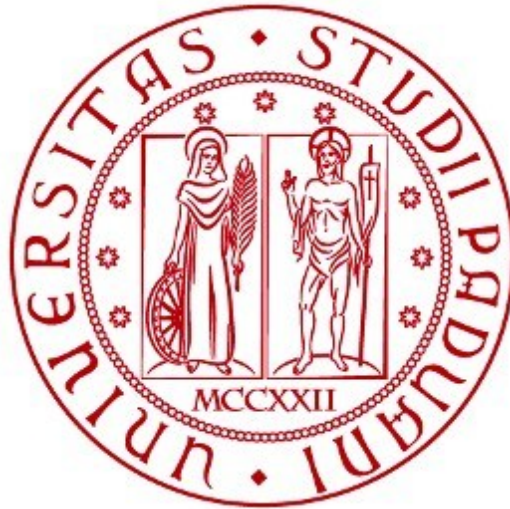


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

*Generazione e caratterizzazione di nanobodies in grado
di bloccare l'attività enzimatica di CD39 umano*

*Tutor: Prof. Laura Cendron
Dipartimento di Biologia*

Laureando: Francesco Bonelli

Anno Accademico 2025 - 2026

INDICE

ABSTRACT.....	6
1. STATO DELL'ARTE	
1.1. Introduzione ai nanobodies.....	7
1.2. Introduzione a CD39.....	11
2. APPROCCIO SPERIMENTALE	
2.1. Introduzione al quesito biologico.....	14
2.2. Materiali e metodi.....	14
2.3. Risultati.....	23
3. ANALISI CRITICA E CONCLUSIONI.....	30
4. BIBLIOGRAFIA.....	32
5. APPENDICE.....	34

ABSTRACT

I nanobodies sono un formato di anticorpi dalle dimensioni ridotte, per via dell'assenza delle catene leggere, e caratterizzati da ottima stabilità, solubilità e versatilità. Questo elaborato analizza la generazione e la caratterizzazione di un nanobody in grado di legare CD39, con l'obiettivo di bloccarne l'attività nel contesto tumorale. CD39 è un enzima che degrada l'ATP extracellulare in ADP, ma, se sovraespresso in contesti patologici, riduce l'effetto pro-infiammatorio del substrato. Gli autori dell'articolo in esame, dopo aver prodotto una libreria di VHH anti-CD39, hanno testato tramite phage display l'affinità dei Nanobodies per la proteina target, e l'inibizione ottenuta, individuando SB24 come il candidato più promettente. Inoltre, SB24 dimerizzato con IgG di coniglio mostra un'affinità all'epitopo superiore rispetto al monomero SB24. Tale studio rappresenta un importante contributo allo sviluppo di nuove strategie di immunoterapia antitumorale basate sui nanobodies.

1. STATO DELL'ARTE

1.1. Introduzione ai nanobodies

I nanobodies (Nb) rappresentano una classe innovativa di anticorpi, isolata dalla specie dei camelidi nel 1989 dai professori Cécile Casterman e Raymond Hamers. La propria struttura peculiare conferisce loro elevata stabilità e favorevoli proprietà biofisiche rispetto agli anticorpi convenzionali, giustificando il loro utilizzo sempre maggiore in un'ampia gamma di applicazioni, che spaziano dal campo medico fino al monitoraggio ambientale o alla ricerca di base.

1.1.1. Confronto strutturale con gli anticorpi convenzionali

Le immunoglobuline da cui i Nb derivano sono prive dei due domini CH1 e delle rispettive catene leggere, come si nota in figura 1, per questo sono chiamate heavy-chain only antibodies (HCAb).

In dettaglio, la struttura HCAb comprende una regione Fc, cioè il frammento cristallizzabile, che è composto dalle catene pesanti CH2 e CH3; questa regione appare omologa, nell'organizzazione delle catene, al suo corrispettivo negli anticorpi convenzionali. La regione Fab, cioè il frammento variabile e legante l'antigene, è invece la parte che differisce dagli anticorpi convenzionali: manca delle catene leggere, sia costanti (CL) che variabili (VL) ed è invece formata da due domini VHH.

Con il termine nanobody (Nb) si intende il frammento VHH, che può essere clonato ed espresso in forma monomerica mediante tecniche di DNA ricombinante. Esso ha diametro di 2.5 nm, lunghezza di 4.0 nm, e pesa 15 kDa, circa un decimo del peso molecolare di una IgG convenzionale.

Differentemente dagli anticorpi convenzionali, che possiedono in totale sei regioni CDR ipervariabili, appartenenti ai domini VL e VH, il dominio VHH presenta tre regioni CDR (regioni determinanti la complementarità), responsabili della formazione del sito di legame per l'antigene, il paratopo, all'N-terminale del Nb. Per compensare queste mancanze, le regioni CDR1 e CDR3 del dominio VHH, interconnesse da un ponte disolfuro, sono mediamente più estese dei loro corrispettivi nell'anticorpo convenzionale. Ciò permette sia la formazione di un paratopo più vasto, che, soprattutto, l'ottenimento di una gamma più ampia di architetture dei loop, che non si conformano alle strutture canoniche.

Quattro regioni framework (FR), assieme alle tre regioni CDR, si ripiegano in due foglietti beta, rispettivamente in quattro e cinque filamenti β . La regione FR2, in un anticorpo convenzionale, costituisce l'interfaccia di associazione VH-VL, ricca di residui idrofobici conservati, chiamati Val37, Gly44, Leu45 e Trp47 (utilizzando

la numerazione di Kabat). Nei nanobodies questi residui sono sostituiti rispettivamente da Phe37, Glu44, Arg45 e Gly47, dato che FR2 rappresenta parte della superficie del VHH, ed è quindi esposta al solvente. Tali sostituzioni sono quindi necessarie ai nanobodies per esistere in forma monomerica.

Tutte le differenze sopra citate rendono il paratopo dei nanobodies convesso, invece di assumere una forma concava o piatta, più convenzionale. [1]

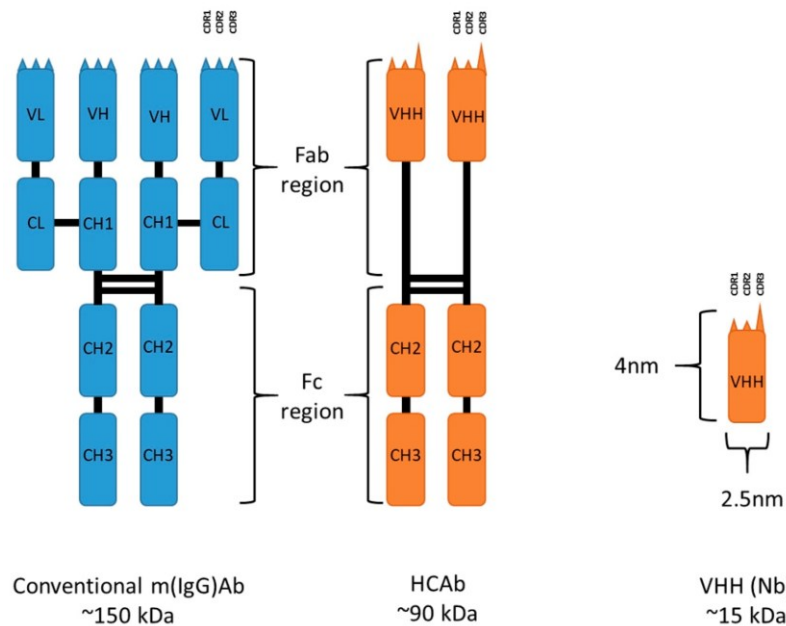


Figura 1. Adattata da Jin et al. [1]. Rappresentazione schematica, partendo da sinistra, della struttura di un anticorpo IgG convenzionale, HCAb, e di un nanobody (VHH).

1.1.2. Vantaggi strutturali e biochimici dei nanobodies

Le ridotte dimensioni e il paratopo convesso, consentono ai nanobodies di riconoscere epitopi localizzati in cavità o solchi profondi dell'antigene. Le ridotte dimensioni permettono, inoltre, una migliore penetrazione del Nb nei tessuti, ma mantenendo l'affinità di legame comparabile a quelle degli anticorpi monoclonali convenzionali, con costanti di dissociazione (K_D) frequentemente comprese nell'intervallo nanomolare e, in alcuni casi, picomolare.

Studi di denaturazione termica e chimica, refolding, e mutagenesi sito-specifica, hanno evidenziato favorevoli caratteristiche anche dal punto di vista biochimico. I Nb presentano infatti elevate temperature di melting, quindi un'elevata stabilità termica, oltre che la capacità di ripiegarsi spontaneamente dopo denaturazione, e una notevole resistenza alle variazioni di pH e all'azione delle proteasi. Tali proprietà sono attribuite principalmente a CDR3, e migliorabili ottenendo un secondo ponte disolfuro fra CDR1 e CDR3. [1]

1.1.3. Generazione e produzione di nanobodies

È possibile ottenere nanobodies antigene-specifico attraverso tre tipologie di librerie diverse, chiamate immuni, naïve o sintetiche. Le librerie immuni sono ottenute a seguito dell'immunizzazione di un camelide con l'antigene target, per indurre la produzione di nanobodies specifici per l'antigene. Successivamente, usando il sangue estratto, si procede con la purificazione di linfociti e l'estrazione dell'mRNA. La conversione in cDNA è seguita, nella maggior parte dei protocolli, da una PCR in due fasi. Nella prima PCR si amplifica dalla sequenza leader fino a una regione conservata all'interno del dominio CH2, comune a tutte le IgG; gli ampliconi derivanti dagli anticorpi a catena pesante (HCAb) possono essere distinti da quelli degli anticorpi convenzionali mediante elettroforesi su gel di agarosio, poiché risultano di dimensioni inferiori a causa dell'assenza del dominio CH1. La seconda PCR amplifica VHH e inserisce i siti di restrizione, necessari per inserire il cDNA in un vettore di espressione.

Il processo per ottenere librerie naïve si distingue dal precedente per l'assenza di immunizzazione del camelide. Queste librerie sono preferite quando l'antigene risulta essere tossico anche a basse concentrazioni, o non induce una risposta immunitaria efficace; tuttavia, l'affinità è inferiore rispetto a Nbs derivanti da librerie immuni.

Le librerie sintetiche sono ottenute a seguito di mutazioni mirate, a partire da uno scaffold di nanobody stabile e ben espresso, introducendo artificialmente variabilità nelle regioni CDR. Tale procedimento permette di evitare l'immunizzazione di camelidi o animali transgenici, rappresentando un'alternativa eticamente migliore, adatta ad antigeni scarsamente immunogenici, o altamente tossici, riducendo i costi e i tempi di produzione. Di contro, queste librerie richiedono una progettazione accurata, e la loro qualità dipende fortemente dal design e dalla rappresentatività della libreria. Perciò le librerie sintetiche, come quelle naïve, richiedono librerie di dimensioni molto elevate. [2]

Ottenuta la libreria di Nbs, il phage display e il biopanning sono usati per selezionare i Nbs con le proprietà ricercate. In dettaglio, il phage display è la tecnica più comune per ottenere un collegamento diretto tra genotipo e fenotipo di una proteina, usando un batteriofago come piattaforma. I geni dei VHH sono codificati in fagemidi, i quali sono trasfettati in cellule batteriche; successivamente, queste vengono infettate con helper phage derivati da M13. Ciò porta alla formazione di particelle fagiche che espongono il nanobody che codificano, perché questo è espresso come proteina di fusione con la proteina del capsido pIII, e impacchettano il fagemide.

Nella fase di biopanning, i fagi vengono introdotti in una piastra per microtitolazione, con l'antigene bersaglio fissato e poi, attraverso vari lavaggi, si scartano i VHH debolmente o non affini al substrato, mentre i leganti positivi

vengono eluiti e conservati. La selezione può essere ripetuta più volte, conservando nanobodies con affinità sempre maggiore. Infine, i fagi vengono utilizzati per infettare nuove cellule.

I nanobodies possono essere prodotti sia da sistemi di espressione procariotici come *E. coli*, che da eucarioti, come *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. [1]

1.1.4. Strategie di umanizzazione e modificazione dei nanobodies

I nanobodies presentano immunogenicità bassa nell'uomo, nonostante ciò, restano sequenze xenogeniche; è perciò opportuno, specialmente a scopo terapeutico, umanizzare le regioni FR, per evitare la produzione di anticorpi anti-farmaco (ADA) nel paziente. Esistono due approcci possibili al fine di ottenere regioni FR più simili a quelle umane: il CDR grafting, in cui le CDR dell'anticorpo non umano vengono trapiantate su un'impalcatura FR completamente umana, e il resurfacing o veneering, in cui si introducono sostituzioni selettive solo nei residui di FR esposti al solvente. Il resurfacing è l'approccio più comune, in quanto i suoi effetti risultano generalmente più contenuti sulle proprietà originarie della molecola. Anche se la regione FR è fondamentale per l'affinità e la stabilità del monomero, uno studio compiuto nel 2009 da Vincke et al. determina che solo i residui conservati nelle posizioni 37 e 47 sono fondamentali per mantenere l'integrità strutturale del VHH e la corretta conformazione della CDR3. [3]

La facilità con cui i nanobodies possono essere ingegnerizzati permette, inoltre, modificazioni atte a migliorare la purificazione e la rilevazione; ne è un esempio la fusione di VHH con tag peptidici, come (His)₆. Un altro esempio è l'unione di due copie dello stesso nanobody, che permette di ottenere costrutti bivalenti, nei quali l'aumento dell'avidità migliora l'efficacia del legame con l'antigene. In alternativa, è possibile fondere due nanobodies diretti contro epitopi differenti dello stesso antigene, generando costrutti biparatopici, oppure contro antigeni diversi, ottenendo molecole bispecifiche in grado di avvicinare due differenti bersagli biologici.

Per migliorare le proprietà farmacocinetiche, i nanobodies possono inoltre essere fusi al dominio Fc di un'IgG, oppure a un nanobody specifico per l'albumina sierica. Queste modifiche aumentano il peso molecolare della molecola e la velocità di eliminazione renale, determinando un significativo prolungamento dell'emivita plasmatica. La fusione con il dominio Fc offre anche il vantaggio di consentire l'attivazione delle funzioni effettrici mediate dalla porzione Fc, qualora desiderate. [2]

1.1.5. Applicazioni diagnostiche e terapeutiche

Date le caratteristiche uniche e i vantaggi elencati finora, i Nb rappresentano un elemento facilmente implementabile in varie applicazioni, per migliorare strumentazioni e protocolli già consolidati o ancora in sviluppo.

In diagnostica, i Nb trovano applicazione soprattutto nei lateral flow immunoassays (LFIA) e nei saggi ELISA, oltre che nei biosensori, l'opzione dove risultano maggiormente performanti. Questi sono impiegati anche nella diagnostica in vivo, in particolare nelle tecniche di imaging molecolare, come PET e SPECT, grazie alle ridotte dimensioni, alla rapida penetrazione nei tessuti, alla facilità di coniugazione con fluorofori o radioisotopi, e alla veloce eliminazione renale.

Sono varie anche le applicazioni terapeutiche: attualmente, i nanobodies sono studiati per combattere le malattie infettive, patologie neurodegenerative e malattie autoimmuni, il campo con più terapie approvate e in studio, e le applicazioni in campo oncologico, di cui tratteremo in questo elaborato.

I nanobodies possono essere impiegati in numerose strategie antitumorali, tra le quali si citano CAR-T basate su nanobodies, di cui ciltacabtagene autoleucel è l'unica terapia di questo tipo approvata e in commercio attualmente.

1.2. Introduzione a CD39

CD39 rappresenta uno dei nuovi checkpoint immunitari più promettenti; il suo ruolo cruciale nel plasmare il microambiente tumorale (TME) rende CD39 adatto per essere bersaglio terapeutico nell'immunoterapia antitumorale.

1.2.1. Analisi strutturale

CD39, detta anche ectonucleoside trifosfato difosfoidrolasi-1 (ENTPD1), è una proteina integrale di membrana dipendente dagli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} , che idrolizza ATP in adenosina difosfato (ADP) o in adenosina monofosfato (AMP).

