón

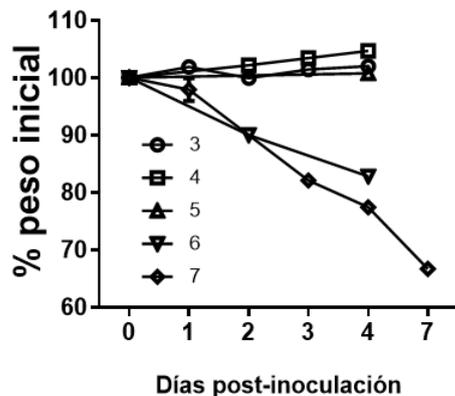
Se realizaron pasajes seriados en ratón, tomando como punto de partida el pasaje número 3 (Tesis de Maestría, MS J. Baztarrica¹⁴³). En cada pasaje se realizó la extracción de pulmón de los animales infectados, se titularon los macerados pulmonares tomando para el siguiente pasaje el macerado de mayor título que se administró por la vía intranasal, según fue explicado en Materiales y Métodos.

En el pasaje número 5 se observó el 50 % de los animales infectados con títulos de $1 \times 10^{6.5}$ y 1×10^8 DICT₅₀/ml, respectivamente. En el pasaje 6 se observó el 100 % de los animales con títulos virales detectables en homogenato de pulmón con un promedio de $1 \times 10^{8.5}$ DICT₅₀/ml. En el pasaje número 7 se diagramaron, además del grupo control, un grupo para evaluación de título de homogenato de pulmón al 4 dpi (n=5) y otro grupo para evaluación de peso (n=5), observándose en dicho pasaje un título máximo de $1 \times 10^{9.33}$ DICT₅₀/ml con una disminución máxima de peso (30%) al 7 dpi (Figura 17).

A



B



C

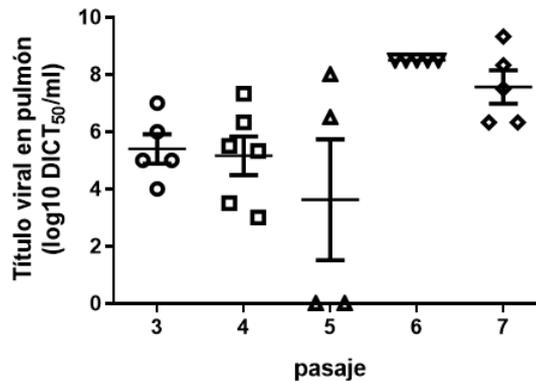


Figura 17. (A) Esquema del diseño experimental utilizado para la adaptación del virus H1N1 hu/Arg/09 al ratón. (B) Registro de peso de los animales representado como porcentaje del peso inicial en los animales desafiados con la cepa H1N1 hu/Arg/09 a lo largo de los pasajes realizados. (C) Titulación viral en homogenato de pulmón frente al desafío viral a lo largo de los pasajes (n=4-6).

A partir del último pasaje se generó un *stock* viral para el trabajo con animales del virus H1N1 hu/Arg/09ma. Para ello se realizaron 3 rondas de clonado por dilución final. Luego se realizó el escalado del clon viral (soporte T25: 5 ml; soporte T75: 10 ml; *roller* de 2L: 70 ml), su posterior concentración por ultracentrifugación y almacenamiento en 20 % en glicerol para su utilización en ensayos *in vivo*. Una vez obtenido este *stock* de trabajo se procedió a buscar la dosis letal 50 (DL₅₀) en los ratones por el método de Reed & Muench, obteniéndose un valor de DL₅₀/50 µl de $1 \times 10^{-3,5}$ (equivalente a $1 \times 10^{6,5}$ DICT₅₀), como así también el seguimiento de peso de los animales a lo largo de 14 días posterior a la inoculación, en los cuales se observó un descenso máximo de peso en los 7-8 dpi (Figura 17. A y B). A su vez, se realizó la titulación por infectividad en cultivo de tejido, obteniendo un título infeccioso de 1×10^{11} DICT₅₀/ml y 1024 UHA/50 µl por hemaglutinación de glóbulos rojos de cobayo.

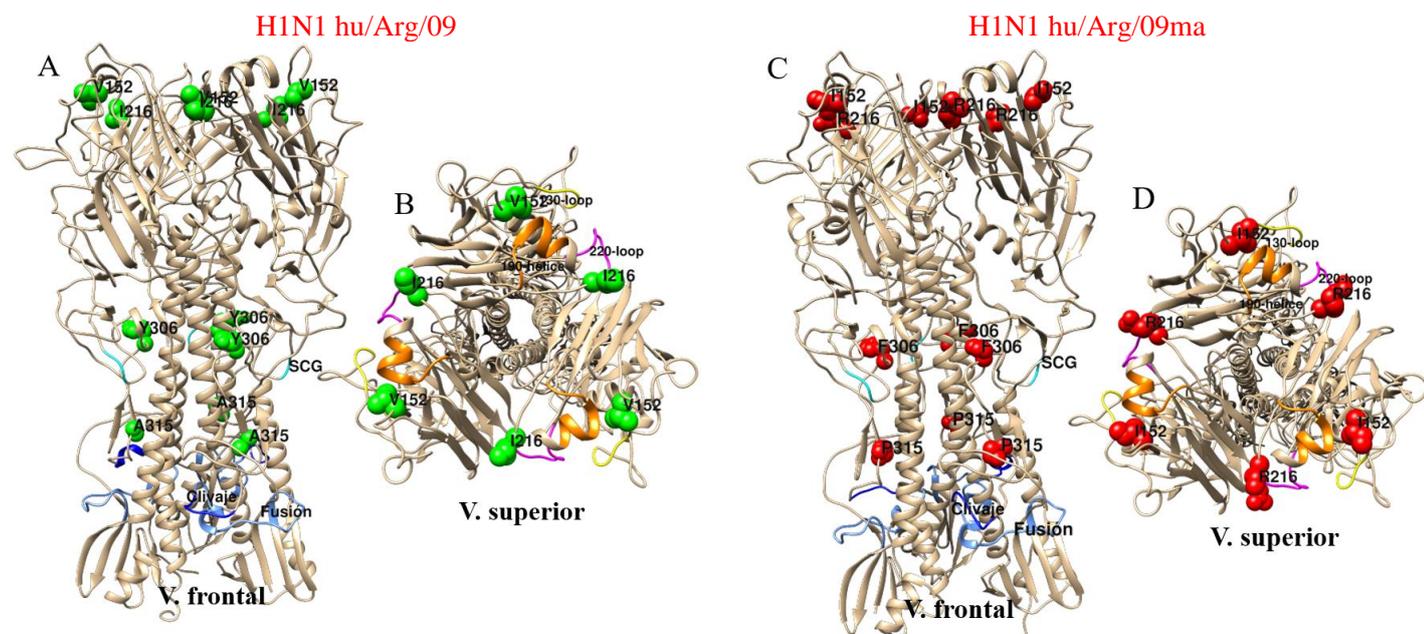
Con el objetivo de caracterizar la variante viral adaptada al ratón se procedió a secuenciar el fragmento 4 codificante de HA de los virus H1N1 hu/Arg/09 y hu/Arg/09 ma. A partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidos para la hemaglutinina se encontró un 99 % de identidad, con 4 sustituciones aminoacídicas en la variante H1N1 hu/Arg/09ma, las cuales fueron V152I, I216R, Y306F y A315P (Figura 18 y Tabla 10). Como puede observarse en la Figura 18, los dos primeros cambios corresponden a las posiciones 152 y 216, que se encuentran localizadas dentro del dominio del RBS, en las cuales se encuentran estructuras relevantes como el 130-*loop*, 190-hélice y el 220-*loop*. Por otro lado, las dos sustituciones restantes son en las posiciones 306 y 315, que se encuentran entre el sitio conservado de glicosilación (SCG) y la zona de clivaje que se encuentra pegada al sitio de fusión, pero alejado de las zonas que puedan tener relevancia en la unión de los VHHs estudiados en el presente trabajo a la HA. La sustitución V152I (isoleucina en la posición de la valina) corresponde un evento conservativo, en las cuales se conservan las propiedades físico-químicas del residuo (ambos no polares). En cambio, la sustitución I216R (arginina en la posición de la isoleucina), corresponde a una sustitución radical, dada por un residuo largo y básico en lugar de un residuo no polar, que puede llegar a tener un impacto en la conformación estructural de la zona y a su funcionalidad, dada su asociación al RBS y próxima al 220-*loop*. La sustitución en la posición 306 (fenilalanina en lugar de tirosina), se considera un cambio no radical, siendo ambos aminoácidos aromáticos. Por último, la sustitución en la posición 325, corresponde a una prolina en la posición de una alanina, lo que es un cambio radical, siendo la prolina

un residuo involucrado con la rigidez en la cadena, dado que suele impedir la libertad de giro.

Tabla 10. Detalle de las sustituciones aminoacídicas ocurridas en la hemaglutinina tras la adaptación del virus H1N1 hu/Arg/09 al ratón.

Posición*	Sustitución	Detalles	Posición en la HA
152	I → V	Evento conservativo. Se conservan las propiedades fisicoquímicas del residuo (ambos no polares)	HA1, dominio RBS
216	R → I	Sustitución radical. Cambio por un residuo largo y básico en lugar de un residuo no polar, con posible impacto en la funcionalidad, dada su asociación al RBS y proximidad al 220-loop.	HA1, dominio RBS
306	F → Y	Evento conservativo.	HA1, entre el SCG y el sitio de clivaje y fusión
315	P → A	Sustitución radical. La prolina es un residuo involucrado con la rigidez en la cadena, dado que suele impedir la libertad de giro	HA1, entre el SCG y el sitio de clivaje y fusión

Referencia: * Numeración H1; I: Isoleucina; V: Valina; R: Arginina; F: Fenilalanina; Y: Tirosina; P: Prolina; A: Alanina; SCG: Sitio Conservado de Glicosilación; RBS: *Receptor Binding Site*.



E

Subtipo	Templado	Resolución (Å)	Identidad de secuencia	Similitud de secuencia	QSQE	QMQE	QMEAN
hu/Arg/09	6N41.1.A	2,50	80,69	0,56	0,87	0,79	-0,29
hu/Arg/09ma	6N41.1.A	2,50	80,49	0,56	0,86	0,79	0,34

Figura 18. Modelado de proteínas HA, se presenta la estructura tridimensional del homotrímero (A) y (B) de H1N1 hu/Arg/09; (C) y (D) H1N1 hu/Arg/09ma. En ambos modelados se muestran los residuos involucrados en las 4 sustituciones observadas luego de los pasajes en ratón. Los residuos señalados son V152I, I216R, Y316F y A315P. Para la realización del modelo se utilizó SWISS-MODEL (ProMod3 3.1.1) y el PDB 6N41 fue utilizado como templado. (E) Se indican los parámetros obtenidos de cada modelo. Se señalan algunas estructuras relevantes, en celeste: sitio conservado de glicosilación (SCG); azul: sitio de clivaje; azul claro: sitio de fusión; amarillo: 130-loop; naranja: 190-hélice; fucsia: 220-loop, se etiquetan dichos sitios en uno de los monómeros de cada figura. (A) y (C) vista frontal; (B) y (D) vista superior.

Por otro lado, se realizó el estudio de la dosis letal en ratones, del virus H1N1 hu/PR8/34, obteniéndose en este caso un valor de $DL_{50}/50 \mu l$ de $1 \times 10^{-4,5}$ (equivalente a $1 \times 10^{4,5}$ DICT₅₀), con un descenso máximo de peso en el 8 dpi (Figura 19. C y D). Se obtuvo un título de infectividad en monocapas de células MDCK de 2048 UHA/50 μl de glóbulos rojos.

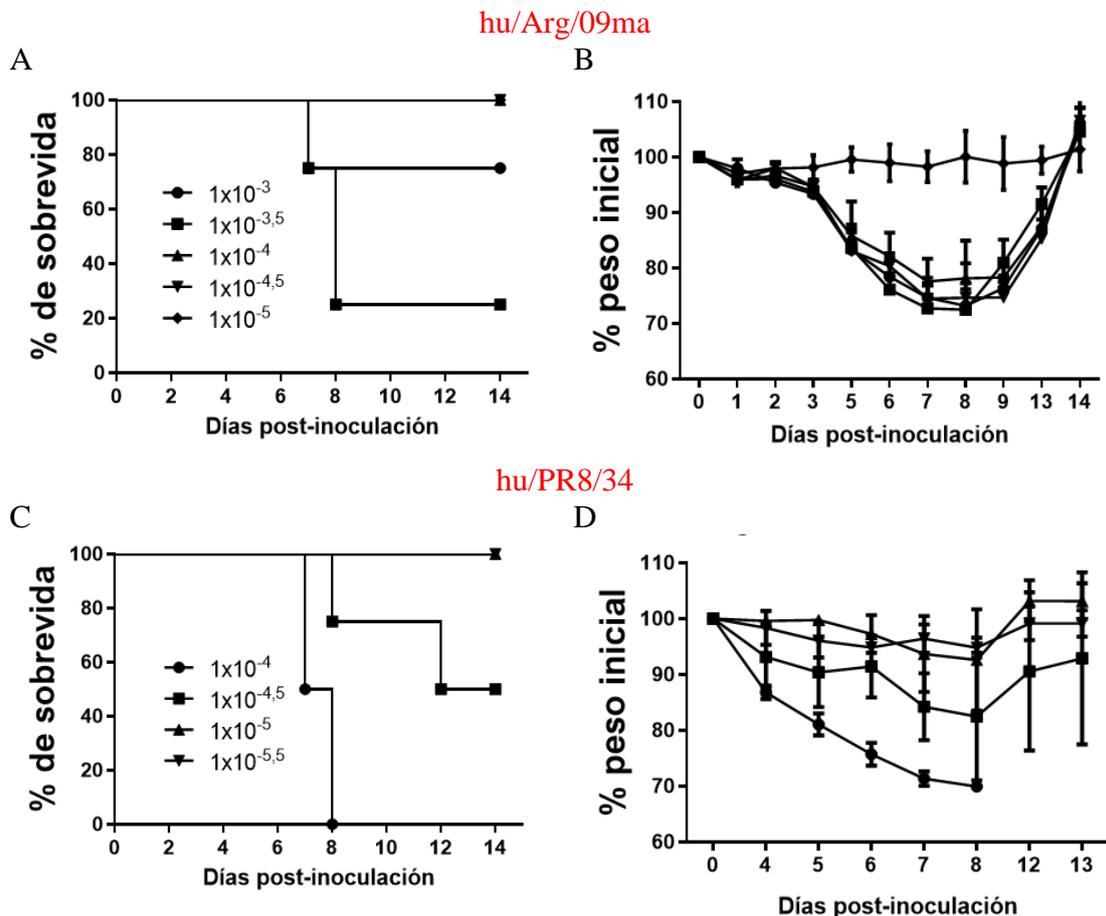


Figura 19. Estudio de DL_{50} en ratones para el virus H1N1 hu/Arg/09ma (A), (B), y el virus H1N1 hu/PR8/34 (C), (D). (A y C) Curva de sobrevivida Kaplan-Meier. (B y D) Curva de peso. Registro de peso de los animales representado como porcentaje del peso inicial, se presenta la media de cada grupo, barras de error como desvío estándar de la media. n=4 por grupo; dpi: días post-infección.

Estudio de eficacia profiláctica de nanoanticuerpos neutralizantes *in vitro* en el modelo ratón

En primer lugar, se evaluó la eficacia profiláctica de una selección de nanoanticuerpos frente al desafío viral con el virus H1N1 hu/Arg/09ma. Para ello se evaluó la morbilidad de los animales considerando la variación del peso corporal a lo largo de la experiencia, el título viral alcanzado al día 4 post-infección y la mortalidad de los animales. Se administraron cinco VHHs que resultaron neutralizantes *in vitro*: A5, D81, D91, E13 y G41, como así también el VHH no neutralizante B33, pero de relevancia, dado sus características de amplio reconocimiento de cepas. Se incluyeron además como controles,

un grupo control positivo tratado con suero inmune de animales infectados con H1N1 hu/Arg/09 (α -H1N1), y como grupo control negativo animales tratados con PBS. Se trataron 10 ratones por grupo con 100 μ g de cada VHH (5 mg/kg dosis), 4 horas previas al desafío con 2 DL₅₀ del virus (Diseño experimental: Figura 20. A).

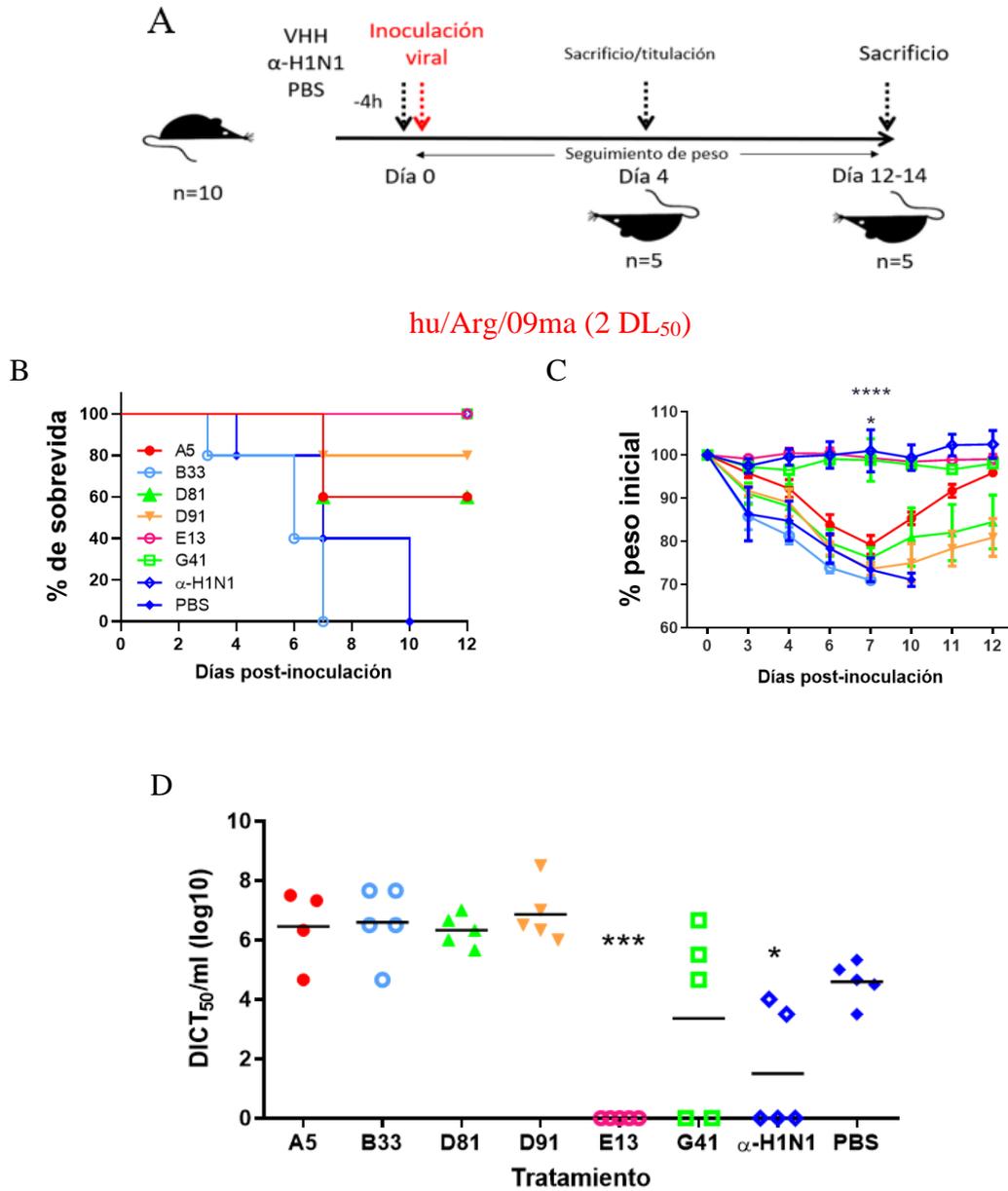


Figura 20. Eficacia profiláctica de los nanoanticuerpos neutralizantes frente al desafío viral con H1N1 hu/Arg/09ma. (A) Se presenta el esquema del diseño experimental utilizado. (B) Se presenta la curva de supervivencia Kaplan-Meier. (C) La curva de seguimiento de peso durante el ensayo. (D) Título en homogenato de pulmón observado al dpi 4. Se representan las medias observadas en cada grupo, barras de error como desvío estándar de la media. ANOVA de una vía ($p < 0,05$) al 7 dpi; Test de Dunnett vs grupo PBS; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$.

