



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de Doctorado en Biomedicina

TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de anticuerpos terapéuticos contra el
receptor CCR6 humano**

**Development of therapeutic antibodies against the human
CCR6 receptor**

Memoria presentada por

Sara Gómez Melero

Directores

Dr. Isaac Túnez Fiñana

Dra. Fé Isabel García Maceira

Dr. Javier Caballero Villarraso

Córdoba, Octubre de 2022

TITULO: *DESARROLLO DE ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS CONTRA EL
RECEPTOR CCR6 HUMANO*

AUTOR: *Sara Gómez Melero*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



TÍTULO DE LA TESIS: Desarrollo de anticuerpos terapéuticos contra el receptor CCR6 humano

DOCTORANDO/A: Sara Gómez Melero

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda Sara Gómez Melero ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de tesis doctoral, enfocado en la búsqueda de un anticuerpo monoclonal antagonista del receptor CCR6 humano. Se ha planteado como objetivo general del proyecto la obtención y caracterización de un anticuerpo monoclonal que permita interferir la señalización del receptor en algunas de sus vías convirtiéndolo en un potencial tratamiento de enfermedades relacionadas con dicho receptor.

La memoria de tesis está bien estructurada y desarrollada. En cuanto a los contenidos, la ejecución del trabajo ha requerido el diseño e implementación de un amplio espectro de técnicas de laboratorio, que incluyen metodologías de vanguardia de los ámbitos de la biología celular y molecular.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se han materializado en forma de publicaciones científicas. Concretamente, se ha dado lugar a dos artículos: uno en la revista *Biomedicines* (2022) (doi: 10.3390/biomedicines10020422) (Q2, JCR 2021) y el otro en la revista *BMC Biotechnology* (2021) (doi: 10.1186/s12896-021-00699-2) (Q3, JCR 2021). En ambos casos la doctoranda fue primera autora. Estas publicaciones en revistas científicas especializadas avalan la originalidad y calidad de los resultados.

Durante el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral, Sara Gómez Melero ha superado satisfactoriamente los objetivos formativos y de investigación exigidos. En este sentido, ha participado a las actividades contempladas en el cronograma académico del Programa de Doctorado de Biomedicina. A tenor de lo expuesto,

consideramos que el presente trabajo presentada por Dña. Sara Gómez Melero como Tesis Doctoral cumple los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctora en Biomedicina y, en consecuencia, procedemos a autorizar su presentación.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos donde proceda, firman el presente informe.

Córdoba, 10 de octubre de 2022

Firma de los directores

CABALLERO VILLARRASO JAVIER - 30541937F	Firmado digitalmente por CABALLERO VILLARRASO JAVIER - 30541937F Fecha: 2022.10.10 20:09:30 +02'00'
--	--

Fdo: Javier Caballero Villarraso

Firmado por GARCIA
MACEIRA FE ISABEL -
***7171** el día
11/10/2022 con un
certificado emitido por
AC FNMT Usuarios

Fdo: Fé Isabel García Maceira

TUNEZ FIÑANA ISAAC - 30801139E	Firmado digitalmente por TUNEZ FIÑANA ISAAC - 30801139E Fecha: 2022.10.11 07:33:04 +02'00'
---	--

Fdo: Isaac Túnez Fiñana

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis. En primer lugar, quería agradecer al Dr. Javier Caballero Villarraso, por su labor como tutor y director y el tiempo que me ha dedicado. A mi director de tesis el Dr. Isaac Túnez Fiñana, por su ayuda y consejos. A mi directora de tesis, la Dra. Fé Isabel García Maceira, y al director de Canvax Biotech, Elier Paz Rojas, que han estado guiándome y compartiendo conmigo su experiencia y conocimiento, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible, muchas gracias porque siempre han confiado en mí. Gracias a todos por haberme apoyado y ayudado a poder realizar este trabajo.

A mis compañeros de trabajo Vanesa, Ana, María José, Valle, Ana Belén, Verónica y Aurora. Y en especial, a Tania y Luis por su gran apoyo y estar a mi lado tanto profesional como personalmente. Todos ellos han contribuido a crear un gran ambiente de trabajo y a formar un grupo que para mí ha sido fundamental para cumplir mis objetivos.

A mis amigos, Cristina, Montes, Berni y Álvaro, por estar siempre ahí para escucharme y por los buenos momentos que hemos pasado juntos y que me permiten salir de la rutina y recargar pilas.

Agradecer a mis padres, mi hermana y mi sobrina quienes están siempre en los buenos y malos momentos, apoyándome en todo y dándome fuerzas. A mi pareja, Jesús, quien siempre me ha dado palabras de ánimo para seguir adelante y ha estado a mi lado en los momentos más difíciles.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN	7
1. Receptores acoplados a proteínas G	7
1.1. Receptores de membrana y señalización celular	7
1.2. Clasificación	8
1.3. Topología	12
1.4. Vías de señalización	15
2. Receptores de quimioquinas	20
2.1. Características generales	20
2.2. Receptor CCR6 humano	23
2.3. Señalización de CCR6h: eje CCR6h-CCL20	25
2.4. Aplicaciones terapéuticas de CCR6h como diana farmacológica	30
3. Obtención de anticuerpos terapéuticos contra GPCRs	38
3.1. Anticuerpos terapéuticos frente a pequeñas moléculas	38
3.2. Inmunógenos	40
3.3. Técnicas para la obtención de anticuerpos	43
4. GPCRs como diana farmacéutica	46
4.1. Mecanismos de acción de los fármacos dirigidos a GPCRs	46
4.2. Situación actual del mercado farmacológico dirigido a GPCRs	48
4.3. Anticuerpos terapéuticos dirigidos a GPCRs	52
II. HIPÓTESIS	55
III. OBJETIVOS	56
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Material biológico empleado y mantenimiento	57
1.1. Bacterias	57
1.2. Líneas celulares	57
1.3. Animales	58
2. Oligonucleótidos	59
3. Técnicas generales de biología molecular	59
3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	59
3.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	60

3.3. Digestiones con enzimas de restricción	61
3.4. Purificación de ADN	61
3.5. Ligación de fragmentos de ADN a vectores	61
3.6. Transformación de las células competentes	61
4. Obtención de plásmidos	62
5. Transfección de células de mamífero	64
6. Purificación de membrana: fraccionamiento subcelular	65
7. Anticuerpos	66
8. Generación de anticuerpos monoclonales	66
8.1. Selección de la diana	66
8.2. Inmunización de los ratones	67
8.3. Extracción de suero	68
8.4. Fusión celular y selección de hibridomas	68
8.5. Obtención de clones mediante el método de la dilución limitante	70
8.6. Purificación de anticuerpos	70
9. Citometría de flujo	71
9.1. Procedimiento general	71
9.2. Marcaje de las líneas celulares transfectadas	71
9.3. Selección y caracterización de anticuerpos anti-CCR6h	71
9.4. Mapeo del epítipo de unión del anticuerpo	72
9.5. Reactividad cruzada	72
10. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	72
10.1. ELISA sándwich	72
10.2. ELISA indirecto	73
11. Caracterización de la inhibición de la señalización de los anticuerpos anti-CCR6h	75
11.1. Inhibición de la señalización celular a través de la ruta del flujo de calcio	75
11.2. Inhibición de la señalización celular a través de la ruta de la β -arrestina	75
12. Quimiotaxis	76
13. Evaluación del efecto del anti-CCR6h 1C6 en células Th17	76
13.1. Aislamiento de linfocitos T y diferenciación a linfocitos Th17	76
13.2. Inhibición de la expresión de citoquinas por el anti-CCR6h	77
14. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	78
15. Análisis estadístico	79

V. RESULTADOS	80
1. Selección de la diana para la obtención de anticuerpos terapéuticos	80
2. Plásmidos y líneas celulares obtenidas	81
3. Obtención del anti-CCR6h	87
3.1. Titulación del suero de los ratones inmunizados	87
3.2. Selección de hibridomas productores de anti-CCR6h	88
3.3. Selección de anti-CCR6h antagonistas	89
3.4. Purificación de anticuerpos	90
4. Caracterización del anticuerpo anti-CCR6h 1C6	92
4.1. Isotipado	92
4.2. Caracterización de la unión del anticuerpo 1C6 al receptor CCR6 humano	92
4.2.1. Especificidad por el receptor CCR6h	92
4.2.2. Determinación de la unión al epítipo	95
4.3. Caracterización funcional	97
4.3.1. Inhibición de la señal a través de la vía de flujo de calcio	97
4.3.2. Inhibición de la señal a través de la vía de la β -arrestina	98
4.3.3. Inhibición de la quimiotaxis	99
4.3.4. Inhibición de la producción de citoquinas	100
VI. DISCUSIÓN	103
1. Importancia de la selección de la diana	103
2. Importancia del proceso de inmunización	106
3. Caracterización del anticuerpo 1C6 y efecto sobre las vías de señalización de CCR6h	109
4. Relevancia de la actividad del anticuerpo 1C6 en células Th17	113
VII. CONCLUSIONES	117
VIII. BIBLIOGRAFÍA	118
IX. PUBLICACIONES	139

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADCP	Fagocitosis celular dependiente de anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIJ	Artritis idiopática juvenil
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
APC	Célula presentadora de antígenos
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
ATLL	Leucemia/linfoma de células T del adulto
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
CCR6h	Receptor CC de quimioquinas 6 humano
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
CDR	Regiones determinantes de la complementariedad
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CRC	Carcinogénesis del cáncer colorrectal
DAG	Diacilglicerol
DC	Células dendríticas
EAE	Encefalomielitis autoinmune experimental
EC₅₀	Concentración media máxima efectiva
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EM	Esclerosis múltiple
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ESC	Células endometriales estromales
Fab	Fragmento de unión al antígeno
FBS	Suero fetal bovino
Fc	Fragmento cristalizante
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GDP	Difosfato de guanosina
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRKs	GPCR quininas
GTP	Trifosfato de guanosina
HBD	β -Defensinas humanas
ICL-3	Células linfoides innatas-3
IFN-γ	Interferón- γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
IP3	Inositol trifosfato
iv	Intravenosa
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal

LARC	Quimioquina hepática y regulada por activación
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MHC	Hormona concentradora de melanina
MIP-3α	Proteína inflamatoria de macrófagos-3 α
MMP	Metaloproteinasa de la matriz extracelular
NAL	Ligando alostérico neutro
NAM	Modulador alostérico negativo
NCEs	Nuevas entidades químicas
NFκB	Factor nuclear kappa B
NK	Células <i>natural killer</i>
NKT	Células T <i>natural killer</i>
PAM	Modulador alostérico positivo
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDL1	Ligando de muerte programada 1
PEG	Polietilenglicol
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RGS	Reguladores de la señalización de las proteínas G
ROR	Receptor nuclear huérfano relacionado con el ácido retinoico
SC	Subcutánea
siRNA	ARN pequeño de interferencia
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
SOG	Receptores somatostatina-opioides-galanina
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β
Th1	Células T colaboradoras 1
Th2	Células T colaboradoras 2
Th17	Células T colaboradoras 17
TM	Transmembrana
Treg	Células T reguladoras
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPLs	Partículas semejantes a virus

RESUMEN

El receptor CC de quimioquinas 6 humano (CCR6h) es una diana con un gran potencial terapéutico ya que cuando se une a su ligando, CCL20, se produce una red de señalización que está implicada en procesos relacionados con un gran número de enfermedades como cáncer, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o infección por VIH. Las células Th17 expresan CCR6 y citoquinas inflamatorias, incluyendo IL-17, que están implicadas en la propagación de respuestas inmunes inflamatorias. Un anticuerpo antagonista de CCR6h sería un tratamiento potencial para pacientes con enfermedades relacionadas con el eje CCR6h-CCL20. Por ello, el objetivo de este estudio fue desarrollar un anticuerpo monoclonal antagonista dirigido hacia el receptor CCR6h.

Se generaron los anticuerpos monoclonales inmunizando ratones BALB/c con células que sobre-expresaban el receptor CCR6h. Se probó la especificidad de la unión de los anticuerpos al receptor por citometría de flujo y se obtuvieron clones mediante el método de dilución limitante. De este modo, se aisló el anticuerpo monoclonal anti-CCR6h, denominado 1C6. Mediante ELISA y citometría de flujo, se determinó contra qué epítipo mapea el anticuerpo obtenido, resultando ser un anticuerpo de unión al dominio amino terminal del CCR6h. La capacidad del anticuerpo 1C6 para neutralizar la señalización a través del receptor CCR6h fue evaluada a través de las vías dependiente e independiente de proteína G, mediante ensayos de flujo de calcio y de reclutamiento de β -arrestina, respectivamente. Se determinó que el anticuerpo 1C6 es capaz de bloquear la señalización mediada por el reclutamiento de β -arrestina con una IC_{50} de 10,23 nM, sin embargo, no inhibe la señalización por flujo de calcio. Además, se realizaron ensayos de quimiotaxis en los que se demostró que el anticuerpo 1C6 reduce la migración de células que expresan CCR6h hacia su ligando CCL20. Finalmente, se determinó a través de ELISA que la producción de CCL20 no se ve afectada por el anticuerpo 1C6, pero sí se produce una reducción de la producción de IL-17A por células Th17. Esta disminución de la producción de IL-17 fue confirmada en el análisis de la expresión de IL-17 en células Th17 mediante RT-qPCR.

En conclusión, en el presente trabajo se aplicó la inmunización con células enteras para obtener con éxito un anticuerpo específico y selectivo del receptor CCR6h. Por lo tanto, este método de inmunización proporciona un enfoque efectivo para obtener anticuerpos terapéuticos dirigidos hacia GPCRs. El anticuerpo obtenido, llamado 1C6, es capaz de neutralizar la señalización de receptor, reducir la migración de células CCR6⁺ y la expresión de IL-17. Estos resultados indican que el anticuerpo 1C6 posee características que lo convierten en una atractiva herramienta terapéutica en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el receptor CCR6h.

ABSTRACT

The human CC chemokine receptor 6 (hCCR6) is a target with a great therapeutic potential, since when it binds to its ligand, CCL20, a signaling network is produced that is involved in processes related to a large number of diseases such as cancer, psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis or HIV infection. Th17 cells express CCR6 and inflammatory cytokines, including IL-17, which are involved in the spread of inflammatory immune responses. An antagonist antibody against CCR6h would be a potential treatment for patients with diseases related to the CCR6h-CCL20 axis. The aim of this study was to develop an antagonist monoclonal antibody directed at the CCR6h receptor.