CD39 umana consta di 510 amminoacidi, organizzati in 5 domini strutturali principali. Come mostrato in figura 2, la proteina possiede un breve dominio intracellulare N-terminale di 16 amminoacidi, seguito da un dominio transmembrana di 21 amminoacidi, e da un ampio dominio extracellulare di 441 amminoacidi, che ospita il sito catalitico dell'enzima. Successivamente, è presente un secondo dominio transmembrana di 21 amminoacidi e, infine, un breve dominio intracellulare C-terminale di 11 amminoacidi. Presenta inoltre sette potenziali siti di N-glicosilazione e 11 residui di cisteina. [5]

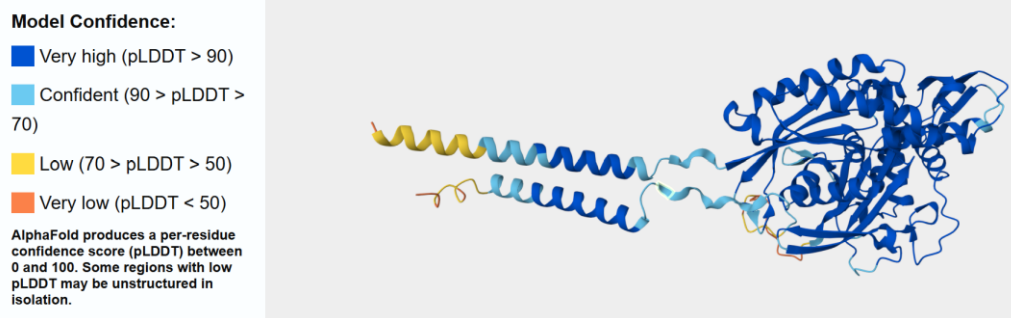


Figura 2. Adattata da uniprot, struttura della proteina P49961, ENTP1_HUMAN. Si nota a sinistra due strutture alfa elica, i domini intracellulari, successivamente, spostandosi a destra, si distinguono facilmente i due domini transmembrana, mentre la parte proteica più voluminosa è il vasto dominio extracellulare.

1.2.2. Il sistema purinergico

La funzione di CD39 è la fosfoidrolizzazione di ATP in ADP extracellulare e, meno efficacemente, in AMP; successivamente AMP è convertita da CD73 in adenosina. L'asse CD39/73 si inserisce nel sistema di segnalazione chiamato purinergico.

L'ATP è risultata essere una molecola segnale pro-infiammatoria, rilasciata dalle cellule in seguito a condizioni fisiologiche o patologiche, come, ad esempio, a seguito di un danneggiamento a un tessuto, o di stress legato al microambiente tumorale. È una molecola agonista della famiglia dei recettori purinergici P2; tra questi, P2X7 è responsabile della produzione di IL-1 β matura, citochina pro-infiammatoria.

L'adenosina esercita invece un'azione anti-infiammatoria, legandosi ai recettori P1, di cui si cita il recettore A2A: presente ad esempio sulla superficie dei linfociti T citotossici, CD8⁺, e cellule Natural Killer (NK), per ridurre l'attività citotossica di questi quando lega adenosina.

CD39, CD73 e i recettori purinergici P1 e P2 sono espressi prevalentemente sulle cellule del sistema immunitario, dove regolano la risposta immunitaria. [5]

1.2.3. CD39 nell'ambiente tumorale

Tuttavia, nell'ambiente tumorale, CD39 risulta essere sovraespresso sia dalle cellule tumorali sia da quelle stromali e immunitarie. La conseguenza è una prognosi sfavorevole in numerosi tumori, dato che CD39 in questo contesto favorisce un microambiente immunosoppressivo.

Nelle cellule tumorali, degradando l'ATP extracellulare, CD39 riduce i segnali pro-infiammatori e favorisce l'accumulo di adenosina, che facilita l'evasione immunitaria. Nelle cellule immunitarie del microambiente tumorale, come le

cellule T regolatorie (Treg) e i macrofagi associati al tumore (TAM), CD39 è altamente espresso e contribuisce a sopprimere l'attività dei linfociti T citotossici (CTL) e delle cellule NK, rafforzando l'immunotolleranza. [4]

Tuttavia, CD39 è espresso anche sulle cellule endoteliali e sulle piastrine, dove è necessario per inibire l'attivazione piastrinica e prevenire trombosi microvascolari; la sua inibizione generale può quindi compromettere l'omeostasi vascolare aumentando il rischio di eventi trombotici.

2. APPROCCIO SPERIMENTALE

2.1. *Introduzione al problema*

Come illustrato nel capitolo precedente, lo studio di CD39 si inserisce nel contesto più vasto della cura e prevenzione del cancro. La sua sovraespressione è un fenomeno molecolare tipico nel TME di tumori al polmone, prostata, colon, ovaio e pancreas; inoltre, CD39 si presta bene come target immunoterapeutico, dato che costituisce il principale enzima limitante della velocità dell'asse purinergico CD39/CD73.

Valutare l'impatto di una cura immunoterapeutica basata su una molecola anti-CD39, tuttavia, risulta essere un'indagine complessa: la sovraespressione di CD39 non è né causa né effetto di una specifica patologia, rendendo difficile l'ottenimento dei dati necessari a quantificare i pazienti che ne beneficerebbero. Nello studio di Koppensteiner et al., condotto su pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), si dimostra come l'espressione dell'enzima è eterogenea sia tra pazienti affetti dalla stessa neoplasia, sia all'interno del microambiente tumorale, oltre ad evidenziare come tali eterogeneità possano incidere sul valore prognostico a seconda del contesto. [6]

Attualmente esistono già diversi programmi clinici per testare molecole anti-CD39, fino alla fase I dei trial clinici, come i due anticorpi monoclonali TTX-030 ed ES002023. Ciò testimonia il crescente interesse dell'industria farmaceutica verso CD39 come target immuno-oncologico, seppur è ancora preliminare l'evidenza di efficacia nell'uomo. [4]

Rese note le proprietà dei Nbs e i loro vantaggi rispetto agli anticorpi convenzionali, l'impiego di VHH come molecole anti-CD39 sembra una scelta naturale; tuttavia, la letteratura in merito risulta ancora debole. Lo studio di Menzel et al. rappresenta il primo lavoro originale, peer-reviewed indicizzato, che descrive la generazione e la caratterizzazione di nanobodies antagonisti anti-CD39 umano.

2.2. *Materiali e metodi [13]*

2.2.1. *Generazione di cellule HEK umane stabilmente trasfettate con CD39.*

Le cellule che sovraesprimono CD39 con alta fedeltà sono state impiegate in diversi esperimenti, oltre che essere state usate come boost nell'immunizzazione dei camelidi.

Le cellule HEK293-T sono state coltivate in fiasche per colture cellulari T75, fino al raggiungimento di una confluenza del 70–80%. Successivamente, è stata

eseguita la trasfezione utilizzando 5 µg di plasmide huCD39-pCMVSPORT6 linearizzato, e 5 µg dello stesso plasmide in forma circolare. I plasmidi di espressione contengono il promotore forte CMV; la forma circolare rimane generalmente in forma episomiale e determina un'espressione transiente nei primi giorni, mentre il plasmide linearizzato è più propenso a integrarsi.

Il protocollo usato, jetPEI®, prevede di diluire i 10 µg di DNA e 20 µL di jetPEI separatamente in 250 µL di NaCl 150 mM, per poi aggiungere la soluzione di jetPEI nella soluzione contenente il DNA e, infine, distribuirla omogeneamente nella coltura cellulare, dato che jetPEI resta stabile in presenza di siero. [7]

Dopo due giorni, le cellule sono state raccolte e colorate con un anticorpo monoclonale anti-CD39 umano (clone A1, BioLegend), per essere analizzate e selezionate mediante citometria a flusso con cell sorting, usando un FACS Aria IIIu Sorter di BD Biosciences, come descritto nel paragrafo 2.2.9.

2.2.2. Immunizzazione dei camelidi

Due alpaca sono stati immunizzati mediante gene gun, utilizzando quindi particelle d'oro coniugate con il plasmide huCD39-pCMVSPORT6.

La strategia di immunizzazione, che si basa sui risultati degli studi di Eden et al., permette alla proteina di membrana target di non perdere la sua conformazione naturale nell'animale, come può succedere iniettandola in forma proteica, data la presenza di due domini transmembrana idrofobici; si ricorda che il target è una proteina transmembrana a doppio passaggio, e, come tale, si denaturerebbe in soluzione.

Il protocollo prevede lo sparo di particelle d'oro a livello della pelle del basso collo o della parte superiore della zampa posteriore. Questo è necessario affinché il DNA, a velocità balistica, possa attraversare più strati di cellule cutanee e perforare la membrana plasmatica, migliorando l'efficienza di trasfezione. [8]

Le proteine non-self sono trascritte, tradotte e modificate post-traduzionalmente, per poi essere riconosciute dal sistema immunitario, attivando il processo che porta alla formazione di linfociti B che esprimono HCAb specifici per il target scelto.

Il protocollo di immunizzazione è stato ripetuto ai giorni 21, 42 e 64, mentre al giorno 85 è stato eseguito un ulteriore boost proteico, mediante cellule HEK293-T trasfettate con CD39 umano. I campioni di sangue periferico, invece, sono stati prelevati ai giorni 70 e 91, e da questi sono state isolate le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) per l'estrazione dell'RNA.

L'intero procedimento di immunizzazione è stato condotto da Eurogentec (Belgio), nel rispetto delle normative locali e nazionali approvate in materia di etica animale.

2.2.3. Colorazione immunofluorescente mediante siero immunitario di alpaca

Per verificare l'efficacia dell'immunizzazione, è stata eseguita una colorazione in immunofluorescenza delle PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) isolate. La tecnica consiste nell'incubare le PBMC con cellule trasfettate per esprimere sulla loro superficie il target di interesse. Le cellule B, che esprimono immunoglobuline di membrana specifiche per il target, si legano alle cellule trasfettate. Successivamente, viene aggiunto un anticorpo secondario fluorescente diretto contro le immunoglobuline della specie immunizzata, che consente di visualizzare le cellule legate mediante microscopia a fluorescenza.

La linea cellulare scelta per essere trasfettata, CHO (Chinese Hamster Ovary), deriva dall'ovaio del *Cricetulus griseus*, e ha il vantaggio di esprimere bassi livelli di molte proteine di membrana endogene, proprietà utile per verificare che gli anticorpi leganti la cellula siano affini solamente a CD39.

Per la trasfezione transitoria delle cellule CHO si è utilizzata polietilenimmina e 10 µg del plasmide huCD39-pCMVSPORT6. Successivamente, le cellule sono state incubate per 60 minuti a 4°C, con siero immunitario di alpaca diluito 1:600 in DMEM contenente 10% di siero fetale bovino (FCS). Quest'ultima incubazione permette di far le immunoglobuline anti-CD39, prodotte dal sistema immunitario dell'alpaca, alle cellule CHO, che esprimono alti livelli del target proteico.

Le cellule sono state, perciò, incubate per 20 minuti, a temperatura ambiente, con un anticorpo secondario IgG anti-lama coniugato con ficoeritrina (PE) (Abcam, ab72485), diluito 1:200 in DMEM/FCS. La PE, il fluorocromo coniugato all'anticorpo, una volta eccitata, emette fluorescenza con un picco di emissione a circa 575–578 nm, consentendo la rilevazione delle cellule a cui l'anticorpo si è legato. Dunque, le cellule sono state analizzate con un microscopio a fluorescenza EVOS (Thermo Fisher Scientific) dotato di una telecamera digitale.

2.2.4. Phage display e panning

Per ottenere il repertorio immunitario di VHH, l'RNA estratto dalle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) è stato retrotrascritto, ottenendo il suo cDNA, il quale è stato amplificato mediante PCR. Durante quest'ultima fase, sono stati introdotti alle estremità di ciascuna sequenza VHH i siti di restrizione SfiI e NotI. Successivamente, il repertorio di VHH e il fagemide pHEN2 sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione SfiI e NotI (NEB) e ligati mediante T4 DNA ligasi (NEB). Il fagemide contiene un gene di resistenza alla carbenicillina e la sequenza del gene gIII del batteriofago filamentoso M13, che consente l'esposizione del VHH sulla superficie del fago.

I prodotti della ligazione sono stati utilizzati per trasformare le cellule batteriche competenti TG1 (Lucigen), che sono state poi selezionate mediante semina su piastre di agar LB contenenti carbenicillina (Thermo Fisher) alla concentrazione finale di 100 µg/mL. Le colonie batteriche cresciute sulle piastre sono state raccolte e incubate in terreno arricchito con estratto di lievito e triptone a concentrazione doppia, e carbenicillina (2×YT).

Quando la libreria batterica ha raggiunto una densità ottica a 600 nm (OD₆₀₀) pari a 0,5, i batteri sono stati superinfettati con il fago helper M13K07 (BioLab), che porta la resistenza alla kanamicina, e incubati per 30 minuti a 37 °C con agitazione a 150 rpm. Al fine di selezionare le cellule TG1 contenenti sia il fagemide che il fago helper, le colture sono state risospese in terreno 2×YT contenente carbenicillina e kanamicina,. Solo tali cellule sono in grado di sopravvivere, oltre che permettere la produzione di fagi che espongono VHH, il cui DNA è il fagemide pHEN2, ma le cui proteine strutturali sono fornite dal fago helper.

Un'incubazione per 6 ore a 28 °C con agitazione a 220 rpm permette la produzione e il rilascio dei fagi nel mezzo di coltura, che sono poi separati dal debris cellulare, mediante centrifugazione.

Anche la purificazione della libreria fagica si basa su una sequenza di centrifugazioni e precipitazioni selettive. Inizialmente si aggiunge una sospensione di PEG/NaCl, che promuove la precipitazione dei fagi dopo una centrifugazione a bassa velocità, formando il pellet fagico. Dopo la risospensione del pellet in PBS, centrifugazioni ad alta velocità permettono di eliminare aggregati insolubili e residui di precipitazione, mantenendo i fagi purificati nel surnatante finale. Questa fase di centrifugazione e trasferimento è stata ripetuta 4–5 volte, fino alla completa scomparsa del pellet.

Per selezionare i VHH anti-CD39, si esegue il panning, cioè la tecnica spiegata al paragrafo 1.1.3., che consiste nell'incubare nella stessa soluzione i fagi prodotti con la tecnica del phage display, con le cellule HEK293-T trasfettate, la cui descrizione è avvenuta al paragrafo 2.2.1.. Solo i fagi che si legano saranno selezionati.

La libreria fagica è stata quindi incubata in un buffer di blocking in una provetta Falcon per 1 ora a temperatura ambiente, al fine di ridurre il legame aspecifico alle superfici di polistirene. Successivamente, la libreria fagica è stata miscelata con una sospensione di cellule HEK293-T non trasfettate e incubata per 1 ora a 4 °C, in modo da rimuovere il legame aspecifico verso le proteine di superficie delle cellule HEK293-T.

Si è scartata la sospensione cellulare, contenente fagi con affinità a proteine non target, attraverso centrifugazione. Il surnatante è stato quindi aggiunto a una sospensione di cellule HEK293-T trasfettate con il gene umano CD39, e incubato per 1 ora a temperatura ambiente su uno shaker a vibrazione. Infine, la sospensione

cellulare è stata centrifugata per raccogliere il pellet, cioè le cellule HEK trasfettate con CD39 legate ai fagi.

Si è risospeso il pellet cellulare in tripsina (Gibco), necessaria per rompere le interazioni proteiche, al fine di eluire i fagi dalle cellule HEK. Per inibire la proteasi, dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la sospensione fagica è stata trasferita in una nuova provetta da 1,5 mL pre-trattata con AEBSF (100 mM, Merck). Dopo aver conservato il surnatante, contenente i fagi, si è conclusa la fase di panning.

I fagi eluiti sono stati utilizzati per trasformare altre cellule TG1, le quali sono state piastrate su agar 2×YT contenente carbenicillina e glucosio al 2%, e poi incubate overnight a 37 °C. Successivamente, sono state prelevate singole colonie cresciute sulle piastre, per l'estrazione del plasmide tramite miniprep e sequenziamento, utilizzando il primer LMB3 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Eurofins). Tale procedura è vantaggiosa perché ogni colonia batterica deriva generalmente da un singolo clone fagico contenente una specifica sequenza di VHH (nanobody); isolare colonie singole permette quindi di analizzare cloni individuali e non una popolazione mista.

Tutte le colonie sono state inoltre raccolte e conservate in terreno 2×YT con glicerolo al 20% a -80 °C come libreria batterica arricchita.

2.2.5. Produzione di nanobody ricombinanti

Gli autori procedono con la produzione di VHH ricombinanti di due tipi: Nbs fusi a tag proteici di 6-His in forma monomera e Nbs fusi a IgG, di coniglio o uomo.

Il protocollo prevede l'amplificazione mediante PCR delle sequenze codificanti per i nanobodies anti-CD39, durante il quale sono introdotti siti di restrizione PciI all'estremità 5' e NotI all'estremità 3' delle sequenze VHH. I prodotti di PCR sono stati quindi sottoposti a digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione PciI e NotI (New England Biolabs, NEB) per 2 ore a 37 °C.