De los seis nanoanticuerpos que fueron analizados en el presente ensayo, E13 mostró una protección total frente a la infección viral, mostrando 100 % de supervivencia,

mantenimiento del peso a lo largo de la experiencia y ninguno de ellos mostró títulos virales detectables en homogenato de pulmón al 4 dpi. Por otro lado, los animales tratados con G41 presentaron una protección parcial ya que, si bien todos los animales mantuvieron su peso corporal inicial, el 60 % de los animales (2:5) presentaron títulos virales en tejido pulmonar que variaron entre $1 \times 10^{4,66}$ a $1 \times 10^{6,66}$ DICT₅₀/ml. Los VHHs A5, D81 y D91 presentaron un efecto protector menor, dado que los animales lograron recuperar la pérdida de peso, sin embargo, la replicación viral en homogenato de pulmón fue similar al control PBS. En cuanto al análisis de sobrevida, 100% de los animales para el grupo que recibió el VHH no neutralizante B33, alcanzó el criterio de eutanasia, mientras que el 40 % de los que recibieron A5 (2:5) y D81 (2:5) y el 20 % en el grupo que recibió D91 como tratamiento (1:5). Por lo tanto, a partir de estos resultados, E13 y G41 se convirtieron en los candidatos terapéuticos.

E13 y G41 fueron evaluados en cuanto a su eficacia profiláctica contra las cepas hu/Arg/09ma y hu/PR8/34 utilizando 4 DL₅₀/50 µl en ambos casos, así como también con la cepa hu/Arg/09 original sin adaptar al ratón (con una dosis de 50000 DICT₅₀). Se utilizó como control positivo un grupo tratado con suero de ratón α-H1N1 y dos controles negativos, un grupo tratado con un VHH no relacionado (nr-VHH), y otro grupo tratado con PBS (diseño experimental en la Figura 21. A).

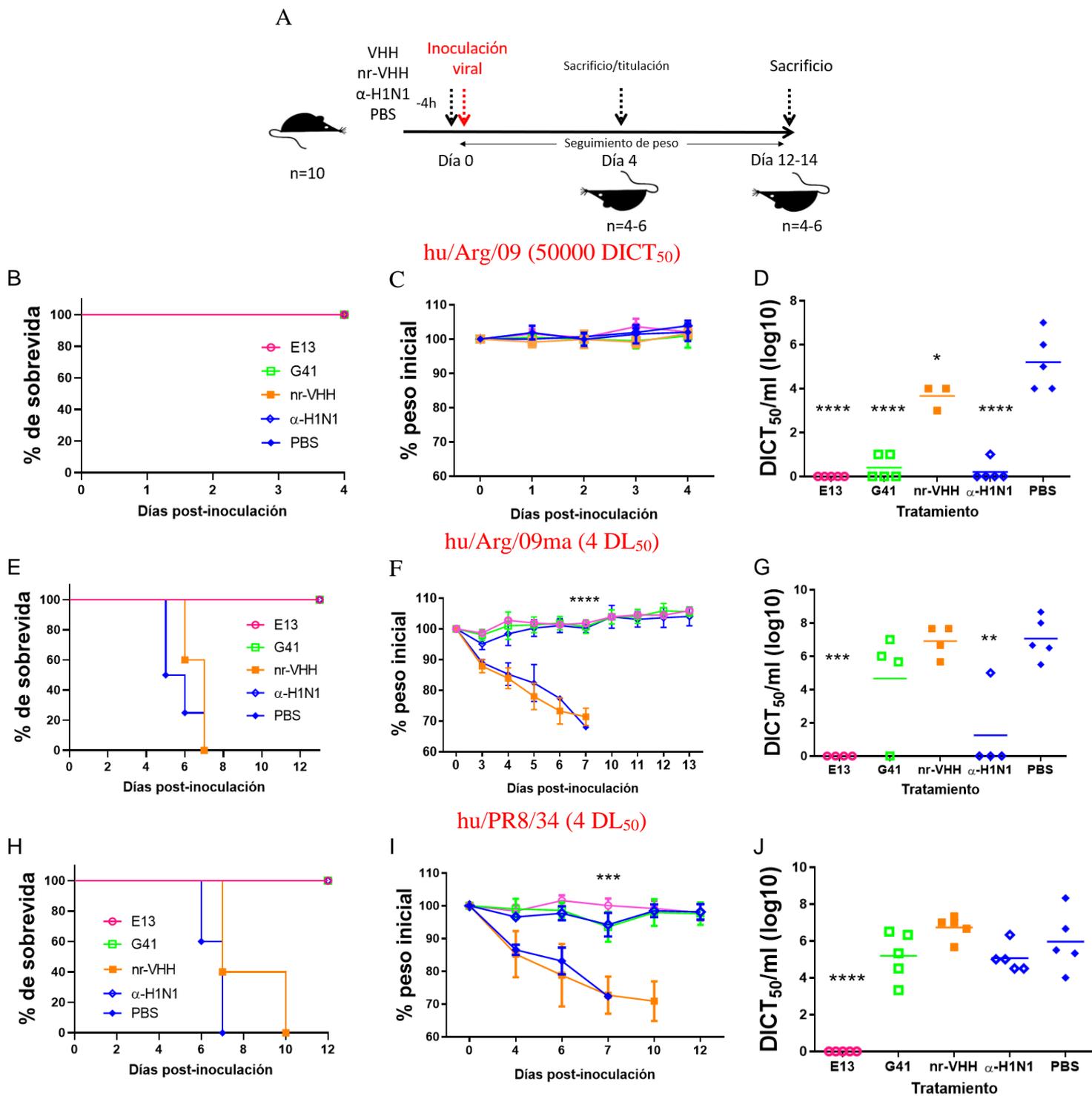


Figura 21. Eficacia profiláctica de los nanoanticuerpos frente al desafío viral de cepas H1N1. (A) Esquema del diseño experimental utilizado frente al desafío viral de las cepas hu/Arg/09 (B, C, D), hu/Arg/09ma (E, F, G) y hu/PR8/34 (H, I, J). Se presentan las curvas de supervida (B, E, H), las curvas de seguimiento de peso durante los ensayos (C, F, I) como así también el título observado al dpi 4 en los macerados de pulmón (D, G, J). Se representan las medias observadas en cada grupo, barras de error como desvío estándar de la media. ANOVA de una vía ($p < 0,05$), Test de Dunnet vs grupo PBS de cada respectivo ensayo; $* \leq 0,05$; $** \leq 0,01$; $*** \leq 0,001$; $**** \leq 0,0001$.

En aquellos animales que no recibieron tratamiento específico (PBS o nr-VHH), se detectaron títulos virales en pulmón en las 3 cepas estudiadas, con un 100% de muerte en

los animales entre los días 7-10 dpi tanto para la cepa hu/Arg/09ma como para la cepa hu/PR8/34. Esto mismo no se observa para la cepa hu/Arg/09, dado que la misma no está adaptada al ratón, y por lo tanto no se observa la pérdida de peso ni disminución del porcentaje de sobrevida.

En cuanto a los animales que recibieron tratamiento específico, se observó que los animales tratados con el nanoanticuerpo G41 y desafiados tanto con el virus hu/Arg/09ma o con el hu/PR8/34, no presentaron protección a la replicación del virus en pulmón al 4 dpi, presentando en ambos casos títulos virales en el homogenato de pulmón sin diferencias significativas a sus respectivos grupos control que recibieron PBS como tratamiento, con títulos de hasta 1×10^7 DICT₅₀/ml en los desafiados con hu/Arg/09ma; y títulos que oscilaron entre $1 \times 10^{3,33}$ - $1 \times 10^{6,5}$ DICT₅₀/ml en los que recibieron el desafío viral con hu/PR8/34. Asimismo, se observa que este nanoanticuerpo evita la pérdida de peso y protege en un 100 % a los ratones de la muerte frente al desafío de la dosis letal administrada. Esto se contrapone a lo observado cuando G41 se administra como tratamiento a animales desafiados con hu/Arg/09 de origen humano sin adaptar al ratón, en los cuales los animales mostraron títulos significativamente diferentes a los observados al grupo control (PBS), con títulos no detectables en tejido pulmonar o un máximo de 1×10^1 DICT₅₀/ml, y también manteniendo el peso de los animales y el 100 % de protección de sobrevida. De este modo, este VHH señala una capacidad protectora específica a la infección viral frente a la cepa hu/Arg/09.

El nanoanticuerpo E13 mostró una capacidad protectora del 100 % con títulos virales no detectables en homogenato de pulmón, así como también en cuanto al mantenimiento del peso corporal de los individuos a lo largo de la experiencia y a la sobrevida de los animales, frente al desafío viral en los 3 casos estudiados. Sugiriendo un efecto de inmunidad esterilizante otorgado por el tratamiento con E13.

Estudio de eficacia profiláctica de combinación de nanoanticuerpos neutralizantes

Asimismo, con el objeto de analizar un posible efecto sinérgico o antagónico, se evaluó la eficacia profiláctica de tres combinaciones de nanoanticuerpos en dosis de 25 µg de cada VHH/ratón, con E13 en todas ellas. Ninguna de las combinaciones alteró el efecto esterilizante de E13 (Figura 22).

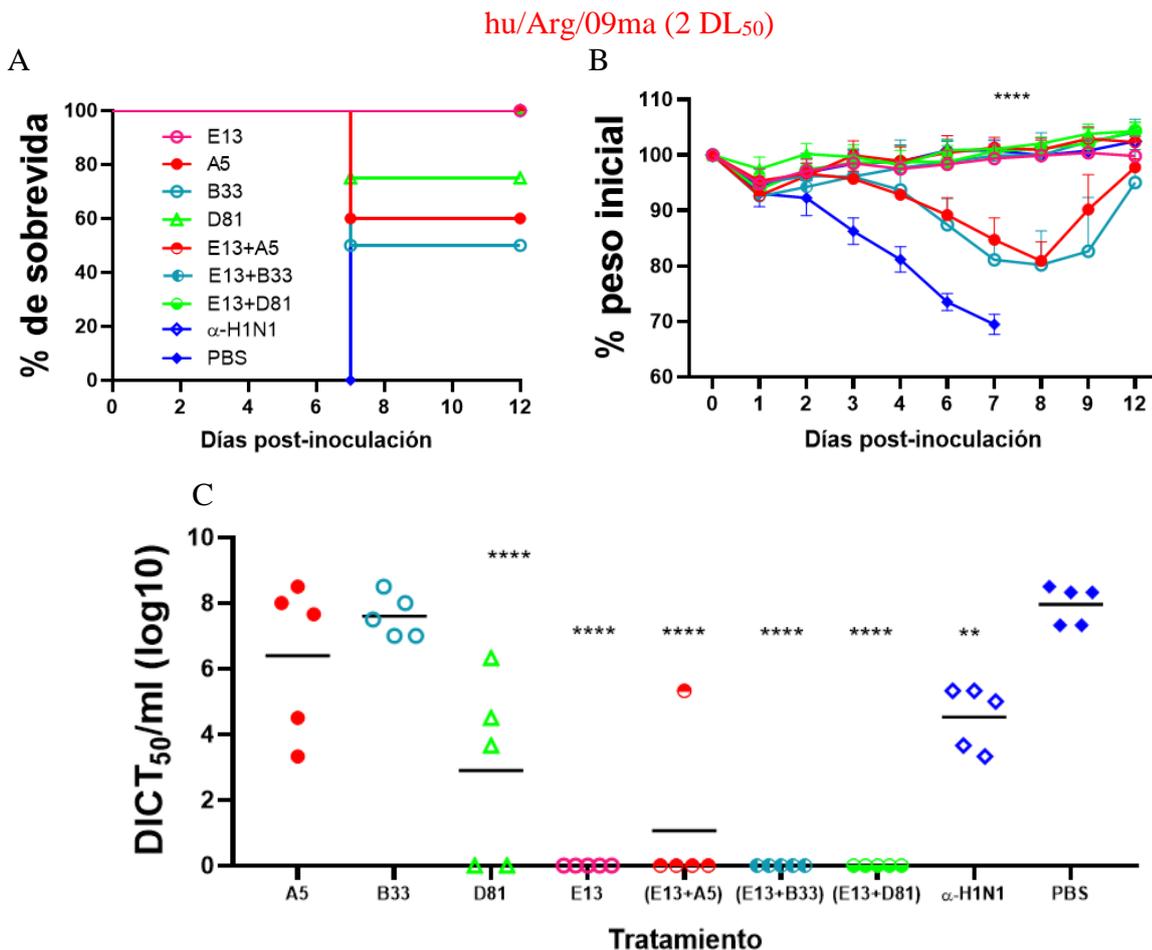


Figura 22. Eficacia profiláctica de nanoanticuerpos neutralizantes combinados con E13 en dosis de 25 μ g para cada VHH. Se evaluó la eficacia profiláctica frente al desafío viral con 2 DL₅₀ de H1N1 hu/Arg/09ma. (A) Se presenta la curva de sobrevivida Kaplan-Meier. (B) La curva de seguimiento de peso durante el ensayo. (D) Título en homogenato de pulmón observado al dpi 4. Se representan las medias observadas en cada grupo, barras de error como desvío estándar de la media. ANOVA de una vía ($p < 0,05$) al 7 dpi; Test de Dunnet vs grupo PBS; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$.

Estudio de la dosis efectiva de los nanoanticuerpo E13 y G41 en el modelo ratón

Se realizó un ensayo para evaluar la dosis efectiva (DE) de ambos nanoanticuerpos candidatos frente al desafío viral de la cepa hu/Arg/09ma y de la cepa de referencia hu/PR8/34. Para ello, se utilizó un rango de dosis del VHH E13 entre los 100-1 μ g/animal (5-0,05 mg/kg) y para G41 se utilizaron dos dosis, de 200 μ g y de 100 μ g (10 y 5 mg/kg), ya que dados los resultados previos no era esperable que una dosis menor a 100 μ g tuviera efecto profiláctico frente al desafío viral con estas cepas. Los tratamientos fueron administrados como fue detallado anteriormente vía intranasal bajo anestesia.

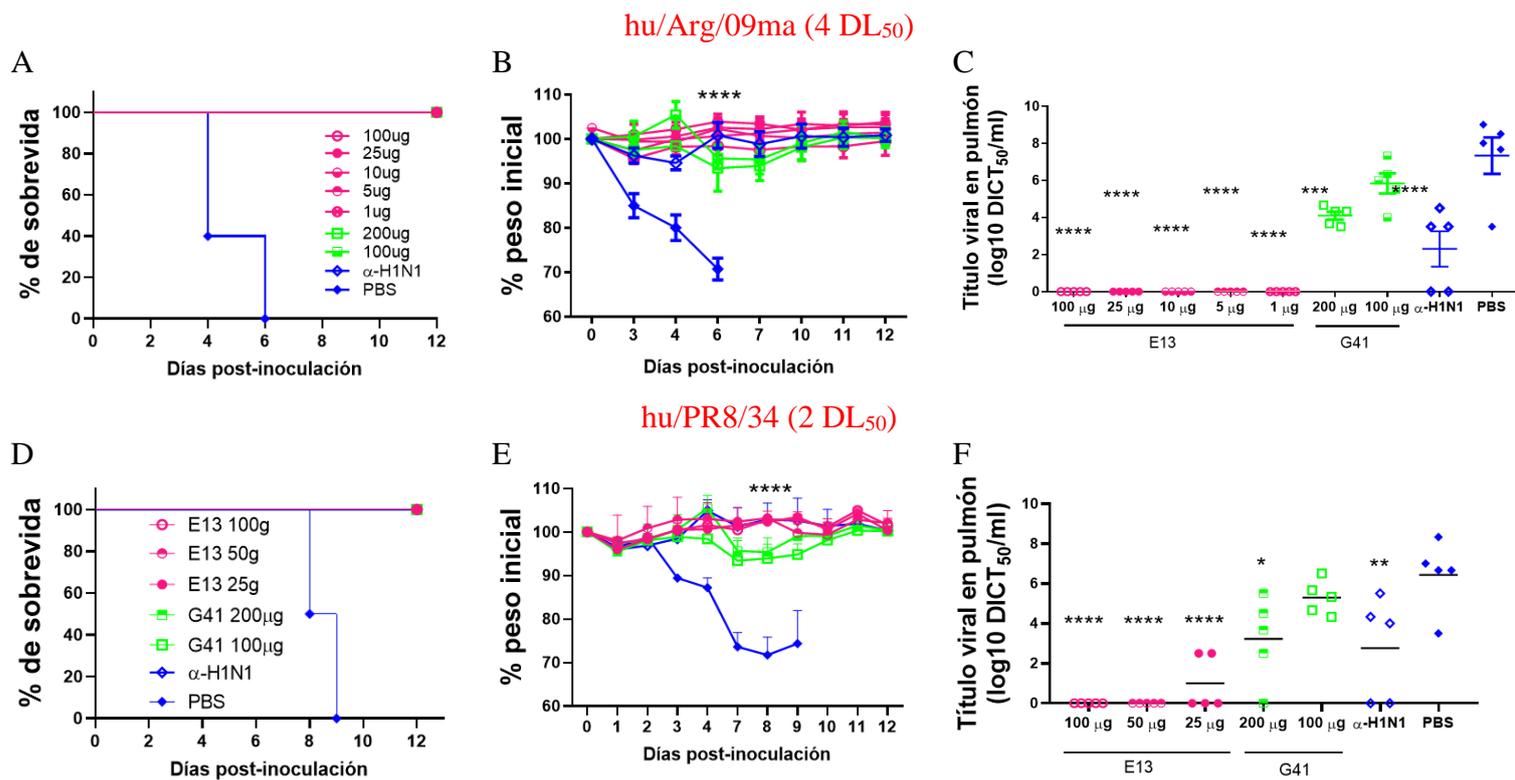


Figura 23. Estudio de la DE de los nanoanticuerpos E13 y G41 frente al desafío viral utilizando las cepas hu/Arg/09ma (A, B, C), y hu/PR8/34 (D, E, F). Se presentan las curvas de sobrevivida (A, D), las curvas de seguimiento de peso durante los ensayos (B, E) y el título observado al dpi 4, en los macerados de pulmón (C, F). Se representan las medias observadas en cada grupo, barras de error como desvío estándar de la media. ANOVA de una vía ($p < 0,05$), Test de Dunnett vs grupo PBS de cada respectivo ensayo; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$.