Monoclonal antibodies were generated by immunizing BALB/c mice with cells that overexpressed CCR6h. The specificity of antibody binding to the CCR6h receptor was tested by flow cytometry and clones were obtained by the limiting dilution method. Thus, the anti-CCR6h monoclonal antibody, called 1C6, was isolated. Epitope binding it was determined using ELISA and flow cytometry, and resulted that the obtained antibody binds to the amino terminal domain of the CCR6h receptor. The ability of the 1C6 antibody to neutralize signaling through the CCR6h receptor was evaluated through the G-protein-dependent and independent pathways, using calcium flux assays and β -arrestin recruitment, respectively. It was determined that the antibody 1C6 is able to block the signaling mediated by the recruitment of β -arrestin with an IC_{50} of 10.23 nM, however, it is unable to inhibit calcium flux signaling. In addition, chemotaxis assays were performed and showed that the 1C6 antibody reduces the migration of cells expressing CCR6h to their CCL20 ligand. Finally, it was determined through ELISA that the production of CCL20 is not affected by the antibody 1C6, but there is a reduction in the production of IL-17A by Th17 cells. This decrease in IL-17 production was confirmed by analyzing IL-17 expression in Th17 cells using RT-qPCR.

In conclusion, in the present study whole cell immunization was applied to obtain a specific and selective antibody against CCR6h. Therefore, this method of immunization provides an effective approach to obtain potential therapeutic antibodies directed towards GPCRs. The obtained antibody, called 1C6, is able to neutralize receptor

signaling, reduces the migration of CCR6⁺ cells and the expression of IL-17. These results indicate that the 1C6 antibody has characteristics that make it an attractive therapeutic tool in the treatment of diseases related to the CCR6h receptor.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Receptores acoplados a proteínas G

1.1. Receptores de membrana y señalización celular

La recepción de información por parte de una célula es un proceso de gran complejidad biológica. Para este propósito las células poseen un extenso número de receptores de naturaleza proteica presentes en la membrana plasmática, en las membranas de los orgánulos, en el citosol o en el núcleo celular, a las que se unen específicamente las moléculas señalizadoras (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, luz, compuestos volátiles, ...). La unión de una molécula señalizadora a su receptor específico desencadena una cascada de reacciones, llamada transducción de señal, cuyo resultado final depende no solo del estímulo recibido, sino de muchos otros factores, como el estadio celular, la presencia de patógenos o el estado metabólico de la célula. De modo general, existen cuatro grandes grupos de receptores: receptores asociados a canales iónicos, receptores asociados a enzimas, receptores acoplados a proteína G (GPCRs, *G protein-coupled receptors*) y receptores intracelulares (Figura 1)[1].

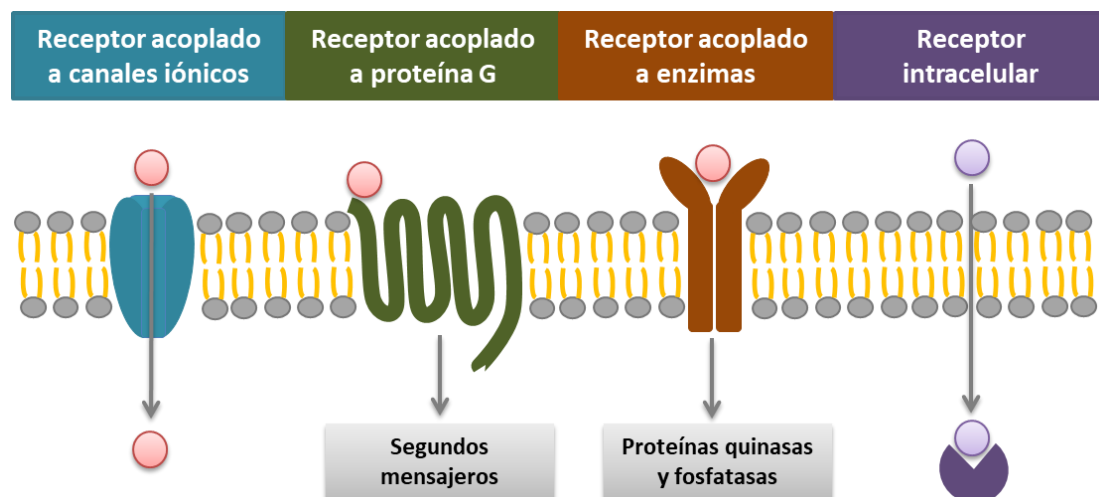


Figura 1. Tipos de receptores. Las moléculas de señalización impermeables a la membrana (círculo rosa) pueden unirse y activar receptores acoplados a canales iónicos, a proteína G o a enzimas. Las moléculas de señalización permeables a la membrana (círculo violeta) activan receptores intracelulares. Tomado de [1].

La transducción de señales es un proceso biológico fundamental para mantener la homeostasis y asegurar la actividad celular coordinada en todo el organismo. Los

GPCRs, dado su número y especificidad, actúan como un verdadero panel de control de las células ya que son activados por múltiples estímulos, que varían desde un simple fotón, iones (Ca^{2+}), aminoácidos, neurotransmisores, péptidos, polipéptidos y moléculas de adhesión, hasta compuestos orgánicos volátiles (olores), siendo responsables del 80% de la transducción de señales a través de la membrana celular [2]–[5]. Esto garantiza su participación en muchos y variados procesos fisiológicos que abarcan, entre otros, la comunicación célula-célula [5], la transmisión neuronal, la señalización hormonal, el olfato y la visión.

Los GPCRs son proteínas de membrana que están presentes en todos los organismos eucariotas y poseen homólogos en arqueas y bacterias. Estos receptores constituyen una de las mayores familias de proteínas codificadas por el genoma humano, con 825 miembros, que representan alrededor del 4% del genoma humano, siendo una de las dianas terapéuticas más atractivas debido a que median un amplio conjunto de funciones fisiológicas [6], [7].

1.2. Clasificación

Los GPCRs han sido clasificados en relación a sus características estructurales y fisiológicas (Figura 2). En 1994, Kolakowski introdujo el primer sistema de clasificación de GPCRs conocido como sistema de clasificación A-F [8]. Este sistema ordena a los GPCRs en función de su homología en la secuencia aminoacídica y similitud funcional en seis clases: clase A (receptores semejantes a rodopsina), clase B (receptores de secretina), clase C (receptores metabotrópicos de glutamato), clase D (receptores fúngicos implicados en la determinación sexual), clase E (receptores de adenosina monofosfato cíclico (AMPC)) y clase F (receptores frizzled / smoothened) [9]. Casi 10 años después, en 2003, se establece el sistema de clasificación “GRAFS” basado en estudios filogenéticos, desarrollado a partir de los datos del Proyecto Genoma Humano. Este sistema comprende cinco familias llamadas glutamato (G), rodopsina (R), adhesión (A), frizzled / taste2 (F) y secretina (S) [3]. La mayor diferencia entre los dos sistemas es la división de la clase B del sistema de clasificación A-F en dos familias del sistema GRAFS: adhesión y secretina, basada en los descubrimientos que describen una historia evolutiva distinta entre ambas familias [9]. Las clases D y E del sistema de

clasificación A-F no incluyen receptores humanos y no están incluidas en la clasificación GRAFS [10].

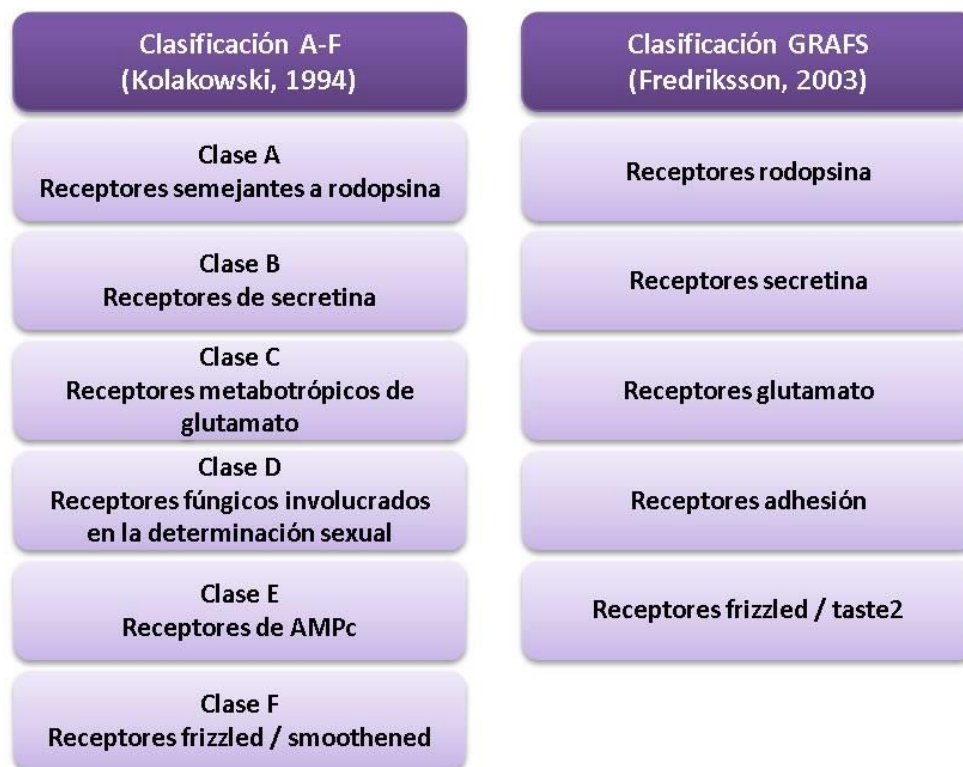


Figura 2. Sistemas de clasificación de GPCRs. Sistema de clasificación A-F, basado en la homología de la secuencia y funcionalidad, y sistema de clasificación GRAFS, basado en el análisis filogenético. *Adaptado de [11].*

Las clases a su vez se agrupan en familias de receptores según la clasificación farmacológica de su ligando endógeno que abarca iones, neurotransmisores, lípidos, carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos, péptidos y proteínas [12].

La clase A agrupa a los receptores con similitud a la rodopsina, siendo la mayor de las familias de GPCRs con aproximadamente 719 miembros e integrando el 80% de los receptores humanos. Los receptores que integran la familia rodopsina son muy heterogéneos en cuanto a su estructura primaria y al tipo de ligando a los que se unen, y pueden ser subdivididos en cuatro subfamilias α , β , γ y δ [10]. La subfamilia α se subdivide en 5 grupos: receptores de prostaglandinas, aminas, opsinas, melatoninas y adenosinas. La subfamilia β incluye los receptores de hipocretinas, neuropéptido FF, tachiquininas, colecistoquinina, neuropéptido Y, endotelina, péptido liberador de gastrina, neuromedina B, bombesina, neurotensina, hormona del crecimiento, hormona liberadora de tirotrópina, grelina, arginina vasopresina, hormona liberadora

de gonadotropina, oxitocina y receptores huérfanos. La subfamilia γ contiene tres grupos: receptores de somatostatina-opioides-galanina (SOG), receptores de la hormona concentradora de melanina (MCH) y receptores de quimioquinas. Por último, la subfamilia δ está integrada por cuatro grupos: receptores relacionados con el oncogén MAS, receptores de glicoproteínas, receptores de nucleótidos y receptores olfatorios [10].

La familia frizzled / taste2 está formada por 36 miembros de los cuales 11 son miembros de la clase F, diez receptores frizzled y uno smoothed, y 25 son receptores taste2, previamente agrupados en la clase F, que recientemente se han situado como una clase aparte evolucionada de la clase A [12].

En tamaño, le sigue a la familia frizzled / taste2, la familia de receptores de adhesión con 33 miembros. Esta familia está formada por parte de los miembros de la clase B, por lo que también es conocida como clase B2, y sus receptores poseen un largo dominio N-terminal [13].

La familia de receptores de glutamato contiene 22 receptores pertenecientes a la clase C e incluye receptores metabotrópicos de glutamato, receptores GABA, receptores sensibles a calcio y receptores gustativos [13].

La familia secretina, también conocida como clase B1, está formada por parte de los miembros de la clase B y posee 15 miembros cuyos ligandos son grandes péptidos. Los receptores de esta familia tienen un largo dominio extracelular que está involucrado en la unión al ligando [13], [14].

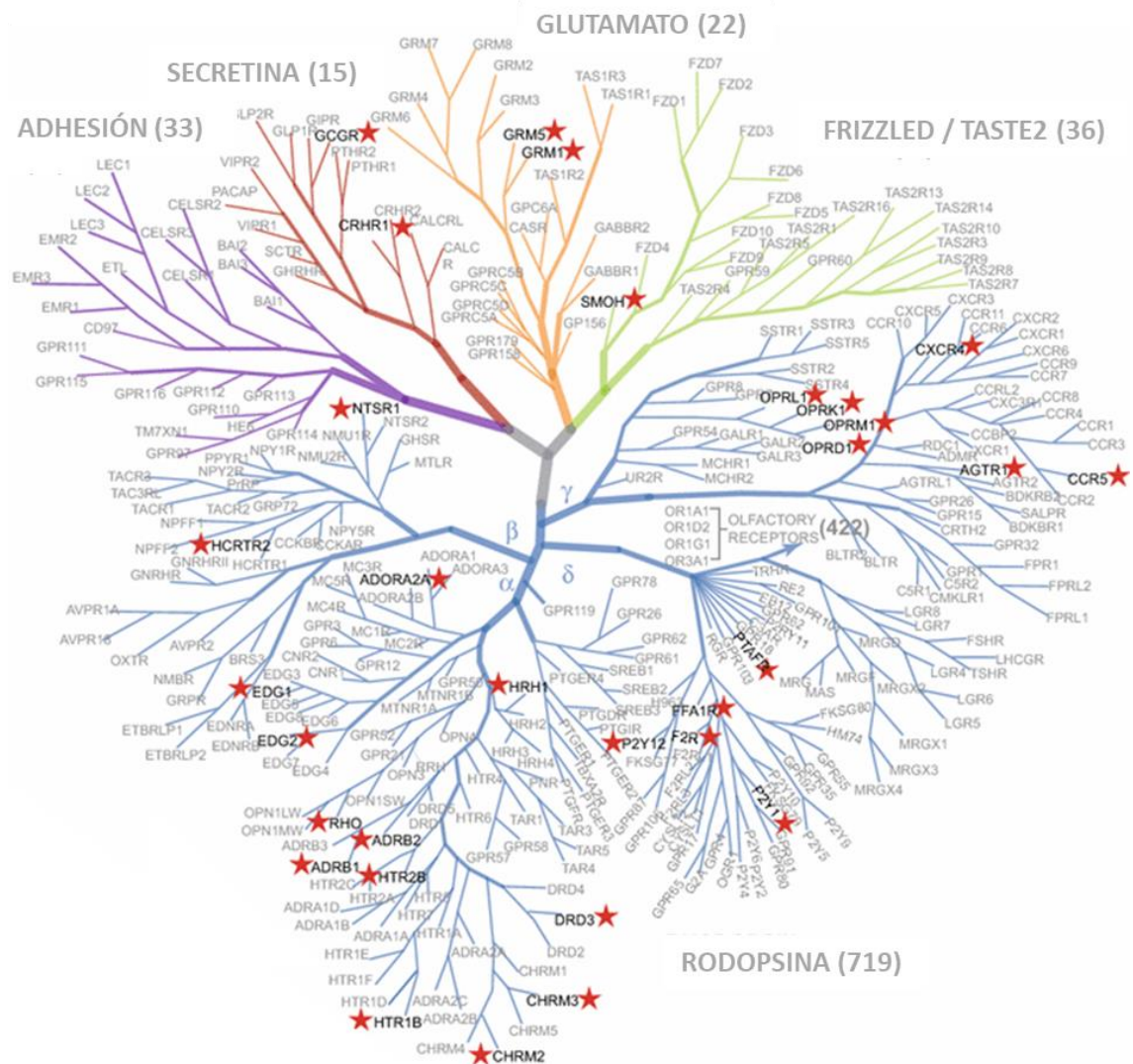


Figura 3. Árbol filogenético de los GPCRs. Árbol filogenético de los 825 GPCRs humanos mostrando su clasificación según el sistema GRAFs. Los GPCRs marcados con una estrella son aquellos cuya estructura cristalina ha sido determinada. Tomado de [15].