Parallelamente, i vettori di espressione pCSE2.5_HIS e pCSE2.5_Fc sono stati linearizzati mediante digestione con gli enzimi NcoI e NotI. Il vettore pCSE2.5_HIS contiene una sequenza codificante per un tag esaidistidinico, mentre il vettore pCSE2.5_Fc possiede la sequenza codificante per il dominio Fc di IgG umana o di coniglio; inoltre, gli enzimi NcoI e PciI sono isocaudomeri, cioè generano estremità coesive compatibili, consentendo l'inserimento delle sequenze VHH digerite all'interno dei vettori. Si esegue perciò una ligazione.

I prodotti di ligazione sono stati prima utilizzati per trasformare cellule batteriche competenti di E. coli XL1-Blue, per amplificare i plasmidi ricombinanti, e poi sono stati purificati mediante preparazione miniprep. I plasmidi sono stati infine

trasfettati in cellule HEK293-6E, usando il reagente JetPEI, per produrre le proteine ricombinanti.

Dopo cinque giorni dall'inizio dell'espressione, la sospensione cellulare è stata centrifugata, e il surnatante, contenente anche le proteine ricombinanti, è stato raccolto e filtrato attraverso cromatografia di affinità. Tale tecnica di purificazione è basata sull'interazione tra una sostanza immobilizzata su una matrice cromatografica, e una molecola che possiede alta affinità per la sostanza. In particolare, i nanobodies fusi al dominio Fc di IgG di coniglio (Nb-rbFc) sono stati purificati sfruttando l'interazione specifica tra la proteina A e il dominio Fc delle immunoglobuline. I nanobodies monomerici con tag 6-His sono stati invece purificati mediante cromatografia di affinità per ioni metallici immobilizzati (IMAC) utilizzando resina Ni-NTA, grazie alla capacità del tag istidinico di coordinare gli ioni nichel.

2.2.6. Calcolo della velocità di dissociazione mediante Octet RED96

Il sistema Octet RED96 è una piattaforma di analisi basata su una misura interferometrica (BLI; biolayer interferometry), cioè una tecnica ottica che misura le interazioni molecolari in tempo reale, senza necessità di marcatori fluorescenti o radioattivi. Il principio di funzionamento si basa sull'analisi dell'interferenza della luce bianca riflessa all'interno di un biosensore, formato da un multistrato ottico. La luce incidente viene riflessa da due interfacce principali: la superficie interna del biosensore, che funge da riferimento, e la superficie esterna dello strato di biomolecole immobilizzate, sulla quale avviene il legame con l'analita, ovvero la molecola in esame.

Quando l'analita si lega al biosensore, aumenta lo spessore ottico dello strato molecolare sulla superficie del biosensore, il quale è rilevato dallo spostamento del pattern di interferenza della luce riflessa. Questo shift è proporzionale alla variazione di spessore che risulta sull'interfaccia della superficie esterna, e quindi alla quantità di biomolecole associata alla superficie del biosensore. Lo shift è misurato in nanometri, e offre dati in tempo reale, oltre che privi di rumore dovuto al flusso, poiché il sistema è privo di fluidica. [9]

Nel presente studio tale tecnologia è stata usata per svolgere saggi cinetici, in cui il sistema monitora le fasi di associazione e dissociazione del legame ligando-analita; tuttavia, il macchinario può eseguire anche saggi di quantificazione, utilizzati per determinare la quantità di una specifica molecola presente in un campione biologico o chimico, intesa sia come concentrazione che massa assoluta.

Lo studio della costante di dissociazione mediante Octet RED96, in questo articolo, è stato usato per selezionare i nanobodies anti-CD39 con la migliore capacità di legame e la maggiore stabilità del complesso antigene-anticorpo.

I surnatanti contenenti le proteine di fusione Nb-rbFc sono stati caricati su biosensori, rivestiti con proteina A per interagire con il dominio Fc. I biosensori, equilibrati con buffer di analisi, sono poi stati incubati con ectodomini ricombinanti di CD39, dando inizio alla fase di associazione antigene–nanobody, seguita da una fase di dissociazione, mediante incubazione dei biosensori in buffer di analisi privo di antigene. Nella prima fase, perciò, CD39 si lega al nanobody immobilizzato e il segnale BLI aumenta, mentre nella seconda fase si calcola la velocità con cui il legame antigene–nanobody si dissocia. La diminuzione del segnale BLI nel tempo permette di calcolare la velocità di dissociazione.

Le curve di legame ottenute sono state analizzate mediante il software GraphPad Prism, utilizzato per la visualizzazione dei dati e il calcolo delle costanti di dissociazione (K_D).

2.2.7. Valutazione dell'inibizione dell'idrolisi dell'ATP mediante CellTiter-Glo

Per dimostrare in vitro che il legame antigene-Nb determina l'inibizione dell'attività di CD39, è stato eseguito un saggio funzionale basato sulla quantificazione dell'ATP residua dopo l'incubazione di questa con il complesso antigene-Nb. La quantità di ATP non degradata è stata determinata mediante il reagente luminescente CellTiter-Glo® (o CTG) Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Il saggio, infatti, si basa sull'impiego della luciferasi, un enzima, e del suo substrato, la luciferina; in presenza di ATP, la luciferasi catalizza l'ossidazione della luciferina, generando ossiluciferina, AMP, pirofosfato (PPi), CO₂ ed emissione di luce. L'intensità del segnale luminoso rilevato dal luminometro è direttamente proporzionale alla quantità di ATP disponibile nel campione; quindi, poiché CD39 catalizza l'idrolisi dell'ATP, una maggiore attività enzimatica determina una riduzione dell'ATP residua, e quindi una diminuzione del segnale luminescente.

Gli autori hanno valutato l'attività inibitoria dei nanobodies utilizzando due differenti sistemi sperimentali: cellule HEK293-T trasfettate, che consentono di analizzare la proteina nella sua conformazione nativa di membrana, e domini ectodominiali ricombinanti della proteina CD39 umana, per valutare direttamente l'interazione con la porzione extracellulare della proteina.

Entrambi i sistemi sperimentali sono stati incubati, separatamente, con ogni nanobody selezionato; successivamente, è stata aggiunta ATP a una concentrazione finale compresa tra 50 e 100 μ M per 30 minuti, per poi centrifugare la piastra e rimuovere il pellet cellulare. Infine, in una piastra da 96 pozzetti, è stato distribuito il surnatante, e a ciascun campione sono stati aggiunti 50 μ l di reagente CTG. Dopo un'incubazione di 10 minuti, la luminescenza è stata misurata mediante un luminometro (PerkinElmer).

2.2.8. *High-performance liquid chromatography*

Per valutare la capacità di agire da antagonista del nanobody SB24 per l'attività ATPasica di CD39, è stato eseguito un saggio funzionale basato sulla degradazione dell'analogo fluorescente dell'ATP, 1,N6-eteno-ATP (eATP), la cui quantità residua è stata rilevata mediante high-performance liquid chromatography measurements (HPLC) in fase inversa con rilevazione a fluorescenza (RT-HPLC).

La high-performance liquid chromatography (HPLC) è una tecnica analitica utilizzata per separare, identificare e quantificare le componenti di una miscela sulla base delle loro proprietà chimico-fisiche; il sistema è costituito principalmente da una fase mobile liquida, una pompa ad alta pressione, un iniettore del campione, una colonna cromatografica contenente la fase stazionaria e un rivelatore che consente di identificare e quantificare gli analiti separati.

Il principio della separazione, nel sistema RT-HPLC (fase inversa), si basa sulle proprietà delle molecole contenute nella fase stazionaria, fissate all'interno della colonna cromatografica; quest'ultima è infatti costituita da particelle di silice modificate con catene alchiliche, per trattenere maggiormente le molecole idrofobiche. La fase mobile, cioè il solvente che attraversa la colonna ad alta pressione, è costituita da molecole con affinità differenti per la fase stazionaria, permettono differenti tempi di permanenza di queste nella colonna, definiti tempi di ritenzione. Essendo i nucleotidi in analisi molecole con polarità diverse, il loro tempo di ritenzione è basso e specifico: l'eATP in particolare è il più polare, avendo tre gruppi fosfato, e ha il minor tempo di ritenzione. [10]

La rilevazione dei nucleotidi è effettuata mediante un rivelatore a fluorescenza, utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 275 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 410 nm.

L'inibizione dell'attività ATPasica è stata valutata utilizzando due sistemi sperimentali diversi; il primo tipo comprende cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), precedentemente stimulate per sei giorni con un anticorpo anti-CD3 (aCD3), il quale mima l'attivazione del TCR (recettore delle cellule T), al fine di incrementare l'espressione di CD39 sui linfociti T. Il secondo sistema usato è CD39 umano ricombinante. Separatamente, entrambi i sistemi sono stati incubati per 15 minuti a 37 °C con SB24 IgG LALAPG, cioè unIgG la cui regione Fc mutata è resa silente dal punto di vista immunologico. Successivamente, ai campioni è stato aggiunto eATP, e la reazione enzimatica è stata lasciata procedere per ulteriori 30 minuti a 37 °C.

Al termine dell'incubazione, le cellule presenti nei campioni cellulari sono state rimosse mediante centrifugazione, e tutti i campioni sono stati successivamente sottoposti a filtrazione mediante membrane per esclusione dimensionale con cut-

off di 10 kDa, al fine di eliminare proteine e componenti ad alto peso molecolare. RP-HPLC è stata eseguita utilizzando lo strumento 1260 Infinity II (Agilent Technologies), mentre l'integrazione dei picchi cromatografici e la successiva analisi quantitativa dei segnali ottenuti sono state eseguite mediante il software OpenLab CDS (Agilent Technologies).

2.2.9. *Flow cytometry e FACS*

La flow cytometry, o citometria a flusso, è una tecnica di analisi multiparametrica utilizzata per la caratterizzazione di popolazioni cellulari, o molecole biologiche, sulla base delle loro proprietà fisiche e molecolari. Il citometro consta di un sistema fluidico, che permette alle cellule del campione, sospese in una soluzione liquida, di passare singolarmente attraverso un fascio laser focalizzato, in modo da analizzare le caratteristiche ottiche generate dall'interazione tra luce e particella. I principali segnali analizzati sono la dimensione (forward scatter), granularità (side scatter) ed emissione di fluorescenza derivante da marcatori specifici. [11]

Nell'articolo, quando è stata utilizzata la citometria a flusso, il campione è stato marcato mediante l'impiego di fluorofori legati ad anticorpi, consentendo di identificare le molecole che possedevano le caratteristiche ricercate. In particolare, la flow cytometry è stata eseguita per determinare se i nanobodies selezionati fossero in grado di riconoscere CD39. La stessa tecnica è stata usata anche per valutare il riconoscimento di CD39 da parte dei nanobodies sulle cellule immunitarie presenti nel sangue umano. Lo studio ha compreso l'incubazione di sangue con un cocktail di anticorpi monoclonali coniugati a diversi fluorocromi, per identificare contemporaneamente diverse popolazioni cellulari attraverso marcatori specifici, ottenendo una valutazione multiparametrica.

La citometria a flusso si limita ad analizzare il campione, che, successivamente, viene convogliato in un unico recipiente; con cell sorting si intendono, invece, le tecniche che permettono di separare fisicamente le cellule in sottopopolazioni sulla base dei parametri misurati. La FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) è una tecnica avanzata di citometria a flusso, che permette la separazione fisica di popolazioni cellulari eterogenee sulla base delle loro caratteristiche fluorescenti. [11]

Si prende come esempio, per la descrizione del metodo, il protocollo usato al capitolo 2.2.1. "Generazione di cellule HEK umane stabilmente trasfettate con CD39". Dopo che le cellule HEK293-T trasfettate sono state incubate con un anticorpo anti-CD39 umano coniugato a un fluorocromo, il clone A1, il campione è stato analizzato e separato mediante FACS. L'intensità della fluorescenza misurata dipende dalla concentrazione di clone A1 legato alla cellula, che dipende a sua volta dall'espressione di CD39 esposto sulla membrana cellulare. Il sistema

rileva la fluorescenza emessa e la usa per classificare le cellule in popolazioni diverse. Queste popolazioni sono divise attraverso l'attribuzione di una carica elettrica alle goccioline contenenti le cellule selezionate, che vengono poi deviate attraverso campi elettrostatici in diverse frazioni.

La frazione di cellule caratterizzata da un'elevata espressione di CD39 è stata isolata e la procedura di selezione è stata ripetuta quattro volte, fino a ottenere una popolazione in cui oltre il 95% delle cellule HEK293-T mostrava un'espressione stabile ed elevata della proteina CD39 umana.

2.3. Risultati

2.3.1. Isolamento di nanobodies anti-CD39

Il sangue estratto dai due alpaca al giorno 70 dell'immunizzazione è stato analizzato mediante microscopia a fluorescenza. Nell'articolo si nota che le cellule esprimenti CD39 utilizzate in questa fase appartengono alla tipologia HEK, e non CHO, come descritto nel protocollo al paragrafo 2.2.3. L'esito delle analisi è positivo in entrambi i camelidi, come si vede in figura 3, e perciò si può constatare che entrambi i alpaca (SAL009 e SAL010) presentano nel siero immunologico anticorpi specifici anti-CD39.

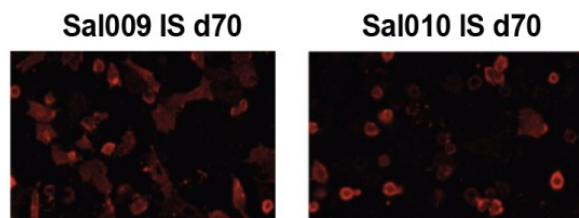


Figura 3. Adattata da Menzel et al. [13]. Verifica tramite microscopia a fluorescenza del legame tra le cellule esprimenti CD39 e le cellule del siero immunologico. La fluorescenza rilevata nei campioni SAL009 e SAL010 testimonia la presenza di anticorpi specifici anti-CD39.

Dopo il secondo prelievo, l'RNA estratto dalle cellule del sangue periferico è stato retrotrascritto in cDNA, da cui sono stati isolati i geni codificanti i domini VHH. È stata poi costruita una libreria di Nb, selezionati attraverso phage display e panning. In parallelo, la libreria di nanobodies è stata anche ingegnerizzata per formare Nbs ricombinanti, quindi fusi al dominio Fc di IgG di coniglio (Nb-rbFc). I candidati della libreria VHH, e i corrispettivi Nbs ricombinanti, sono stati sequenziati, fatti esprimere nel sistema di espressione HEK6E e, successivamente, purificati.

Per ottenere uno screening sulla capacità dei candidati delle librerie di legare CD39, è stata eseguita una citometria a flusso. In particolare, ogni candidato è stato

incubato individualmente con cellule HEK trasfettate con CD39, e successivamente, dopo il lavaggio, sono stati aggiunti anticorpi secondari anti-IgG di coniglio coniugati con PE.

Utilizzando i risultati mostrati in figura 4A, sono state individuate sette famiglie diverse di nanobodies, che mostrano una maggiore intensità media della fluorescenza (MFI), sia rispetto al controllo che tra i candidati scartati; ciò dimostra un legame rilevabile e significativo con CD39 espresso sulla superficie cellulare.

La famiglia 1 è composta da tre candidati, SB24, SB27 e SB28, ottenuti mediante clonaggio diretto, e altri tre, SB130, SB131 e SB132, ottenuti mediante phage display. La famiglia 2 è, invece, composta da quattro candidati, SB126, SB127, SB128 e SB129, mentre la famiglia 7 da due: SB30 e SB32. Le famiglie dalla 3 alla 6 sono composte da un singolo membro, rispettivamente SB134, SB135, SB137, SB112. Questa suddivisione è stata determinata mediante lo studio della sequenza della regione CDR3, come si nota in figura 4B.

Successivamente, sono state determinate le velocità di dissociazione (off-rate) dei nanobodies selezionati, utilizzando la biolayer interferometry (BLI). Per questo esperimento sono stati utilizzati i Nbs in forma Nb-rbFc, per poter essere legati dalla proteina A fissata nei biosensori.

In figura 4C sono mostrate le costanti di dissociazione K_D dei candidati con il dominio ectocellulare CD39 umano ricombinante. Tutti i candidati della famiglia 1 mostrano buone proprietà di legame e, quindi, alta affinità al target; in particolare, i K_D dei candidati SB28, SB24 e SB131 risultano essere i più bassi, inferiori a 0.001. Al contrario, le famiglie 2-7 hanno velocità di legame iniziale maggiore.