Se observó que el VHH E13 mostró una protección profiláctica aun utilizando una dosis de $1 \mu\text{g}$ para la cepa hu/Arg/09ma, con títulos virales no detectables en homogenato de pulmón y protección del 100 % de la sobrevivida, con diferencias significativas en el registro de peso al 6 dpi respecto del grupo que no recibió tratamiento específico (PBS). A su vez, frente al desafío viral con la cepa de referencia hu/PR8/34, los animales presentaron títulos virales en homogenato de pulmón con diferencias significativas respecto del grupo PBS, con la menor dosis utilizada ($25 \mu\text{g}/\text{animal}$), incluyendo también la protección al 100 % de la sobrevivida y detectada al 8 dpi, momento de mayor diferencia en la pérdida del peso en el grupo control PBS.

Por otro lado, el VHH G41 registró un aumento de la capacidad protectora cuando se duplicó la dosis, utilizando $200 \mu\text{g}/\text{animal}$, con un rango de títulos virales desde $1 \times 10^{3,50}$ - $1 \times 10^{4,66}$ DICT₅₀/ml para el virus hu/Arg/09ma, y una mayor variación en la excreción viral frente al desafío con la cepa hu/PR8/34 con títulos que oscilaban entre los 0 - $1 \times 10^{5,50}$ /ml. En ambas dosis, G41 mantuvo un 100 % en el porcentaje de sobrevivida sin

disminución del peso significativa, tanto para hu/Arg/09ma como para hu/PR8/34 (Figura 23).

Evaluación de la respuesta de anticuerpos frente al tratamiento profiláctico y al desafío viral

Dentro del ensayo de eficacia profiláctica de los VHHs E13 y G41 realizado frente al desafío viral con la cepa hu/PR8/34 se evaluó la respuesta de isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM) específicas contra diferentes antígenos de interés. Como fue explicado anteriormente, los tratamientos se realizaron 4 horas antes del desafío viral, ambos vía intranasal y bajo anestesia intraperitoneal. Los tratamientos utilizados incluyeron el nanoanticuerpo E13 (con 100, 50, y 25 $\mu\text{g}/\text{animal}$), G41 (200 y 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$), un grupo control negativo (PBS) y un grupo control positivo tratado con suero policlonal de ratón inmunizado con hu/Arg/09 ($\alpha\text{-H1N1}$). Luego de 28 días post-infección, los animales fueron sacrificados y se extrajeron, pulmón, bazo y ganglios linfáticos cervicales (Diseño experimental en Figura 24. A). Luego de la extracción de las células mononucleares de los distintos órganos se realizó el ELISPOT para lo cual se fijaron en una placa los distintos antígenos a analizar: la HA0 (recombinante de hu/PR8/34), el virus hu/Arg/09, como así también los VHHs E13 y G41 (Figura 24. B), utilizados como tratamiento en el ensayo *in vivo* en los ratones. Se contaron los números de *spot* por pocillo, indicadores de la presencia de una célula secretora y se expresaron como número de células secretoras cada 100000 células sembradas, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 11.

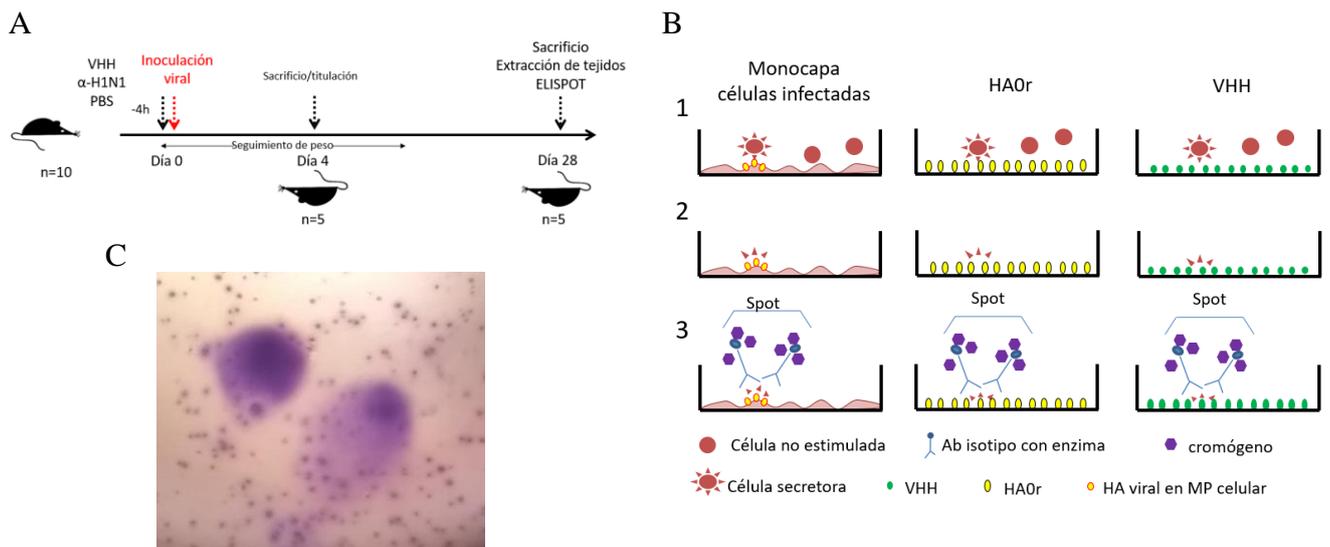


Figura 24. Evaluación de la respuesta inmune. (A) Esquema del diseño experimental utilizado. (B) Esquema del ensayo de ELISPOT, donde se muestran las monocapas de células infectadas con el virus hu/PR8/34, el pocillo con la HA0r o el VHH (E13 y G41) como antígeno de placa: 1, Se incuban las células mononucleares extraídas se incubaron en pocillos conteniendo el antígeno según se describe; 2, lavado de células y anticuerpos no específicos; 3, unión de anti-isotipos, revelado del spot y conteo de los mismos. (C) Foto representativa de la técnica ELISPOT específico, donde puede observarse la presencia de dos *spots*.

En un experimento preliminar, se observó respuesta específica con IgG contra el virus y contra la HA0r tanto en bazo como el pulmón, sin embargo no se detectó respuesta de células productoras de anticuerpos en ganglios linfáticos cervicales de los grupos analizados. A su vez, no se detectó respuesta en la evaluación del isotipo IgA en ninguno de los órganos estudiados.

La respuesta se ve principalmente a nivel de pulmón en la evaluación de los isotipos IgG, con valores promedios de 52,5 y de 32 *spots*/100.000 células sembradas contra la HA0r y el virus, respectivamente en los animales que no recibieron tratamiento específico (PBS) que se ve concentrada en pulmón, y con niveles mínimos detectados en bazo. En los grupos de animales que recibieron tratamiento específico (α -H1N1, G41 y E13) la respuesta se vio disminuida, en las diferentes dosis administradas. Para el grupo de animales tratados con E13, se observó la respuesta de células productoras de anticuerpos concentrada en pulmón, mientras que para G41 y en grupo tratado con suero inmune, la respuesta estuvo concentrada en bazo. Estos resultados sugerirían que en los animales tratados con E13 la infección solo activó células productoras de anticuerpos radicadas en tejido pulmonar y no en el bazo, mientras que para los animales tratados con G41 o bien suero inmune, la infección logra activar tanto células que se localizan en pulmón como en el bazo. En congruencia con lo descrito en la literatura, no se detectaron células

productoras de anticuerpos respuesta específicos contra el tratamiento, confirmando su inocuidad.

Tabla 11. Respuesta de células productoras de isotipo Ig analizadas (IgG, IgA, IgM) específica contra HA0 y virus, detectada en tejidos de animales desafiados con H1N1 hu/PR8/34. Se expresan como el promedio de spots observados cada 100000 células sembradas.

	Ag de placa	Tejido	Tratamiento						
			E13			G41		α -H1N1 PM09	PBS
			100 μ g	50 μ g	25 μ g	200 μ g	100 μ g		
IgG+M	HA0r	Pulmón	6,5	6	0,5	17,5	14,5	5	52,5
		Bazo	2,5	9	2	8	10	2,5	13
	Virus	Pulmón	6,5	0	3	0	3,5	4,5	32,5
		Bazo	4	9	9	17,5	12,5	12,5	6,5
	E13	Pulmón	0	0,5	0,5				0
		Bazo	0	7,5	0				1
	G41	Pulmón				0	0	1	0
		Bazo				2,5	3	1	0

CARACTERIZACIÓN DIFERENCIAL DE NANOANTICUERPOS EXPRESADOS EN *P. PASTORIS* Y EN *E. COLI*

Caracterización diferencial *in vitro* de los nanoanticuerpos E13 y G41 expresados en *P. pastoris* y *E. coli*

Se realizó el estudio comparado de los nanoanticuerpos E13 y G41 expresados en levaduras *P. pastoris*, generados en el MIT (Instituto Tecnológico de Massachusetts) a partir de la secuencia aminoacídica de los VHHs y los mismos expresados en nuestro laboratorio, en bacterias *E. coli*.

Pichia pastoris

Escherichia coli



* G41 elución a pH 7; E13 elución a pH 8

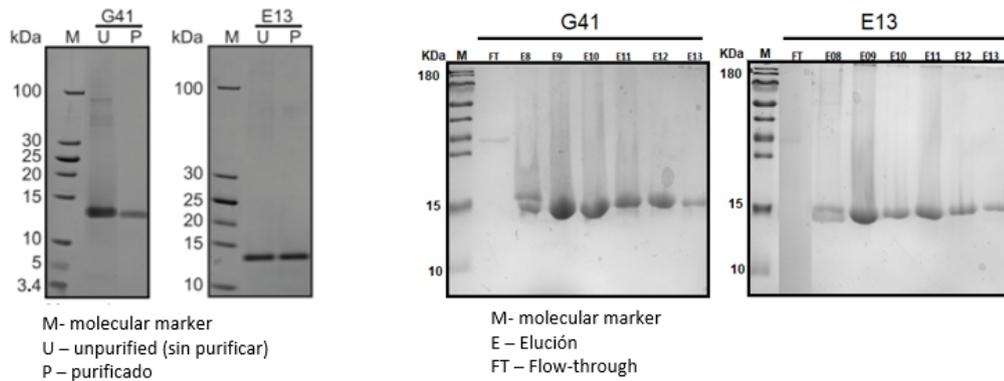


Figura 25. Comparación de la producción y purificación de los VHHs producidos en diferentes sistemas de expresión. Se presenta a su vez los WB (*western blot*) de los nanoanticuerpos purificados.

Para ello se analizó mediante la técnica de ELISA la capacidad de reconocimiento de la partícula viral de H1N1, como así también su capacidad de inhibir la infección viral en monocapas de células MDCK (MN) o la hemaglutinación (IHA), los resultados se presentan en la Figuras 26 y 27 y la Tabla 12, a continuación.

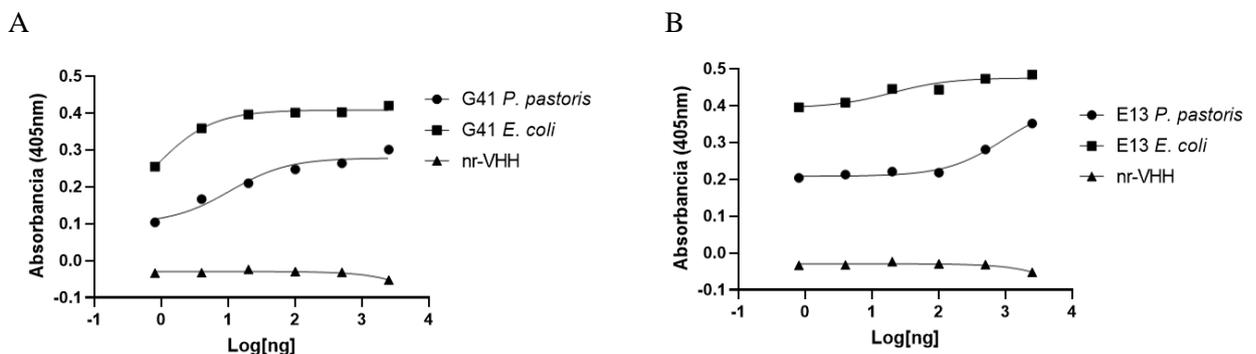


Figura 26. ELISA de dosis respuesta de los nanoanticuerpos (A) G41 y (B) E13 frente al virus hu/Arg/09. Se presenta la absorbancia a 405 nm en función de la concentración de nanoanticuerpos. En ambos casos se utilizó como control un VHH no relacionado (nr-VHH).

Tabla 12. Estudio *in vitro* de los nanoanticuerpos VHH E13 y G41 expresados en *P. pastoris* vs *E. coli*.VHH

	Sistema de expresión	Elisa (nM) hu/Arg/09 (32 UHA)*	MN (µM) hu/Arg/09 (100 DICT ₅₀ /50 µl)	IHA (µM) hu/Arg/09 (8 UHA/25 µl)
E13	<i>P. pastoris</i>	0,5-2	0,10-0,12	-
	<i>E. coli</i>	0,5	0,45	-
G41	<i>P. Pastoris</i>	12	0,05-0,95	-
	<i>E. coli</i>	0,5	0,23	0,05

*Inversa de la mayor dilución con señal positiva

El ELISA mostró un comportamiento diferencial entre los VHHs expresados en ambos sistemas de expresión, con valores de absorbancias menores en los expresados en *P. pastoris*. A su vez, se observó que el nanoanticuerpo G41 expresado en *P. pastoris* no tiene la capacidad de inhibición de la hemaglutinación (IHA) como sí tiene el VHH G41 expresado en *E. coli*, lo cual puede deberse a propiedades asociadas al *buffer* de suspensión, o a propiedades del nanoanticuerpo asociadas a modificaciones post-traduccionales que se llevan a cabo en la expresión en *P. pastoris*. Por otro lado, tanto G41 como E13 presentan actividad neutralizante frente a la infección viral con hu/Arg/09 en monocapas de células MDCK.

Estudio de la eficacia profiláctica de nanoanticuerpos E13 y G41 expresados en *P. pastoris* y *E. coli* en el modelo ratón

Se estudiaron los niveles de eficacia profiláctica en ratones que fueron desafiados con el virus hu/Arg/09ma con los nanoanticuerpos E13 y G41 producidos en distintos sistemas de expresión. Para ello se utilizó el mismo diseño experimental que fue explicado anteriormente en el modelo ratón.

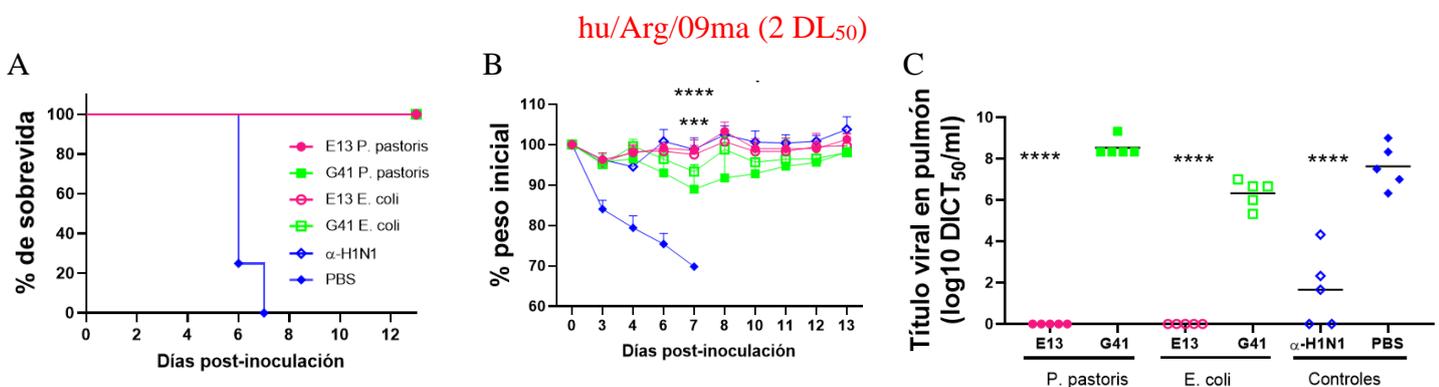


Figura 27. Estudio de la eficacia profiláctica de los nanoanticuerpos E13 y G41 expresados en distintos sistemas de expresión (*P. pastoris* y *E. coli*) en el modelo ratón frente al desafío viral con hu/Arg/09ma. Curvas de sobrevida (A), las curvas de seguimiento de peso durante los ensayos, (B) el

título observado al dpi 4 en los macerados de pulmón (C). Se representan las medias observadas en cada grupo, barras de error como desvío estándar de la media. ANOVA de una vía ($p < 0,05$), Test de Dunnett vs grupo PBS de cada respectivo ensayo; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$.

Los niveles de eficacia profiláctica del nanoanticuerpo E13 de ambos sistemas de expresión mostraron títulos virales no detectables en homogenato de pulmón al 4to dpi, siendo significativamente diferentes a los observados en el grupo control negativo (PBS). Por otro lado, el nanoanticuerpo G41 mostró una capacidad protectora parcial tanto el *E. coli* como en *P. pastoris*, siendo consecuente con lo que se vio en ensayos previos, con títulos virales en homogenato de pulmón sin diferencias significativas respecto al grupo que recibió tratamiento control (PBS), lo cual se atribuye a cambios en los sitios antigénicos de la HA durante el proceso de adaptación de la cepa al ratón. En todos los casos, tanto con E13 y con G41 de ambos sistemas de expresión, se observó una protección en el porcentaje de sobrevivencia del 100 %, sin pérdida de peso significativa respecto del grupo PBS a 7 dpi (Figura 27).

CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DE LOS NANOANTICUERPOS: MODELO COBAYO

Modelo de infección por contacto

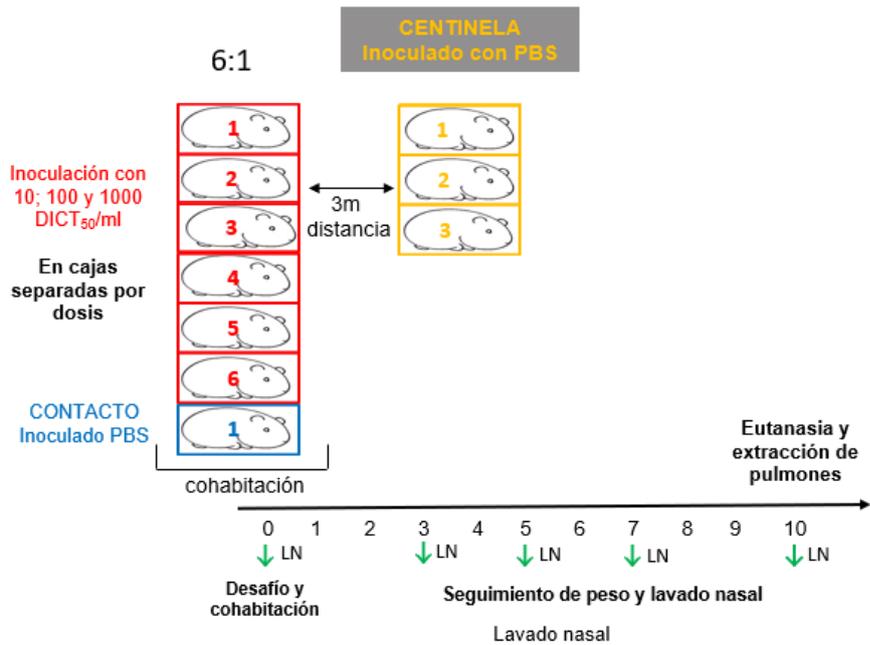
Se realizó un ensayo utilizando el cobayo (*Cavia porcellus*) como modelo de infección por contagio, los individuos utilizados fueron hembras (300-350 gramos). Cada grupo consistió en un conjunto de 6 animales inoculados con virus, más 1 animal inoculado con PBS (contacto) en convivencia con los individuos inoculados, dentro de la misma jaula (0,6 x 0,6 x 0,6 m) durante la duración del ensayo, quedando en una proporción 6:1. Los animales fueron infectados con el virus H1N1 hu/Arg/09 utilizando 10, 100 y 1000 DICT₅₀/ml vía in a fin de encontrar la dosis que generara infección viral en el individuo en contacto. Se introdujo además como control un grupo CENTINELA inoculado con PBS (n=3) que fue ubicado a una distancia de al menos 3 metros de los grupos inoculados con virus (Figura 28. A).

Todos los grupos fueron inoculados con 300 μ l/animal (150 μ l por nostril) bajo anestesia ip y se realizó tanto el seguimiento de peso durante el ensayo como así también lavados nasales con PBS bajo anestesia ip en los 0, 3, 5, 7 y 10 dpi y posterior titulación de los mismos.

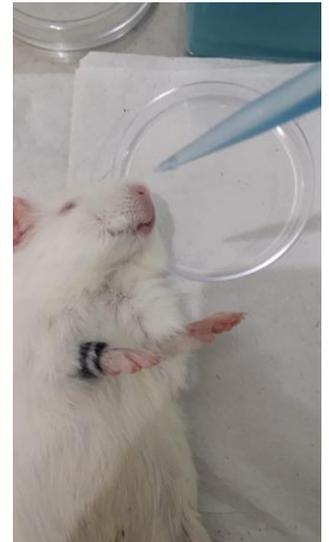
En la evaluación del peso de los animales a lo largo de la experiencia no se observó una disminución del peso significativa respecto del grupo inoculado con PBS, como es

esperable en el modelo. El análisis de los títulos virales de los grupos inoculados con el virus H1N1 hu/Arg/09, el grupo que recibió 10 DICT₅₀/ml alcanzó un máximo de $1 \times 10^{2.2}$ DICT₅₀/ml a 10 dpi y se registraron niveles detectables de virus mediante titulación por infección de células MDCK. En 5/6 de los animales inoculados con el virus (83 %); el animal contacto del grupo presentó un título de 1×10^4 DICT₅₀/ml al 3 dpi, alcanzando niveles no detectables a partir del 5 dpi. En los grupos inoculados con 100 y 1000 DICT₅₀/ml se logró la infección en el 100 % de los animales inoculados, alcanzando un título promedio máximo de $1 \times 10^{5.67}$ DICT₅₀/ml y $1 \times 10^{7.55}$ DICT₅₀/ml respectivamente, ambos en el 3 dpi. Los animales contacto de ambos grupos alcanzaron títulos virales detectables, con un valor máximo de $1 \times 10^{5.5}$ DICT₅₀/ml en el 5 dpi para el animal en contacto con el grupo 100 DICT₅₀/ml y de $1 \times 10^{8.33}$ DICT₅₀/ml en el 7 dpi para el animal en contacto con el grupo 1000 DICT₅₀/ml. En función de los datos obtenidos se observa que el pico de excreción viral en los animales inoculados en el 3 dpi (Figura 28).

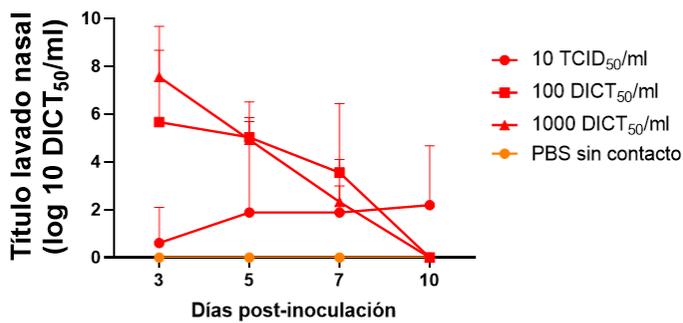
A



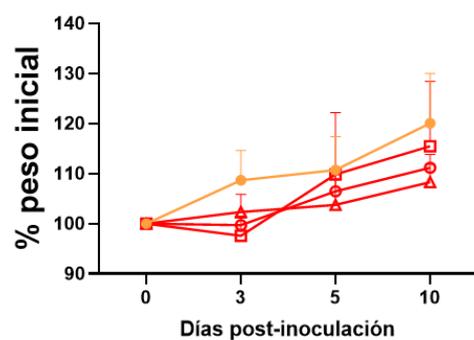
B



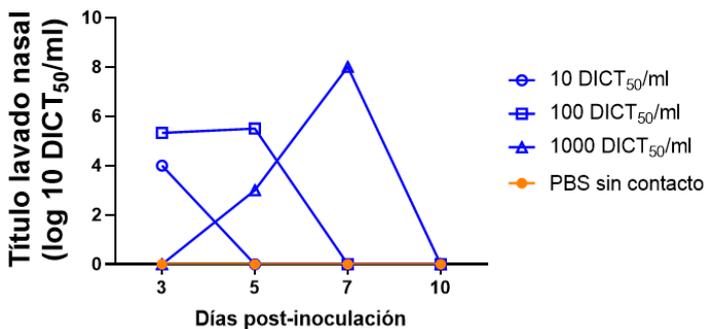
C



D



E



F

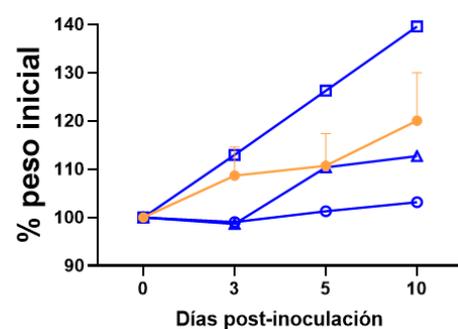
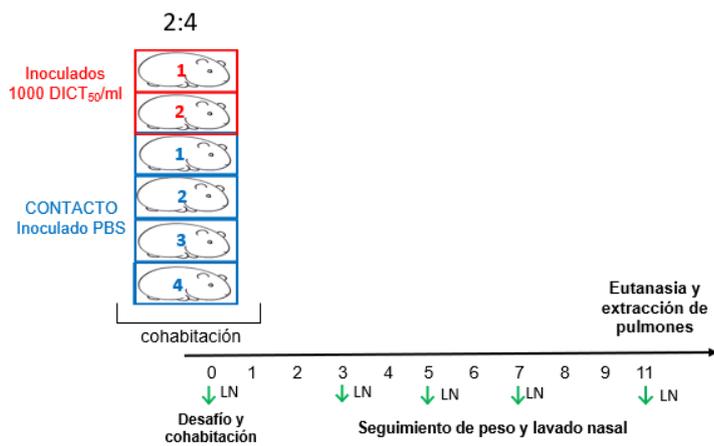


Figura 28. Ensayo de evaluación de dosis efectiva de infección por contacto en cobayo. (A) Diseño experimental, Se representa el diseño utilizado por grupo, el mismo consistió en 6 animales inoculados vía intranasal con el virus (rojo) y 1 animal inoculado con PBS en contacto con los animales con inoculación viral (celeste), Las dosis utilizadas por grupo fueron 10, 100 y 1000 DICT₅₀/ml (n=7) y un grupo al cual se le administró PBS (naranja) y se colocó a 3 metros de distancia del resto de las jaulas (n=3). (B) Foto representativa de un cobayo al que se le está realizando el LN. Se tomaron muestras LN en los 0, 3, 7 y 10 dpi (flechas verdes). Se muestran en gráficos separados los títulos obtenidos y seguimiento de peso en los animales que fueron inoculados con el virus hu/Arg/09 (C y D) y los animales que fueron contacto de cada grupo (E y F).

Continuando con la generación del modelo para el estudio de la protección de la transmisión viral de los VHHs frente al desafío viral en cobayos se realizó un ensayo modificando la proporción de individuos inoculados y contacto a una de 2:4 (jaulas de 1 x 0,7 x 0,7 m). En este modelo, se podría estudiar la protección de los VHHs E13 y G41, como así también tener un control negativo (PBS) y un control positivo al cual se le puede administrar suero de cobayo α -H1N1.

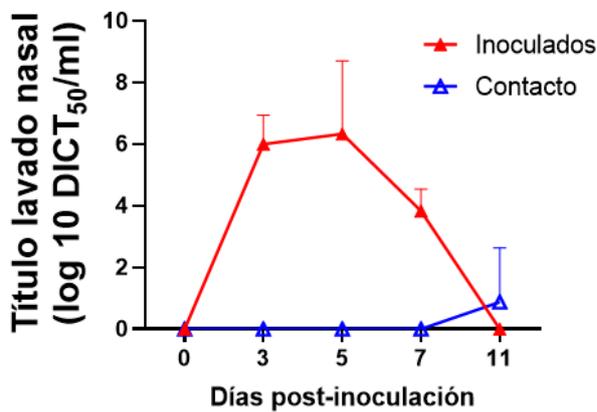
A



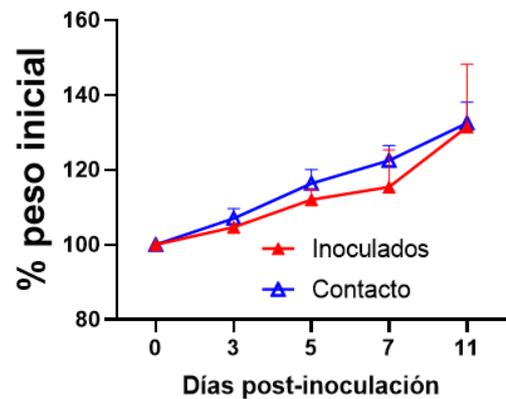
B



C



D



E

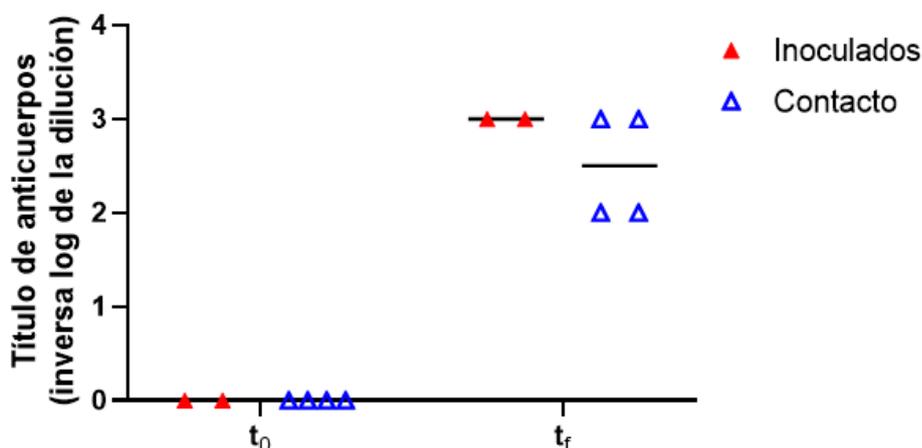


Figura 29. Estudio del modelo para la evaluación en cobayo de la capacidad protectora de VHHs frente a la transmisión viral por contacto. (A) Diseño experimental, se representa el diseño utilizado por grupo, el mismo consistió en 2 animales inoculados vía intranasal con el virus H1N1 hu/Arg/09 (rojo) y 4 animales inoculados con PBS (contactos, color celeste). (B) Fotos representativa de los cobayos dentro de las jaulas. (D) Titulación viral de lavados nasales. Se muestran los títulos promedios alcanzados en LN a lo largo de la experiencia para los animales inoculados con virus y los animales inoculados con PBS (contactos). (D) Curva de seguimiento de peso. Se muestra el registro de peso de los animales durante el ensayo, representado como porcentaje del peso inicial. (E) ELISA de sueros de cobayos. Se utilizó el virus H1N1 hu/Arg/09 para la evaluación de anticuerpos específicos contra el virus previo y posterior a la infección directa/contacto (dpi -1= t₀ y dpi 11= t_r), se grafican los valores obtenidos en cada animal y las medias de cada grupo (inoculados y contacto).

En la evaluación del peso de los animales a lo largo de la experiencia no se observaron diferencias significativas en la variación de peso entre los grupos inoculado con el virus y PBS, tal como lo observado en este modelo (Figura 29. D). El análisis de las muestras tomadas en LN por hemaglutinación directa arrojó niveles no detectables, tanto para los animales inoculados con el virus como para los animales inoculados con PBS (datos no mostrados). Los títulos virales en LN analizados por infectividad de células MDCK alcanzaron un valor máximo en el dpi 3 ($1 \times 10^{6.66}$ DICT₅₀/ml) y dpi 5 (1×10^8 DICT₅₀/ml) para los animales que recibieron la inoculación in del virus H1N1 hu/Arg/09 (Figura 29. C), tal como lo observado en el ensayo presentado anteriormente. Los animales que recibieron PBS in y se mantuvieron en contacto directo no tuvieron niveles detectables de virus, a excepción de un animal en el dpi 11, con un título de $1 \times 10^{3.5}$ DICT₅₀/ml. Sin embargo, el análisis de los títulos de anticuerpos contra el virus H1N1 hu/Arg/09 en suero de los animales arrojó seroconversión en los 6 animales analizados, a 11 dpi (100 % de los animales), incluyendo los animales en contacto. La respuesta detectada para los infectados con el virus fue positiva hasta la dilución 1/1000, mientras que para dos de los animales en contacto fue de 1/1000 y de 1/100 para los dos restantes (Figura 29. E), demostrando el contacto con el virus incluso en los animales que no fueron inoculados en forma directa. En función de los datos obtenidos, las condiciones utilizadas no serían ideales para realizar un ensayo de eficacia de los VHHs en el modelo contagio, ya que no

se logró observar mediante las técnicas utilizadas la infección en los animales en contacto, demostrando que las condiciones estudiadas no son las óptimas para el estudio de la capacidad protectora en la infección viral por contacto de animales infectados mediante los VHHs.

BIOPANEO: DISPLAY EN FAGOS Y SELECCIÓN DE NANOANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA H3N2 PERTH

Para la realización del biopaneo se utilizó la técnica *display* en fagos, la cual consiste en la expresión de los VHHs como proteínas de fusión en la superficie del bacteriófago filamentoso M13. Para ello, se utilizaron tres rondas consecutivas de biopaneo en placas de ELISA sensibilizadas con el antígeno de interés, el virus H3N2 Perth producido en células MDCK y purificado con una membrana Sartobind Q. En cada ronda de biopaneo, una vez eluidos los fagos fueron re-amplificados y se volvieron a enfrentar al mismo antígeno, como así también a un pocillo control sin antígeno (blanco).

Concentración y purificación de virus H3N2 hu/Perth/09

Con el propósito de aumentar la señal específica contra el virus H3N2, se optó por utilizar una tecnología de columna de intercambio iónico Sartobind Q (Figura 30) de modo tal de favorecer la eliminación de restos celulares. Para ello, se generó un stock inicial de 100ml de virus con 32 UHA/50 μ l y con título de $1 \times 10^{5.5}$ DICT₅₀/ml por infectividad de monocapas de células MDCK luego de 48 horas de infección. El virus fue concentrado mediante un gradiente de sacarosa en *buffer* NET (70 %:40 % p/V) luego del cual se obtuvieron 10 ml de stock viral con un título de 128-256 UHA/50 μ l y de $1 \times 10^{6.33}$ DICT₅₀/ml. Dicho stock fue cargado en una columna Sartobind. Luego de los lavados y el paso de la muestra, se realizó la elución del virus con soluciones de NaCl de molaridad creciente (0,6 M; 0,9 M; 1,2 M; 1,5 M) recolectando 10 alícuotas de 0,5 ml cada una. Una vez finalizado el procedimiento, se midió la densidad óptica (DO) a 260 nm de las fracciones obtenidas como medida de la cantidad de ARN presente en las muestras (Figura 30. B).

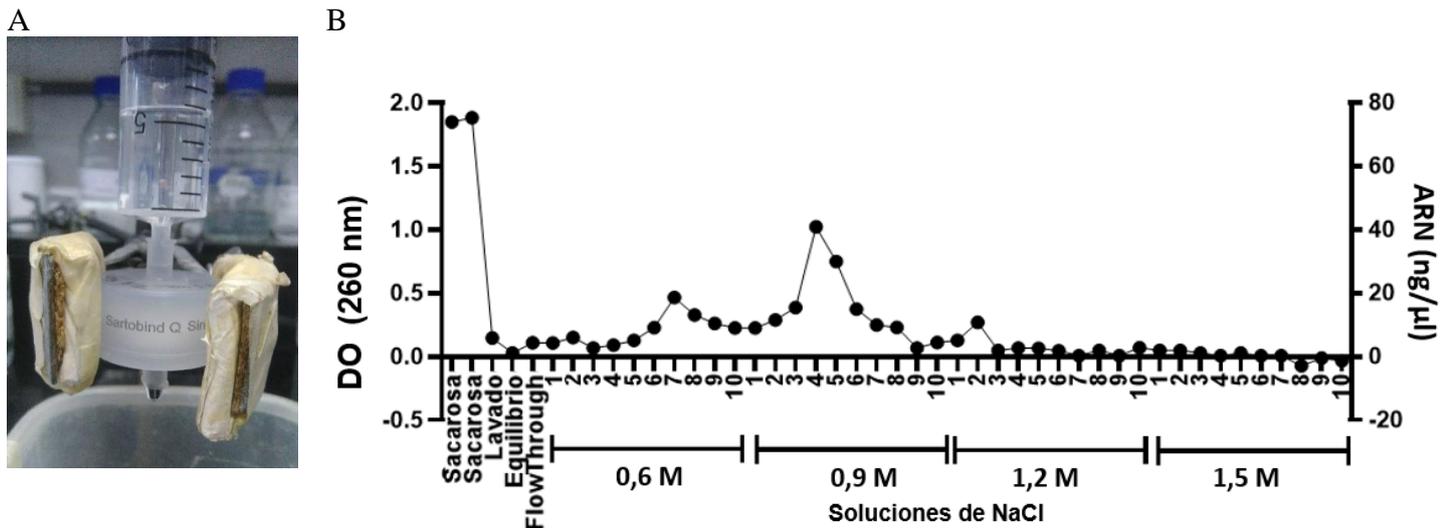


Figura 30. Purificación del stock viral de H3N2 hu/Perth/09. (A) Columna de intercambio iónico de Sartobind Q utilizada para la purificación de la muestra. (B) Gráfico de la densidad óptica (DO) a 260 nm de las muestras analizadas tras el paso del stock viral por la columna con su equivalencia en ng/μl de ARN presente en la muestra. Se muestran los valores obtenidos para la muestra previo al paso de la columna por duplicado (Sacarosa), la solución de lavado, de equilibrio y el *Flow Through* del paso de la muestra, como así también de las alícuotas eluidas con las distintas soluciones de NaCl de molaridad creciente.