La información estructural tridimensional detallada es de gran importancia para comprender las funciones fisiológicas de los GPCRs y para el diseño de fármacos basado en la estructura (*SBDD, structure based drug design*). Los esfuerzos persistentes de los investigadores y la implementación de nuevas tecnologías han contribuido en los últimos años a acelerar el desarrollo de estudios estructurales de los GPCRs. Hace ya 22 años se definió la estructura cristalizada del primer GPCR de mamífero, la rodopsina bovina [16]. Desde entonces, se han reportado la estructura de 30 GPCRs diferentes (Figura 3) y aunque esto representa un gran progreso, este avance comprende solo una fracción de los casi 300 GPCRs involucrados en enfermedades y es tan solo una pequeña parte de los 825 GPCRs identificados en humanos [15].

1.3. Topología

Los GPCRs tienen una estructura comprendida por siete α -hélices transmembrana (TM), con cuatro regiones extracelulares: N-terminal o amino terminal, bucle extracelular 1 (ECL1), bucle extracelular 2 (ECL2) y bucle extracelular 3 (ECL3), y cuatro regiones intracelulares: bucle intracelular 1 (ICL1), bucle intracelular 2 (ICL2), bucle intracelular 3 (ICL3) y C-terminal o carboxilo terminal (Figura 4).

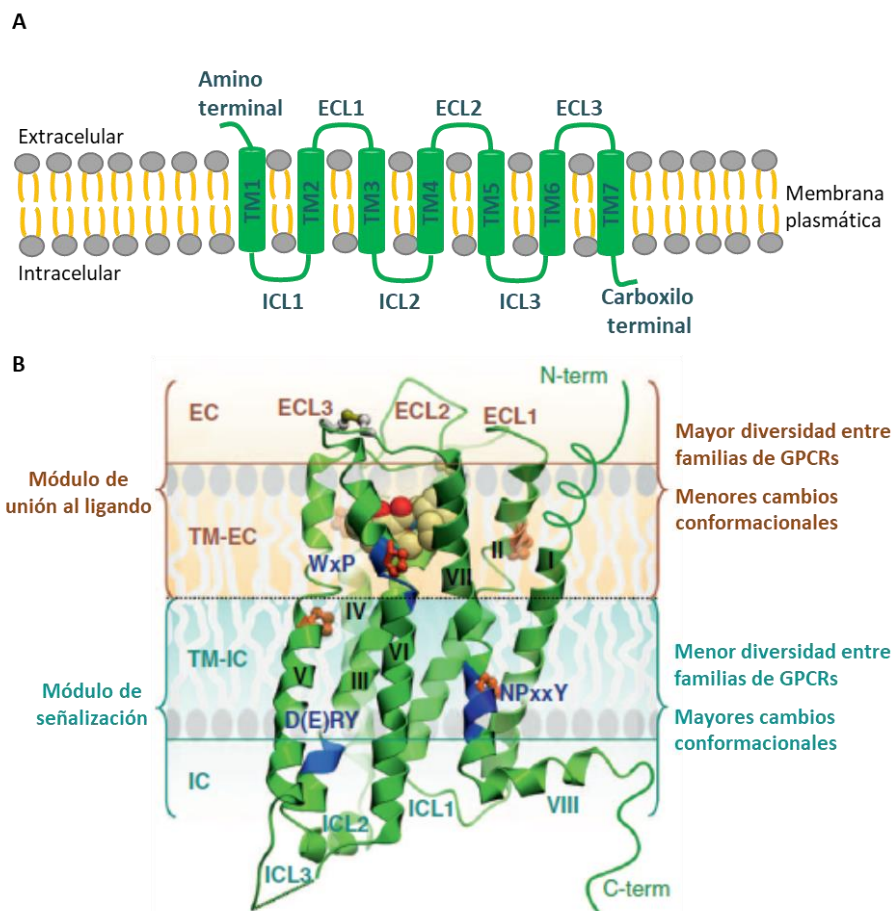


Figura 4. Estructura típica de un GPCR. (A) GPCR embebido en la capa lipídica mostrando el amino terminal, las regiones transmembrana (TMs), extracelulares (ECLs), intracelulares (ICLs) y el carboxilo terminal. **(B)** Ejemplo de la estructura cristalina del receptor de la dopamina D3 (PDB ID: 3PBL) donde se muestran las principales regiones y características estructurales de los GPCRs. La región extracelular (EC) incluye los tres dominios ECLs y el N-terminal, que puede estar representado por un péptido no estructurado corto (como en la mayoría de los GPCRs de clase A), o por un dominio globular más largo. El haz helicoidal 7TM contiene una serie de pliegues dependientes de prolina (mostradas en naranja) que dividen el receptor en aproximadamente dos módulos. El módulo EC (regiones EC y TM-EC) es responsable de la unión de diversos ligandos y tiene una diversidad estructural mucho mayor. Por el contrario, el módulo IC (regiones IC e IC-TM), implicado en la unión de los efectores entre los que se incluyen proteínas G y arrestinas, está más conservado entre los GPCRs, pero sufre cambios de conformación mayores tras la activación del receptor. En color azul se destacan motivos muy conservados y funcionalmente relevantes en las hélices TM de los GPCRs de clase A. En la mayoría de los GPCRs el C-terminal está compuesto por la hélice VIII y en muchos receptores también tiene un sitio de palmitoilación anclando la hélice VIII a la membrana. Tomado de [17].

A pesar de su diversidad y complejidad, los GPCRs exhiben una arquitectura proteica notablemente conservada. La cara extracelular de los GPCRs comprende el N-terminal más tres bucles extracelulares. Estos bucles son muy diversos en la secuencia y la longitud, incluso al comparar subtipos de la misma familia de receptores. Esta falta de conservación de la secuencia tal vez pueda interpretarse como una falta de importancia funcional. Sin embargo, éste no es el caso, ya que en la revisión realizada por Wheatley et al. en 2012 se destacan importantes roles funcionales para las regiones ECLs, tanto en la familia A como en la familia B de GPCRs [18]. La región extracelular, responsable de la unión con el ligando, también incluye el amino terminal que puede tener desde secuencias relativamente cortas, como en el caso de la rodopsina, a largos dominios extracelulares característicos en otras familias de GPCRs, como son los de las familias adhesión y glutamato (Tabla 1) [17].

Los enlaces disulfuro son una característica conservada en la gran mayoría de los GPCRs. Tanto la familia A como la familia B tienen un enlace disulfuro, entre el dominio ECL2 y la parte superior del dominio TM3 (Cys^{3.25}), que une el ECL2 al haz helicoidal produciendo una restricción conformacional. La interrupción de este enlace disulfuro conservado es perjudicial para el funcionamiento de muchos GPCRs de la familia A [18].

Los GPCRs son generalmente N-glicosilados en su cara extracelular y tienen al menos un sitio de glicosilación (N-X-S/T) en el amino terminal, aunque a menudo tienen otros sitios. Es bastante común la N-glicosilación del dominio ECL2. En un análisis de la secuencia de 613 GPCRs de la familia A se ha revelado que el 32% de ellos contiene al menos un sitio consenso de N-glicosilación en el ECL2. El 85% de estos sitios se encuentra entre la parte superior del TM4 y la cisteína conservada en el ECL2. Hay evidencias que indican que, en términos generales, la glicosilación de los GPCRs tiene un papel en el tráfico a la membrana celular y/ o la estabilidad del receptor [18].

Tabla 1. Resumen de las propiedades de las familias de GPCRs. Tomado de [19].						
Propiedad	Rodopsina	Secretina	Adhesión	Glutamato	Frizzled	Taste2
Número de receptores	719 (388 ORs)	15	33	22	11	25
Número de dianas farmacológicas identificadas	>39	4	0	3	0	0
Número de receptores huérfanos	63 (ORs no incluidos)	0	30	7	0	21
N-terminal extendido (>100 AA) *	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
N-terminal con dominios funcionales conservados *	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Tipo de dominios funcionales en el N-terminal (TM no incluido)	Sitios proteolíticos, LRR, LDLa	HBD	GPS, TSP1, HBD, PTX, EGF OLF, GBL, CA, LamG, EGF-Lam, LRR, Ig, SEA, Calx-beta, EAR, CUB, lectina tipo C	VFTM, SUSHI	Dominio de unión Wnt	-
Procesamiento proteolítico del N-terminal	Sí	No	Sí	No	No	No
Residuos de cisteína conservados en ECL1 y ECL2 *	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Adecuado como diana farmacológica	Sí **	Sí	Sí	Sí **	Sí	No

*Más del 50% de los miembros de la familia. **Excepto receptores sensoriales. AA: aminoácidos; CA: dominio cadherina; Calx-beta: dominio encontrado en los intercambiadores de Na-Ca; CUB: semejante a la estructura de inmunoglobulinas; EAR: repetición asociada a epilepsia; EGF: dominio del factor de crecimiento epidérmico; EGF-Lam: dominio similar a laminina EGF; ECL: bucle extracelular; GBL: dominio lectina de unión a galactosa; GPS: sitio proteolítico de GPCR; HBD: dominio de unión a hormonas; Ig: dominio inmunoglobulina; LamG: dominio laminina G; LDLa: receptor de lipoproteínas de baja densidad clase A; Lectina de tipo C: similar al dominio de reconocimiento de lectina tipo C o de carbohidratos; LRR: repetición rica en leucina; OLF: dominio olfatomedina; ORs: receptores olfatorios; PTX: dominio pentraxina; SEA: dominio encontrado en la proteína espermática de erizo marino; SUSHI: proteína de control de complemento o repeticiones consenso cortas; TSP1: dominio tromboespondina 1; VFTM: dominio Venus atrapamoscas.

El módulo extracelular presenta una gran diversidad estructural, pero poca movilidad durante la activación, sin embargo, aunque los cambios conformacionales tienden a ser mayores en el lado intracelular del GPCR, en la mitad extracelular del receptor también se producen algunos cambios. El bolsillo de unión al ligando sufre cambios sutiles, pero importantes, en la estructura que se acoplan a los cambios conformacionales de las hélices en el lado intracelular. La movilidad de los bucles extracelulares del receptor puede afectar a la cinética de unión de los ligandos que se unen al bolsillo de unión. Estos bucles también pueden formar sitios de unión

alternativos para ligandos conocidos como moduladores alostéricos, cuya presencia puede causar cambios conformacionales localizados que alteren las propiedades del bolsillo de unión, incluyendo su afinidad por los ligandos nativos [20].

Con frecuencia, el sitio de unión del ligando nativo (sitio ortostérico) de los GPCRs de clase A reside en el centro del haz helicoidal de los siete dominios transmembranas, ubicado entre los bucles extracelulares y el plano medio de la membrana. Los sitios ortostéricos exhiben diferentes formas y composición dependiendo de la naturaleza del ligando. Por ejemplo, los ligandos más lipofílicos, como los cannabinoides, entran en el receptor desde la membrana y el sitio de unión hidrofóbico está cubierto con residuos de los bucles extracelulares para proporcionar una barrera al espacio extracelular hidrofílico [21].

La región intracelular interactúa con distintas proteínas G, arrestinas, proteínas de andamiaje y otros efectores e incluye el extremo carboxilo terminal que puede proveer sitios de palmitoilación. A diferencia de la región extracelular, la región intracelular está más conservada pero está sujeta a mayores cambios conformacionales que la región extracelular tras la activación del receptor [17].

1.4. Vías de señalización

La mayoría de los receptores responden a moléculas, llamadas ligandos, que al unirse al receptor desencadenan una respuesta celular específica. La señalización de los GPCRs es un proceso complejo que puede llevarse a cabo a través de las proteínas G o que puede ser independiente de las mismas [10].

La proteína G es una proteína heterotrimérica constituida por tres subunidades: α , β y γ . Las proteínas G tienen actividad GTPasa por parte de la subunidad α , es decir, pueden hidrolizar trifosfato de guanosina (GTP) a difosfato de guanosina (GDP).