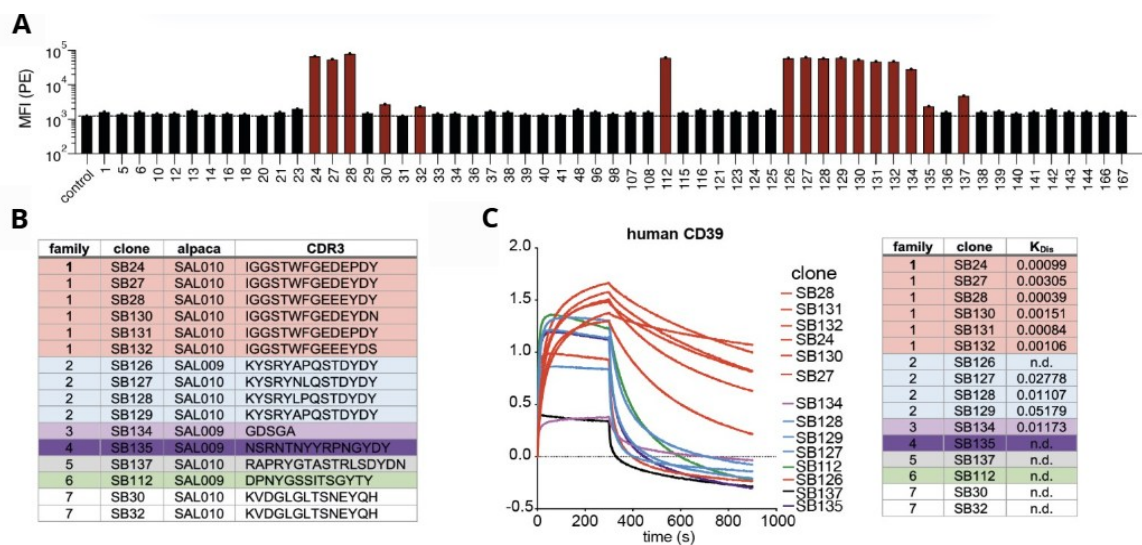


Figura 4. Adattata da Menzel et al. [13]. (A) Screening di nanobodies anti-CD39 tramite citometria a flusso. Le barre del barplot rappresentano l'intensità media di fluorescenza (MFI) dei rispettivi Nbs, in ascissa. Le sedici barre rosse segnalano

i candidati che dimostrano livelli di MFI significativamente più alti del controllo. (B) Raggruppamento delle famiglie di Nb in base alla regione CDR3. (C) Determinazione di K_D mediante analisi di interferometria BLI. I profili di legame sono mostrati sia come grafico, per mostrare l'affinità di legame nel tempo, sia in tabella, con le rispettive costanti di dissociazione.

2.3.2. Studio degli epitopi legati dai candidati mediante cross-blockade

Il saggio di cross-blockade è una tecnica di laboratorio utilizzata per caratterizzare gli epitopi legati dai candidati, e individuare i Nbs che riconoscono gli stessi epitopi. Gli autori hanno utilizzato due diversi nanobodies ingegnerizzati dello stesso VHH, Nb-human-IgG e Nb-rabbit-IgG hcAbs, permettendo la rilevazione di un solo tipo di Nb ricombinante tra i due, mediante flow cytometry. Inizialmente, sono state incubate cellule HEK sovraesprimenti CD39 con una soluzione di Nb-human-IgG (huNb, detecting Nb), e, dopo il lavaggio, il complesso cellula-Nb è stato incubato con una soluzione di Nb-rabbit-IgG (rb-Nb, blocking Nb), così che quest'ultimo potesse legare il target solo se il suo epitopo fosse stato diverso da quello di huNb. Infine, è stato aggiunto anti-rb-IgG coniugato con PE per marcare solo i Nbs con rb-IgG, e la sospensione cellulare è stata analizzata mediante citometria a flusso, i cui risultati sono mostrati nella figura 5A.

Nei dot plot di citometria a flusso, ogni punto rappresenta un singolo evento cellulare. La scala di fluorescenza sull'asse Y identifica la quantità di CD39 espresso sulle cellule, perché il plasmide usato per la trasfezione contiene anche GFP, espresso in modo proporzionale alla proteina target. L'asse X, invece, riflette la quantità di detecting Nb residuo legato ad ogni cellula, rilevato tramite la fluorescenza prodotta da anti-rb IgG coniugato con APC (si osserva discrepanza con i dati forniti nel testo, secondo cui PE era stato scelto come fluoroforo). Una popolazione spostata verso destra indica un elevato legame del detecting Nb, perciò, una popolazione che si concentra a sinistra del grafico indica una riduzione del segnale APC, e, quindi, che il nanobody utilizzato per il pre-incubamento ha impedito il legame del detecting Nb.

La figura 5B mostra gli stessi risultati della precedente, ma trasformando le differenze in percentuali, per una comprensione migliore, utilizzando la formula:

$$\%blockade = 100 \left(1 - \frac{MFI_{blocking\ Nb}}{MFI_{no\ blocking\ Nb}}\right).$$

La MFI massima di ogni candidato è stata ottenuta incubando il detecting Nb senza nessun blocking Nb. Come atteso, inoltre, la MFI ottenuta usando come blocking Nb il controllo, un Nb-hu non specifico per CD39, risulta essere vicina al valore massimo per ogni candidato. (da -3,7% a 8,1%).

Utilizzando lo stesso Nb come detecting e blocking Nb, si ottiene una diminuzione di MFI elevata, tra 52.9% e 86.3%. È invece più complessa la valutazione usando Nb di famiglie diverse: il candidato SB24, e quindi la famiglia 1, sembra legare un epitopo diverso rispetto alle altre famiglie, non rilevando, nei vari test con gli altri candidati, diminuzione significativa di MFI. I candidati delle altre quattro famiglie, invece, se confrontate fra di loro, mostrano una % di blockade elevata, suggerendo il riconoscimento dello stesso epitopo o di epitopi stericamente sovrapposti. In figura 5C si mostrano schematicamente i risultati dedotti.

Gli autori giustificano la bassa % di blockade ottenuta quando SB137 è utilizzato come blocking Nb, dal fatto che questa famiglia ha mostrato già bassa K_D , come si può vedere in figura 4C.

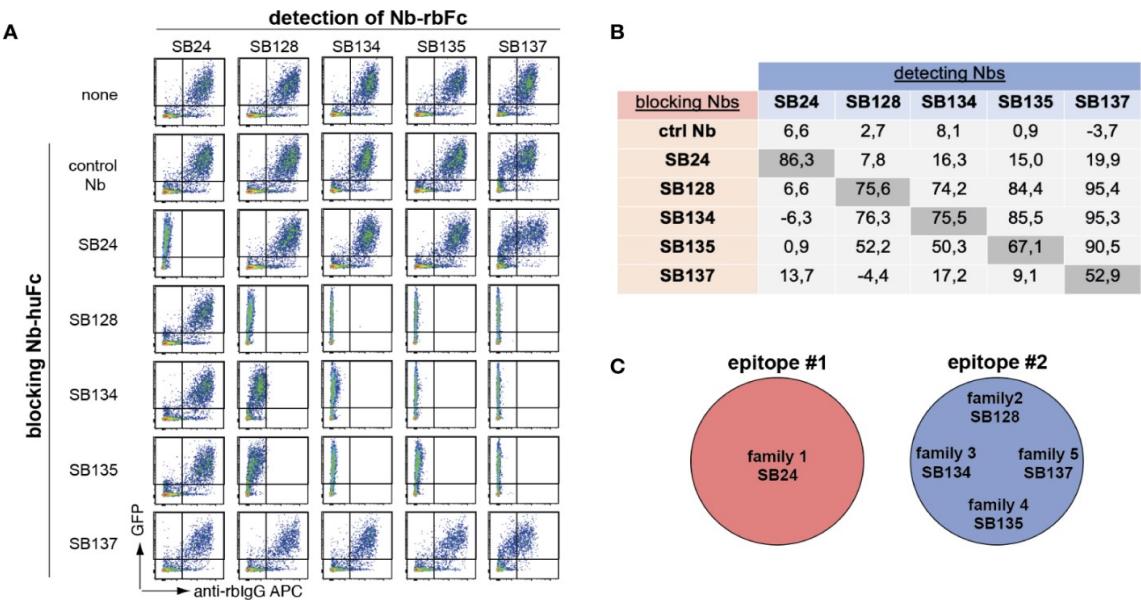


Figura 5. Adattata da Menzel et al. [13]. (A) Analisi mediante flow cytometry del saggio cross-blockade. (B) Confronto in tabella, per ogni combinazione di blocking e detecting Nbs, della capacità di blocco del legame dei blocking Nbs. (C) Rappresentazione schematica dei risultati dedotti.

2.3.3. Verifica della capacità dei Nb candidati di bloccare l'attività di CD39

Gli autori inizialmente hanno dimostrato, mediante saggio CellTiterGlo, che le cellule HEK sovraesprimenti CD39 degradano l'ATP extracellulare in modo dipendente dal numero di cellule nel campione, i cui risultati sono riportati in figura 6A. L'integrità dell'attività di CD39 permette di utilizzare queste cellule come modello per testare l'efficienza dei candidati nel bloccare l'attività ATPasica di CD39.

I candidati individuati al paragrafo 2.3.1. sono quindi stati sottoposti allo stesso saggio e condizioni precedenti, per valutare la loro abilità di inibire l'attività di CD39. Come si evince dalla figura 6B, tutti i membri della famiglia 1, a differenza delle altre famiglie valutate, hanno mostrato buone abilità di bloccare l'attività della proteina target; in particolare, SB24 si è dimostrato in grado di preservare pressoché integralmente i livelli di ATP, evidenziando la migliore capacità tra i candidati valutati.

Successivamente, è stato confrontato l'impatto sull'attività di CD39 in cellule trasfettate, utilizzando la forma monomerica di SB24, o quella dimerizzata, ottenuta legando due VHH allo stesso IgG di coniglio. Il saggio CellTiterGlo è stato ripetuto a diverse concentrazioni delle due forme di Nb e, perciò, la figura 6C, che mostra i risultati dell'esperimento, non è rappresentata con un bar plot, come in precedenza, ma con un grafico di curve dose-risposta. Il plateau dell'attività bloccante è osservato già a 2 $\mu\text{g/ml}$ nella forma dimerizzata, mentre tali livelli sono raggiunti in forma monomerica solo a concentrazioni pari a 130 $\mu\text{g/ml}$.

Dato che evidenze scientifiche dimostrano la presenza di CD39 nel TME anche in forma non legata alla membrana cellulare, ad esempio sulle vescicole extracellulari, oppure rilasciata tramite shedding, è stato verificato mediante saggio CellTiterGlo l'effettiva attività enzimatica di CD39 ricombinante. È stata poi valutata l'attività bloccante dei membri della famiglia 1 in forma monomerica, mediante saggio CellTiterGlo, di cui la figura 6D ne riassume i risultati. Infine, è stata confrontata la curva del candidato SB24, ottenuta dall'ultimo esperimento, con la sua versione dimerica; in figura 6E si può apprezzare la similitudine dei due tracciati. In questo contesto, SB24 dimostra potenza di blocco simile a SB24-Fc.

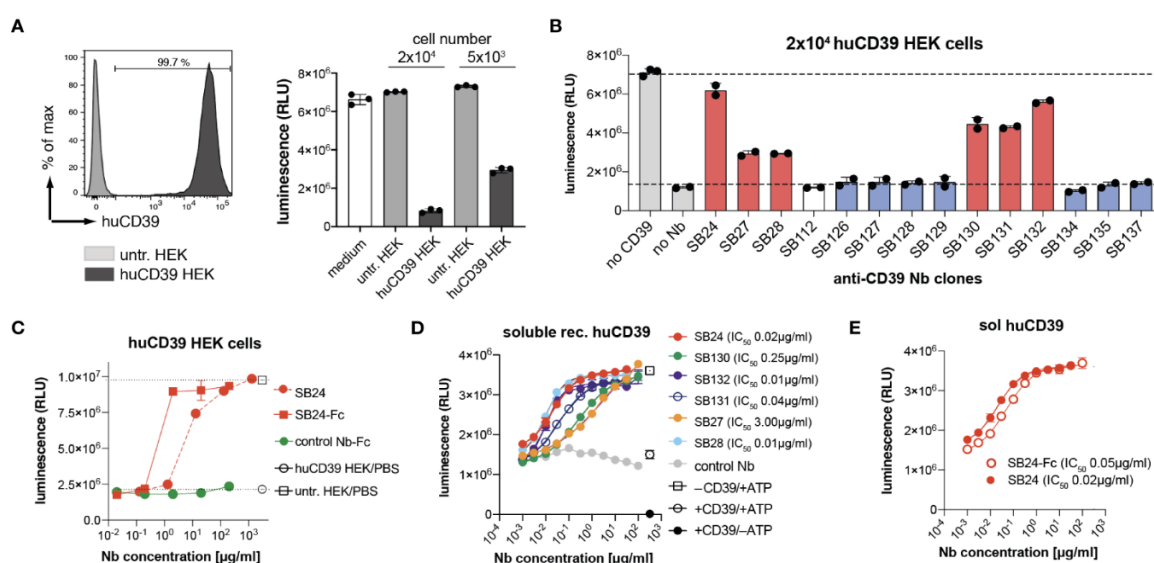


Figura 6. Adattata da Menzel et al. [13]. Misurazioni successive al saggio CellTiterGlo, per cui l'intensità rilevata è proporzionale alla concentrazione di

ATP residua. (A) L'istogramma a sinistra mostra che solo le cellule trasfettate risultano fluorescenti. Il grafico è stato ottenuto dopo l'incubazione delle cellule con anticorpi anti-CD39, e mediante flow cytometry. Il bar plot a destra mostra la luminescenza misurata dal saggio dopo che 2×10^4 e 5×10^3 cellule HEK trasfettate con CD39, e non, sono state incubate con $100 \mu\text{M}$ di ATP per 30 minuti. (B) Bar plot rappresentante la luminescenza dei campioni dopo che 2×10^4 cellule HEK trasfettate con CD39 sono state preincubate con una concentrazione saturante di nanobody, seguita dall'incubazione di ATP. I nanobody che riconoscono l'epitopo 1 sono indicati in rosso, mentre quelli che riconoscono l'epitopo 2 sono indicati in blu. (C) Confronto della capacità di bloccare l'attività di CD39 in cellule HEK trasfettate tra il nanobody monomerico SB24 e la forma dimerica SB24-Fc. (D) Risultati ottenuti dall'incubazione di nanobodies monomerici con CD39 umano ricombinante, e, successivamente, ATP. (E) Confronto della capacità del monomero SB24 e del costrutto dimerico SB24-Fc di bloccare l'attività di CD39 umano ricombinante. (C-E) Il grafico per costruire la curva dose-risposta mostra nell'asse y l'intensità luminescente, e nell'asse x la concentrazione di Nb.

2.3.4. Caratterizzazione delle proprietà di SB24 su cellule immunitarie

Per studiare le reali capacità dei nanobodies anti-CD39 in contesti sempre più realistici, sono state incubate cellule immunitarie umane (PBMCs) con SB24, SB128, o un anticorpo anti-CD39 monoclonale commerciale, come controllo. Lo studio ha compreso anche la caratterizzazione del campione di cellule mononucleate del sangue periferico umano, mediante incubazione di queste con un cocktail di anticorpi monoclonali coniugati a diversi fluorocromi, per identificare contemporaneamente diverse popolazioni cellulari, attraverso marcatori specifici, e ottenendo una valutazione multiparametrica. I risultati in figura 7A, a destra, ottenuti dopo citometria a flusso, mostrano pattern di legame simili tra i 3 anticorpi, dimostrando qualità comparabili tra nanobodies e anticorpi già in commercio, almeno come sonde per quantificare CD39 in diagnostica. Un altro risultato da precisare è l'espressione di CD39, che su neutrofili, monociti e cellule B è moderata, mentre è scarsa sulla superficie cellulare di T CD4⁺ e CD8⁺.

Nota l'abilità delle cellule PBMC di degradare ATP fino ad adenosina, è stato effettuato un saggio per determinare la quantità dei prodotti ottenuti dal substrato, in assenza e presenza di SB24. È stata utilizzata eATP, la cui molecola e i suoi derivati risultano fluorescenti; i risultati sono stati ottenuti mediante HPLC. Come mostrato in figura 7B, CD39 ricombinante degrada principalmente eATP in eADP, e, solo in minima parte, in eAMP; mentre, incubando anche SB24, l'idrolizzazione in entrambe le forme è completamente bloccata. La figura 7C mostra, invece, come eATP è quasi totalmente idrolizzata in presenza di cellule immunitarie, sia in eADP

che, soprattutto, in eAMP. In presenza di SB24, la maggior parte di eATP è preservata; tuttavia, si osserva una ridotta quantità di eADP presente.

Si può concludere che SB24 riduce in modo significativo l'attività enzimatica di CD39, sia sulla superficie cellulare che in forma solubile. Inoltre, la ridotta e quasi assente produzione di AMP extracellulare permette di ridurre il substrato disponibile di CD73, abbassando la concentrazione di adenosina.