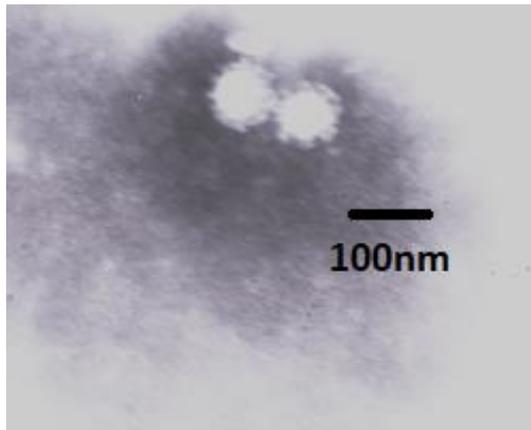
La muestra proveniente de la concentración por gradiente de sacarosa se midió por duplicado, presentando antes de pasar por la columna de intercambio iónico una densidad óptica (DO) promedio de 1,864 equivalente a 74,53 μg/μl de ARN. Se observaron DO en las alícuotas correspondientes a los lavados, equilibrio o el *Flow Through* de la muestra por debajo de los 0,147 considerando estos valores como presencia viral negativa. Los picos máximos de absorbancia indicativos de presencia de partículas virales fueron para la solución 0,6M en la alícuota número 7, con una DO de 0,465 equivalente a 18,59 ng/μl de ARN, para la solución 0,9 M en la alícuota número 4 con una DO de 1,021 representando 40,859 ng/μl, para la solución de NaCl de 1,2 M fue la alícuota número 2 con una DO de 0,269 equivalente a 10,76 ng/μl, mientras que la solución de NaCl de 1,5 M presentó valores de DO por debajo de los valores alcanzados por las soluciones de lavado. La presencia de partículas virales fue analizada por hemaglutinación, infectividad de monocapas de células MDCK, como así también evaluada la integridad de las partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

Tabla 13. Evaluación de las alícuotas obtenidas luego de la purificación por Sartobind Q mediante la absorbancia (a 260 nm), título viral y microscopía electrónica de transmisión (MET).

Muestra		DO	RNA	Título		Vol	MET	
Solución	Alícuota		(ng/μl)	UHA/50μ	DICT ₅₀ /ml	(ml)		
				1	(log10)			
Stock original	-	-	-	32	5,5	100		
Sacarosa	-	1,864	74,53	128-256	6,33	10	Sí	
0,6 M	6	0,229	0,153	32		0,5		
	7	0,465	18,59	256	5,5	0,5	Sí	
	8	0,328	13,117	128		0,5		
	9	0,262	10,479	128		0,5		
	10	0,225	8,989	64		0,5		
NaCl	1	0,225	9,01	64		0,5		
	2	0,288	11,536	128		0,5		
	0,9 M	3	0,387	15,536	128	4,33	0,5	
		4	1,021	40,859	128	5,5	0,5	
	5	0,741	29,908	32		0,5		
1,2 M	2	0,269	10,759	16		0,5		
	3	0,048	1,907	4		0,5		

Las alícuotas que presentaron mayor título por hemaglutinación de glóbulos rojos se seleccionaron para la evaluación del título por infectividad de monocapas de células MDCK, resultando la alícuota número 7 de la solución de NaCl 0,6 M con un título de $1 \times 10^{5,5}$ DICT₅₀/ml, y las alícuotas 3 y 4 de la solución 0,9 M de NaCl con $1 \times 10^{4,33}$ DICT₅₀/ml y $1 \times 10^{5,5}$ DICT₅₀/ml respectivamente. A su vez se enviaron alícuotas al servicio de Microscopía del Instituto de Virología para la detección mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Fue posible comprobar, la presencia de partículas virales completas, esféricas, de integridad conservada, de aproximadamente 70-80 nm de diámetro, y con las espículas características descritas del Virus Influenza (Figura 30), tanto en la muestra proveniente de la concentración por gradiente de sacarosa, como en la alícuota purificada por columna (alícuota 7 de la solución de NaCl 0,6 M).

A



B

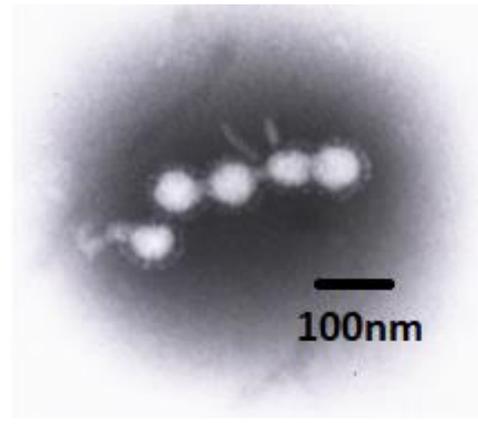


Figura 31. Fotografía por Microscopía electrónica de transmisión (MET) del virus Influenza Tipo A tomada en el servicio de Microscopía electrónica de INTA Castelar. Se observan partículas del virus Influenza con presencia de espículas características, tanto para la alícuota purificada por gradiente de sacarosa (A) como para la proveniente de la purificación por columna (B).

En función de los resultados obtenidos se seleccionó la fracción número 7 de la elución en NaCl 0,6 M por poseer mayor título viral. Para ello, se tomaron sueros en sus tiempo inicial y final luego de las inmunizaciones y como control se utilizó suero de cobayo inmunizado con la cepa H3N2 hu/Perth/09 (Figura 32). Fue posible observar un aumento de la señal específica contra H3N2 hu/Perth/09, lo que lograba maximizar la probabilidad de aislamiento de clones positivos a lo largo de las rondas de biopaneó.

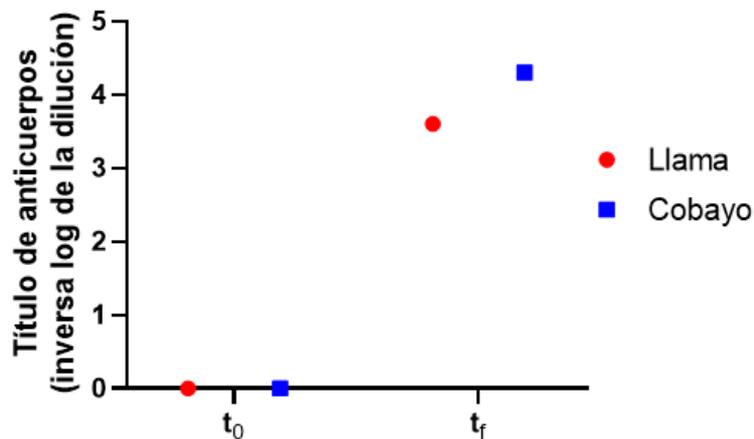
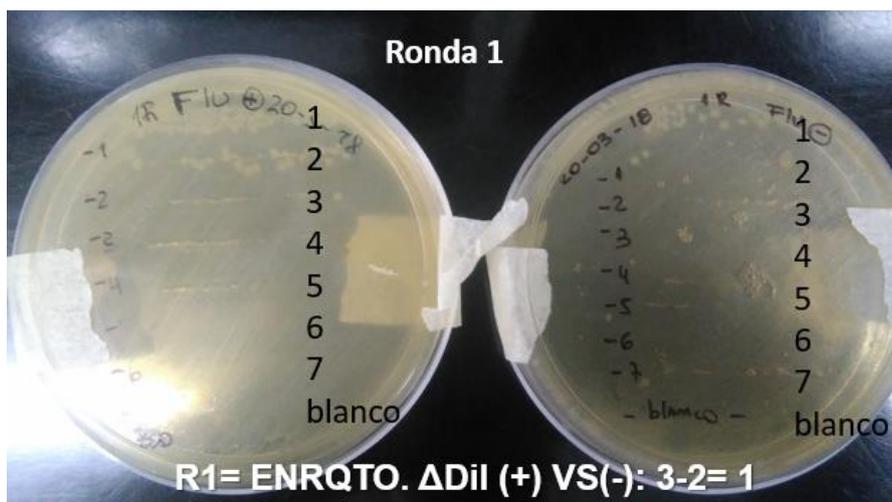


Figura 32. Título de anticuerpos específicos contra hu/Perth/09 en la llama utilizada para la generación de la biblioteca de VHHs. Se utilizó la técnica de ELISA para evaluar el título de anticuerpos de la llama antes y después de recibir las inmunizaciones con la vacuna; t_0 : tiempo inicial; t_f : tiempo final, correspondiente al día 40 post-inmunización con la vacuna trivalente. Como control se utilizó también el suero de cobayo inmunizado con el virus H3N2 hu/Perth/09.

Selección de nanoanticuerpos específicos contra el virus H3N2 hu/Perth/09

Para la selección de VHHs específicos se realizaron 3 rondas de enriquecimiento, utilizando como antígeno de selección la alícuota 7 de la solución de NaCl 0,6 M del virus H3N2 hu/Perth/09. Se tomó como medida de enriquecimiento de cada ronda la diferencia entre la máxima dilución en la que se observó crecimiento de colonias positivas al antígeno de selección versus las que crecieron frente al antígeno control. En la primera ronda se observó un crecimiento de colonias de bacterias infectadas con el fago eluído que fue expuesto al antígeno de selección hasta la dilución -3 y un crecimiento colonias de bacterias inespecífico hasta la dilución -2. En la segunda ronda se observó un crecimiento hasta la dilución -5 y -3 respectivamente. En la última ronda hasta las diluciones -5 y -6, dando un enriquecimiento de 1, 2 y -1 para las rondas 1, 2 y 3 respectivamente (Figura 33).

A



B



C

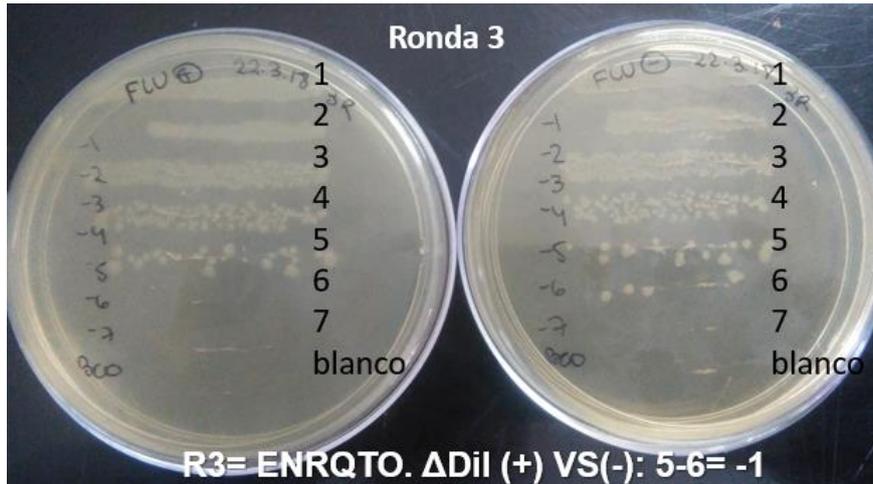


Figura 33. Fotos de las placas de ágar para la medición del enriquecimiento a lo largo de las rondas de biopaneó. Se observan las placas obtenidas para la primera ronda (A), la segunda (B) y la tercera (C).

Se tomaron 50 μ l de las diluciones -3 y -4 de la segunda ronda y de las diluciones -4 y -5 de la tercera ronda y se plaquearon en ágar 2TY suplementado con glucosa (1 %) y ampicilina (0,1 mg/ml) utilizando bolillas para la obtención de colonias aisladas que fueron utilizadas para el ELISA de fagos. Para ello, se seleccionaron 95 colonias provenientes de dichas placas, 43 colonias de la dilución -4 de la segunda ronda; 5 colonias de la dilución -3 de la segunda ronda; 14 colonias de la dilución -3 de la tercera ronda; 25 colonias de la dilución -5 de la tercera ronda y 8 colonias de la dilución -4 de la tercera ronda, y se dejó el último pocillo como blanco. Como antígeno de placa se utilizó el virus H3N2 hu/Perth/09 purificado, como se describió previamente, en 10 ml de *buffer coating* (aproximadamente 26 UHA/pocillo), y como blanco se utilizó una placa en la que inmovilizó sobrenadante de células MDCK sin infectar (*Mock*). Luego del ELISA de fagos, a partir del análisis de las absorbancias observadas, se seleccionaron 26 clones, tomando como punto de corte el promedio de absorbancia obtenido en la placa control a lo que se sumaron 10 desvíos estándar (Figura 34).

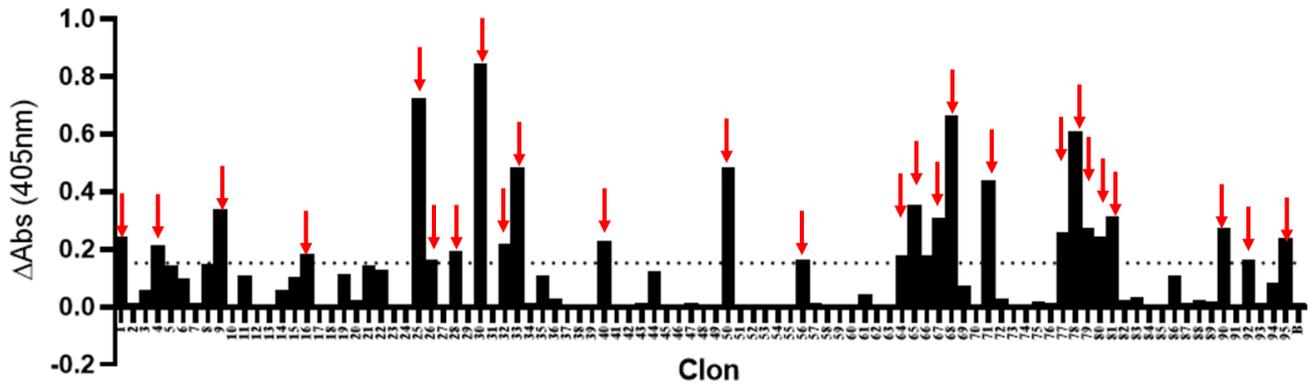


Figura 34. ELISA de fagos. Se representa un gráfico con la absorbancia de cada pocillo del ELISA de fagos con la sustracción de la absorbancia obtenida en el pocillo control (Blanco). Con una línea punteada se señala el punto de corte de la selección de clones positivos, a partir del promedio de la absorbancia de la placa utilizada como control negativo (*Mock*) más diez desvíos standard ($\bar{X}+10DS$); quedando 26 clones positivos seleccionados.

De los 26 clones obtenidos fue posible obtener las secuencias de 14 de ellos.

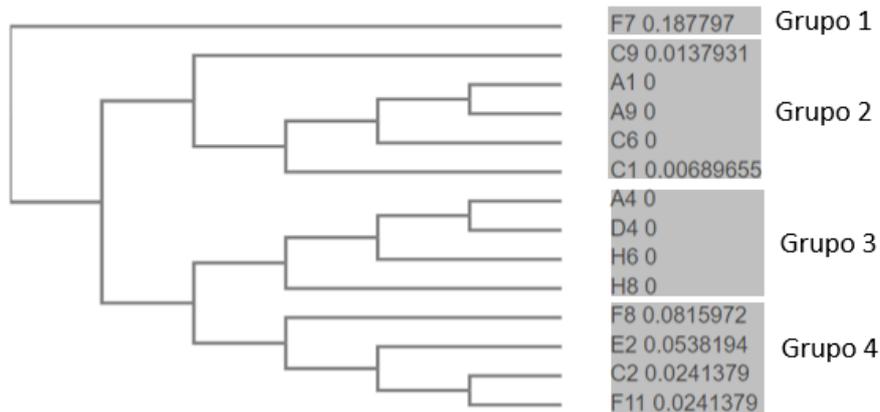


Figura 35. Análisis de secuencias de los clones obtenidos en el biopaneamiento para la selección de nanoanticuerpos específicos contra el virus H3N2 hu/Perth/09. Árbol guía en función de las diferencias en los residuos aminoacídicos en los clones seleccionados, se puede observar la presencia de cuatro (4) grupos.

A través del alineamiento de secuencias (datos no mostrados), todos los clones presentan las estructuras que conforman la estructura de la inmunoglobulina, con sus tres regiones de complementariedad, denominadas CDR, que están involucradas con la unión al antígeno, y sus respectivas zonas flanqueantes, más conservadas entre los VHHs, denominadas FR. En todos se observa la presencia de dos residuos de cisteína (C), una presente en el FR1 y otra en el FR3 que se conectan formando un puente disulfuro canónico característico de los anticuerpos de cadena pesada de los camélidos, como así

también se presentan algunas sustituciones características de los VHHs respecto a los VH que le otorgan su solubilidad característica.

El análisis de las secuencias mediante el alineamiento y el árbol guía (Figura 35) mostró la presencia de 4 grupos, el grupo número 1 que se compone del clon F7, que a su vez es el único clon que presenta un puente disulfuro extra con dos cisteínas presentes (una en el FR2 y otra en el CDR3); el grupo 2 que se compone de 5 clones, C9, A1, A9, C6 y C1, de los cuales A1, A9 y C6 presentan la misma secuencia aminoacídica, y cuyas diferencias con los otros clones residen en 2 posiciones en el dominio FR1; el grupo 3 que se compone de 4 clones que presentan la misma secuencia, A4, D4, H6 y H8; y por el último el grupo 4 con los clones F8, E2, C2 y F11, cuya variabilidad se centra en 4 posiciones dentro de los dominios de unión a antígeno, dos en el CDR1 y 2 en el CDR3, junto a 11 posiciones distribuidas tanto en el FR1, FR2 y FR3, generando 4 clones con diferencias entre sí en al menos una posición. Por ello, se plantea la selección para la continuación del estudio de las propiedades de al menos 8 clones, que serían los clones F7, C9, A1 (C6 o C1 en su defecto), A4 (o D4, H6, H8) y los 4 clones del grupo 4 que son F8, E2, C2 y F11.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Desde la pandemia de 1918, ha habido un progreso significativo en la ciencia médica, incluido el desarrollo de vacunas contra la influenza, medicamentos antivirales y herramientas diagnósticas. Sin embargo, los eventos pandémicos han azotado globalmente en 1957, 1968 y 2009⁸. La última pandemia (H1N1) generó 600000 casos fatales con una distribución etaria concentrada en la población de menores de 65 años. Estos casos fatales estuvieron estrechamente asociados a la falta de respuesta inmune específica contra el virus H1N1, dado que el virus circulante estacionalmente fue H3N2, hasta el año 2008. Estos eventos pandémicos ratificaron el potencial pandémico de los virus influenza tanto de origen aviar como porcino debido a la conocida capacidad de re-arreglos durante eventos de coinfección, combinado con el estrecho contacto de estas especies con el hombre, y la baja disponibilidad de opciones terapéuticas efectivas para el control de esta enfermedad viral¹⁴⁴.

En este sentido, la propuesta de terapias pasivas basadas en anticuerpos monoclonales recombinantes resulta una valiosa herramienta por su potencial aplicación terapéutica^{78,80,145}.