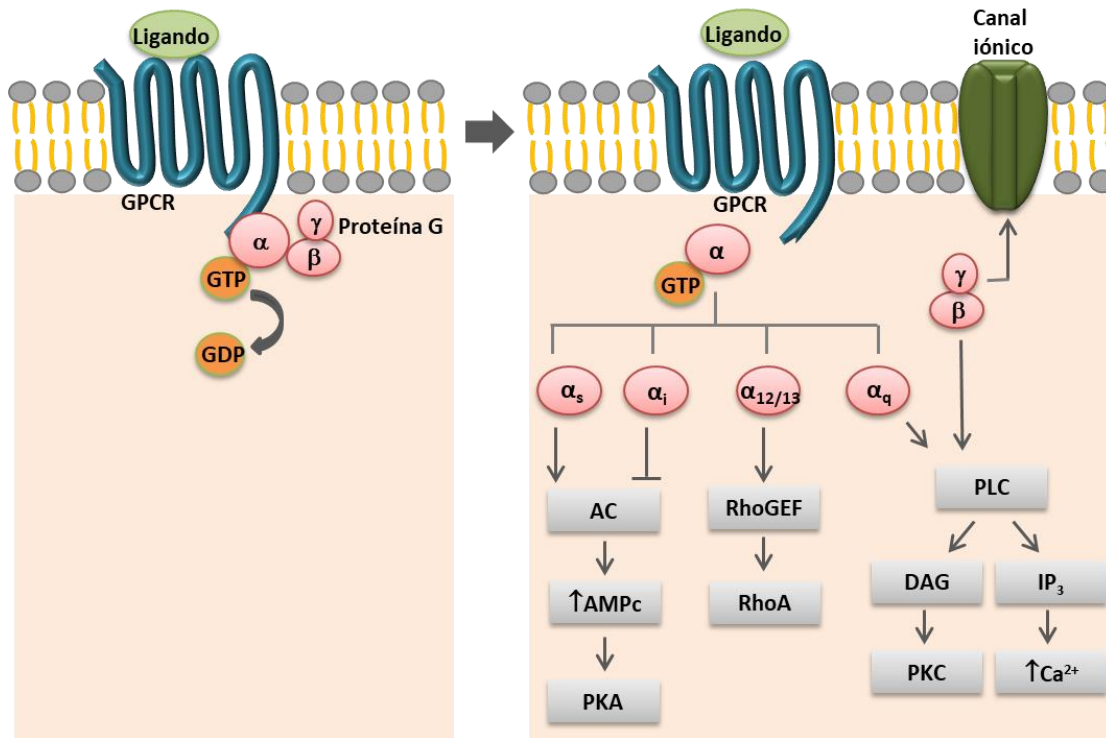


Figura 5. Señalización de un receptor GPCR a través de la proteína G heterotrimérica. Cuando el ligando se une al receptor interacciona con la proteína G trimérica y la subunidad α se disocia uniéndose a proteínas intracelulares como la adenilato ciclasa (AC), la proteína Rho o la fosfolipasa C (PLC) regulando su actividad. Estas proteínas modulan la señalización directamente o través de segundos mensajeros (AMP cíclico (AMPc), diacilglicerol (DAG) o inositol trifosfato (IP_3)) regulando la producción de efectores como la proteína quinasa A (PKA) o C (PKC). Las subunidades $\beta\gamma$ unidas también pueden regular vías de señalización como la de la PLC o activar canales iónicos. *Tomado de [22].*

En la señalización dependiente de proteína G (Figura 5), cuando el ligando se une al receptor se produce un cambio conformacional y éste pasa a tener una conformación activa en la que es capaz de interactuar con la proteína G heterotrimérica. Cuando el GPCR interacciona con la proteína G, la subunidad α se une a GTP liberando GDP y disociándose del dímero $\beta\gamma$. Tanto la subunidad α unida a GTP como el dímero $\beta\gamma$ activan diferentes vías de señalización. La activación se detiene cuando las proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G (RGS) inducen la actividad GTPasa y la subunidad α , unida a GDP, se reasocia al dímero $\beta\gamma$ quedando la proteína G en estado inactivo y, por tanto, pudiendo participar en un nuevo ciclo de activación. Existen varios tipos de proteínas G y el efecto producido dependerá de la subunidad α (α_s , α_i , $\alpha_{12/13}$ y α_q) que posean y del dímero $\beta\gamma$ que posee su propia cascada de señalización [10]. Las familias G_{α_s} y G_{α_i} participan en las rutas dependientes de AMP cíclico, la familia G_{α_q} activa las rutas dependientes de fosfolipasa C y la familia $G_{\alpha_{12/13}}$ activa una pequeña familia de GTPasas [23]–[26].

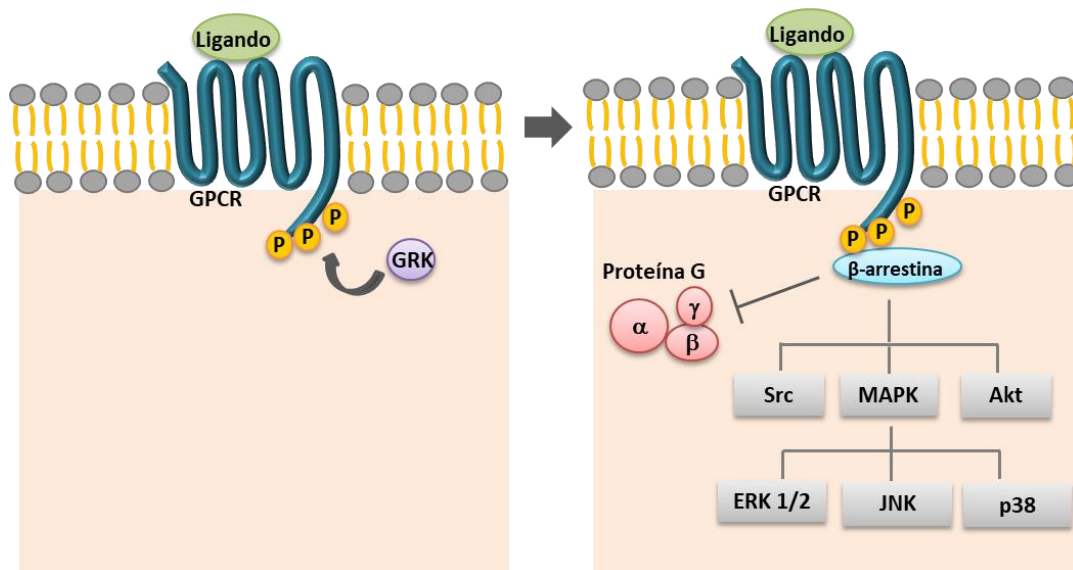


Figura 6. Señalización independiente de proteína G. Cuando el ligando se une al receptor se produce la fosforilación del receptor y el posterior reclutamiento de β -arrestina que desencadena la desensibilización o la señalización celular a través de la interacción con proteínas efectoras como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), Src o Akt. Tomado de [22].

Los GPCRs no solo señalizan a través de las proteínas G, sino que también pueden señalizar a través de mediadores independientes de las proteínas G, como son las β -arrestinas (Figura 6). Tras la unión del ligando, se produce la fosforilación del carboxilo terminal de los GPCRs por un segundo mensajero dependiente de quinasa y por las GPCR quinasas (GRKs). La fosforilación induce el reclutamiento de β -arrestina que compite estéricamente con la proteína G en la unión al receptor, produciéndose la desensibilización del receptor para la señal mediada por proteína G. El reclutamiento de β -arrestina también puede conducir a la internalización del receptor y señalización a través de proteínas quinasas [22], [27], [28]. El complejo GPCR- β -arrestina puede desencadenar numerosas vías de señalización a través de c-Src, ERK 1/2, p38, JNK o Akt de manera independiente a la proteína G [22], [29].

Se conoce que algunos ligandos pueden activar selectivamente la vía de la proteína G o la vía de la β -arrestina, lo que se denomina activación sesgada (Figura 7A-B). El descubrimiento y desarrollo de ligandos sesgados, que activan preferencialmente la señalización sesgada por proteína G o por β -arrestina, podría promover selectivamente efectos beneficiosos y bloquear efectos perjudiciales o no deseados inducidos por la activación de los GPCRs. Así, el descubrimiento de ligandos sesgados ha cambiado por completo el concepto clásico de fármacos dirigidos a GPCRs [30], [31]. Las respuestas

sesgadas pueden ser inducidas por ligandos sesgados, receptores sesgados o sesgos del sistema, y cualquiera de ellos puede dar como resultado una señalización preferencial a través de proteínas G o β -arrestinas [32].

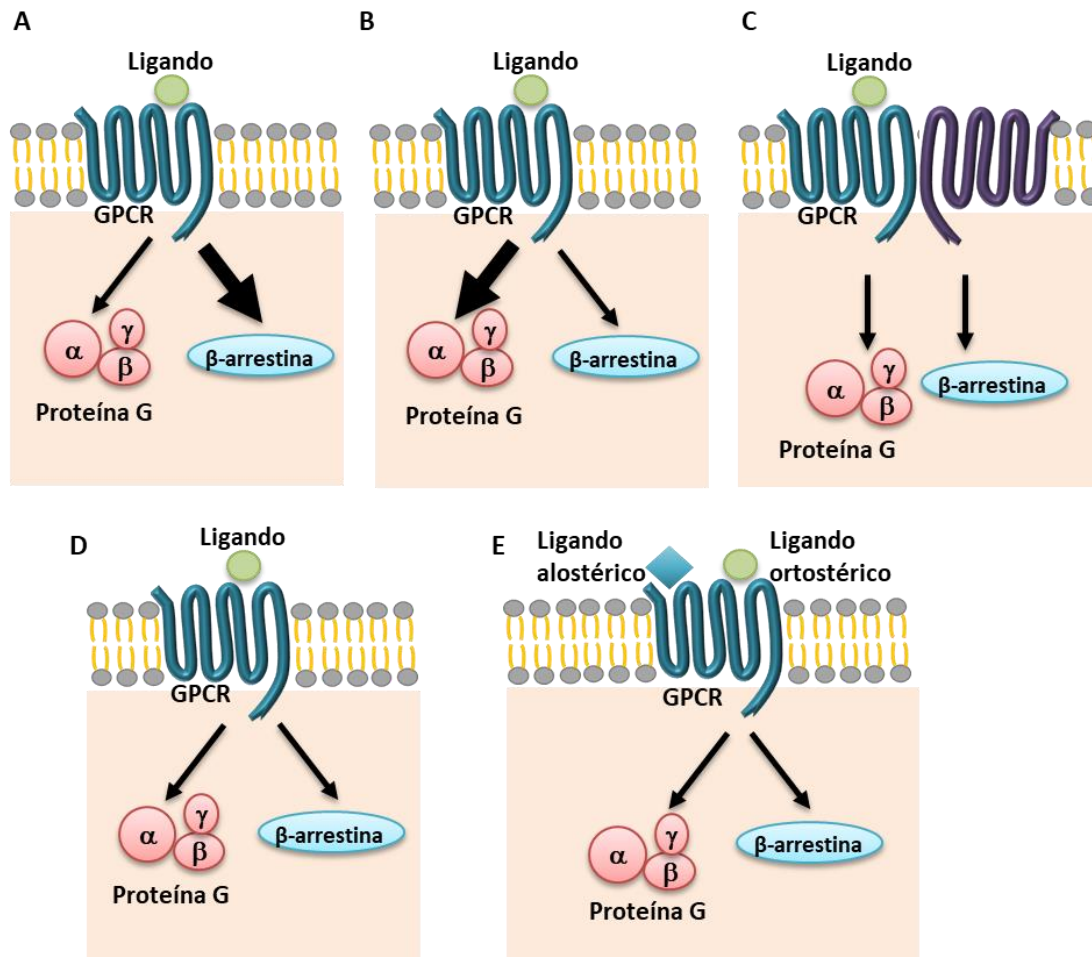


Figura 7. Modos de activación de los GPCRs. (A) Activación sesgada a través de ligando sesgado hacia la señalización por β -arrestina. (B) Activación sesgada a través de ligando sesgado hacia la señalización por proteína G. (C) Activación por dimerización (D) Activación clásica por ligando ortostérico. (E) Activación alostérica por ligando alostérico de unión a un sitio diferente al ligando endógeno. Tomado de [30], [33].

Aunque los GPCRs pueden funcionar en muchos casos como monómeros, a menudo parecen ensamblarse como dímeros (Figura 7C), y en algunos casos incluso como tetrámeros o complejos de orden superior [34]. Está en debate la relevancia fisiológica de los dímeros de GPCRs, tanto heterodímeros como homodímeros, frente a los GPCRs monoméricos. Los GPCRs de la familia C, tales como los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), son activos solamente en el estado dimérico y la conformación en la interfaz puede transmitir efectos alostéricos, mientras que los receptores GABA_B requieren un heterodímero funcional de los subtipos 1 y 2. Otros GPCRs, tales como los GPCRs semejantes a rodopsina, también puede actuar en forma

monomérica o dimérica [35]. Se ha demostrado que el acoplamiento de proteína G, la señalización y los procesos reguladores, como la internalización, están influenciados por la naturaleza dimérica de los receptores. En particular, los cambios en las propiedades de unión al ligando y la señalización que acompañan a la heterodimerización podrían dar lugar a una diversidad farmacológica inesperada que habría que considerar [36].

La gran mayoría de los ligandos se unen a un GPCR, generalmente, en el mismo sitio que su ligando nativo. Este sitio, llamado bolsillo de unión en GPCRs de clase A, se conoce como sitio ortostérico y estos ligandos como ligandos ortostéricos (Figura 7D). Sin embargo, ciertos ligandos, conocidos como ligandos alostéricos o moduladores alostéricos, se unen en otros sitios (Figura 7E). Estos moduladores alostéricos pueden influir de múltiples maneras en la estructura, dinámica y función de los GPCRs.

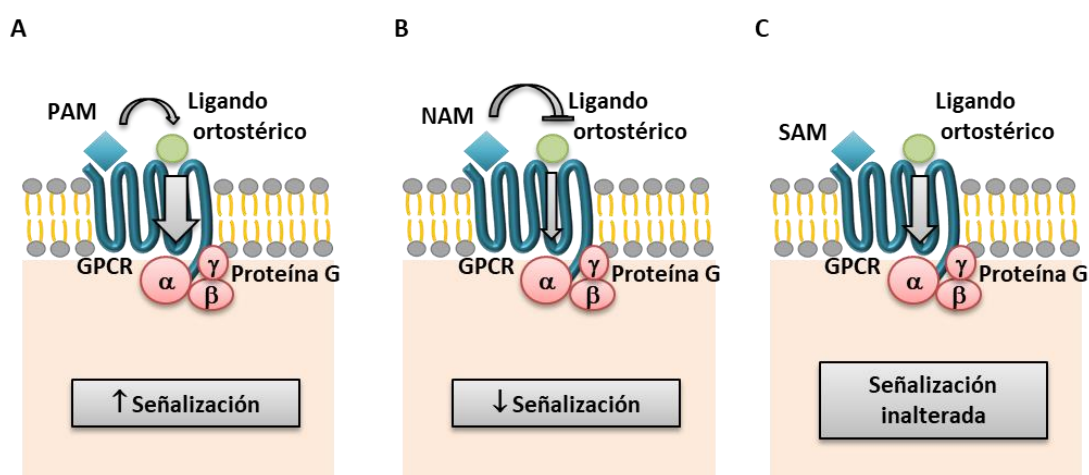


Figura 8. Influencia de los moduladores alostéricos en la función del agonista ortostérico. El modulador alostérico se une a un sitio topográficamente distinto e induce cambios conformacionales en el receptor influyendo en la función del agonista ortostérico. El modulador alostérico positivo (PAM) (A) aumenta y el modulador alostérico negativo (NAM) (B) disminuye la afinidad y/o eficacia del agonista ortostérico. El modulador alostérico silencioso (SAM) o ligando alostérico neutro (NAL) (C) no influye en la función del agonista ortostérico. Tomado de [37].