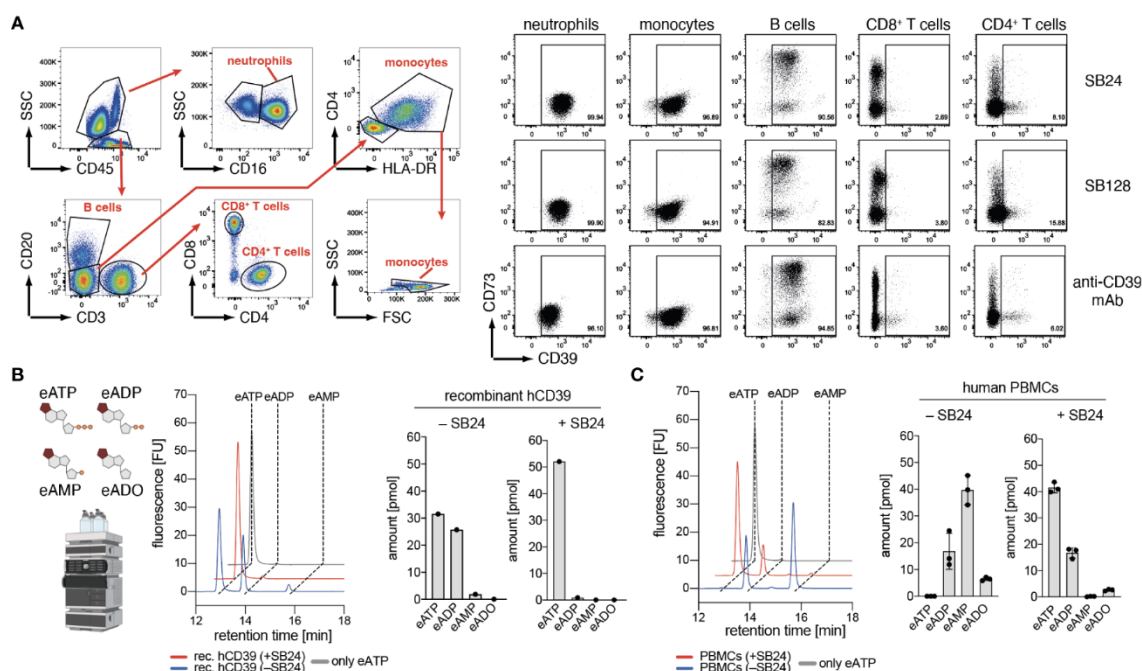


Figura 7. Adattata da Menzel et al. [13]. (A) A sinistra, si analizzano i risultati di citometria a flusso confrontando due proprietà alla volta, per identificare le componenti del campione di cellule PBMC. A destra è mostrato il confronto, mediante citometria a flusso, del legame tra le cellule PBMC e i Nb-hcAbs SB24 e SB128, e il controllo. Ogni grafico mostra in basso a destra la percentuale di cellule rilevate attraverso il legame con l'anticorpo. (B) Quantificazione mediante HPLC di eATP e dei suoi prodotti, dopo l'incubazione di CD39 ricombinante con o senza SB24 (100 μ g/ml), e successiva aggiunta di eATP (1 μ M). (C) Quantificazione mediante HPLC di eATP e dei suoi prodotti, dopo incubazione di PBMC umane attivate, con o senza SB24 (100 μ g/ml), e successiva aggiunta di eATP (1 μ M).

3. ANALISI CRITICA E CONCLUSIONI

Gli inibitori dei checkpoint immunitari (ICIs) hanno rivoluzionato il trattamento di diversi tumori grazie alla loro capacità di riattivare la risposta dei linfociti T contro le cellule neoplastiche. CD39 è un esempio di checkpoint immunitario, la cui sovraespressione in TME porta a una riduzione dell'infiammazione, e, quindi, a un migliore mimetismo della massa tumorale verso il sistema immunitario. Esistono già molecole terapeutiche in studio, come molecole a basso peso molecolare o anticorpi convenzionali, che testimoniano l'interesse verso questo target, oltre a fornire dati in vivo a supporto di un reale miglioramento della prognosi di tumori a seguito di terapie anti-CD39. [12]

I nanobodies rappresentano un'innovazione relativamente recente; tuttavia, le proprietà strutturali e funzionali di questo formato di anticorpi lo rendono una valida alternativa, in specifici contesti diagnostici e terapeutici, rispetto ad approcci più convenzionali.

Gli autori dell'articolo trattato hanno perciò generato una libreria di Nbs, a seguito dell'immunizzazione di due camelidi contro il target umano CD39, e caratterizzato i migliori candidati, gettando così le basi per una futura immunoterapia basata su antibodies anti-CD39, per inibire l'attività enzimatica del target nel TME.

Lo studio ha portato all'individuazione di sette famiglie di VHH, di cui la famiglia 1 lega l'epitopo 1, mentre le restanti legano l'epitopo 2. La famiglia 1 possiede i candidati con più alta K_D e migliore capacità di bloccare l'attività enzimatica del target, con SB24 come miglior membro; le altre famiglie non possiedono cloni con qualità così positive; perciò, non sono nemmeno stati mostrati completamente i loro risultati negli esperimenti finali.

In questo studio, inoltre, la forma monomerica di SB24 è stata confrontata con quella dimerica, fusa a un IgG di coniglio; SB24-Fc risulta bloccare più efficacemente l'idrolisi di ATP extracellulare di CD39 quando è legata alla cellula, mentre l'azione inibente delle due forme di Nb risulta simile se testata su CD39 ricombinante. Gli autori giustificano i risultati proponendo tre osservazioni. Nel caso del target in forma solubile, potrebbe presentare struttura proteica leggermente modificata e di conseguenza favorire l'inibizione della molecola; mentre, nel caso di target leganti le cellule, l'epitopo potrebbe trovarsi vicino alla membrana plasmatica, o nascosto da altre proteine, rendendo più difficile il legame. Un fattore che può favorire il legame tra CD39 legante la cellula e la struttura dimerica, tuttavia, è anche l'avidità. Può essere infatti che l'antigene in forma solubile interagisca con i nanobodies solo in modo monomerico, mentre, se presente sulla membrana cellulare, SB24-Fc possa avere un'interazione dimerica, e quindi una cinetica favorevole.

Seppure la ricerca rappresenti l'inizio di uno studio pionieristico, gli autori hanno mostrato chiare prospettive di sviluppo; il costrutto bivalente SB24-Fc è solo uno dei vari modi per migliorare le abilità dei VHH. Oltre alle proprietà peculiari dei nanobodies già citate, come ottima stabilità e penetrazione nei tessuti, è possibile fondere nanobodies tra loro, generando costrutti biparatopici che riconoscono epitopi diversi della stessa proteina, per esempio unendo SB24 con VHH di famiglie diverse, per migliorare affinità di legame e capacità modulatoria.

Tale versatilità dei nanobodies potrà aiutare anche in step successivi, per esempio, ottenendo molecole bispecifiche in grado di legare solo CD39 di cellule tumorali. Come è stato sottolineato al capitolo 1.2.3., l'antigene in studio non è specifico di ambienti patologici, ma, anzi, nelle cellule endoteliali, è una proteina fondamentale per permettere il corretto flusso sanguigno. Gli autori hanno evidenziato la possibilità di progettare un Nb ricombinante che possieda un VHH anti-CD39, e un VHH legante un antigene specifico dell'ambiente tumorale, per esempio, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Queste modifiche, tuttavia, aumentano le dimensioni del costrutto, oltre che renderlo più complesso, e possono far perdere al Nb finale le qualità che lo rendevano competitivo, come l'ottima penetrazione nei tessuti, stabilità e facile produzione. Gli autori dichiarano di voler ottenere un Nb di circa 30 kDa, che possa quindi conservare i vantaggi strutturali desiderati.

Si precisa, per una più completa descrizione del contesto terapeutico di CD39 come target, che i dati forniti da terapie già in studio su modelli murini o in trial clinici sottolineano come una strategia immunitaria basata solamente su molecole che inibiscono CD39 non è sufficiente per curare un tumore. Sembrano essere particolarmente efficaci solo quando usate in combinazione con altre terapie, come gli anticorpi anti-PD-1, gli antagonisti del recettore A2A dell'adenosina, o la chemioterapia.

In conclusione, questo articolo propone un'alternativa promettente per traghettare CD39 in contesti non fisiologici; tuttavia, questa prima pubblicazione risulta essere solo l'inizio di un lungo studio, rendendo impossibile determinare ora se terapie basate su nanobodies anti-CD39 possano ottenere prestazioni significativamente migliori rispetto alle attuali molecole terapeutiche in studio. SB24 ha dimostrato elevata affinità e inibizione dell'attività enzimatica di CD39 umano in vitro; negli studi successivi sarà necessario ingegnerizzare ulteriormente il Nb, o umanizzarlo, per migliorare le proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche richieste per la somministrazione.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. Nanobodies: A Review of Generation, Diagnostics and Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6):5994. doi:10.3390/ijms24065994
- [2] Muyldermans S. A guide to: generation and design of nanobodies. *FEBS Journal.* 2021;288(7):2084–2102. doi:10.1111/febs.15515
- [3] Rossotti MA, Bélanger K, Henry KA, Tanha J. Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. *FEBS J.* 2022;289(14):4304–4327. doi:10.1111/febs.15809
- [4] Li Z, Xu W, Kwok HF. Targeting CD39 as a therapeutic for cancer immunotherapy. *Expert Rev Mol Med.* 2026;28:e5. doi:10.1017/ERM.2026.10033
- [5] Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013;19(6):355–367. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005
- [6] Koppensteiner L, Mathieson L, Pattle S, Dorward DA, O'Connor R, Akram AR. *Location of CD39+ T cell subpopulations within tumors predict differential outcomes in non-small cell lung cancer.* *J Immunother Cancer.* 2023;11(8):e006770. doi:10.1136/jitc-2023-006770
- [7] Sartorius. *jetPEI® In Vitro DNA Transfection Reagent.* Disponibile su: <https://api.sartorius.com/document-hub/dam/download/282464/In-Vitro-DNA-Transfection-Reagent-jetPEI-Datasheet-en-Sartorius.pdf>
- [8] Eden T, Menzel S, Wesolowski J, Bergmann P, Nissen M, Dubberke G, et al. A cDNA immunization strategy to generate nanobodies against membrane proteins in native conformation. *Front Immunol.* 2017;8:1989. doi:10.3389/fimmu.2017.01989
- [9] Sartorius. *Octet® RED96e System.* Disponibile su: <https://www.sartorius.com/download/552460/octet-red96e-system-datasheet-en-sartorius-data.pdf>

- [10] Agilent Technologies. *What is High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)?*. Disponibile su:
<https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography/hplc-fundamentals>
- [11] Telford WG. Flow cytometry and cell sorting. *Front Med.* 2023;10:1287884. doi:10.3389/fmed.2023.1287884
- [12] Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. Blocking antibodies targeting the CD39/CD73 immunosuppressive pathway unleash immune responses in combination cancer therapies. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11):3407. doi:10.3390/cancers12113407
- [13] **Menzel S, Duan Y, Hambach J, Albrecht B, Wendt-Cousin D, Winzer R, Tolosa E, Rissiek A, Guse AH, Haag F, Magnus T, Koch-Nolte F, Rissiek B. Generation and characterization of antagonistic anti-human CD39 nanobodies. *Front Immunol.* 2024;15:1328306. doi:10.3389/fimmu.2024.1328306**

APPENDICE

Copia integrale dell'articolo originale [13], riportata per comodità di consultazione
ai sensi della licenza CC-BY con cui è pubblicato



OPEN ACCESS

EDITED BY

Luca Antonioli,
University of Pisa, Italy

REVIEWED BY

Carola Ledderose,
University of California, San Diego,
United States
Nicholas John Geraghty,
University of Wollongong, Australia
Houssam-eddin Khalaf,
Atomic Energy Commission of Syria, Syria

*CORRESPONDENCE

Björn Rissiek
✉ b.rissiek@uke.de
Stephan Menzel
✉ smenzel@uni-bonn.de

†These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

‡PRESENT ADDRESS

Yinghui Duan,
The First Affiliated Hospital of Soochow
University, Suzhou, China

RECEIVED 26 October 2023

ACCEPTED 13 March 2024

PUBLISHED 25 March 2024

CITATION

Menzel S, Duan Y, Hambach J, Albrecht B,
Wendt-Cousin D, Winzer R, Tolosa E,
Rissiek A, Guse AH, Haag F, Magnus T,
Koch-Nolte F and Rissiek B (2024) Generation
and characterization of antagonistic
anti-human CD39 nanobodies.
Front. Immunol. 15:1328306.
doi: 10.3389/fimmu.2024.1328306

COPYRIGHT

© 2024 Menzel, Duan, Hambach, Albrecht,
Wendt-Cousin, Winzer, Tolosa, Rissiek, Guse,
Haag, Magnus, Koch-Nolte and Rissiek. This is
an open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](#). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or reproduction
is permitted which does not comply with
these terms.

Generation and characterization of antagonistic anti-human CD39 nanobodies

Stephan Menzel^{1,2,3*†}, Yinghui Duan^{4†‡}, Julia Hambach¹,
Birte Albrecht¹, Dorte Wendt-Cousin¹, Riekje Winzer¹,
Eva Tolosa¹, Anne Rissiek^{1,5}, Andreas H. Guse⁶,
Friedrich Haag¹, Tim Magnus⁴, Friedrich Koch-Nolte¹
and Björn Rissiek^{4*}

¹Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany,

²Mildred Scheel Cancer Career Center HaTriCS4, University Medical Center Hamburg-Eppendorf,
Hamburg, Germany, ³Core Facility Nanobodies, University of Bonn, Bonn, Germany, ⁴Department of
Neurology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁵Cytometry und Cell
Sorting Core Unit, Dept. of Stem Cell Transplantation, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf,
Hamburg, Germany, ⁶Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, University Medical
Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

CD39 is the major enzyme controlling the levels of extracellular adenosine triphosphate (ATP) via the stepwise hydrolysis of ATP to adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP). As extracellular ATP is a strong promoter of inflammation, monoclonal antibodies (mAbs) blocking CD39 are utilized therapeutically in the field of immune-oncology. Though anti-CD39 mAbs are highly specific for their target, they lack deep penetration into the dense tissue of solid tumors, due to their large size. To overcome this limitation, we generated and characterized nanobodies that targeted and blocked human CD39. From cDNA-immunized alpacas we selected 16 clones from seven nanobody families that bind to two distinct epitopes of human CD39. Among these, clone SB24 inhibited the enzymatic activity of CD39. Of note, SB24 blocked ATP degradation by both soluble and cell surface CD39 as a 15kD monomeric nanobody. Dimerization via fusion to an immunoglobulin Fc portion further increased the blocking potency of SB24 on CD39-transfected HEK cells. Finally, we confirmed the CD39 blocking properties of SB24 on human PBMCs. In summary, SB24 provides a new small biological antagonist of human CD39 with potential application in cancer therapy.

KEYWORDS

nanobody, CD39, ENTPD1, VHH, single-domain antibody

1 Introduction

Upon tissue damage and inflammation, adenosine triphosphate (ATP) is released into the extracellular space, where it acts as proinflammatory mediator (1). Extracellular ATP serves as ligand for members of the purinergic P2X receptor family (P2X1-P2X7). In particular, P2X7 is known for its role in inflammation and the release of mature interleukin-1 beta (IL-1b) (2). The amount of extracellular ATP is tightly regulated by extracellular enzymes such as the ecto-nucleotidase CD39. Structurally, human CD39 consists of 510 amino acids (aa), starting with a 16aa intracellular N-terminus, followed by a 21aa transmembrane domain, a 441aa large extracellular domain, containing the enzymatically active site, a second 21aa transmembrane domain and an 11aa intracellular C-terminus. CD39 is expressed on the surface of cells from various tissues, including blood vessel endothelial cells, platelets, cells of the innate and adaptive immune system and various tumor tissues (3, 4). CD39 converts extracellular ATP to adenosine diphosphate (ADP) and can further hydrolyze ADP to adenosine monophosphate (AMP). CD73, another ecto-nucleotidase, further converts AMP to adenosine, which can exert anti-inflammatory effects via P1 receptors, such as the A2a receptor, on immune cells (5). Therefore, the abundance and activity of CD39 and CD73 control the balance of pro-inflammatory ATP versus anti-inflammatory adenosine. It has become clear that manipulation of the CD39/CD73 axis can impact the course and/or outcome of several pathophysiological events, such as autoimmune diseases, infections, ischemia-reperfusion injuries, and cancer (3). In particular, blocking the enzymatic activity of CD39 in the setting of cancer is considered a promising approach to boost anti-cancer immunity (6–8). Small molecule inhibitors of CD39, such as ARL67156, as well as antagonistic anti-CD39 antibodies have been developed (8–12). Clinical trials using anti-CD39 mAbs TTX-030 (NCT04306900, NCT06119217) and ES002023 (NCT05075564) in cancer therapy are ongoing (www.clinicaltrials.gov).