En el presente trabajo se describe en detalle la caracterización *in vitro* e *in vivo* de 10 VHHs específicos contra virus H1N1 producidos en *E. coli* y en *P. pastoris*, el aislamiento de 8 VHHs específicos contra virus H3N2, y la puesta a punto del modelo cobayo para la infección con virus influenza, con proyección en la futura prueba de eficacia de herramientas profilácticas.

En trabajos anteriores se describió la obtención de 10 VHHs, por medio de la selección usando la proteína HA recombinante de hu/PR8/34 luego de la inmunización de una llama con dos vacunas comerciales de origen humano que contenían virus Influenza tipo A de los subtipos H1N1, H3N2 y virus tipos B^{143,146}. Estos VHHs fueron capaces reconocer H1N1 hu/Arg/09 y su variante adaptada a ratón. En particular, los VHHs A5, A32, B11, B33, D81, D91, E101 demostraron reconocer epítopes lineales, mientras que B93, E13 y G41 reconocen epítopes conformacionales. Si bien todos demostraron a su vez reconocer a la variante adaptada al ratón del aislamiento argentino (H1N1 hu/Arg/09ma), la capacidad de reconocer otras cepas del subtipo H1 (hu/PR8/34) o H5 (av/Viet/04) fue heterogénea entre los VHHs. Por otro lado, 5 de los VHHs que mostraron actividad neutralizante contra el virus hu/Arg/09 *in vitro* (A5, D81, D91, E13 y G41), presentaron a su vez, actividad neutralizante contra el mismo virus adaptado al ratón (D81, D91, E13 y G41). Más aun, se observó actividad neutralizante pan-H1 para los candidatos E13 y

G41, en concentraciones que oscilan entre 0,94 y 0,01 μM , cuando se probaron contra siete virus H1N1, incluidos aislamientos de especies humana, aviar y porcina, que abarcan más de 80 años de evolución antigénica. Lo que indicaría que ambos VHHs estarían reconociendo epítopes conformacionales que son altamente conservados, a pesar de la alta variabilidad detectada para la secuencia de las proteínas HA analizadas. El parámetro de actividad neutralizante de amplio espectro constituye un requisito central al momento de evaluar agentes activos para su implementación a nivel global ¹⁴⁷. Los resultados aquí mostrados sugerirían que E13 cumple con este parámetro, por lo que se convierte en candidato para su traslación a la clínica.

En los últimos años se ha difundido la preocupación frente al riesgo de problemas asociados con la aparición de virus emergentes con impacto en la salud pública, al punto que ha sido definido el criterio de una salud difundido tanto por la Organización mundial de la salud (OMS), como la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) ^{148,149}. Entre los factores asociados a la aparición de virus emergentes, aparecen no solo el aumento de movilidad internacional y de la población en general por urbanización, sino también el incremento en los cambios del uso del suelo y la deforestación, junto con el cambio en los hábitos alimenticios ¹⁴⁴. En diversos aspectos, esto conlleva a centrar la atención en la importancia de la vigilancia de virus animales con potencial transmisión a la población humana, como así también en la prevención y vigilancia de los mismos debido al impacto sobre la economía y la producción ^{50,150}. Por esa razón, se incluyeron en el presente trabajo virus provenientes de especies animales de estrecho contacto con el hombre incluyendo en el mismo los subtipos H1 y H3 originadas en diversas especies animales (aviar, equino, humano y porcino), como así también un virus H5 recombinante de baja patogenicidad, con el objeto de abarcar ambos grupos filogenéticos ⁴⁵. Asimismo, se utilizaron virus con fecha de aislamiento tanto previa como posterior a la pandemia del año 2009 (referidos como pre- y post-pandémicos) abarcando aproximadamente 84 años de evolución viral. Los VHHs B33 y D81 presentaron reacción contra subtipos pertenecientes a ambos grupos filogenéticos de la HA. El grupo 1 estuvo representado por virus H1N1 de origen aviar y humano; y un virus recombinante H5 de origen aviar, y el grupo 2 estuvo representado por virus H3N2 de origen humano y porcino, y un virus H3N8 de origen equino. El nanoanticuerpo B33 reconoce un epítipo lineal del dominio HA2 y si bien en la literatura han sido reportados VHHs con amplia capacidad de neutralización heterosubtípica por su unión a la región del tallo de la HA del virus Influenza H1N1 (HA2) ⁹², este nanoanticuerpo no presentó actividad neutralizante frente a ninguno de los

virus analizados en el presente trabajo. Para B33 la región de los residuos KFE 395-397 (numeración H1) en la HA2 mostró ser crítica para la unión de este VHH a la HA, respaldado por lo observado en el estudio de cambio conformacional de la HA inducido por las condiciones reductoras como así también mediante el análisis por ELISA de péptidos y el estudio de interacción de proteína-proteína. Por otro lado, el nanoanticuerpo D81, mostró reconocimiento por un epítipo en el dominio globular de la HA (HA1) entre las posiciones 84-98 (SSDNGTCYPGDFIDY) y presenta actividad neutralizante, a pesar de que el dominio mencionado se encuentra alejado de los residuos W150, H180, I/L 191 e Y192, altamente conservados entre los distintos subtipos y relacionados con la unión del ácido siálico ³³. Mediante el análisis de interacción de proteínas se dedujo que el dominio de residuos ETPSSDN (posiciones 81-87) se uniría exclusivamente con el CDR3 del VHH. El análisis de secuencias de HA para los virus analizados mostró gran variabilidad en la región del epítipo, que arrojó tres posiciones conservadas en el residuo 81 con un ácido glutámico (E), una alta probabilidad de presencia de dos serinas contiguas (SS) en las posiciones 83 y 84, entre ambos grupos filogenéticos. También se observa la presencia de los residuos CYP en las posiciones 90-92 y de Y98, que si bien son cercanas al epítipo de D81, en el análisis de unión de proteínas no presentan unión a dicho VHH, esto puede deberse a que el mismo cuenta con un programa de evaluación de unión de cuerpos rígidos (PIPER, que es el utilizado por ClusPro) a diferencia de otros programas más sofisticados computacionalmente de cuerpos flexibles ¹³⁹, inhabilitando de este modo la posibilidad de evaluar la capacidad de reconocimiento de los CDRs con presencia de cierta movilidad y que podría estar implicada en el reconocimiento y la unión a antígenos ⁸⁰. De este modo, no se descarta que la unión del VHH a la HA pueda ser mediada y estabilizada también por los CDR cercanos gracias a la flexibilidad de los nanoanticuerpos que reconocen a esta zona altamente conservada heterosubtípicamente. En suma, los resultados sugieren que B33 y D81 reconocen dominios de residuos altamente conservados en ambos grupos filogenéticos por lo que constituyen herramientas de interés para su aplicación en el diagnóstico rápido de aplicación en el monitoreo de la circulación viral.

Otros VHHs que reconocieron tanto a H1N1 hu/Arg/09ma como al virus H5N1 fueron A32, B11 y B93, sin embargo, no reconocieron los virus del grupo 2 analizados (H3N2 y H3N8). Dado que el reconocimiento heterosubtípico ha sido descrito previamente tanto para individuos humanos inmunizados con una vacuna conteniendo antígenos H1 y H3, y también para nanoanticuerpos reportados por otros autores, sería de relevancia el

análisis de la unión de nuestros VHHs a subtipos que suelen impactar esporádicamente en la salud humana como H2, H6 y H9 del grupo 1^{92,151}.

Entre los VHHs con actividad neutralizante, A5, D81 y D91, lograron reducir la mortalidad de los animales entre un 60-80 %, con una recuperación del peso corporal a partir del día 7, por lo que se logró una protección parcial frente a la infección del virus influenza como se describe para otros VHHs en el modelo ratón^{90,93}. Cabe destacar que la infección permisiva, no esterilizante mediante la utilización de inmunidad pasiva, en este caso con nanoanticuerpos, en donde se observa modulación positiva frente a la variación de peso, pero sin impedir la replicación viral en el pulmón, puede resultar útil frente a la re-infección, ya sea con el mismo virus o frente a cepas heterosubtípicas^{152,153}. En contraposición, el tratamiento con E13 o con G41 indujo reducción de la mortalidad del 100 % sin pérdida significativa de peso de los animales a lo largo del ensayo. Llamativamente, E13 transfirió inmunidad esterilizante a los animales tratados con dosis muy bajas (0,05 mg/kg) frente al desafío viral con dosis letales de tres virus H1N1, lo que lo posiciona como candidato ideal para su traslación a la terapéutica para la prevención de infecciones severas por virus H1N1. El nanoanticuerpo G41 resultó neutralizante de otros virus del subtipo H1N1, tanto de origen humano como aviar. Cuando se utilizó como tratamiento profiláctico (dosis de 5 mg/kg) en ratones 4 horas previas a la exposición frente al virus hu/Arg/09, resultó tener un efecto profiláctico con una reducción significativa de títulos virales en los macerados de pulmón analizados. Esta capacidad de impedir la replicación viral en el pulmón de los animales, no se evidenció cuando se utilizaron los virus H1N1 hu/Arg/09ma y hu/PR8/34, a pesar de que el peso corporal de los animales tratados se mantuvo sin cambios. Estos resultados serían indicadores de que propiedades intrínsecas de la HA de los virus serían responsables de la heterogeneidad de reconocimiento, por lo que se procedió a su secuenciación.

En el presente trabajo, la adaptación al ratón del aislamiento pandémico argentino 2009 (H1N1 hu/Arg/09) se logró realizando 7 pasajes seriados. Cuando se observó una disminución del 30 % del peso de los animales al séptimo día posterior a la infección viral. El análisis de secuencias evidenció 4 sustituciones de aminoácidos, localizados en el dominio globular de la hemaglutinina de modo similar a los descritos en la literatura¹⁵⁴. La alta tasa de mutación restringida al dominio HA1 es frecuentemente atribuida a la presión ejercida por la respuesta inmune específica desencadenada en individuos inmunocompetentes. En nuestro caso, cada paso del virus en el tracto respiratorio del ratón implicó cuatro días de replicación del virus, que funcionan exponiendo

repetidamente el sistema inmunológico del animal a la totalidad de los antígenos virales¹⁵⁵. De acuerdo con observaciones anteriores, luego de la inoculación en ratones con un virus H1N1 pandémico de origen humano, incluso sin causar pérdida de peso, pudo replicarse a títulos elevados en los pulmones de los ratones¹⁵⁶. Después de los siete pasajes pulmonares, el virus H1N1 hu/Arg/09ma alcanzó un título ~245 veces mayor en el pulmón del ratón respecto al H1N1 de origen humano, manteniendo una cinética de replicación en cultivo celular similar entre ambos virus. La comparación de las secuencias de la proteína HA de hu/Arg/09 y su variante adaptada al ratón, mostró que las cuatro sustituciones aminoacídicas fueron V152I, I216R, Y306F, A315P. Si bien estas sustituciones contribuyeron a un aumento no significativo de los títulos virales en el cultivo de células MDCK, las mismas contribuyeron a desencadenar la pérdida de peso en ratones infectados por la vía intranasal. La sustitución V152I en un sitio antigénico (Sa) y la sustitución I216R ubicada en la estructura 220-*loop*, se encontrarían en estrecho contacto con el RBS (*Receptor Binding Site*)³³, y serían responsables de la limitada eficacia observada para el tratamiento con G41 en ratones frente a la infección con hu/Arg/09ma. Aunque separados por 69 residuos en la secuencia primaria, las posiciones 152 y 216 se encuentran muy cercanos en la estructura secundaria de la HA monomérica, y son parte del dominio RBS que participa en la unión de la partícula viral al receptor en las células blanco en el tracto respiratorio. En otros sistemas, el cambio de valina por isoleucina se ha visto asociado con cambios tridimensionales críticos en la proteína mutada posiblemente basados en el carbono extra en la isoleucina^{54,157}. Además, la sustitución de isoleucina 216 por arginina implica la incorporación de una cadena lateral básica, y dado el grupo guanidino de la arginina, permite interacciones en tres direcciones posibles, lo que permitiría que la arginina forme un mayor número de interacciones electrostáticas en comparación con la isoleucina¹⁵⁸. Por otro lado, se debe considerar que la arginina en la posición 216 puede ser susceptible de glicosilación, pudiendo enmascarar el reconocimiento de anticuerpos, y aumentando así la aptitud de una variante capaz de escapar de la respuesta inmune de un nuevo huésped¹⁵⁹. Las otras dos sustituciones encontradas, en las posiciones Y306F y A315P se encuentran proximal al dominio de clivaje y el de fusión, respectivamente, por lo que podrían impactar modificando la fusión de la membrana viral al endosoma durante la replicación viral, aunque en el presente trabajo no se evidenció una diferencia significativa en la cinética de replicación *in vitro* realizada en monocapas de cultivo celular. La sustitución de tirosina 306 por fenilalanina constituye una sustitución conservadora entre los aminoácidos básicos. Asimismo, es

importante notar que mediante la sustitución de alanina 315 por prolina, HA1 adquiere un residuo que típicamente se ve asociado a cambios en el plegamiento de proteínas, pudiendo lograr mayor eficiencia en el estado funcional de la proteína, incluyendo la eficacia de interacción entre dominios vecinos de proteínas multidominio¹⁶⁰. A su vez, la sustitución de residuos puede haber seleccionado aquellas partículas virales con mutaciones que ayuden a la evasión de la respuesta inmune específica junto con una unión ventajosa al receptor $\alpha 2,3$ del AS del tracto respiratorio superior del ratón en lugar de $\alpha 2,6$ del AS, presente en el tracto respiratorio superior humano^{36,161}. Sería necesaria una caracterización adicional de la especificidad del receptor de las variantes adaptadas al ratón generadas para abordar las capacidades de unión mejoradas al AS $\alpha 2,3$ y la unión disminuida a los receptores unidos al $\alpha 2,6$.

En particular, el cambio de la eficacia del tratamiento con G41 frente al virus H1N1 hu/Arg/09ma, evidenció el papel crítico de los residuos que sufrieron sustitución en las posiciones 152 y 216 de la hemaglutinina. Si bien es sabido que los ratones no son huéspedes naturales del Virus Influenza, han demostrado ser buenos modelos para el estudio de la patogénesis del virus en mamíferos. Mediante pasajes seriados de macerados de pulmón, obtienen variantes virales que inducen la reducción del peso corporal a medida que replican eficientemente¹⁵⁶. Sería relevante extender el análisis de secuencia a los segmentos genómicos no analizados aún, dado que el fenómeno de adaptación al hospedador suele estar asociado también a mutaciones en otros sectores genoma viral, que pueden estar asociados con el aumento de la capacidad de virulencia y replicación viral¹⁶²⁻¹⁶⁶.

El estudio del epítipo reconocido por E13 en HA1 determinó que el mismo también pertenecería al RBS, ubicado en la HA1. El análisis de la interacción de proteínas propuso la unión del VHH a la HA1, y simultáneamente a su monómero vecino, lo cual podría tener un rol en la estabilización de la unión VHH-HA. Se destaca la acción de este VHH, que confirió protección esterilizante incluso cuando se administró en la dosis más baja probada (1 $\mu\text{g}/\text{animal}$, que corresponde a 0,05 mg/kg) a ratones desafiados con el virus H1N1 hu/Arg/09ma (4 DL_{50}). Estudios de inmunidad pasiva suelen aplicar dosis de 3 a 25 mg/kg de inmunoglobulinas, sin embargo, se debe tener en cuenta que los nanoanticuerpos son 10 veces más pequeños que los anticuerpos convencionales con 15 kDa versus 150 kDa respectivamente. Entre los anticuerpos monoclonales humanos (Ig) de amplio espectro que se encuentran en desarrollo clínico, MEDI8852 fue capaz de transferir inmunidad esterilizante luego del tratamiento (vía intraperitoneal), con una

dosis de 10 mg/kg, mientras que en dosis de 3 mg/kg logró reducir más de 10 veces del título viral sin en el pulmón de los ratones ¹⁶⁷. Si consideramos los registros de tratamientos con nanoanticuerpos, se ha observado neutralización viral en pulmón luego de la administración de nanoanticuerpos monoméricos contra el virus influenza (H5N1) en dosis de 30 µg/dosis animal, equivalente a 1,5 mg/kg, con un aumento de 60 veces la eficacia luego de la dimerización del VHH ⁹⁰. Asimismo, recientemente se ha descrito la acción de nanoanticuerpos trimerizados, y administrados vía endovenosa, con eficacia profiláctica en ratón luego de su administración intranasal en dosis de 1,7 a 5 mg/kg ⁹³. Aunque se observó una reducción significativa de los títulos virales para los VHH específicos de HA, utilizando dosis en el rango de 0,2 mg/kg a 20 mg/kg, aún no se ha informado protección esterilizante para un VHH monomérico con dicha dosis ^{92,93,168}. Por todo lo anterior, se destaca que un único tratamiento intranasal con bajas dosis de E13, otorga inmunidad esterilizante frente a la infección con virus de diferentes clados del subtipo H1N1. El nanoanticuerpo E13 establece su reconocimiento de la HA a través del contacto con 24 aminoácidos distribuidos a lo largo de un epítipo conformacional que abarca más de 100 residuos. Esta distribución de contactos sugeriría que sería poco probable la generación de mutantes de escape, sin embargo, esta hipótesis deberá ser corroborada experimentalmente.

Asimismo, se encontró similar eficacia profiláctica para el E13 expresado en el sistema de recombinante de *P. pastoris* en ratones frente al desafío viral con el virus H1N1 hu/Arg/09, en comparación con el VHH expresado por *E. coli*. Estos resultados demuestran que la eficacia profiláctica de E13 expresado en el sistema habitualmente utilizado en la industria, se mantiene inalterada lo que constituye un primer paso que lo acerca a la traslación a la clínica ¹⁶⁹.

En estudios preliminares que deben ser repetidos para reforzar la significancia de los resultados, se observó la concentración significativa en pulmón de la respuesta inmune de plasmocitos específicos contra el virus H1N1, en todos los individuos desafiados y de modo independiente del tratamiento. Sin embargo, para los animales tratados tanto con G41, E13 o con suero α -H1N1, se observó la tendencia de una modulación negativa de la respuesta de plasmocitos diferenciados. De modo muy relevante, nuestros estudios preliminares mostraron la inocuidad del tratamiento ya que no se detectó respuesta específica contra los VHHs. Sería necesario repetir estos ensayos para confirmar estas hipótesis.