La mayoría de los fármacos dirigidos a GPCRs son funcionalmente activos al unirse al sitio ortostérico del receptor, que es el responsable de la unión de los ligandos endógenos de los GPCRs. Los fármacos que se unen al sitio ortostérico pueden activar el receptor (agonistas o agonistas parciales), inhibir la activación del receptor (antagonistas) o producir la inversión de la respuesta funcional (agonistas inversos). Como estrategia alternativa hacia el diseño de fármacos, la modulación alostérica es

un enfoque emergente donde los ligandos son diseñados para que puedan modular la función del receptor, pero no comprometan el sitio ortostérico del receptor. Los moduladores alostéricos puros, por definición, pueden funcionar como moduladores alostéricos positivos (PAM) (Figura 8A) incrementando la respuesta funcional del receptor y/o afinidad intrínseca por un ligando ortostérico, como moduladores alostéricos negativos (NAM) (Figura 8B) suprimiendo total o parcialmente la respuesta funcional del receptor a un ligando ortostérico, o como moduladores alostéricos silenciosos (SAM) (Figura 8C), también llamados ligandos alostéricos neutros (NAL), uniéndose a un sitio alostérico del receptor sin producir cambios medibles en el receptor o en el comportamiento del ligando ortostérico [37], [38].

2. Receptores de quimioquinas

2.1. Características generales

Los receptores de quimioquinas constituyen una familia de GPCRs que se encuentran en vertebrados, bacterias y virus. Estos receptores son regulados por pequeños ligandos proteicos de 8-10 kDa conocidos como quimioquinas, pertenecientes a la familia de las citoquinas, con una estructura de núcleo globular estabilizada por 1-2 puentes disulfuro conservados [39]. Estos receptores se dividen en cuatro subclases: C, CC, CXC y CX3C en base a la ubicación de un residuo de cisteína clave que participa en los puentes disulfuro, ya sean yuxtapuestos (CC) o separados por uno o tres aminoácidos (CXC y CX3C, respectivamente).

Han sido identificadas alrededor de 50 quimioquinas y 23 receptores de quimioquinas (Tabla 2). En humanos existen 18 receptores de quimioquinas convencionales (CCR1-10, CXCR1-6, XCR1 y CX3CR1) y cinco atípicos (ACKRs: ACKR1, ACKR2, ACKR3, ACKR4 y ACKR5 (CCRL2)). Todos tienen un amplio y abierto bolsillo ortostérico para la unión de su ligando [40]–[42].

Tabla 2. Receptores de quimioquinas humanos. Tomado de [43]–[45].

Receptor de quimioquinas	Ligando endógeno/natural	Localización celular
CCR1	CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23	Th1, Th17, Tregs, macrófagos, monocitos, neutrófilos, DC, NK, MDSCs
CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL16, CCL24, CCL26	Th1, Th2, Th9, Th17, TRM, macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, DC
CCR3	CCL2, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28	Th1, Th2, Th9, Tregs, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, MDSCs
CCR4	CCL17, CCL22	Th2, Th17, Th22, Tregs, T CD3, monocitos, basófilos, DC
CCR5	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL16	Th1, Th9, Th17, TEM, TRM, T CD8, macrófagos, DC, NK
CCR6	CCL20, β -defensinas	Th9, Th17, Th22, TFH, Tregs, DC, NK, NKT, T $\gamma\delta$, ILC, B
CCR7	CCL19, CCL21	Tregs, TCM, T activadas, T naïve, DC, B
CCR8	CCL1	Tregs, Th2, T $\gamma\delta$, macrófagos, monocitos, TRM
CCR9	CCL25	Th17, Th22, PC IgA+, DC
CCR10	CCL27, CCL28	Th17, Th22, macrófagos, PC IgA+
CXCR1	CXCL6, CXCL8	TEFF CD8, macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, MDSCs, NK
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8	T CD8, macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos, MDSCs
CXCR3	CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL19, CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12	Th1, Th9, Tregs, DCs, T CD4 activadas, TCM CD8, NK, NKT, TFH, TEM
CXCR4	CXCL12	Tregs, macrófagos, monocitos, neutrófilos, T, MDSCs, B, PC
CXCR5	CXCL13	Th17, TFH, TFR, TCM, TEM CD8, B
CXCR6	CXCL16	Th17, Th22, T $\gamma\delta$, ILC, NK, NKT, PC
XCR1	XCL1, XCL2	DC
CX3CR1	CX3CL1	Th1, T $\gamma\delta$, DC, NK, macrófagos
ACKR1	CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL11, CCL2, CCL5, CCL7, CCL11, CCL14, CCL17	RBC, LEC, células de Purkinje
ACKR2	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL17, CCL22	DC, B, leucocitos, LEC
ACKR3	CXCL11, CXCL12	B, células mesenquimales, células estromales
ACKR4	CCL19, CCL21, CCL25	Células de pulmón e intestino, nódulos linfáticos
ACKR5	CCL19	Macrófagos, monocitos, neutrófilos, DC, T, B, NK, mastocitos

B: células B; DC: células dendríticas; ILC: células linfoides innatas; LEC: células endoteliales linfáticas; NK: células *natural killer*; NKT: células T *natural killer*; PC: células plasmáticas; RBC: glóbulos rojos; MDSCs: células mieloides supresoras; T: células T; Th: células T ayudadoras; TCM: células T de memoria central; TEFF: células T efectoras; TEM: células T de memoria efectoras; TFH: células T ayudadoras foliculares; TFR: células T reguladoras foliculares; TRM: células T de memoria residente.

Los receptores de quimioquinas están presentes en la superficie celular de linfocitos T y B, células dendríticas, macrófagos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células linfoides innatas, neuronas, células epiteliales y células endoteliales. Participan en funciones como el desarrollo embrionario, la angiogénesis, la

cicatrización de heridas, el desarrollo de la población de linfocitos T colaboradores y la maduración de las células B [46].

Todos los receptores de quimioquinas pertenecen a la clase A y, cuando señalizan a través de proteínas G, inducen la transducción de señales a través de $G_{\alpha i}$ y ocasionalmente de otras proteínas G. La mayoría de quimioquinas inducen señalización a través de flujo de calcio, ya sea por entrada o salida de éste a la célula [47]. Está documentado que la proteína $G_{\alpha q}$, con los cinco últimos aminoácidos cambiados con las proteínas $G_{\alpha s}$ o $G_{\alpha i}$, puede acoplarse a GPCRs que originalmente se acoplaban a $G_{\alpha s}$ o $G_{\alpha i}$ e inducir la movilización por calcio tras la estimulación por su ligando [48]. La red de señalización activada a través de las quimioquinas es compleja dando lugar a múltiples resultados que incluyen la quimiotaxis, la adhesión, la proliferación y el control de la expresión génica [47]. A través de los receptores de quimioquinas, sus ligandos pueden regular la migración, activación, diferenciación y supervivencia de los leucocitos durante la respuesta inmune y por tanto están involucrados en numerosas enfermedades incluyendo cáncer, trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [39], [46], [49].

Para determinar qué vías de señalización son relevantes para la respuesta biológica son de utilidad los estudios en animales transgénicos knockout. Los animales knockout de receptores de quimioquinas se emplean para discernir el papel de cada receptor *in vivo* y pueden proporcionar una base para el desarrollo de futuros agentes terapéuticos dedicados a interrumpir el reclutamiento y activación de linfocitos [50].

Dada la importancia de los GPCRs en muchos procesos fisiológicos y su relevancia farmacéutica como diana de fármacos, entender el papel de variaciones en la secuencia de los GPCRs tiene implicaciones potenciales para dilucidar los mecanismos de patogénesis de la enfermedad y los problemas de eficacia de los fármacos. El estudio de los polimorfismos de nucleótido único (SNP), variaciones de una base entre genomas de una especie, se puede usar para explicar las diferencias de respuesta a un fármaco entre individuos y para adaptar los fármacos en función de la genética del individuo [51].

2.2. Receptor CCR6 humano

El receptor CC de quimioquinas 6 humano, CCR6h (*human CC chemokine receptor 6*), es un GPCR de la clase A perteneciente al grupo de los receptores tipo CC de la familia de las quimioquinas. En humanos, el receptor CCR6 es identificado con diferentes sinónimos: DCR2, DRY6, BN-1, CCR-6, CMKBR6, GPRCY4, STRL22, CD196, CKRL3, GPR29, CKR-L3, CC-CKR-6 o C-C CKR-6 [52].

El receptor CCR6h se expresa en muchos tejidos, predominantemente en apéndice, páncreas, ganglios linfáticos y bazo y, en menor medida, en el hígado fetal, testículos, colon, intestino delgado y timo. A nivel celular, CCR6h es característico de linfocitos T, tanto colaboradores (Th17) como reguladores (Treg), células linfoides innatas-3 (ILC-3), neutrófilos, células *natural killer* (NK), células B y células dendríticas inmaduras [52], [53] (Tabla 3). Se ha demostrado que las células que se caracterizan por expresar el receptor de quimioquinas CCR6h, podrían tener un papel en numerosas enfermedades inflamatorias y autoinmunes [54].

Tabla 3. Células CCR6⁺. Tomado de [55].

Tipo celular	Especie	Referencias
Célula T de memoria CD45RO ⁺	Humano	[56]
Célula Th17	Humano, ratón	[57]
Célula T reguladora	Humano, ratón	[58]
Célula B virgen	Humano, ratón	[59], [60]
Célula B de memoria	Humano, ratón	[59], [61]
DC mielóide CD11b ⁺ CD8a ⁻	Ratón	[59], [62]
DC mielóide derivada célula BM inmadura CD34 ⁺	Humano	[63], [64]
DC derivada de monocito inmaduro	Humano	[65]
Célula de Langerhans (LC)	Humano	[66]
Macrófago (peritoneal)	Ratón	[67]
Célula NKT	Humano	[68]
Célula T infectada HTLV-1	Humano	[69]
Célula de cáncer pancreático	Humano	[70]

BM: célula de la médula ósea, DC: célula dendrítica, NKT: célula T *natural killer*.

Se ha estudiado que los polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el gen de CCR6 pueden ser la posible causa de muchas enfermedades como artritis reumatoide, psoriasis, nefritis lúpica, esclerodermia y otras enfermedades autoinmunes. Un estudio sugiere que los SNPs más patogénicos en el gen CCR6 son los que implican un cambio de aminoácido como son rs1376162684 (T₈₁I), rs751102128 (P₁₁₃S) y rs1185426631 (W₁₇₂R), y los SNPs rs1438637216 (Q₁₄₉Ter), rs139697820 (R₁₅₇Ter), rs768420505

(C₁₆₈Ter), rs1282264186 (Q₁₉₂Ter), rs1394647982 (W₂₁₀Ter), rs769360638 (R₂₆₈Ter) y rs1263402382 (Y₃₁₆Ter) que dan como resultado un codón de parada. Por tanto, los SNPs mencionados deben ser considerados como las estrategias terapéuticas más relevantes [71].

En 1997, Baba et. al, documentaron que CCR6h es el receptor específico de la quimioquina CCL20 [72]. CCL20 ha sido identificada con varios nombres como proteína inflamatoria de macrófagos-3 α (MIP-3 α , *Macrophage Inflammatory Protein-3 α*), exodus-1 o quimioquina hepática y regulada por activación (LARC, *liver and activation regulated chemokine*) [46]. CCL20 es la única quimioquina de alta afinidad de CCR6h (Figura 9). Aunque hasta 2012, varias hipótesis apuntaban a una relación de CCR6 con la quimioquina CCL18 esta relación no pudo ser demostrada en ratones [73].

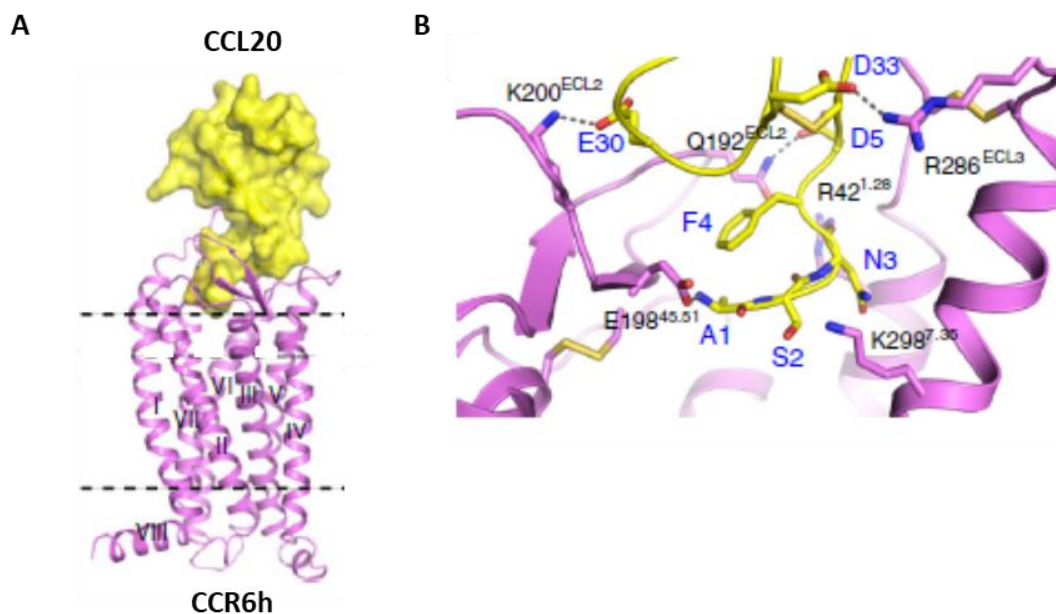


Figura 9. Estructura del cristal CCR6h-CCL20 (PDB ID: 6WWZ). (A) CCL20 (amarillo) se une en un bolsillo poco profundo en la superficie extracelular con mínimo contacto con el núcleo que dejan las 7 hélices transmembrana de CCR6h (rosa). Las líneas de puntos indican los límites de la membrana. (B) El N-terminal de CCL20 se une al bolsillo ortostérico de CCR6h con interacciones polares críticas mostradas por líneas punteadas. Tomado de [39].

CCL20 se expresa en varios tejidos humanos, observándose principalmente en ganglios linfáticos, hígado y pulmones. A nivel celular, secretan CCL20 las células ligadas a inflamación, destacando células endoteliales, neutrófilos, células Th17, células B, células NK, células dendríticas, macrófagos y células de Langerhans [52], [53],

[74]. Se ha descrito que los linfocitos Th17 expresan CCL20, pero no los linfocitos Treg u otras poblaciones de linfocitos T colaboradores [46].

Recientemente se ha descrito que las β -defensinas humanas -1 y -2 (HBD), un grupo de péptidos antibacterianos, actúan como ligandos de baja afinidad del receptor CCR6h [47]. Se ha demostrado que las β -defensinas humanas también provocan quimiotaxis a través de CCR6h [52]. Existen cada vez más evidencias de que la β -defensina humana-2 (HBD2) contribuye a la migración de células epiteliales para mantener la integridad de la barrera epitelial intestinal, actuando como defensa de primera línea contra la invasión microbiana. Además, HBD2 es capaz de estimular la entrada de calcio intracelular y se cree que aumenta la movilización de células inmunes, la defensa microbiana, la restitución de la barrera intestinal y los mecanismos inmunitarios en general. Estos resultados respaldan la idea de que HBD2 funciona de manera paralela a CCL20, actuando como un ligando adicional asociado a CCR6h [53].