Therapeutic antibodies represent the spearhead of modern immunomodulatory therapy for treating autoimmune diseases and cancer. As biologicals, therapeutic antibodies exhibit good pharmacological properties and are highly specific to their target. Yet, due to their large size of approximately 150 kDa, tissue penetration by conventional therapeutic antibodies is rather poor, making it difficult e.g. to reach their target antigen deep within a solid tumor. As conventional antibodies bind their cognate antigen via the variable domain of the light- (VL) and the heavy-chain (VH), the ground breaking discovery of heavy-chain-only antibodies (hcAbs) in camelids by the group of Raymund Hamers (13) paved the way for the engineering of novel small single-domain antibodies. These, 15 kDa small antigen-binding variable domains of the heavy-chain of heavy-chain-only antibodies (termed VHH or nanobodies) can be obtained from immunized camelids such as llamas or alpacas. Using phage display technology, the amino acid sequence of antigen-binding nanobodies can be determined, and nanobodies can be recombinantly produced e.g. in eukaryotic cells via transfection with a nanobody-encoding plasmid. Due to their small size of 15 kDa, nanobodies exhibit better tissue penetration than conventional antibodies (14). However, their small size leads also to the rapid renal excretion after *in vivo* application.

To overcome this, Fc-nanobody fusion proteins or trimeric constructs containing an anti-albumin nanobody combined with two target-specific nanobodies have been generated (15). Further, in comparison to conventional antibodies, nanobodies have a longer complementary determining region three (CDR3), which allows them to bind epitopes in deep molecular pockets (16, 17). This feature makes them well suited for targeting and inhibiting enzymes in the extracellular space or on the cell surface (18).

Here, we report the identification and characterization of CD39-specific nanobodies from cDNA-immunized alpacas. Among the identified CD39-specific binders, clone SB24 showed potent CD39-antagonizing properties.

2 Methods

2.1 Immunization of alpacas

Two alpacas were immunized by gene gun with gold particles conjugated with huCD39-pCMVSPORT6 essentially as described previously (19–21). The immunization procedure was repeated on days 21, 42, and 64. On day 85, a final protein boost was performed with human CD39-transfected HEK293-T cells. Peripheral blood was drawn on days 70 and 91 and RNA was prepared from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The immunization procedure was performed by Eurogentech (Belgium) according to approved local and national animal ethics protocols.

2.2 Generation of human CD39 stably transfected HEK cells

HEK293-T cells were cultured in a T75 cell culture flask and were transfected when cell confluence reached 70%–80%. Transfection was performed with 5 µg linearized and 5 µg circular huCD39-pCMVSPORT6 plasmid using JetPEI (Polyplus) according to the manufacturer's protocol. After two days, cells were harvested and stained with anti-human CD39 (clone A1, BioLegend) monoclonal antibody for cell-sorting (FACS Aria-IIIu Sorter, BD Biosciences). The fraction of cells highly expressing CD39 was isolated and the sorting procedure was repeated four times until more than 95% HEK293-T cells showed a stable high expression of human CD39.

2.3 Immunofluorescence staining using alpaca immune serum

CHO cells were cultured in a T75 cell culture flask and were passaged onto a 96 well plate before transfection. Transient transfection of CHO cells was performed using polyethylimidine (Sigma) and 10 µg of the huCD39-pCMVSPORT6 plasmid as per manufacturer's instructions. 24h after transfection, CHO cells were gently washed once with warm phosphate-buffered saline (PBS) and were incubated for 10 min in PBS containing 2% paraformaldehyde. Cells were washed with 200 µl PBS containing 0.02% sodium azide

and incubated for 60 min at 4°C with alpaca immune serum diluted 1:600 in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS). Cells were washed twice with PBS and incubated for 20 min at RT with PE-conjugated anti-llama IgG (Abcam, ab72485) (diluted 1:200 in DMEM/FCS). Cells were washed twice with PBS and analyzed with an EVOS fluorescence microscope (Thermo Fisher Scientific) equipped with a digital camera.

2.4 Phage display

The VHH immune repertoire was PCR-amplified from cDNA obtained by reverse transcription of PBMC RNA. During the PCR amplification, SfiI and NotI restriction sites were introduced to the end of each VHH sequence. The VHH repertoire and phagemid pHEN2 were digested by SfiI and NotI restriction enzymes (NEB) and ligated by T4 ligase (NEB). Ligation products were used to transform TG1 cells (Lucigen), which were plated on LB agar containing carbenicillin (Thermo Fisher) at a final concentration of 100 mg/ml. Colonies on agar plates were scraped and incubated in 2×YT medium (containing carbenicillin + 20% glycerol + 2% glucose) at room temperature for 1 h. Bacterial cells were pelleted by centrifugation at 4600 rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf) at 4°C for 10 min. The cells were resuspended with 2×YT medium containing 20% glycerol, and stored at -80°C as bacterial library. The bacterial library was inoculated and cultured in 2×YT medium (containing carbenicillin + 2% glucose) at 37°C until OD600 reached 0.5. Bacteria were superinfected with M13K07 helper phage (BioLab) and incubated for 30 min at 37°C and 150 rpm shaking. The cultures were centrifuged for 10 min at 4°C and 4600 rpm. The bacteria pellet was resuspended in 2×YT medium containing carbenicillin and kanamycin in order to select TG1 cells co-transfected with phagemid and helper phage. Phages were produced and released into the medium during 6 h of incubation at 28°C and 220 rpm shaking. The cultures were centrifuged for 10 min at 4°C and 4600 rpm, the supernatant was added to pre-chilled PEG/NaCl buffer (Merck) and incubated on ice overnight. Phages were pelleted through centrifugation for 10 min at 4°C and 4600 rpm. The phage pellet was resuspended in 1x PBS (Gibco) and transferred into a new 1.5 ml tube with PEG/NaCl buffer. This tube was centrifuged for 5 min at 4°C and 13,000 rpm, and the supernatant was transferred to a new 1.5 ml tube with PEG/NaCl buffer. The centrifugation and transfer steps of the 1.5 ml tube were repeated 4-5 times until no pellet was visible. The purified phage library was obtained and stored at 4°C.

For panning, the phage library was incubated in blocking buffer [DMEM (1x) + GlutaMax (Gibco) + 10% FCS (Sigma) + 1% BSA (Sigma)] in a falcon tube for 1h at room temperature to minimize non-specific binding to polystyrene. Subsequently, the phage library was mixed with untransfected HEK293-T cell suspension and incubated for 1h at 4°C to remove non-specific binding to surface proteins on HEK293-T cells. The cell suspension was centrifuged for 10 min at 4°C and 4600rpm and the supernatant was added to human CD39 transfected HEK293-T cell suspension and incubated for 1h at room temperature on a vibration shaker. Then, the cell suspension was centrifuged for 10 min at 4°C and 4600rpm, to

harvest the phage-bound CD39-transfected HEK cells. The cell pellet was washed 15-20 times with blocking buffer and finally resuspended in 1x PBS. HEK cell suspension was centrifuged at 4°C and 2500 rpm for 5 min and resuspended in 1x trypsin (Gibco) to eluted phages from the HEK cells. After 15 min incubation at room temperature, the phage suspension was added to a new 1.5ml tube pre-coated with AEBSF (100mM, Merck). The phage containing supernatant was centrifuged at 13000 rpm and 4°C for 5min.

After panning, the eluted phages were used to transfect TG1 cells. Transfected TG1 cells were plated on 2×YT agar containing carbenicillin and 2% glucose and incubated overnight at 37°C. Single colonies on plate were taken to extract plasmid (Miniprep Kit, Qiagen) and sequenced with primer LMB3 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Eurofins). All colonies were scraped and further stored in 2×YT medium, 20% glycerol at -80°C as enriched bacterial library.

2.5 Recombinant production of nanobodies

VHH sequences were PCR-amplified from individual phagemid pHEN2, adding PciI and NotI restriction sites to 5' and 3' ends, respectively. VHH sequences were digested with PciI and NotI restriction enzymes (NEB) for 2 h at 37°C. The pCSE2.5_HIS expression vector and pCSE2.5_Fc expression vector (kindly provided by Thomas Schirrmann, Braunschweig, Germany (22), containing the coding sequence for six histidine and the Fc domain of rabbit or human IgG downstream of a NotI restriction site respectively (20), were digested with NcoI and NotI restriction enzymes (NEB). NcoI and PciI enzymes are isocaudomers and generate compatible overhangs. The digested VHH fragments were ligated with pCSE2.5_HIS and pCSE2.5_Fc vector backbone for 6His-tagged Nb monomer and Fc-Nb fusion protein production respectively, and the ligation products were used to transform XL1 blue E. coli for recombinant plasmid purification (Miniprep Kit, Qiagen).

To produce recombinant VHH- rabbit IgG hcAbs (Nb-rbFc) or monomeric His-tagged nanobodies, purified recombinant plasmid was used to transfect HEK293-6E cells using JetPEI. One day after transfection, feeding medium [FreeStyle™ 293 Expression Medium (Gibco) + 20% tryptone (Difco)] was added. Five days later, cell suspension was centrifuged for 10 min at 4600 rpm and 4°C and the supernatant containing Nb-rbFc was harvested and filtered with a Steriflip (Merck). Nb-rbFc were purified by Protein A affinity chromatography and monomeric His-tagged nanobodies were purified by immobilized metal ion affinity chromatography using Ni-NTA sepharose.

2.6 Octet Red96 off-rate screening

Off-rate screening of nanobodies were performed using an Octet Red96 (ForteBio). Supernatants containing Nb-rbFc were bound to Protein A Biosensors (ForteBio) and incubated first in assay buffer for 120 s. Loaded biosensors were then incubated with recombinantly produced CD39 ectodomains at 50 ng/μl. Binding

responses were monitored for 300 s (association) followed by 600 s incubation with assay buffer (dissociation). Protein A biosensors were regenerated by Glycin pH 2.5 and neutralized by assay buffer, before biosensors were again loaded using supernatants containing Nb-rbFc. Visualization and calculation of dissociation constants (K_D) were performed using Prism (Graphpad).

2.7 CellTiterGlo assay

Human CD39 stably transfected HEK293-T cells or recombinantly produced human CD39 ectodomains were preincubated with either Nb-rbFc containing supernatants (for screening) or purified nanobodies of indicated concentrations for 30 min at RT. ATP was added to a final concentration of 50 – 100 μ M and the mixture was incubated at room temperature for 30 min. The plate was centrifuged for 5 min at 4°C and 1410 rpm and 50 μ l supernatant was transferred to a new white polystyrene 96-well plate. Subsequently, 50 μ l CTG reagent (CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay Kit, Promega) was added per well. After 10 min, luminescence was measured on a luminometer (Perkin Elmer). When performing functional assay human CD39 specific Nbs, 140 μ l human CD39 transfected HEK293-T cell suspension were incubated with 10 μ l nanobody supernatant on ice for 30 min before adding ATP.

2.8 High-performance liquid chromatography measurements

The blocking capacity of SB24 on the ATPase activity of recombinant human CD39 or CD39-expressing cells was analyzed by assessing its effect on the degradation of 1, N^6 -etheno-ATP (eATP). For this, 0.2×10^6 PBMCs (stimulated for six days with 0.5 μ g/mL α CD3 to increase CD39 expression on T cells) or 15 ng recombinant human CD39 were incubated with SB24 hIgG LALAPG (100 μ g/mL) for 15 min at 37°C. 1 μ M eATP was added to the samples and incubated further for 30 min (37°C). After the incubation, cells were removed (450 $\times$ g, 5 min, 4°C), and all samples were passed through 10 kDa size exclusion filters (10,000 $\times$ g, 10 min, 4°C, Pall Corporation), and stored at -20°C until HPLC analysis. The analysis was performed by reversed-phase HPLC on a 1260 Infinity II system (Agilent Technologies). To quantify nucleotides in the sample, different amounts of etheno-nucleotides (Biolog) were measured. The separation was performed on a 250 mm $\times$ 4.6 mm Luna C8 column (Phenomenex). The mobile phase was composed of HPLC buffer A (20 mM KH_2PO_4 , pH 6.0) and HPLC buffer B (50% buffer A and 50% methanol) with the following gradient: 0.0 min (0.0% buffer B), 5.0 min (0.0% buffer B), 27.5 min (100.0% buffer B), 30.0 min (100.0% buffer B), 32.0 min (0.0% buffer B), 43.0 min (0.0% buffer B). The injection volume was 100 μ L and the flow rate was 0.8 mL/min. The temperature of the column compartment was 20°C and the autosampler was kept at 10°C. The signals were detected by the fluorescence detector (excitation 275 nm and emission 410 nm) of the system. Peak integration was performed using OpenLab CDS software (Agilent Technologies).

2.9 Human material

For analysis of leukocytes, we used whole blood samples from healthy volunteer visiting the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE) or buffy coats from the Blood Bank at the UKE. All procedures for collection were approved by the local ethics committee (Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg, PV5139 for samples from healthy donors) and informed consent was obtained from all donors or legal representatives.

2.10 Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood or buffy coats by gradient centrifugation using Biocoll as per manufacturer's instructions (Biochrom, Germany, Berlin).

2.11 Flow cytometric analyses

Human CD39 stably transfected HEK293-T cells were resuspended in FACS buffer and incubated with individual Nb-rbFc at 4°C for 30 min. Cells were washed and stained with APC-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody (BioLegend) at 4°C for 30 min. For staining of human primary leukocytes, peripheral blood (100 μ l) was incubated with an antibody cocktail of fluorochrome-conjugated mAbs for 30 min, and indicated AlexaFluor647-conjugated anti-CD39 Nbs were added separately. This was followed by erythrocyte lysis with 1 ml of Lysing Solution for 10 min followed by two washing steps with PBS. After washing, the cell suspension was measured on FACS Celesta Flow Cytometer (BD Biosciences) and the results were analyzed with FlowJo v10 (BD Biosciences). For staining, the following monoclonal antibodies (mAbs) were used: anti-CD8 BV421, anti-CD45 BV510, anti-CD3 BV605 anti-CD56 BV650, anti-HLA-DR BV785, anti-CD16 AlexaFluor488, anti-CD73 PE, anti-CD14 PerCPCy5.5, anti-CD39 PECy7, anti-CD20 AlexaFluor700, CD4 APC-Cy7, anti-CD39 Nb-hcAbs in AlexaFluor647.

3 Results

3.1 Isolation of CD39-specific nanobodies

VHH domains of camelid heavy-chain antibodies often bind to molecular cavities, e.g. the active site of an enzyme (23). In order to generate a biological inhibitor of the human ecto-enzyme CD39 we immunized two alpacas. As CD39 is a double-span transmembrane protein we used a cDNA immunization strategy (Figure 1A) by gene gun for priming on day 1 and boosting on days 21, 42 and 64 (21). Blood was taken on day 70 and was analyzed for the presence of CD39-specific antibodies. Indeed, fluorescence microscopy analyses on CD39-transfected HEK cells revealed that both alpacas had CD39-specific antibodies in their serum (Figure 1B).