Dado que H3N2 circula de modo estacional en la población humana y animal a nivel global, disponer de VHHs específicos contra el virus H3N2 hu/Perth/09 resulta crítico para el control de la de circulación. A partir de la misma biblioteca de genes, se procedió a realizar el aislamiento y la caracterización de nanoanticuerpos específicos contra el Virus Influenza tipo A H3N2 hu/Perth/09. Se obtuvieron 4 grupos de nanoanticuerpos, que en el futuro serán subclonados para su expresión y posterior caracterización funcional. Según lo evaluado en el alineamiento de las secuencias de los clones obtenidos, todos poseen las dos cisteínas (C), una en FR1 y otra en FR3, que forman el puente disulfuro canónico de los VHH. Por otro lado, también se observa la presencia de sustituciones características que los diferencian de los VHs convencionales, permitiendo confirmar su identidad ⁷⁹. En los VHs dentro del FR2 se observan aminoácidos altamente hidrofóbicos (V47, G49, L50, W52) que son sustituidos normalmente en los VHHs por residuos más pequeños y/o hidrofílicos (en general F42, E49, R50, G52), lo que les confiere la hidrosolubilidad característica que transforma a los VHHs en grandes herramientas biotecnológicas ⁷⁸⁻⁸⁰. Según lo expuesto en la bibliografía, las secuencias de los aminoácidos de los VHHs pueden analizarse y clasificarse en familias según la diversidad del CDR3, donde una familia de nanoanticuerpos está compuesta por aquellos VHHs que comparten una alta similitud en el CDR3, con una longitud idéntica y más de un 80% de identidad. Una familia de VHHs deriva de un mismo linaje de células B y por ende se unen al mismo epítipo del antígeno ¹⁷⁰. En el presente trabajo se detectaron VHHs cuyos CDR3 variaron entre 14-19 aminoácidos, y que en función de la variabilidad de secuencia pueden clasificarse en 4 grupos, la diversidad entre los mismos se centra en el CDR3, tanto en variabilidad de residuos como en longitud, como así también en el CDR1 y CDR2. El grupo 1, consiste de clon único, con un CDR3 de 19 aminoácidos, y presenta un puente disulfuro extra, en el 90 % de los casos este enlace extra suele presentarse entre los *loops* del CDR1 y el CDR3, pero en el 10 % restante, como en este caso, se presenta entre el FR2 y el CDR3. Según otros autores, el mismo podría conferir mayor rigidez al *loop* del CDR3 y generar mayor estabilidad y rigidez en la ausencia del antígeno ⁸⁰, como así también mayor estabilidad y menor pérdida de entropía en presencia y unión al antígeno ¹⁷¹. El cuarto grupo presenta mayor diversidad, con cambios tanto en los CDR como en los FR. Estos cambios de entre 1 a 2 residuos en cada región del VHH pueden afectar la afinidad por el antígeno, como así también su estabilidad y su solubilidad, como fue descrito anteriormente. Por ello, se propone la selección de al menos 8 clones según las propiedades mencionadas para la continuación del estudio.

Surge la utilización del cobayo como modelo accesible y confiable para el estudio de la infección, transmisión y evaluación de la serología por infección del virus Influenza ^{118,119,172} y frente a la dificultad de adaptar al ratón cepas del tipo H3N2 reportada por otros autores ¹⁷³. La literatura registra la utilización del mismo tanto para virus del subtipo H1 ^{174,175}, como del subtipo H3 ^{122,176}.

En cuanto a los modelos de infección en animales con el virus Influenza, estos suelen incluir ratones, hurones, cobayos, cerdos, gatos y perros ¹¹⁵. Entre ellos, uno de los más difundidos es el modelo murino, dada la disponibilidad de animales, su relativo bajo costo, la posibilidad de trabajar con variedad de antecedentes genéticos y sus posibles defectos, como así también la disponibilidad general de reactivos ¹⁷⁷. Sin embargo, como se ha mencionado, presenta la limitación de la necesidad de adaptar las cepas al hospedador, mediante un largo proceso de pasajes seriados, con el riesgo asociado de la pérdida de epítopes específicos, como hemos evidenciado. La secuenciación de la variante hu/Arg/09 adaptada al ratón, evidenció 4 sustituciones aminoacídicas que confirmarían esta hipótesis ^{115,156,178}. Asimismo, el hecho de que dos de las posiciones participan del epítipo reconocido por G41 a la HA, constituye un ejemplo de las dificultades que el uso del modelo ratón representa para la selección de terapéuticos para su posterior estudio e implementación en humanos. A su vez, dicho modelo no reproduce la infección por contagio característica en humanos. Entre las cualidades que se evalúan en el modelo animal, se encuentra la distribución del ácido siálico (AS) en la mucosa respiratoria del hospedador, ligando de la hemaglutinina viral. En el tracto superior de las vías respiratorias humanas predomina el AS $\alpha 2,6$, mientras que en la zona alveolar o de unión de bronquiolos-alveolos (tracto respiratorio inferior) aunque también el ojo humano, se distingue el $\alpha 2,3$ ³⁸. Las cepas de influenza adaptadas a humanos suelen tener preferencia por el $\alpha 2,6$ y las aviares por el $\alpha 2,3$, de esta manera se explica la dificultad encontrada por los virus de origen aviar para infectar a los seres humanos, a la vez que exhiben una alta patogenicidad debido a la falta de inmunidad preexistente en el nuevo hospedador ^{36,50,114}. Para el análisis de la transmisión entre individuos, se suele utilizar el hurón, por su similitud en cuanto a estructura del tracto respiratorio y distribución de tipos de AS, lo que permite además observar manifestaciones clínicas similares al humano, como fiebre, congestión y descarga nasal, anorexia y aletargamiento. Este modelo se destaca porque no requiere la adaptación de la cepa viral para lograr infección efectiva en los animales ¹¹⁷. Sin embargo, el trabajo con hurones acarrea diversas dificultades, por lo

que emerge el modelo cobayo como alternativa para el estudio de la transmisión viral en mamíferos. El mismo, presenta la ventaja de que la distribución de AS en el tracto respiratorio es similar al del humano, por lo que aislamientos humanos son infectivos sin mediar el proceso de adaptación^{39,50,115,116,118}. En este animal la infección a nivel del tracto respiratorio superior, permite la evaluación del curso de la infección de los animales a través de la recolección de muestras nasales (lavados nasales) sin necesidad de sacrificar el animal, por lo que se pueden realizar sucesivos muestreos. En el presente trabajo, se logró reproducir el modelo de infección por contagio luego de la co-habitación de animales infectados vía intranasal con el virus H1N1 hu/Arg/09^{120,122,172}. Al igual que fuera descrito en la bibliografía, los animales no presentaron descenso de peso a lo largo de la experiencia. Nuestros resultados muestran la infección exitosa del 83 % de los animales que recibieron inoculación directa vía intranasal del virus H1N1 (10 DICT₅₀/ml), mientras la infección fue efectiva en el 100 % de los animales para los inoculados con 100 y 1000 DICT₅₀/ml, con un título promedio máximo detectado 3 días post-infección. Los animales no inoculados y expuestos contacto con los animales inoculados con 100 y 1000 DICT₅₀/ml, alcanzaron títulos comparables con sus pares inoculados, con el pico de título viral detectado día 5 y 7, respectivamente. El grupo centinela, colocado a una distancia de 3 metros no recibió desafío viral y no presentó títulos virales detectables a lo largo de la experiencia sugiriendo que la distancia fue suficiente para evitar la dispersión aérea de microgotas conteniendo virus provenientes de los animales infectados.

Con el objeto de ajustar las condiciones de transmisión para su aplicación en el análisis de la eficacia del tratamiento con nanoanticuerpos, se modificó la relación de individuos inoculados y contacto (2:4) dispuestos en la misma jaula, así como también se modificó el tamaño de las jaulas, de modo que permitiera el estudio del rol de los VHHs E13 y G41 en el bloqueo de la transmisión de la infección por contacto. Los animales que se mantuvieron en contacto directo con animales desafiados con el virus, no presentaron niveles detectables de virus, a excepción de un animal en el dpi 11. Sin embargo, el análisis de los títulos de anticuerpos contra el virus H1N1 hu/Arg/09 en suero de los animales arrojó seroconversión en los 6 animales analizados, a 11 dpi (100% de los animales), incluyendo a los animales contacto. De esta manera, la medición de anticuerpos como una lectura marcadora de circulación viral resultó una herramienta gran utilidad para el modelo¹¹⁹. Por ello, se propone las condiciones óptimas para próximos

estudios, utilizando las dosis de infección de 1000 DICT₅₀/ml, en jaula de 0,6 x 0,6 m y con la proporción 2:4.

Por lo expuesto hasta aquí, la transferencia de inmunidad esterilizante pan-H1, por medio de dosis del orden de 50 microgramos por kilo por administración intranasal, no se ha demostrado en la literatura para un VHH monomérico y apoya firmemente el desarrollo adicional de E13 como un agente inmunoterapéutico para su aplicación en la clínica médica.

Los nanoanticuerpos específicos contra el virus H1N1 hu/Arg/09, junto a los nanoanticuerpos específicos contra el virus H3N2 hu/Perth/09, constituyen potenciales herramientas para su implementación en el tratamiento y/o el diagnóstico de virus Influenza de Tipo A de ambos grupos filogenéticos 1 y 2, circulantes a nivel global, y con impacto tanto en la salud humana como en animales de interés en la producción ⁵⁰

Por otro lado, el modelo cobayo, que no requiere adaptación previa de los virus Influenza de origen humano, facilitaría la evaluación de la eficacia terapéutica como profilácticas de los nanoanticuerpos presentados frente a la infección del Virus Influenza. Asimismo, facilitaría el estudio del bloqueo de la transmisión viral por contacto, ya sea de los subtipos H1 como H3, tanto de origen humano como de origen animal ^{118,179}.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los nanoanticuerpos B33 y D81, presentan amplia capacidad de reconocimiento hererosubtípica, reconociendo epítopes lineales, B33 en HA2 y D81 en HA1. Los mismos se presentan como candidatos para la utilización como herramientas diagnósticas.

El nanoanticuerpo G41 reconoce los subtipos H1, con alta capacidad de neutralización de H1N1 pandémico del año 2009 (hu/Arg/09), modulando de manera positiva la respuesta frente a la infección viral con dicha cepa en el modelo ratón.

El nanoanticuerpo E13 con capacidad neutralizante pan-H1, aún en dosis de 0,05 mg/Kg, otorga inmunidad esterilizante. Estas características no reportadas hasta el momento para VHHs monoméricos, posicionan a E13 como una potencial herramienta profiláctica para la biomedicina, ya que además mantuvo su capacidad protectora cuando se lo expresó en el sistema de *P. pastoris*, ampliamente utilizado en la industria.

Se obtuvieron 8 nanoanticuerpos específicos contra el virus H3N2 que podrían resultar de gran utilidad dado su carácter de circulación estacional global en la población humana, como así también por potencial impacto en animales de interés en la producción. Junto con los nanoanticuerpos específicos contra el virus H1N1, se mejoraría la disponibilidad de herramientas para el diagnóstico y tratamiento del virus Influenza de ambos grupos filogenéticos.

El modelo cobayo de infección con virus influenza H1N1 en la dosis 1000 DICT₅₀ de inoculación, resultó ser efectivo para la transmisión por contacto y facilitaría la evaluación de las capacidades protectoras de los nanoanticuerpos presentados, tanto terapéuticas como profilácticas frente a la infección viral, como así también la posibilidad de evaluar el bloqueo de la transmisión viral por contacto, ya sea de los subtipos H1 como H3, tanto de origen humano como de origen animal.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. *International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV* (2022) doi:<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
2. Asha, K. & Kumar, B. Emerging influenza D virus threat: What we know so far! *Journal of Clinical Medicine* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jcm8020192> (2019).
3. Wolff, T. & Veit, M. Influenza B, C and D Viruses (Orthomyxoviridae). in *Encyclopedia of Virology* 561–574 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.21505-7.
4. Kilbourne, D. E. Taxonomy and Comparative Virology of the Influenza Viruses. in *Influenza* (ed. Kilbourne Edwin D) 25–32 (Springer New York, NY, 1987). doi:<https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5239-6>.
5. *Fields Virology, 6th Ed PDF*. vol. 1 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
6. Meseko, C., Kumar, B. & Sanicas, M. Preventing Zoonotic Influenza. in *Influenza - Therapeutics and Challenges* 33–55 (InTech, 2018). doi:10.5772/intechopen.76966.
7. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases* vol. 12 15–22 Preprint at <https://doi.org/10.3201/eid1209.05-0979> (2006).
8. Khanna, M., Saxena, L., Gupta, A., Kumar, B. & Rajput, R. Influenza pandemics of 1918 and 2009: A comparative account. *Future Virology* **8**, 335–342 (2013).
9. Kumar, B. *et al.* The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control. *Archives of Virology* **163**, 831–844 (2018).
10. Francis, T. A New Type of Virus from Epidemic Influenza. *Source: Science, New Series* **92**, 405–408 (1940).
11. Osterhaus, A. D. M. E., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E. E., Bestebroer, T. M. & Fouchier, R. A. M. Influenza B virus in seals. *Science* (1979) **288**, 1051–1053 (2000).
12. Kawano, J., Kida, H. & Yanagawa, R. Article in The Japanese journal of veterinary research. *Japanese Journal of Veterinary Research* **26**, 74–80 (1978).
13. Chang, C. P., New, A. E., Taylor, J. F. & Chiang, H. S. Influenza virus isolations from dogs during a human epidemic in Taiwan. *Int J Zoonoses* **3**, 61–4 (1976).
14. Ran, Z. *et al.* Domestic Pigs Are Susceptible to Infection with Influenza B Viruses. *Journal of Virology* **89**, 4818–4826 (2015).
15. Taylor, R. M. Studies on Survival of Influenza Virus Between Epidemics and Antigenic Variants of the Virus. *American Journal of Public Health and the Nations Health* **39**, 171–178 (1949).
16. Homma, M., Ohyama, S. & Katagiri, S. Age Distribution of the Antibody to Type C Influenza Virus. *Microbiology and Immunology* **26**, 639–642 (1982).
17. Ohwada, K. *et al.* Distribution of the Antibody to Influenza C Virus in Dogs and Pigs in Yamagata Prefecture, Japan. *Microbiology and Immunology* **31**, 1173–1180 (1987).

18. Salem, E. *et al.* Serologic evidence for influenza c and d virus among ruminants and Camelids, Africa, 1991-2015. *Emerging Infectious Diseases* **23**, 1556–1559 (2017).
19. Hause, B. M. *et al.* Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: Proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBio* **5**, (2014).
20. Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F. & Veit, M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence* vol. 8 1580–1591 Preprint at <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1365216> (2017).
21. <https://app.biorender.com/>. (2022).
22. Fujiyoshi, Y., Kume, N. P., Sakata, K. & Sato, S. B. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO Journal* **13**, 318–326 (1994).
23. Harris, A. *et al.* Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607614103 (2006).
24. Wasilewski, S., Calder, L. J., Grant, T. & Rosenthal, P. B. Distribution of surface glycoproteins on influenza A virus determined by electron cryotomography. *Vaccine* **30**, 7368–7373 (2012).
25. Zhang, J., Pekosz, A. & Lamb, R. A. *Influenza Virus Assembly and Lipid Raft Microdomains: a Role for the Cytoplasmic Tails of the Spike Glycoproteins*. *JOURNAL OF VIROLOGY* vol. 74 (2000).
26. Schroeder, C., Heider, H., Möncke-Buchner, E. & Lin, T.-I. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *European Biophysics Journal* **34**, 52–66 (2005).
27. Wu, Y. & Voth, G. A. Computational studies of proton transport through the M2 channel. *FEBS Letters* **552**, 23–27 (2003).
28. Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H. & Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* vol. 143 147–161 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010> (2009).
29. Ghedin, E. *et al.* Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* **437**, 1162–1166 (2005).
30. Wise, H. M. *et al.* A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA. *Journal of Virology* **83**, 8021–8031 (2009).
31. Childs, R. A. *et al.* Receptor-binding specificity of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray. *Nature Biotechnology* vol. 27 797–799 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nbt0909-797> (2009).
32. Pinto, L. H. & Lamb, R. A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *Journal of Biological Chemistry* vol. 281 8997–9000 Preprint at <https://doi.org/10.1074/jbc.R500020200> (2006).
33. Sriwilaijaroen, N. & Suzuki, Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences* **88**, 226–249 (2012).

34. Loregian, A., Mercorelli, B., Nannetti, G., Compagnin, C. & Palù, G. Antiviral strategies against influenza virus: Towards new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 71 3659–3683 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1615-2> (2014).
35. WHO, OIE & FAO. <https://www.who.int/news/item/01-12-2021-tripartite-and-uneep-support-ohhleps-definition-of-one-health>. (2021).
36. Wasik, B. R. *et al.* Distribution of O-Acetylated Sialic Acids among Target Host Tissues for Influenza Virus. *mSphere* **2**, (2017).
37. Richard, M., de Graaf, M. & Herfst, S. Avian influenza A viruses: From zoonosis to pandemic. *Future Virology* vol. 9 513–524 Preprint at <https://doi.org/10.2217/fvl.14.30> (2014).
38. Kumlin, U., Olofsson, S., Dimock, K. & Arnberg, N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza and other Respiratory Viruses* vol. 2 147–154 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00051.x> (2008).
39. Belser, J. A., Szretter, K. J., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. Chapter 2 Use of Animal Models to Understand the Pandemic Potential of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *Advances in Virus Research* vol. 73 55–97 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)73002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)73002-7) (2009).
40. Weis, W. *et al.* Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**, 426–431 (1988).
41. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26**, (2008).
42. Wiley, D. C., Wilson, I. A. & Skehel, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* **289**, 373–378 (1981).
43. Underwood, P. A. Mapping of Antigenic Changes in the Haemagglutinin of Hong Kong Influenza (H3N2) Strains using a Large Panel of Monoclonal Antibodies. *Journal of General Virology* **62**, 153–169 (1982).
44. Iba, Y. *et al.* Conserved Neutralizing Epitope at Globular Head of Hemagglutinin in H3N2 Influenza Viruses. *Journal of Virology* **88**, 7130–7144 (2014).
45. Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y. & Gao, G. F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology* vol. 22 183–191 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.010> (2014).
46. Petrova, V. N. & Russell, C. A. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nature Reviews Microbiology* vol. 16 47–60 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118> (2018).
47. Yang, W., Schountz, T. & Ma, W. Bat influenza viruses: Current status and perspective. *Viruses* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/v13040547> (2021).
48. Tong, S. *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4269–4274 (2012).

49. Su, S. *et al.* Epidemiology, Evolution, and Recent Outbreaks of Avian Influenza Virus in China. *Journal of Virology* **89**, 8671–8676 (2015).
50. Long, J. S., Mistry, B., Haslam, S. M. & Barclay, W. S. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology* vol. 17 67–81 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0115-z> (2019).
51. Fouchier, R. A. M. & Guan, Y. Ecology and evolution of influenza viruses in wild and domestic birds. in *Textbook of Influenza* 173–189 (John Wiley & Sons, Ltd, 2013). doi:10.1002/9781118636817.ch11.
52. Cauldwell, A. v., Long, J. S., Moncorgé, O. & Barclay, W. S. Viral determinants of influenza A virus host range. *Journal of General Virology* vol. 95 1193–1210 Preprint at <https://doi.org/10.1099/vir.0.062836-0> (2014).
53. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. The pathology of influenza virus infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* vol. 3 499–522 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316> (2008).
54. Liu, S. T. H. *et al.* Antigenic sites in influenza H1 hemagglutinin display species-specific immunodominance. *Journal of Clinical Investigation* **128**, 4992–4996 (2018).
55. Beigel, J. H. *et al.* Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. *New England Journal of Medicine* **353**, 1374–1385 (2005).
56. Kilbourne, E. D. Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 9–14 (2006).
57. Bedford, T. *et al.* Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *Elife* **2014**, (2014).
58. Baumeister, E., Pontoriero, A. & Czech, A. *Boletín Integral Vigilancia*. <http://iah.salud.gob.ar/doc/510.pdf> (2019).
59. Retamal, M., Abed, Y., Rhéaume, C., Baz, M. & Boivin, G. In vitro and in vivo evidence of a potential A(H1N1)pdm09 antigenic drift mediated by escape mutations in the haemagglutinin Sa antigenic site. *Journal of General Virology* **98**, 1224–1231 (2017).
60. Hanke, L. *et al.* The antiviral mechanism of an influenza a virus nucleoprotein-specific single-domain antibody fragment. *mBio* **7**, (2016).
61. Soema, P. C., Kompier, R., Amorij, J.-P. & Kersten, G. F. A. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **94**, 251–263 (2015).
62. Beigel, J. & Bray, M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Research* **78**, 91–102 (2008).
63. Hayden, F. G. Antiviral Resistance in Influenza Viruses — Implications for Management and Pandemic Response. *New England Journal of Medicine* **354**, 785–788 (2006).
64. Zylberman, V. *et al.* Development of a hyperimmune equine serum therapy for COVID-19 in Argentina. *Buenos Aires* **80**, 1–6 (2020).