2.3. Señalización de CCR6h: eje CCR6h-CCL20

Las quimioquinas controlan la migración a través de interacciones específicas con los receptores de quimioquinas, expresados principalmente en la superficie de los leucocitos [75]. El par compuesto por el receptor de quimioquinas y su ligando (CCR6h-CCL20) es reconocido por su inestimable potencial terapéutico en la investigación inmunológica [46]. Esta interacción ha tenido tradicionalmente dos papeles fundamentales en inmunología; como par involucrado en la homeostasis inmunológica y como par conductor en inflamación y autoinmunidad, principalmente a través de las células Th17 [76].

La importancia del eje CCR6h-CCL20 ha quedado enfatizada por el descubrimiento de la subpoblación de células T CD4⁺ ayudadoras (Th, *T helper*), entre las que se encuentran las células Th17, y células T CD4⁺ reguladoras (Treg) que expresan CCR6h y forman una plataforma que regula estrictamente la tolerancia inmunitaria en individuos sanos. La interrupción de esta delicada alianza inclina la balanza en favor de las células proinflamatorias, Th17, o de las células reguladoras inmunológicas, Treg, que son reclutadas ávidamente en los sitios de infección o lesión [75] (Figura 10).

La interacción CCR6h-CCL20 favorece numerosas afecciones inflamatorias, autoinmunes y procesos metastásicos de muchos tumores. En enfermedades inflamatorias, la función crítica de CCR6h es mantener la homeostasis de los leucocitos a través del reclutamiento de las células Th17 y Treg a los sitios de inflamación [77].

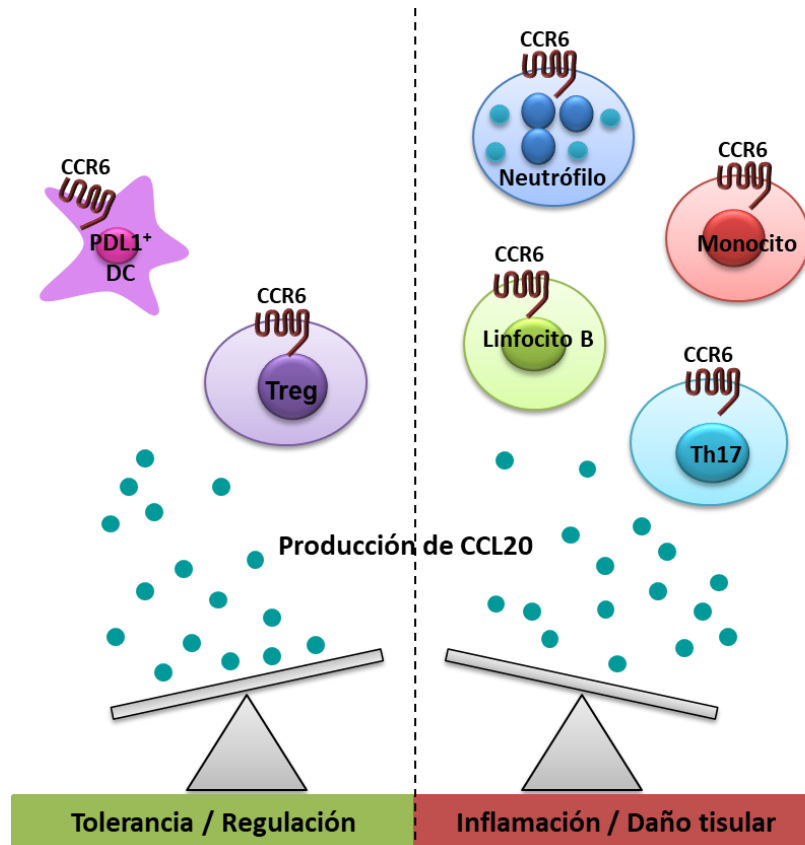


Figura 10. Eje CCR6-CCL20: equilibrio entre tolerancia e inflamación. La producción de CCL20 atrae a las células reguladoras e inflamatorias a los sitios de producción de quimiocinas. Las células T reguladoras (Treg) y las células dendríticas (DC) tolerogénicas (PDL1⁺) regulan las respuestas inflamatorias; en cambio, las células T inflamatorias (Th17), las células B, los neutrófilos y los monocitos pueden ser reclutados en virtud de la expresión de CCR6, conduciendo al desarrollo de respuestas inflamatorias. PDL: ligando de muerte programada. Tomado de [75].

Como en la mayoría de los receptores de quimiocinas clásicos, se ha demostrado que la señalización a través de CCR6h implica la activación de la movilización de calcio, PLC- β , fosfatidilinositol 3 quinasa/Akt, la fosforilación ERK1/2 y la polimerización de actina [54].

La activación de CCR6h por CCL20 da lugar a una cascada de transducción de señales a través de la proteína G heterotrimérica G $_{\alpha i}$. Tras la unión de CCL20 a CCR6h se desencadena la inhibición mediada por G $_{\alpha i}$ de la producción de AMPc y se induce la quimiotaxis de células que expresan CCR6h hacia zonas con alta concentración de

CCL20 [78]. El receptor juega un papel particularmente importante a través del reclutamiento de células Th17 proinflamatorias, productoras de IL-17, a los sitios de inflamación. Por tanto, CCR6h es una diana potencial contra enfermedades inflamatorias y autoinmunes [39].

La unión de CCL20 a CCR6h también puede desencadenar una cascada de señalización independiente de proteína G, a través de las β -arrestinas. Tras la activación de CCR6h, se fosforilan distintos residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) del carboxilo terminal del receptor. Un estudio realizado en el que se sustituyen por alanina ciertos residuos de serina y treonina demostró que los grupos de residuos Thr360/Ser361/Thr363 y Ser370/Ser371 en el dominio C-terminal regulan diferencialmente la señalización inducida por CCL20 y la respuesta celular. Estos dominios intracelulares fosforilados están implicados en el reclutamiento de β -arrestina 1 y 2, regulando los efectos mediados por la activación de CCR6h entre los que se incluyen la internalización del receptor, migración celular, distribución de F-actina y activación de ERK 1/2 [54].

Cuando las células dendríticas muestran un antígeno a las células T vírgenes, también conocidas como T naïve o Th0, se produce la diferenciación de éstas en subpoblaciones efectoras mediada por el entorno de citoquinas predominante junto a otros factores (Figura 11). Las células T efectoras están formadas por cuatro subtipos inmunes: Th1, Th2, Th17 y Treg. Los subgrupos Th17 y Treg tienen roles funcionales claramente opuestos en la respuesta inmune; mientras que los Treg amortiguan la inflamación y promueven la tolerancia inmunitaria inducida por citoquinas inmunosupresoras que ayudan a la restitución de los tejidos, los Th17 desencadenan la inflamación e inducen el inicio de la enfermedad a través de la liberación de citoquinas que provocan daño tisular [53], [75].

Las células Treg se definen como células T CD4⁺ que suprimen activamente la respuesta efectora de las células T a través de la producción de citoquinas como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y la interleuquina-10 (IL-10). Se caracterizan por la expresión de CD25 y el factor de transcripción FoxP3 y dependen de TGF- β e interleuquina-2 (IL-2) para la consolidación de su linaje. Las células Th17

comparten un origen evolutivo común con las células Treg y, de manera similar, dependen de TGF- β para la consolidación de su linaje, aunque necesitan también de las citoquinas inflamatorias interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-1 β (IL-1 β) e interleuquina-23 (IL-23) (Figura 11).

Las células Th17 tienen funciones altamente proinflamatorias a través de la producción de citoquinas como la interleuquina-17A (IL-17A), interleuquina-17F (IL-17F), interleuquina-21 (IL-21) e interleuquina-22 (IL-22) y son caracterizadas por la expresión del receptor de IL-23 y del factor de transcripción ROR γ t [75].

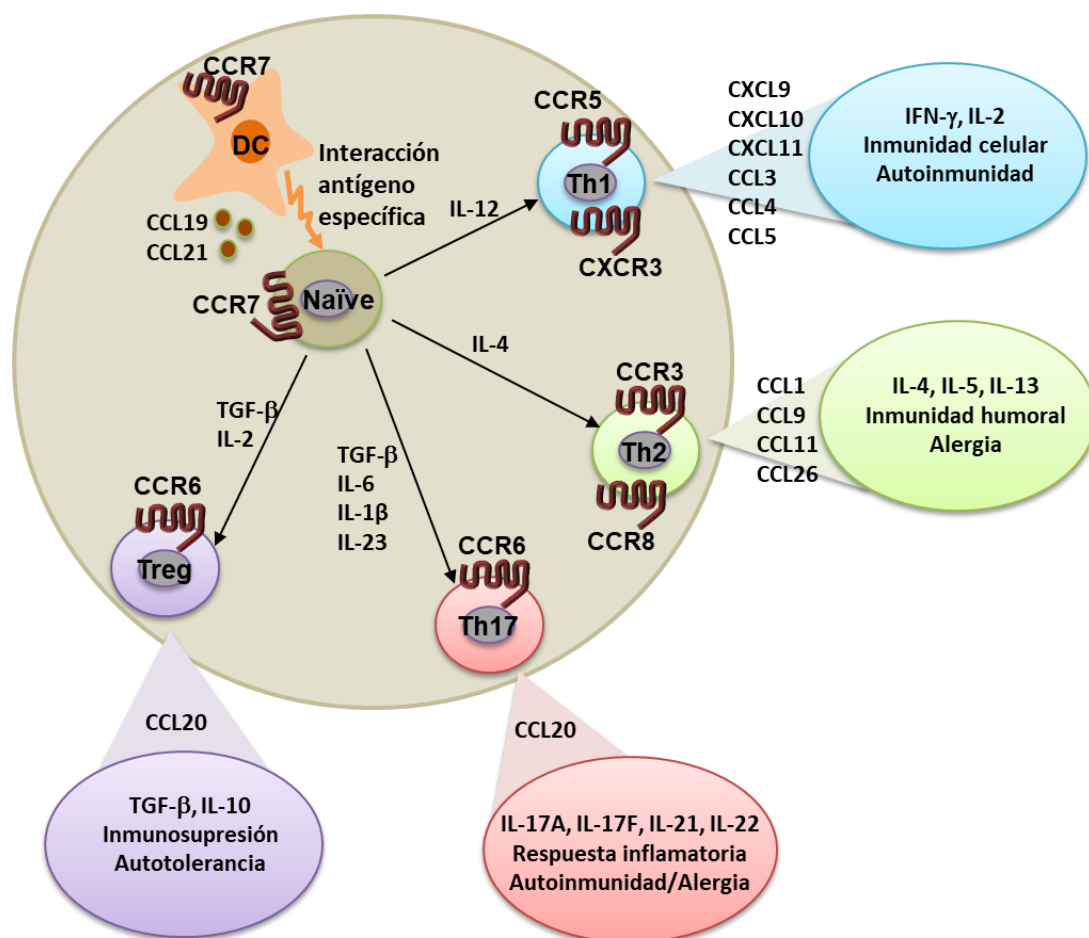


Figura 11. Diferenciación de células T. Las células dendríticas (DC) cargadas de antígenos y las células T vírgenes CD4⁺ sin diferenciar se dirigen selectivamente a la paracorteza de los nódulos linfáticos y áreas del bazo, a través de la expresión del receptor de quimioquinas CCR7, que guía a estas células a regiones de alta concentración de CCL19 y CCL21. La activación específica de antígeno de las células T vírgenes CD4⁺ por las células dendríticas conduce a la generación de diferentes subtipos de células efectoras en función de las citoquinas presentes en el entorno, derivadas de las células dendríticas, durante la estimulación de las células T. Diferentes subconjuntos de células CD4⁺ expresan distintos receptores de quimioquinas que los guían a sitios periféricos de producción de citoquinas. La atracción de las diferentes poblaciones de células T CD4⁺ conduce al desarrollo de formas divergentes de la respuesta inmune. Tomado de [75].

Los mecanismos subyacentes que favorecen los dos roles opuestos de las células Th17 y Treg aún no están claros, pero en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria la expresión del receptor CCR6h es considerada como el determinante de su proliferación selectiva. Múltiples citoquinas y factores de transcripción regulan la expresión de CCR6h en las células Th17. Son importantes reguladores en la inducción inmune de CCR6h: TGF- β , IL-6, IL-17, IL-21, IL-23, factores de transcripción selectivos de linaje y los receptores nucleares huérfanos relacionados con el ácido retinoico y (ROR γ t) y α (ROR α). El receptor CCR6h constituye un arma de doble filo por su habilidad para movilizar a la población de células Treg, inmunosupresoras, y de células Th17, proinflamatorias. Las células Treg, inducidas por el factor de transcripción FoxP3, son muy eficaces modulando la progresión de la enfermedad autoinmune al suprimir activamente la proliferación de las células T proinflamatorias. CCR6h impulsa el reclutamiento quimiotáctico de las subpoblaciones Th17 y Treg a los sitios de inflamación en un circuito de retroalimentación autosostenida, ya que las células Th17 tienen la capacidad de expresar CCL20, inducida por las citoquinas TGF- β e IL-6 y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). Obviamente quedan factores hasta ahora no identificados como citoquinas, moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras y todo un repertorio de factores de inducción inmune innata asociados a CCR6h que contribuye a la movilización selectiva de las células Th17 frente a la distribución de Treg a los sitios de inflamación [53].

El impacto inmunológico de la asociación receptor de quimioquina-ligando tiene consecuencias de gran alcance en la salud y la enfermedad que afectan a múltiples órganos del cuerpo humano. Numerosos estudios han demostrado que el eje CCR6h-CCL20 influye directamente en el sistema nervioso, respiratorio, gastrointestinal, nefrouinario, esquelético y reproductivo, a través de mecanismos inmunes pleiotrópicos, manifestándose como enfermedades con altas tasas de mortalidad. Dado los exclusivos roles que CCR6h y CCL20 desempeñan en la fisiopatología clínica, este eje es considerado como un potencial objetivo terapéutico, donde se espera que el bloqueo o inhibición de los componentes del eje sea la base de una farmacoterapia exitosa para el tratamiento de las enfermedades con las que se relacionan [46].