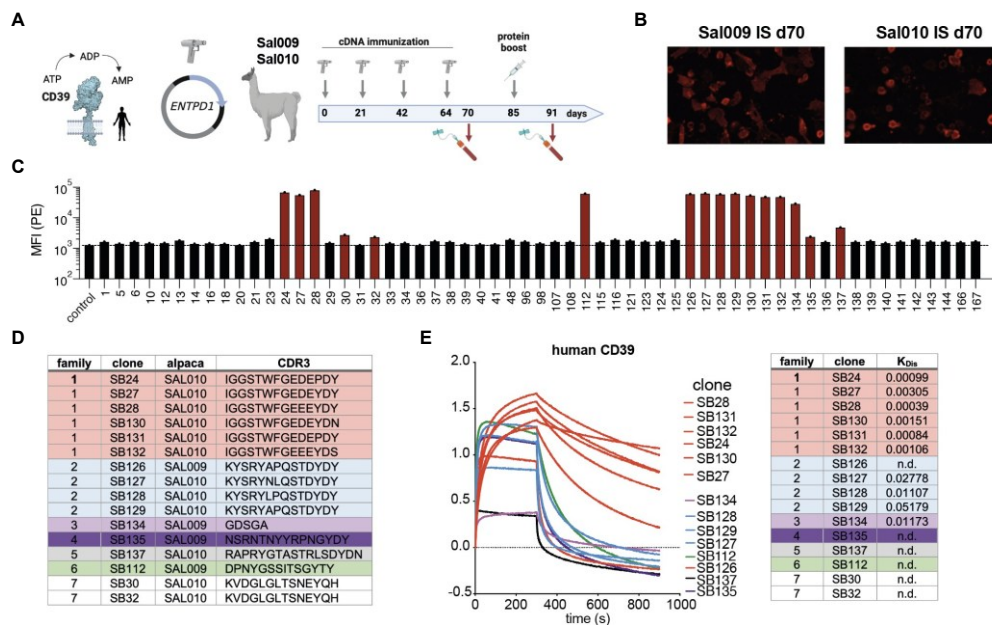


FIGURE 1

Nanobody discovery campaign results in seven different families with different binding modalities. (A) CD39 is an ecto-enzyme that degrades extracellular ATP into ADP and AMP. Two alpacas (SAL009 and SAL010) were immunized by cDNA immunization and a final boost with transfected HEK cells. (B) Immune serum obtained at d70 from both alpacas contain antibodies binding to huCD39-transfected HEK cells, as shown by immunofluorescence staining on huCD39 expressing cells. (C) Screening for CD39-specific nanobodies by binding to CD39 transfected HEK cells by flow cytometry. Nb-rabbit IgG hcAbs were incubated with huCD39 HEK cells and bound hcAbs were detected by PE-conjugated anti-rabbit-IgG secondary antibodies. (D) Grouping of Nb families according to the CDR3 region. (E) Binding profiles of selected nanobodies to recombinant human CD39 and K_D determination using biolayer interferometry analyses. The data shown in (C, E) are results from one out of two independently

A final boost was performed by injection of CD39-transfected HEK cells on day 85. We next isolated mRNA from the peripheral blood cells obtained from the final bleeding of the immunized alpaca at day 91, generated cDNA and PCR-amplified the VHH encoding regions. These were cloned into the pHEN2 phagemid vector in order to perform phage display. In parallel to phage display screening, we cloned the VHH library in the pCSE vector in front of the hinge, CH2 and CH3 domains of rabbit IgG to directly clone and produce Nb-rb IgG heavy-chain antibodies (Nb-hcAbs) in the HEK6E expression system. Candidates obtained from direct cloning and phage display screening were sequenced and expressed as Nb-hcAbs, incubated with CD39 transfected HEK cells and bound Nb-hcAbs were detected by anti-rabbit-IgG PE-conjugated polyclonal F(ab)₂ fragments using flow cytometry (Figure 1C). We identified three members of one VHH family (family 1) comprising the clones SB24, SB27 and SB28 by direct cloning. Phage display screening allowed the isolation of additional CD39-specific clones. Here, we identified three more members of family 1 (SB130, SB131 and SB132) and six additional CD39-specific nanobody families: family 2 comprising clones SB126, SB127, SB128 and SB129, families 3-6 represent four single clone families (SB134, SB 135, SB137, SB112) and family 7 containing the clones SB30 and SB32 (Figure 1D). These clones showed moderate to strong signals in flow cytometry. We next determined the off-rates of selected Nbs using Biolayer Interferometry. For this, Nb-hcAbs were bound to protein A biosensors and the dissociation constant K_{Dis} of recombinant human CD39 ectodomain was measured. Here, Nbs of family 1

demonstrated good binding properties, with SB28, SB24 and SB131 exhibiting off-rates (K_D) below 0.001. In contrast, members of families 2-7 exhibited faster off-rates between 0.01 and 0.05 (Figure 1E). In summary, of seven Nb families selected from two alpacas immunized with human CD39, members of family 1 exhibited the best binding properties towards huCD39.

3.2 The selected CD39-specific nanobodies bind to two distinct epitopes on CD39

We next performed cross-blockade experiments to map the binding epitopes of the different nanobody families. For this we selected one member each of families 1-5 and expressed them as Nb-human-IgG and Nb-rabbit-IgG hcAbs. CD39-transfected HEK cells were incubated with individual Nb-hu IgG hcAbs to occupy their binding epitope. Cells were then washed and incubated with Nb-rb IgG hcAbs and bound hcAbs were measured using PE-conjugated anti-rb-IgG F(ab)₂ fragments and flow cytometry (Figure 2A). We quantified the extent of epitope blockade by calculating the ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) of the detecting nanobody in the presence or absence of the blocking anti-CD39 Nb. As expected, pre-incubation with a control Nb-hu hcAb did not substantially affect binding of the Nb-rb hcAb (epitope blockade between -3.7 and +8.1%) (Figure 2B). Further, preincubation and detection with the same clone led to a

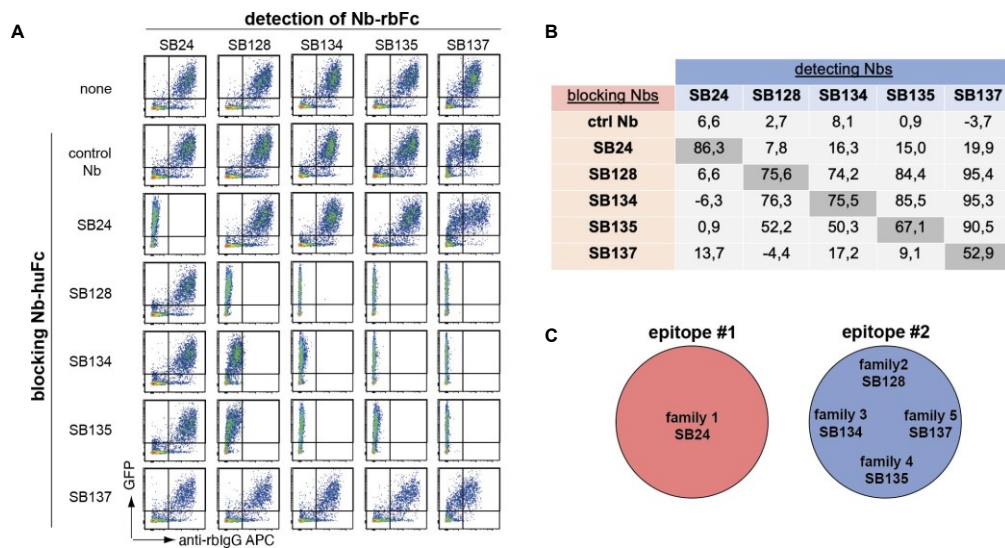


FIGURE 2

Epitope mapping of human CD39-specific nanobodies reveals coverage of two different epitopes. (A) HEK cells co-transfected with GFP and human CD39 were preincubated with anti-human CD39 nanobodies fused to the Fc region of human IgG (Nb-huFc), washed and incubated with anti-human CD39 nanobodies fused to the Fc region of rabbit IgG (Nb-rbFc). Binding of anti-human CD39 Nb-rbFc was detected via APC-conjugated anti-rabbit-IgG F(ab)₂ fragments using flow cytometry. (B) Cross-blockade capacity was calculated as ratio of APC MFI in the presence of a blocking Nb to the APC MFI in the absence of a blocking Nb x 100 (0 = no blockade, 100 = full blockade, negative value = enhanced binding of the detection Nb in the presence of the first Nb). (C) Definition of two binding epitopes of anti-huCD39 Nbs. The data shown in (A, B) are results from one out of

pronounced blockade of binding of the respective Nb-rb hcAb (epitope blockade between 52.9 and 86.3%). Blocking with SB24 of family 1 did not substantially affect binding of the tested members of families 2-5. In contrast, blocking with SB128 of family 2 blocked binding of SB134, SB135 and SB137 of family 3-5 and vice versa, suggesting that family 1 binds a distinct epitope compared to families 2-5, which seem to share a common epitope (Figure 2C). Insufficient blockade using SB137 hu hcAb is likely attributed to the low affinity of SB137 (see Figure 1E).

3.3 Clone SB24 is a potent antagonist of human CD39

In order to evaluate the ability of the selected nanobodies to block CD39 enzymatic activity, we first established a HEK cell line that stably overexpresses human CD39. These cells were then tested for their ability to degrade extracellular ATP. For this we utilized the luciferase-based CellTiterGlo assay that generates luminescence dependent on the amount of extracellular ATP. We incubated 2×10^4 and 5×10^3 CD39-transfected HEK cells with 100 μ M ATP and measured luminescence after 30 min of incubation. As controls, we incubated untransfected HEK cells or medium without cells with 100 μ M ATP. The results show that ATP levels were reduced in a cell number dependent manner by CD39 expressing HEK cells but not by untransfected HEK cells (Figure 3A). Next, we pre-incubated huCD39 HEK cells with Nb-hcAbs, added 100 μ M ATP and measured luminescence after 30 min. All six members of family 1 that target epitope one (red) antagonize CD39 enzymatic activity, with SB24 reaching almost full blockade (Figure 3B). All other tested

clones of families 2-6 did not reduce the ATP-hydrolyzing enzymatic activity of CD39-transfected HEK cells. We next compared the impact of dimerization on the capacity of SB24 to block CD39 enzyme activity. For this we pre-incubated huCD39 HEK cells with increasing amounts of SB24 as monomeric nanobody or as dimeric Nb-rabbit IgG hcAbs (Figure 3C). The results show that dimerization increases the blocking capacity of SB24, reaching maximum blocking capacity at 2 μ g/ml. Comparable results were obtained when using 130 μ g/ml of the SB24 monomer. CD39 can also occur in a non-cell-bound form, e.g. on tumor or regulatory T cell derived extracellular vesicles (24, 25) and by phosphodiesterase 3-induced shedding (26). Therefore, we next analyzed the ability of the selected nanobodies to block the enzymatic activity of recombinant human CD39. First, we confirmed that recombinantly expressed CD39 was enzymatically active, as it reduced the ATP-dependent luminescence when compared to samples that contained only ATP (Figure 3D). We next incubated recombinant CD39 with increasing concentrations of family 1 nanobodies before adding ATP. Here, we observed a potent blockade of soluble huCD39 by SB24, SB28, SB131 and SB132 with an IC₅₀ of 0.01 - 0.04 μ g/ml. SB27 and SB130 showed a slightly reduced blocking potency with IC₅₀ values of 0.25 - 3 μ g/ml. Interestingly, dimeric SB24 rabbit IgG hcAb had a similar blocking potency toward recombinant CD39 as the SB24 monomer (Figure 3E).

3.4 SB24 binds to human immune cells and inhibits ATP degradation by PBMCs

CD39 is expressed on a variety of human immune cells. Therefore, we tested binding of fluorochrome-conjugated-

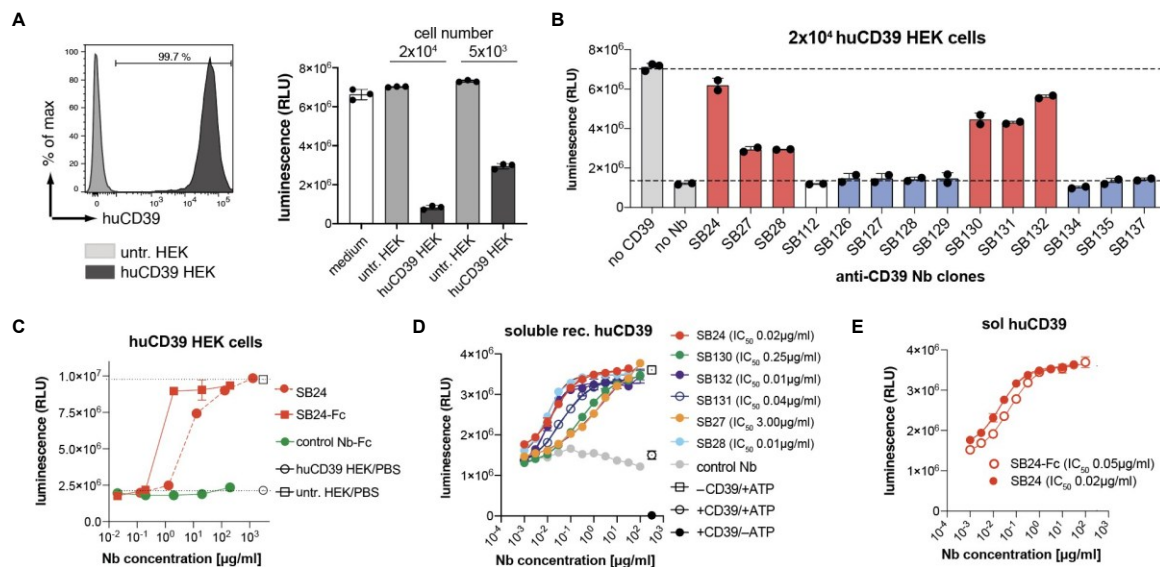


FIGURE 3

Nanobodies from family 1 are potent CD39 antagonists. (A) CD39 stably expressing HEK cells (20,000 or 5,000) were incubated with 100 μM ATP for 30 min. ATP derived luminescence after incubation was measured using the CellTiter-Glo assay. (B) 20,000 CD39-transfected HEK cells were preincubated with a saturating concentration of Nb-rabbit IgG hAb, followed by incubation with 100 μM ATP for 30 min. ATP levels after incubation were analyzed by CellTiter-Glo. Nbs binding epitope 1 are shown in red, Nbs binding epitope 2 are shown in blue. (C) Comparison of the capacity of monomeric SB24 and dimeric SB24 rb hAb (SB24-Fc) to block CD39 on HEK cells using the CellTiter-Glo assay. (D) Monomeric Nbs were incubated with recombinant human CD39. ATP was added and ATP degradation as measured via CellTiter-Glo assay. (E) Comparison of the capacity of SB24 monomer and dimeric SB24 rb hAb (SB24-Fc) to block recombinant human CD39 using the CellTiter-Glo assay. The data shown in (A–E)

conjugated Nb-rb hAbs SB24 (family 1) and SB128 (family 2) to primary human immune cells from peripheral blood by flow cytometry, using a commercially available monoclonal antibody (mAb) against human CD39 as control. The results show moderate expression of CD39 by neutrophils, monocytes and B cells but little if any expression by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Overall, the binding pattern of SB24-hcAb, SB128-hcAb and the anti-CD39 mAb were comparable, demonstrating that both Nb-hcAbs are alternatives to probe CD39 expression by flow cytometry analyses (Figure 4A). As CD39 can generate both, ADP and AMP from ATP, we next analyzed the impact of SB24 on the generation of both breakdown products. For this we used the fluorescent ATP analog etheno-ATP (eATP), which can be degraded by human CD39 into eADP, eAMP and, in the presence of CD73, further to etheno-adenosine (eADO). The amount of these etheno-adenine nucleotides can be quantified using high performance liquid chromatography (HPLC) (Figure 4B). We first tested the impact of SB24 on the enzymatic activity of soluble recombinant huCD39. Here, we observed that soluble huCD39 mainly degrades eATP to eADP, while producing only minimal amounts of eAMP. The production of both products was completely blocked in the presence of SB24. Finally, we investigated SB24-mediated blockade of ATP-degradation by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (Figure 4C). In the absence of SB24, PBMCs converted almost all eATP to eADP and, to a large extent, also to eAMP. In the presence of SB24 most of the eATP was preserved and only a small amount of eADP was generated. Of note, no eAMP was generated in the presence of SB24. In summary, SB24 reduces the generation of extracellular ADP and AMP from eATP

by both, soluble and cell surface CD39 and thereby limits the availability of AMP as the substrate for CD73 to generate potentially immune suppressive adenosine.

4 Discussion

CD39 is an ecto-nucleotidase that hydrolyzes extracellular ATP to ADP and AMP. It thereby plays a pivotal role in regulating both, the level the pro-inflammatory extracellular ATP as well as the level of extracellular AMP, the substrate for the ecto-enzyme CD73 that generates anti-inflammatory adenosine. Drugs targeting CD39 enzyme activity are of interest in immuno oncology as they help to maintain a pro-inflammatory environment thereby favoring anti-tumor immune responses that would otherwise be blunted by adenosine. In the present study we report the generation of new nanobody-based inhibitors of the human CD39. We identified seven Nb families covering two distinct binding epitopes. Members of family 1 bound to epitope 1, whereas Nbs of all other families bound to epitope 2. Family 1 contains clones with the strongest binding capacity. In contrast to other families, members of family 1 inhibited the enzyme activity of huCD39, both as a recombinant soluble enzyme as well as a cell surface enzyme of human PBMCs.