65. Maffey, L., Vega, C. G., Miño, S., Garaicoechea, L. & Parreño, V. Anti-VP6 VHH: An Experimental Treatment for Rotavirus A-Associated Disease. *PLOS ONE* **11**, e0162351 (2016).
66. Garaicoechea, L. *et al.* Llama Nanoantibodies with Therapeutic Potential against Human Norovirus Diarrhea. *PLOS ONE* **10**, e0133665 (2015).
67. Detalle, L. *et al.* Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**, 6–13 (2016).
68. Wrapp, D. *et al.* Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies. *Cell* **181**, 1004-1015.e15 (2020).
69. Jang, Y. H. & Seong, B. L. The Quest for a Truly Universal Influenza Vaccine. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **9**, (2019).
70. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, (2010).
71. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446–448 (1993).
72. Blanc, M. R. *et al.* A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type γ -globulins from camelid sera. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **54**, 207–212 (2009).
73. Nguyen, V., Su, C., Muyldermans, S. & van der Loo, W. Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics* **54**, 39–47 (2002).
74. Desmyter, A. *et al.* Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nature Structural & Molecular Biology* **3**, 803–811 (1996).
75. Vanlandschoot, P. *et al.* Nanobodies⁻: New ammunition to battle viruses. *Antiviral Research* vol. 92 389–407 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.09.002> (2011).
76. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
77. Steeland, S., Vandenbroucke, R. E. & Libert, C. Nanobodies as therapeutics: Big opportunities for small antibodies. *Drug Discovery Today* vol. 21 1076–1113 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.003> (2016).
78. Wesolowski, J. *et al.* Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology* vol. 198 157–174 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0116-7> (2009).
79. Muyldermans, S. *et al.* Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **128**, 178–183 (2009).
80. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annual Review of Biochemistry* vol. 82 775–797 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449> (2013).

81. Dumoulin, M. *et al.* Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science* **11**, 500–515 (2009).
82. Hussack, G., Hiram, T., Ding, W., MacKenzie, R. & Tanha, J. Engineered Single-Domain Antibodies with High Protease Resistance and Thermal Stability. *PLoS ONE* **6**, e28218 (2011).
83. van Bockstaele, F., Holz, J. B. & Revets, H. *The development of nanobodies for therapeutic applications. Current opinion in investigational drugs* vol. 10 (2000).
84. Vincke, C. *et al.* General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 3273–3284 (2009).
85. Ackaert, C. *et al.* Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies. *Frontiers in Immunology* **12**, (2021).
86. Huang, L., Muyldermans, S. & Saerens, D. Nanobodies®: Proficient tools in diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics* vol. 10 777–785 Preprint at <https://doi.org/10.1586/erm.10.62> (2010).
87. Llauger, G. *et al.* Development of Nanobodies against Mal de Río Cuarto virus major viroplasm protein P9-1 for diagnostic sandwich ELISA and immunodetection. *Scientific Reports* **11**, 20013 (2021).
88. Vega, C. G. *et al.* ROTADIAL: The first nanobody-based immunoassay to detect Group A Rotavirus. *Journal of Virological Methods* **298**, 114279 (2021).
89. Hultberg, A. *et al.* Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. *PLoS ONE* **6**, (2011).
90. Ibañez, L. I. *et al.* Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. *Journal of Infectious Diseases* **203**, 1063–1072 (2011).
91. Tillib, S. v. *et al.* Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2). *Antiviral Research* **97**, 245–254 (2013).
92. Hufton, S. E. *et al.* The breadth of cross sub-type neutralisation activity of a single domain antibody to influenza hemagglutinin can be increased by antibody valency. *PLoS ONE* **9**, (2014).
93. Laursen, N. S. *et al.* Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science (1979)* **362**, 598–602 (2018).
94. Voronina, D. v. *et al.* Development of Neutralizing Nanobodies to the Hemagglutinin Stem Domain of Influenza A Viruses. *Acta Naturae* **13**, 33–41 (2021).
95. Wei, G. *et al.* Potent neutralization of influenza a virus by a single-domain antibody blocking M2 ion channel protein. *PLoS ONE* **6**, (2011).
96. Harmsen, M. *et al.* Isolation of Panels of Llama Single-Domain Antibody Fragments Binding All Nine Neuraminidase Subtypes of Influenza A Virus. *Antibodies* **2**, 168–192 (2013).

97. Ashour, J. *et al.* Intracellular Expression of Camelid Single-Domain Antibodies Specific for Influenza Virus Nucleoprotein Uncovers Distinct Features of Its Nuclear Localization. *Journal of Virology* **89**, 2792–2800 (2015).
98. Cardoso, F. M. *et al.* Single-Domain Antibodies Targeting Neuraminidase Protect against an H5N1 Influenza Virus Challenge. *Journal of Virology* **88**, 8278–8296 (2014).
99. Andrews, S. F. *et al.* Immune history profoundly affects broadly protective B cell responses to influenza. *Science Translational Medicine* **7**, (2015).
100. Baccam, P., Beauchemin, C., Macken, C. A., Hayden, F. G. & Perelson, A. S. Kinetics of Influenza A Virus Infection in Humans. *Journal of Virology* **80**, 7590–7599 (2006).
101. Ochsenbein, A. F. *et al.* Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 13263–13268 (2000).
102. Renegar, K. B., Small, P. A., Boykins, L. G. & Wright, P. F. Role of IgA versus IgG in the Control of Influenza Viral Infection in the Murine Respiratory Tract. *The Journal of Immunology* **173**, 1978–1986 (2004).
103. Reynolds, H. Y. Immunoglobulin G and Its Function in the Human Respiratory Tract. *Mayo Clinic Proceedings* **63**, 161–174 (1988).
104. Spiekermann, G. M. *et al.* Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: Functional expression of FcRn in the mammalian lung. *Journal of Experimental Medicine* **196**, 303–310 (2002).
105. Pakkanen, S. H. *et al.* Expression of homing receptors on IgA1 and IgA2 plasmablasts in blood reflects differential distribution of IgA1 and IgA2 in various body fluids. *Clinical and Vaccine Immunology* **17**, 393–401 (2010).
106. Suzuki, T. *et al.* Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 7809–7814 (2015).
107. Nachbagauer, R. *et al.* Age Dependence and Isotype Specificity of Influenza Virus Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies in Humans. *mBio* **7**, (2016).
108. El-Madhun, A. S., Cox, R. J. & Haaheim, L. R. The Effect of Age and Natural Priming on the IgG and IgA Subclass Responses after Parenteral Influenza Vaccination. *The Journal of Infectious Diseases* **180**, 1356–1360 (1999).
109. Manenti, A. *et al.* Comparative analysis of influenza A(H3N2) virus hemagglutinin specific IgG subclass and IgA responses in children and adults after influenza vaccination. *Vaccine* **35**, 191–198 (2017).
110. Frasca, D. *et al.* Effects of age on H1N1-specific serum IgG1 and IgG3 levels evaluated during the 2011-2012 influenza vaccine season. <http://www.immunityageing.com/content/10/1/14> (2013).
111. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology* **5**, (2014).

112. Ellebedy, A. H. *et al.* Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. *Nature Immunology* **17**, 1226–1234 (2016).
113. Maurer, M. A. *et al.* Glycosylation of Human IgA Directly Inhibits Influenza A and Other Sialic-Acid-Binding Viruses. *Cell Reports* **23**, 90–99 (2018).
114. Shinya, K. *et al.* Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* **440**, 435–436 (2006).
115. Radigan, K. A., Misharin, A. v., Chi, M. & Budinger, G. R. S. Modeling human influenza infection in the laboratory. *Infection and Drug Resistance* vol. 8 311–320 Preprint at <https://doi.org/10.2147/IDR.S58551> (2015).
116. Thangavel, R. R. & Bouvier, N. M. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *Journal of Immunological Methods* vol. 410 60–79 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.03.023> (2014).
117. Belser, J. A., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. The ferret as a model organism to study influenza A virus infection. *DMM Disease Models and Mechanisms* vol. 4 575–579 Preprint at <https://doi.org/10.1242/dmm.007823> (2011).
118. Sun, Y. *et al.* Guinea pig model for evaluating the potential public health risk of swine and avian influenza viruses. *PLoS ONE* **5**, (2010).
119. Bushnell, R. v *et al.* *Serological characterization of guinea pigs infected with H3N2 human influenza or immunized with hemagglutinin protein.* <http://www.virologyj.com/content/7/1/200> (2010).
120. Lowen, A. C., Mubareka, S., Tumpey, T. M., García-Sastre, A. & Palese, P. *The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0604157103 (2006).
121. Pica, N., Chou, Y.-Y., Bouvier, N. M. & Palese, P. Transmission of Influenza B Viruses in the Guinea Pig. *Journal of Virology* **86**, 4279–4287 (2012).
122. Lowen, A. C. *et al.* Blocking interhost transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model. *J Virol* (2009) doi:10.1128/JVI.02424-08.
123. Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L. & Gerds, V. The pig: A model for human infectious diseases. *Trends in Microbiology* vol. 20 50–57 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.002> (2012).
124. de los Rios, M., Criscitiello, M. F. & Smider, V. v. Structural and genetic diversity in antibody repertoires from diverse species. *Current Opinion in Structural Biology* **33**, 27–41 (2015).
125. Maisonnasse, P. *et al.* The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. *Mucosal Immunology* **9**, 835–849 (2016).
126. Holzer, B., Martini, V., Edmans, M. & Tchilian, E. T and B Cell Immune Responses to influenza viruses in pigs. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).

127. Holzer, B. *et al.* Protective porcine influenza virus-specific monoclonal antibodies recognize similar haemagglutinin epitopes as humans. *PLoS Pathogens* **17**, (2021).
128. Sunwoo, S. Y. *et al.* A universal influenza virus vaccine candidate tested in a pig vaccination-infection model in the presence of maternal antibodies. *Vaccines (Basel)* **6**, (2018).
129. World Health Organization. *Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza WHO Global Influenza Surveillance Network*. (World Health Organization, 2011).
130. Cappuccio, J. A. *et al.* Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. *Journal of General Virology* **92**, 2871–2878 (2011).
131. Perglione, C. O. *et al.* Epidemiological and virological findings during multiple outbreaks of equine influenza in South America in 2012. *Influenza and Other Respiratory Viruses* **10**, 37–46 (2016).
132. Alvarez, P. *et al.* First isolation of an H1N1 avian influenza virus from wild terrestrial non-migratory birds in Argentina. *Virology* **396**, 76–84 (2010).
133. Barbieri, E. *et al.* Natural infection by H1-like influenza A virus in South American Camelids from Argentina: Serological evidences. *Journal of Veterinary Healthcare* **1**, 21–38 (2017).
134. Burke, D. F. & Smith, D. J. A Recommended Numbering Scheme for Influenza A HA Subtypes. *PLoS ONE* **9**, e112302 (2014).
135. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera. A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1605–1612 (2004).
136. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* **46**, W296–W303 (2018).
137. Lefranc, M. P. *et al.* IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®. *Nucleic Acids Research* **33**, (2005).
138. www.imgt.org. <https://www.imgt.org/> (2022).
139. Desta, I. T., Porter, K. A., Xia, B., Kozakov, D. & Vajda, S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure* **28**, 1071-1081.e3 (2020).
140. www.cluspro.bu.edu. (2022).
141. Reed, L. J. & Muench, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *American Journal of Epidemiology* **27**, 493–497 (1938).
142. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. (2022).
143. Baztarrica, J. Nanoanticuerpos VHH contra el virus de influenza A H1N1 2009 pandémico con potencial aplicación profiláctica. (INCUINTA; Instituto de Virología; INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), 2017).

144. Mackenzie, J. S. Responding to emerging diseases: reducing the risks through understanding of emergence. *Western Pacific Surveillance and Response Journal* **2**, e1–e1 (2011).
145. Sedeyn, K. & Saelens, X. New antibody-based prevention and treatment options for influenza. *Antiviral Research* **170**, 104562 (2019).
146. Baztarrica, J. *et al.* Caracterización de nanoanticuerpos contra la proteína HA del Virus de Influenza H1N1 - Modalidad Póster. (2015).
147. Bullard, B. L. & Weaver, E. A. Strategies Targeting Hemagglutinin as a Universal Influenza Vaccine. *Vaccines (Basel)* **9**, 257 (2021).
148. Zheng, Z., Lu, Y., Short, K. R. & Lu, J. One health insights to prevent the next HxNy viral outbreak: learning from the epidemiology of H7N9. *BMC Infectious Diseases* **19**, 138 (2019).
149. Mackenzie, J. S., McKinnon, M. & Jeggo, M. One Health: From Concept to Practice. in *Confronting Emerging Zoonoses* 163–189 (Springer Japan, 2014). doi:10.1007/978-4-431-55120-1_8.
150. Terrier, O. *et al.* Influenza viruses and coronaviruses: Knowns, unknowns, and common research challenges. *PLoS Pathogens* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010106> (2021).
151. Corti, D. *et al.* Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 1663–1673 (2010).
152. Choi, A. *et al.* Non-sterilizing, Infection-Permissive Vaccination With Inactivated Influenza Virus Vaccine Reshapes Subsequent Virus Infection-Induced Protective Heterosubtypic Immunity From Cellular to Humoral Cross-Reactive Immune Responses. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).
153. Johansson, B. E., Grajower, B. & Kilbourne, E. D. *Infection-permissive immunization with influenza virus neuraminidase prevents weight loss in infected mice.* (1993).
154. Kirkpatrick, E., Qiu, X., Wilson, P. C., Bahl, J. & Krammer, F. The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain. *Scientific Reports* **8**, (2018).
155. Brown, L. E., Murray, J. M., White, D. O. & Jackson, D. C. *Virology An analysis of the properties of monoclonal antibodies directed to epitopes on influenza virus hemagglutinin.* *Arch Virol* vol. 114 (1990).
156. Ilyushina, N. A. *et al.* Adaptation of Pandemic H1N1 Influenza Viruses in Mice. *Journal of Virology* **84**, 8607–8616 (2010).
157. Behmard, E., Abdolmaleki, P. & Asadabadi, E. B. Mutation in a valine residue induces drastic changes in 3D structure of human prion protein. *Frontiers in Life Science* **6**, 47–51 (2012).
158. Sokalingam, S., Raghunathan, G., Soundrarajan, N. & Lee, S.-G. A Study on the Effect of Surface Lysine to Arginine Mutagenesis on Protein Stability and Structure Using Green Fluorescent Protein. *PLoS ONE* **7**, e40410 (2012).

159. Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y. & Webster, R. The Surface Glycoproteins of H5 Influenza Viruses Isolated from Humans, Chickens, and Wild Aquatic Birds Have Distinguishable Properties. *Journal of Virology* **73**, 1146–1155 (1999).
160. Borgia, A. *et al.* Transient misfolding dominates multidomain protein folding. *Nature Communications* **6**, 8861 (2015).
161. Ovsyannikova, I. G., White, S. J., Albrecht, R. A., García-Sastre, A. & Poland, G. A. Turkey versus guinea pig red blood cells: Hemagglutination differences alter hemagglutination inhibition responses against influenza A/H1N1. *Viral Immunology* **27**, 174–178 (2014).
162. Gitelman, A. K., Kaverin, N. V., Kharitononkov, I. G., Rudneva, I. A. & Zhdanov, V. M. Changes in the antigenic specificity of influenza hemagglutinin in the course of adaptation to mice. *Virology* **134**, 230–232 (1984).
163. Kaverin, N. v. *et al.* Studies on the genetic basis of human influenza A virus adaptation to mice: degrees of virulence of reassortants with defined genetic content. *Archives of Virology* **105**, 29–37 (1989).
164. Hartley, C. A., Reading, P. C., Ward, A. C. & Anders, E. M. Changes in the hemagglutinin molecule of influenza type A (H3N2) virus associated with increased virulence for mice. *Archives of Virology* **142**, 75–88 (1997).
165. Smeenk, C. A. & Brown, E. G. The influenza virus variant A/FM/1/47-MA possesses single amino acid replacements in the hemagglutinin, controlling virulence, and in the matrix protein, controlling virulence as well as growth. *Journal of Virology* **68**, 530–534 (1994).
166. Kamal, R. P., Katz, J. M. & York, I. A. Molecular Determinants of Influenza Virus Pathogenesis in Mice. in 243–274 (2014). doi:10.1007/82_2014_388.
167. Kallewaard, N. L. *et al.* Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell* **166**, 596–608 (2016).
168. Branderburg, B., Vogels, R., Kolkman, J. & RHE, F. Binding molecules directed against influenza hemagglutinin and uses thereof. 1–140 (2018).
169. Crowell, L. E. *et al.* Development of a platform process for the production and purification of single-domain antibodies. *Biotechnology and Bioengineering* **118**, 3348–3358 (2021).
170. Pardon, E. *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature Protocols* **9**, 674–693 (2014).
171. Govaert, J. *et al.* Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 1970–1979 (2012).
172. Long, J. *et al.* Evolution of H3N2 influenza virus in a Guinea pig model. *PLoS ONE* **6**, (2011).
173. Wasik, B. R. *et al.* Influenza Viruses in Mice: Deep Sequencing Analysis of Serial Passage and Effects of Sialic Acid Structural Variation. (2019) doi:10.1128/JVI.
174. Zhang, H. *et al.* Airborne spread and infection of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus. *Virology Journal* **10**, (2013).

175. Wiersma, L. C. M. *et al.* Pathogenesis of Infection with 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus in Isogenic Guinea Pigs after Intranasal or Intratracheal Inoculation. *The American Journal of Pathology* **185**, 643–650 (2015).
176. Tang, X. & Chong, K. T. Histopathology and growth kinetics of influenza viruses (H1N1 and H3N2) in the upper and lower airways of guinea pigs. *Journal of General Virology* **90**, 386–391 (2009).
177. Matsuoka, Y., Lamirande, E. W. & Subbarao, K. The Mouse Model for Influenza. *Current Protocols in Microbiology* **13**, (2009).
178. Slaine, P. D. *et al.* Adaptive mutations in influenza a/California/07/2009 enhance polymerase activity and infectious virion production. *Viruses* **10**, (2018).
179. Baz, M. *et al.* Replication and Immunogenicity of Swine, Equine, and Avian H3 Subtype Influenza Viruses in Mice and Ferrets. *Journal of Virology* **87**, 6901–6910 (2013).