2.4. Aplicaciones terapéuticas de CCR6h como diana farmacológica

En una persona sana, la pareja CCR6-CCL20 desempeña un papel en la tolerancia inmune regulando la supresión inmunológica. Sin embargo, ante un estímulo inflamatorio las células Treg FoxP3⁺ tienden a proliferar ayudadas por su entorno de citoquinas. Cuando esta función homeostática típica se interrumpe, se produce un aumento en el eje Th1-Th17, que promueve una respuesta inmunológica adversa de múltiples sistemas que culminan en una serie de enfermedades, como sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad hepática crónica, encefalomiелitis autoinmune experimental, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Behcet, psoriasis, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, infección por el VIH y una serie de cánceres y sus metástasis, como se muestra en la Tabla 4 [52].

Tabla 4. Órganos y enfermedades en los que opera el eje CCR6-CCL20. Tomado de [52].

Órgano	Tipo celular involucrado	Enfermedad producida	Referencia
Pulmón	Fibroblasto, AEC, DC, Th1, AM	IPF, sarcoidosis	[55], [79], [80]
Hígado	Th17, Treg, células T $\gamma\delta$	Enfermedad crónica del hígado	[81], [82]
Riñón	Th1, Th17, Treg	Nefritis glomerular	[83]–[86]
Cerebro	Th1, Th17, células T $\gamma\delta$	EAE, derrame cerebral	[87]–[89]
Ojo	Th17	Enfermedad del ojo seco	[90]
Piel	Th17	Psoriasis	[91], [92]
Articulación	CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	Artritis reumatoide	[93]–[95]
Intestino	Th17, Treg, Th1	IBD	[96]–[99]

AEC: células epiteliales alveolares; AM: macrófagos alveolares; DC: célula dendrítica; EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental; IBD: enfermedad inflamatoria intestinal; IPF: fibrosis pulmonar idiopática.

CCR6 inclina el equilibrio entre la regulación de la tolerancia homeostática y la fisiopatología inflamatoria. Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, se manifiestan como una inflamación crónica en la mucosa intestinal por una desregulación inmunitaria de los linfocitos T colaboradores (Figura 12). Así, CCR6 ocupa una posición exclusiva en la inmunología intestinal que lo convierte en una herramienta terapéutica para la producción de nuevos medicamentos contra las EII [53].

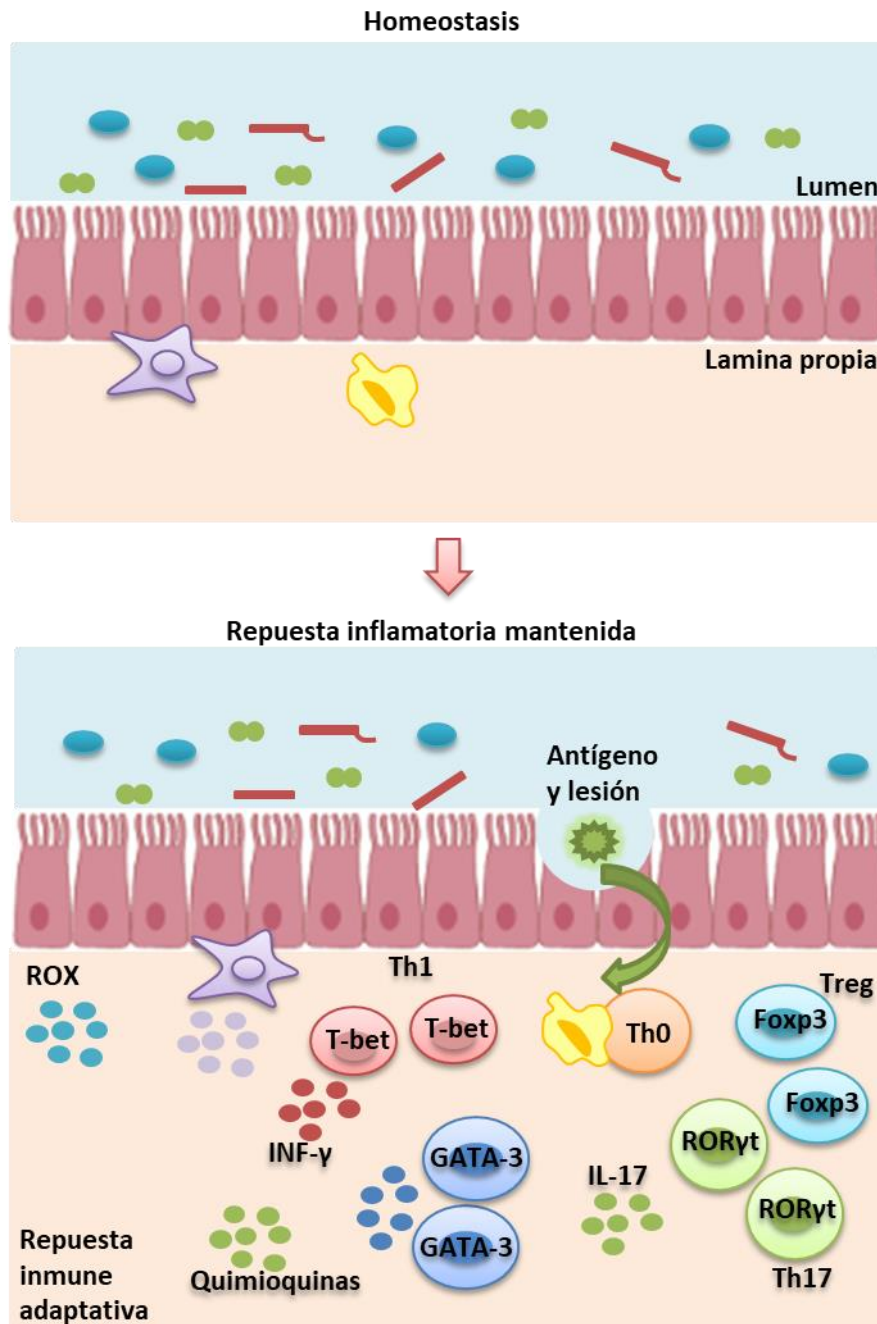


Figura 12. Fisiopatología de la EII. La homeostasis intestinal depende del equilibrio dinámico entre la microbiota, las células epiteliales intestinales y las células inmunes. La ruptura de este equilibrio desencadena el proceso inflamatorio crónico que se produce en la enfermedad inflamatoria intestinal. Durante la inflamación temprana, los antígenos extraños activan las diferentes células inmunes innatas ubicadas en el intestino, incluyendo las células NK, mastocitos, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Una reacción inflamatoria sostenida promueve la activación de la respuesta inmune adaptativa en la que las células T ayudadoras CD4⁺ efectoras anormalmente activadas sintetizan y liberan diferentes mediadores inflamatorios generando un círculo vicioso de inflamación que conduce a lesiones tisulares crónicas y a daño epitelial. *Tomado de [100].*

Recientemente, se han asociado las células Th17 con enfermedades autoinmunes en modelos animales de esclerosis múltiple (EM) y de artritis reumatoide [101]. Los aspectos autoinmunes de la EM están bien modelados a través del modelo animal

conocido como encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) [75]. En este modelo se han observado en la médula espinal y en los ganglios linfáticos, niveles de expresión elevados de CCR6 y CCL20 asociados con la gravedad de la enfermedad (Figura 13). La unión de CCL20 a CCR6 induce el movimiento de las células Th17 en el sistema nervioso central (SNC) a través de los plexos coroideos en el cerebro de los ratones con EAE [101].

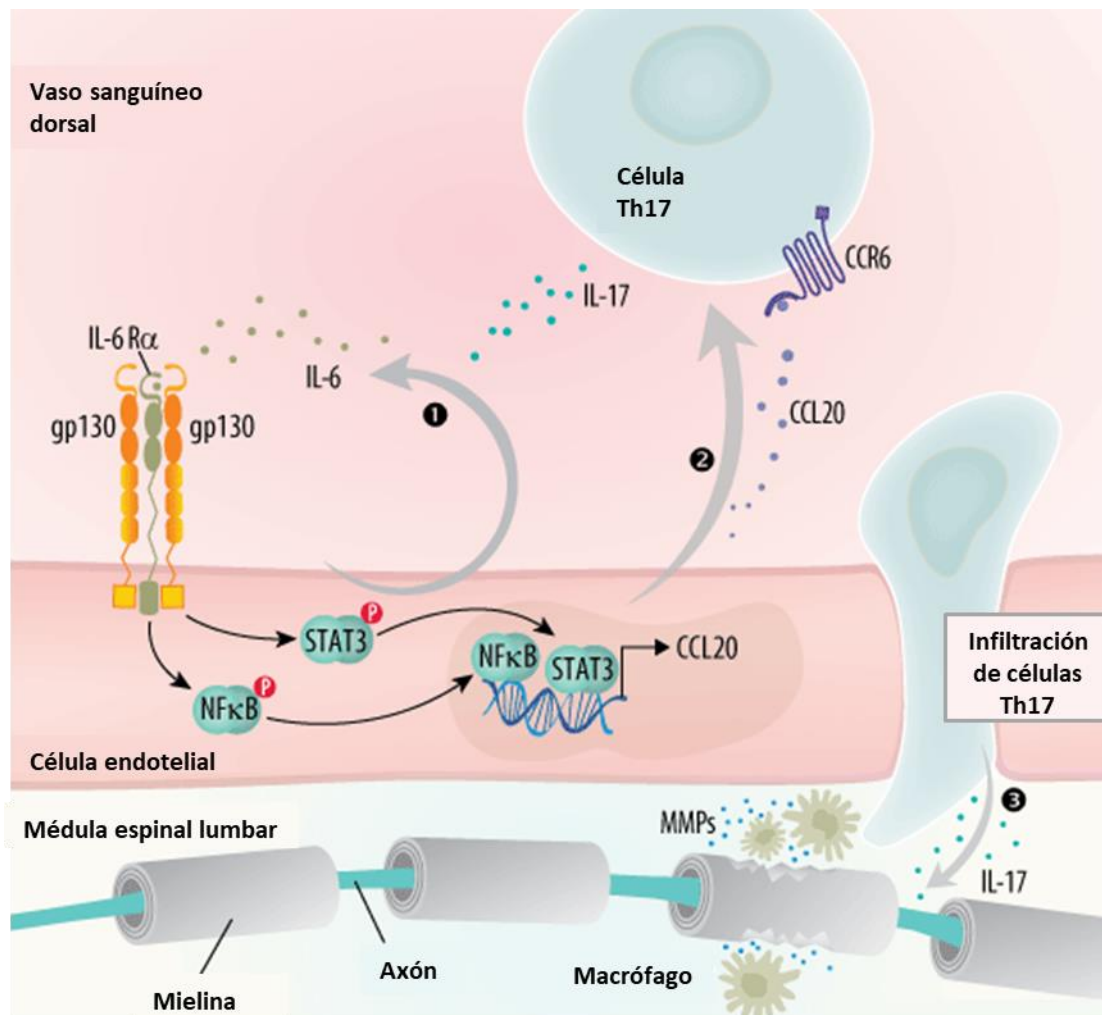


Figura 13. Estimulación de la expresión local de CCL20 e infiltración de células Th17 en la médula espinal en EAE. (1) En este modelo, la activación del nervio sensorial es traducida en una respuesta inflamatoria por un bucle de retroalimentación de señalización de IL-6 localizado en las células endoteliales de los vasos sanguíneos vertebrales. **(2)** La señalización del receptor a través de IL-6 induce la unión de STAT3 al promotor de CCL20, la activación transcripcional y la secreción de CCL20. **(3)** CCL20 funciona como quimioatrayente para reclutar las células circulantes Th17 CCR6⁺ a los sitios de activación neural donde se infiltran en el SNC y causan lesiones localizadas de la EM. Además, la secreción de IL-17 por las células circulantes Th17 amplifica la respuesta proinflamatoria al mejorar la transcripción CCL20 a través de la señalización del factor nuclear kappa B (NFκβ). MMP: metaloproteinasas de la matriz extracelular. Tomado de [102].

La ausencia de CCR6 en células Th17 reduce la severidad de la EAE y el reclutamiento de células Th17 y Treg en tejidos inflamatorios [101]. Liston et al. demostraron que los ratones CCR6^{-/-} o tratados con un anticuerpo anti-CCR6 neutralizante, generado por inmunización con el péptido de CCR6₍₁₈₋₃₉₎ fusionado a la toxina del tétanos 831-848, mostraban resistencia al desarrollo de la EAE [103].

También se ha demostrado que CCL20 es expresada por los astrocitos en el SNC después de la inducción de la EAE y en la periferia después de la inmunización con homogeneizados de la médula espinal [104]. Existen datos que muestran que los pacientes con EM tienen elevados niveles séricos de CCL20 [101]. Kohler et al. consiguieron una reducción de la gravedad de la enfermedad clínica con tratamientos con anticuerpos anti-CCL20, pero no lograron evitar la inducción de la enfermedad [105].

Hay otros estudios que especulan con la idea de que CCR6 puede contribuir a la patogénesis de la EAE de dos maneras diferentes: primero, regulando el desarrollo de la enfermedad a través de la modulación de la migración de células presentadoras de antígenos (APC) y, segundo, regulando la progresión de la enfermedad a través de la modulación de la población de células dendríticas reguladoras [104].

CCR6 y CCL20 también están implicados en las artropatías autoinmunes en la especie humana, incluyendo la artritis reumatoide (AR) y la artritis idiopática juvenil (AIJ). Ambas patologías autoinmunes crónicas son de etiologías desconocidas, pero distintas, y afectan principalmente al tejido sinovial de las articulaciones [75].

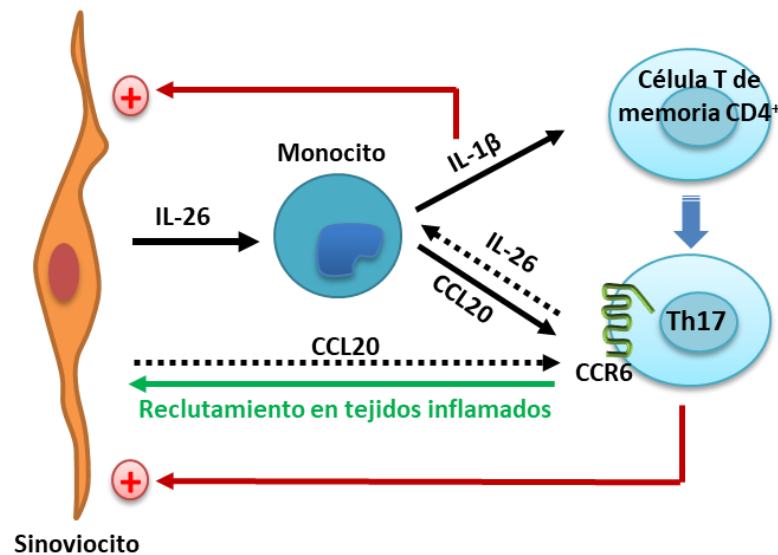


Figura 14. Polarización de las células Th17 en la artritis reumatoide (AR). En las articulaciones inflamadas de la AR, los sinoviocitos producen constitutivamente IL-26 y los monocitos aumentan la secreción de IL-1 β y CCL20. IL-1 β favorece la polarización de las células T CD4⁺ de memoria infiltradas a células Th17, y CCL20 promueve el reclutamiento de células Th17 CCR6⁺. En paralelo, IL-1 β e IL-17A, producidas por monocitos y células Th17 respectivamente, aumentan la secreción de IL-26 por los sinoviocitos. La IL-26 secretada por células Th17 también puede contribuir a la producción de citoquinas proinflamatorias por los monocitos. *Tomado de [106].*

La artritis reumatoide causa inflamación crónica de las articulaciones donde las quimioquinas regulan la infiltración de líquido sinovial por las células inflamatorias. La enfermedad se caracteriza por el aumento de la liberación de CCL20 y la acumulación de células T mononucleares portadoras de CCR6 en las articulaciones (Figura 14). Por tanto, CCR6 podría tener un papel destacable en su patogénesis promoviendo la inflamación en las articulaciones [52].