So far only small molecule- or conventional antibody-based CD39 inhibitors have been developed. With CD39-targeting nanobodies we introduced a new class of CD39-blocking biologicals that exhibit several advantages compared to CD39-antagonizing antibodies. First, they are much smaller than

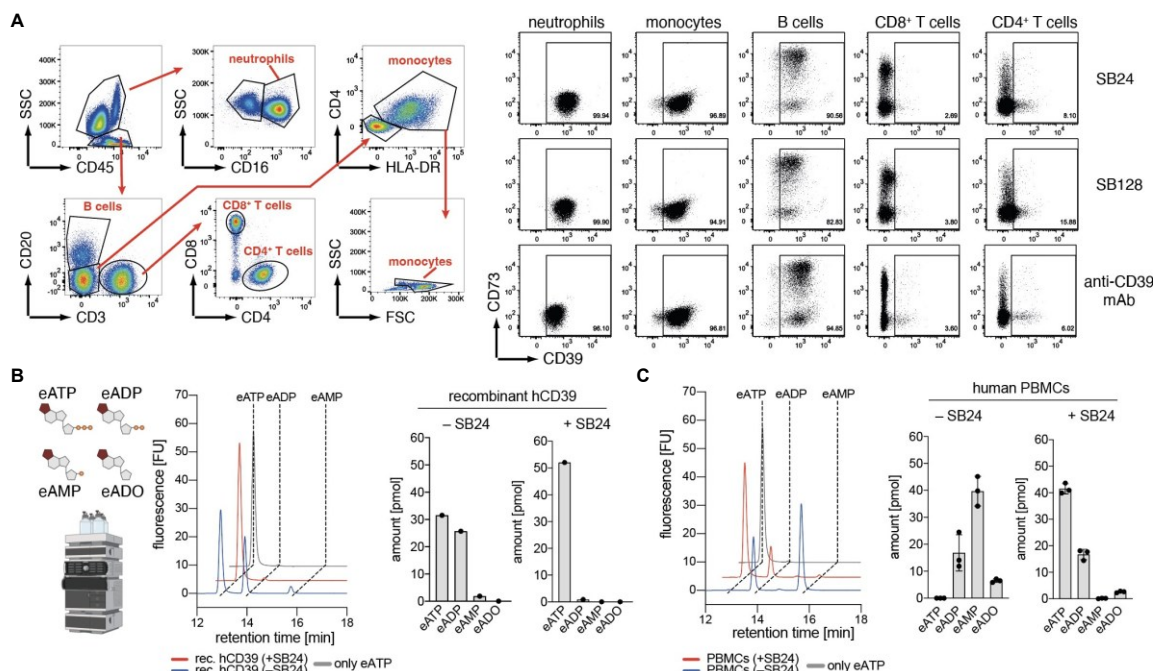


FIGURE 4

Nanobody SB24 binds to and inhibits the enzymatic activity of CD39 on human immune cells. (A) Flow cytometric analyses of the binding of fluorescently labeled Nb-hcAbs SB24 and SB128 to human PBMC compared to that of a conventional monoclonal antibody. (B) Recombinant CD39 was pre-incubated with or without SB24 (100 µg/ml) before addition of etheno-ATP (eATP, 1 µM). Breakdown of eATP into eADP and eAMP was monitored by HPLC. (C) Activated human PBMCs (n = 3) were incubated with or without SB24 (100 µg/ml) and eATP (1 µM) was added. Breakdown of eATP into eADP and eAMP was monitored by HPLC. The data shown in (A, B) are results from one out of two independently performed

conventional antibodies, which allows them to penetrate tissues more easily (27). Further, they exhibit high solubility, due to their hydrophilic framework region 2 (FR2) (28). Nanobodies can be produced recombinantly at high yield in eukaryotic expression systems, often tolerate temperatures up to 75°C (29), are resistance to proteases and endure pH changes. These attributes make nanobodies an interesting option for diagnostics and therapeutics.

An advantage of nanobodies is the ease with which they can be reformatted to suit specific desired applications, e.g. fused to tailor-made effector domains or as bispecific reagents to either recruit effector cells or to target the nanobody to a specific cell population. This could enable targeting of CD39-blocking nanobodies to tumor-infiltrating T cells or CD39-expressing tumor cells while preserving CD39 enzyme activity in other tissues. This is beneficial because CD39 degrades extracellular ADP, which serves as ligand for the P2Y12 receptor expressed on platelets leading to thrombocyte aggregation and thrombosis. As CD39 is constitutively expressed on endothelial cells in order to maintain blood fluidity (30), using a cell-specific anti-CD39 Nb approach would preserve endothelial CD39 enzymatic activity while blocking CD39 on cells relevant for anti-tumor therapy.

In our study we found that SB24 as Fc-fusion protein was considerably more effective in blocking cell-bound CD39 activity when compared to the SB24 monomer. In contrast, the soluble form of CD39 was similarly blocked by SB24-Fc or SB24 monomers. Indeed, there are different factors that can influence the effectiveness of the blockade. Cell-bound antigens might be more difficult to bind since some epitopes might be facing towards the

plasma membrane or are masked by surrounding proteins. This might explain the overall higher amount of nanobodies needed to block cell membrane CD39 compared to soluble CD39. Additionally, the soluble CD39 lacks both transmembrane domains, which might alter the stability of the recombinant protein and render it more prone to inactivation. A second factor is avidity. For soluble monomeric CD39 the interaction to SB24 will be monomeric, regardless of the SB24 construct. When CD39 is expressed on the cell surface, SB24-Fc can bind in a dimeric interaction, whereas SB24 monomer will still bind in a monomeric kinetic, lacking the avidity-effect by dimerization.

The CD39-specific nanobodies identified in this study cover two distinct binding epitopes. The antagonistic family 1 members bind to epitope #1 whereas all other tested nanobodies bind to a non-overlapping epitope #2. The identification of clones against two distinct binding epitopes allows the generation of biparatopic Nb constructs (31), allowing the binding of a dimeric Nb construct to a single CD39 molecule. It needs to be evaluated whether this strategy improves the inhibitory action of SB24 fused to e.g. SB134 or another clone. For other targets, it has been already demonstrated that biparatopic nanobodies can have enhanced target binding or modulatory capacity. For example biparatopic nanobodies against the RBD of SARS-COV2 protect mice from lethal challenge with SARS-CoV-2 variants (32); biparatopic Nb-hcAbs against CD38 show enhanced complement activation (33), CXCR4-specific biparatopic nanobodies can mobilize stem cells and exhibit superior anti-HIV activity compared to nanobodies binding a

single epitope (34), and CART cells based on a biparatopic Nb-CART cells show better therapeutic efficacy than ones based on conventional scFvs (35). Future studies will show whether combining two distinct-paratope-binding CD39-specific nanobodies improves CD39 antagonism and if a biparatopic construct can be combined with cell/tissue targeting nanobodies.

A major field of application for CD39-antagonizing biologicals is cancer therapy. Preclinical studies revealed that blocking mouse CD39 by an anti-CD39 mAb (clone B66) in a MC38 tumor mouse model drives extracellular ATP- and inflammasome-driven anti-tumor immunity with the potential to overcome anti-PD1 resistance (36). Another preclinical study demonstrated that the human CD39 antagonistic mAb IPH5201 unleashed immune responses in combination with chemotherapy, when evaluated in tumor models in human CD39 knock in mice. Of note, we evaluated SB24 already in a previous study and could demonstrate that SB24 was able to increase NK-92 cell-mediated cytotoxicity and act synergistically with TIGIT and A2AR blockade (37). Consequently, CD39-targeting antibodies entered clinical trials (6). SRF617 is a CD39-specific human IgG4 antibody that, similarly to SB24, inhibits the ATPase activity of human CD39 (38). SRF617 is being tested on patients with advanced solid tumors in a phase I dose-escalation study (NCT04336098) to establish safety as monotherapy and in combination with other drugs. Preliminary data demonstrate that SRF617 is well-tolerated at doses that sustain target occupancy throughout the dosing interval, supporting the initiation of expansion cohorts (NCT04336098). Another clinical trial is currently evaluating the CD39-specific antibody TTX-030 in combination with immunotherapy and/or chemotherapy in patients with advanced cancers (NCT04306900). Regarding Nb SB24, the next logical step is the evaluation in preclinical tumor mouse models. Here, the modular nature and small size of the nanobody could be advantageous: bi-specific nanobodies targeting CD39 on cancer cells and cancer-specific antigens e.g. epidermal growth factor receptor (EGFR) could establish an ATP focus within solid tumors, as a small dimeric, bi-specific nanobody construct of ~30 kDa is predicted to penetrate deep into solid tumors. CD39-antagonistic nanobodies hold promise for boosting anti-tumor immunity, especially in combination with other cancer therapy approaches.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg (PV5139 for samples from healthy donors). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

SM: Conceptualization, Writing – original draft, Data curation, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. YD: Investigation, Methodology, Writing – review & editing, Validation. JH: Methodology, Writing – review & editing. BA: Methodology, Writing – review & editing. DW: Methodology, Writing – review & editing. RW: Methodology, Validation, Writing – review & editing. ET: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. AR: Methodology, Validation, Writing – review & editing. AG: Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. FH: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. TM: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. FK-N: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. BR: Conceptualization, Funding acquisition, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) - Project-ID: 335447717 - SFB 1328 to AG (A01), TM (A13), ET (A14), FK-N (Z02), FH (Z02) and BR (Z02), a grant from "Hermann und Lilly Schilling-Stiftung für Medizinische Forschung" to TM, a grant from the Mildred Scheel Cancer Career Center HaTriCS4 to SM and a grant from the T. von Zastrow Foundation to BR and TM.

Acknowledgments

The authors would like to thank the FACS Core Facility (UKE Hamburg, Germany) for HEK cell sorting, Stefan Niebling from the CSSB Hamburg for support with Octet measurements and Andreas Bauche (Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, UKE) for technical assistance with the HPLC measurements. We acknowledge financial support from the Open Access Publication Fund of UKE - Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Figures were created with BioRender.com.

Conflict of interest

YD, FH, FK-N, TM, SM and BR are co-inventors on a patent application on CD39-specific nanobodies EP4137516A1.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The author(s) declared that they were an editorial board member of *Frontiers*, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

1. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* (2010) 10:826–37. doi: 10.1038/nri2873
2. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* (2006) 176:3877–83. doi: 10.4049/jimmunol.176.7.3877
3. Antoniolli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* (2013) 19:355–67. doi: 10.1016/j.molmed.2013.03.005
4. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* (2007) 110:1225–32. doi: 10.1182/blood-2006-12-064527
5. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* (2001) 414:916–20. doi: 10.1038/414916a
6. Moesta AK, Li XY, Smyth MJ. Targeting CD39 in cancer. *Nat Rev Immunol.* (2020) 20:739–55. doi: 10.1038/s41577-020-0376-4
7. Schadlich IS, Winzer R, Stabernack J, Tolosa E, Magnus T, Rissiek B. The role of the ATP-adenosine axis in ischemic stroke. *Semin Immunopathol.* (2023) 45:347–65. doi: 10.1007/s00281-023-00987-3
8. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Dejou C, Giustiniani J, Laheurte C, et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res.* (2015) 3:254–65. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0018
9. Zhao Y, Chen X, Ding Z, He C, Gao G, Lyu S, et al. Identification of novel CD39 inhibitors based on virtual screening and enzymatic assays. *J Chem Inf Model.* (2022) 62:5289–304. doi: 10.1021/acs.jcim.1c00590
10. Jeffrey JL, Lawson KV, Powers JP. Targeting metabolism of extracellular nucleotides via inhibition of ectonucleotidases CD73 and CD39. *J Med Chem.* (2020) 63:13444–65. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01044
11. Perrot I, Michaud HA, Giraudon-Paoli M, Augier S, Docquier A, Gros L, et al. Blocking antibodies targeting the CD39/CD73 immunosuppressive pathway unleash immune responses in combination cancer therapies. *Cell Rep.* (2019) 27:2411–2425.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.091
12. Spatola BN, Lerner AG, Wong C, Dela Cruz T, Welch M, Fung W, et al. Fully human anti-CD39 antibody potently inhibits ATPase activity in cancer cells via uncompetitive allosteric mechanism. *MAbs.* (2020) 12:1838036. doi: 10.1080/19420862.2020.1838036
13. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* (1993) 363:446–8. doi: 10.1038/363446a0
14. Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, Roovers RC, Stam JC, Mali W, et al. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Mol Imaging.* (2012) 11:33–46. doi: 10.2310/7290.2011.00025
15. Henry KA, Tanha J, Hussack G. Identification of cross-reactive single-domain antibodies against serum albumin using next-generation DNA sequencing. *Protein Eng Des Sel.* (2015) 28:379–83. doi: 10.1093/protein/gzv039
16. Wu TT, Johnson G, Kabat EA. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins.* (1993) 16:1–7. doi: 10.1002/prot.340160102
17. Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA, Hamers R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* (1994) 7:1129–35. doi: 10.1093/protein/7.9.1129
18. Lauwereys M, Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Kinne J, Holzer W, De Genst E, et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.* (1998) 17:3512–20. doi: 10.1093/emboj/17.13.3512
19. Koch-Nolte F, Reyelt J, Schossow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, et al. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2. *2 vivo. FASEB J.* (2007) 21:3490–8. doi: 10.1096/fj.07-8661com
20. Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, et al. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med.* (2016) 8(366):366ra162. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8463
21. Eden T, Menzel S, Wesolowski J, Bergmann P, Nissen M, Dubberke G, et al. A cDNA Immunization Strategy to Generate Nanobodies against Membrane Proteins in Native Conformation. *Front Immunol.* (2017) 8:1989. doi: 10.3389/fimmu.2017.01989
22. Jager V, Bussow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A, et al. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* (2013) 13:52. doi: 10.1186/1472-6750-13-52
23. Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh Gh G, Gobert M, Conrath K, Muyldermans S, et al. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int J Cancer.* (2002) 98:456–62. doi: 10.1002/ijc.10212
24. Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol.* (2011) 187:676–83. doi: 10.4049/jimmunol.1003884
25. Tung SL, Fanelli G, Matthews RI, Bazoer J, Letizia M, Vizcay-Barrena G, et al. Regulatory T cell extracellular vesicles modify T-effector cell cytokine production and protect against human skin allograft damage. *Front Cell Dev Biol.* (2020) 8:317. doi: 10.3389/fcell.2020.00317
26. Baek AE, Kanthi Y, Sutton NR, Liao H, Pinsky DJ. Regulation of ecto-apyrase CD39 (ENTPD1) expression by phosphodiesterase III (PDE3). *FASEB J.* (2013) 27:4419–28. doi: 10.1096/fj.13-234625
27. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front Immunol.* (2017) 8:1603. doi: 10.3389/fimmu.2017.01603
28. Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. Nanobodies: A review of generation, diagnostics and therapeutics. *Int J Mol Sci.* (2023) 24(3):456–62. doi: 10.3390/ijms24065994
29. Kunz P, Zinner K, Mucke N, Bartoschik T, Muyldermans S, Hoheisel JD. The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance. *Sci Rep.* (2018) 8:7934. doi: 10.1038/s41598-018-26338-z
30. Enjyoji K, Sevigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, J.S. E 2nd, et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med.* (1999) 5:1010–7. doi: 10.1038/12447
31. Roovers RC, van Dongen GA, van Bergen en Henegouwen PM. Nanobodies in therapeutic applications. *Curr Opin Mol Ther.* (2007) 9:327–35.
32. Wagner TR, Schnepf D, Beer J, Ruetalo N, Klingel K, Kaiser PD, et al. Biparotopic nanobodies protect mice from lethal challenge with SARS-CoV-2 variants of concern. *EMBO Rep.* (2022) 23:e53865. doi: 10.15252/embr.202153865
33. Schutze K, Petry K, Hambach J, Schuster N, Fumey W, Schriewer L, et al. CD38-specific biparotopic heavy chain antibodies display potent complement-dependent cytotoxicity against multiple myeloma cells. *Front Immunol.* (2018) 9:2553. doi: 10.3389/fimmu.2018.02553
34. Jahnichen S, Blanchetot C, Maussang D, Gonzalez-Pajuelo M, Chow KY, Bosch L, et al. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2010) 107:20565–70. doi: 10.1073/pnas.1012865107
35. Martin TG, Madduri D, Pacaud L, Usmani SZ. Cilta-cel, a BCMA-targeting CAR-T therapy for heavily pretreated patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Future Oncol.* (2023) 19(34):2297–311. doi: 10.2217/fon-2022-1317
36. Li XY, Moesta AK, Xiao C, Nakamura K, Casey M, Zhang H, et al. Targeting CD39 in cancer reveals an extracellular ATP- and inflammasome-driven tumor immunity. *Cancer Discovery.* (2019) 9:1754–73. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0541
37. Brauneck F, Seubert E, Wellbrock J, Schulze Zur Wiesch J, Duan Y, Magnus T, et al. Combined blockade of TIGIT and CD39 or A2AR enhances NK-92 cell-mediated cytotoxicity in AML. *Int J Mol Sci.* (2021) 22(23):12919. doi: 10.3390/ijms222312919
38. Warren MC, Matissek S, Rausch M, Panduro M, Hall RJ, Dulak A, et al. SRF617 is a potent inhibitor of CD39 with immunomodulatory and antitumor properties. *Immunohorizons.* (2023) 7:366–79. doi: 10.4049/immunohorizons.2200089