El eje CCR6-CCL20 está regulado al alza en la piel lesionada de la psoriasis humana, en la dermatitis psoriasiforme experimental y en la artritis psoriásica. La psoriasis es una enfermedad inflamatoria de la piel causada por una perturbación en el balance entre queratinocitos, células dendríticas y células Th17 a través del eje TNF- α /IL-23/IL-17A (Figura 15). Así, el eje CCR6-CCL20 funciona como fuerza impulsora que prepara un medio cutáneo rico en IL-17A [107].

La importancia de los ejes IL-23/Th17 y de CCR6-CCL20, en la psoriasis se ha establecido tanto en modelos animales como en la enfermedad humana. De hecho, CCR6 y CCL20 se expresan en niveles significativamente más altos en la piel psoriásica

humana que en la piel normal y la expresión de CCR6 es mayor en PBMCs circulantes de pacientes con psoriasis que en personas sanas [88], [108].

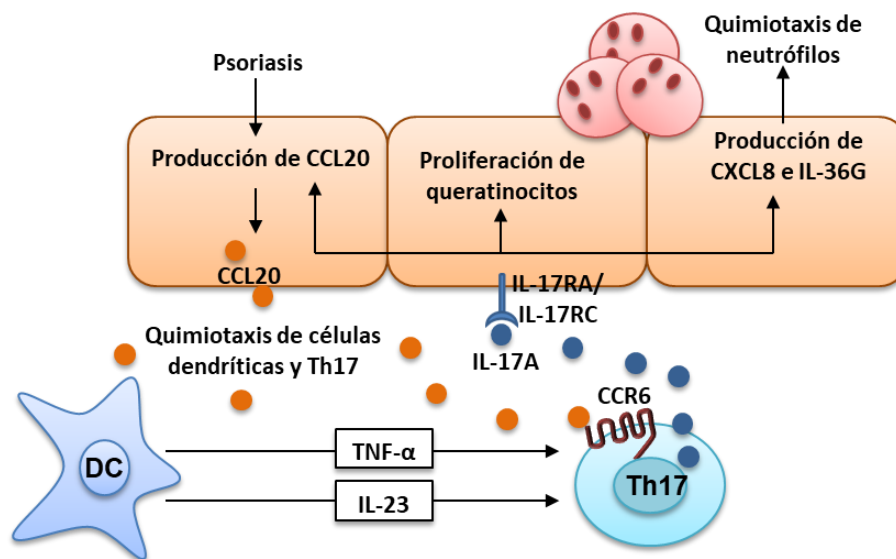


Figura 15. Patogénesis simplificada de la psoriasis. Las células dendríticas activadas (DCs) producen $\text{TNF-}\alpha$ e IL-23, que inducen la diferenciación y maduración de las células Th17. Las células Th17 producen grandes cantidades de IL-17A, que se une a los queratinocitos a través del receptor de IL-17A (IL-17RA/ IL-17RC), aumentando la capacidad proliferativa de los queratinocitos. Además, IL-17A estimula a los queratinocitos para producir CCL20, que induce la quimiotaxis selectiva de las células DCs y Th17 a través de CCR6. IL-17A también estimula los queratinocitos para producir CXCL8 e IL-36G, que induce la quimiotaxis de los neutrófilos. *Tomado de [107].*

Se ha descrito que el bloqueo del eje CCR6-CCL20 por un anticuerpo específico o pseudoantagonista atenúa la dermatitis psoriasiforme experimental [107]. Además, CCR6 es esencial en células T en el modelo de dermatitis inducida por IL-23 y mediada por IL-22, revelando el amplio papel de CCR6 en la respuesta relacionada con IL-23 [109], [110]. Estos hallazgos indican que el eje CCR6-CCL20 es una potencial diana para el tratamiento de la psoriasis.

El anticuerpo monoclonal humanizado GSK3050002, que se une y neutraliza la acción de CCL20 humano, está actualmente en ensayos clínicos en fase 1 (ClinicalTrials.gov: NCT02671188). Su uso se basa en la hipótesis de que este anticuerpo reduciría el movimiento de células inflamatorias que expresan CCR6 hacia los tejidos afectados por psoriasis o artritis psoriásica, conduciendo a una reducción de los síntomas de la enfermedad [111].

El eje CCR6-CCL20 también está asociado con varios cánceres incluyendo el carcinoma hepatocelular [112], [113], el cáncer colorrectal [114], [115], el cáncer de

mama [74], el cáncer de próstata [116], el cáncer de ovario [117], el cáncer de pulmón [118], el cáncer pancreático [119], el cáncer cervical [120] y el cáncer de riñón [121]. La expresión de CCL20 es elevada en muchos cánceres como el cáncer de mama, el carcinoma hepatocelular y el cáncer pancreático [122]. El receptor CCR6 expresado en las células cancerígenas juega un papel importante en la migración de estas células y en la metástasis (Figura 16).

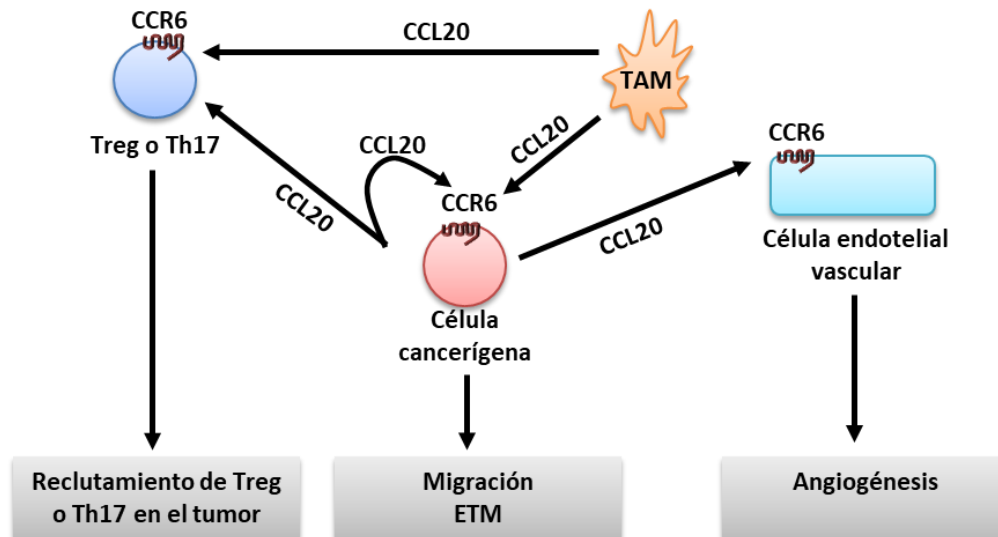


Figura 16. Importancia del eje CCL20-CCR6 en los procesos cancerígenos. CCL20 se expresa en las células tumorales y en los macrófagos asociados a tumores (TAM) pudiendo activar a CCR6 en las células cancerígenas de una manera autocrina, causando su migración y transición epitelio-mesénquima (EMT). Además, el aumento de la concentración de CCL20 en el microambiente cancerígeno recluta a las células Treg y Th17 en el nicho tumoral y causa angiogénesis a través del receptor CCR6 de las células endoteliales vasculares. *Tomado de [122].*

Por ejemplo, CCR6 y su ligando CCL20 están implicados en la carcinogénesis del cáncer colorrectal (CRC) humano y pueden promover su progresión. La sobrerregulación de CCR6 estimulada por IL-17 juega un papel activo en la migración del CRC [49]. La unión de la quimioquina a su receptor media la activación de la cascada de señalización celular a través de la quinasa ERK y desempeña un papel crucial en la proliferación e invasividad de las células cancerosas [46]. El eje CCR6-CCL20 promueve directamente la progresión del cáncer al mejorar la migración y proliferación de las células cancerígenas, e indirectamente remodelando el microambiente del tumor a través del control de las células inmunes [74].

Otro de los tejidos en el que las células Th17 expresan CCR6 es en el tejido endometrial. Se ha detectado expresión de CCL20 en las células endometriales

estromales (ESC) y en las células epiteliales. Hay estudios que sugieren que las células Th17 son reclutadas a los tejidos endometriales por la CCL20 secretada por las células ESC. El medio inflamatorio del tejido puede regular un aumento en la expresión de CCL20 a través de IL-1 β , TNF- α y IL-17A, por lo que, posteriormente, aumenta la migración de células Th17 y el desarrollo de endometriosis [123].

El eje CCR6-CCL20 también resulta importante en la patogénesis de la infección por el virus VIH, ya que este par receptor-ligando está reclutando activamente células Th17 y dendríticas a los sitios de infección, ayudando a que el virus se propague a otras ubicaciones del cuerpo (Figura 17) [52].

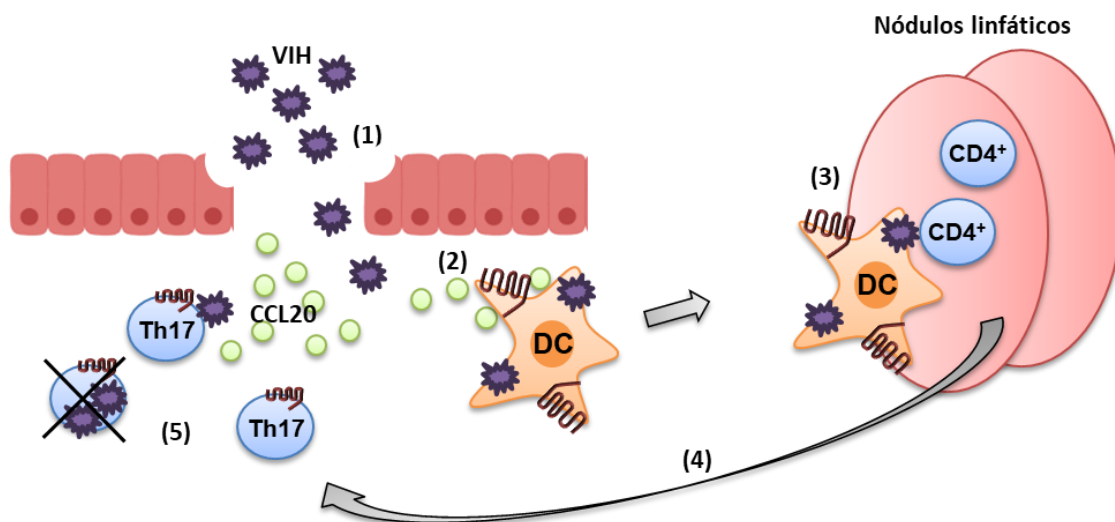


Figura 17. Modelo de la implicación del eje CCR6-CCL20 en la patogénesis e inmunidad del VIH. (1) El VIH rompe la superficie epitelial y las células dañadas liberan la quimioquina CCL20. (2) Las células dendríticas (DCs) CCR6⁺ son atraídas por CCL20 e infectadas o secuestradas por el VIH. (3) Las DCs migran al drenaje linfático y las células T CD4⁺ también se infectan. (4) Las células T CD4⁺ vírgenes se diferencian a células Th17, y como son CCR6⁺, migran por el gradiente de quimioquinas al sitio de la infección. (5) Las células Th17 se infectan por el VIH y se agotan gradualmente. Tomado de [124].

Varios estudios sugieren que CCR6 puede actuar como un correceptor débil de la entrada del VIH, junto a los receptores CXCR4 y CCR5. Además, estudios recientes sobre el VIH han captado el interés por el papel de CCR6 y sus ligandos, CCL20 y las β -defensinas humanas, en la entrada viral, la diseminación y la inmunidad antiviral [124].

Por tanto, la inhibición de la señalización de CCR6h podría ser una estrategia terapéutica válida en múltiples enfermedades como artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer, entre otras [52], [77].

3. Obtención de anticuerpos terapéuticos contra GPCRs

3.1. Anticuerpos terapéuticos frente a pequeñas moléculas

A pesar de que los compuestos dirigidos a los GPCRs continúan aumentando en las últimas décadas, la proporción de pequeñas moléculas identificadas ha ido disminuyendo desde 2010. Una alternativa prometedora a estos fármacos son los anticuerpos terapéuticos [125]. Los anticuerpos monoclonales (mAbs) tienen muchas aplicaciones que hacen deseable su uso en la farmacología experimental y, hoy en día, están bien establecidos como modalidad terapéutica, representando un 27-33% de los nuevos medicamentos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (*Food and Drugs Administration*, FDA) entre los años 2014-2016 [126].

A pesar del éxito de los anticuerpos terapéuticos monoclonales existen sustanciales cuellos de botella en el desarrollo de anticuerpos contra GPCRs. En general, el retraso del desarrollo de anticuerpos monoclonales contra GPCRs se debe a cuatro razones principales: la compleja preparación de antígenos funcionales homogéneos, el difícil desarrollo de herramientas eficientes para el cribado y detección de anticuerpos, la cambiante conformación extracelular de los GPCRs y la variabilidad del área expuesta de los epítomos extracelulares de los GPCRs [127].

Las diferencias en las propiedades de los anticuerpos terapéuticos y las pequeñas moléculas se resumen en la Tabla 5. La diferencia más obvia es el gran tamaño de los anticuerpos monoclonales frente al de las pequeñas moléculas. El tamaño de los mAbs limita su potencial terapéutico a dianas extracelulares y su distribución es menor que la de las pequeñas moléculas. Además, los mAbs no atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE), aunque esto podría ser una ventaja cuando sea conveniente evitar su exposición en el SNC [128].

Tabla 5. Comparativa de las propiedades típicas de anticuerpos terapéuticos y pequeñas moléculas.
Tomado de [128].

Propiedad	Anticuerpos terapéuticos	Pequeñas moléculas
Composición	Proteínas	Compuestos orgánicos sintéticos o productos naturales
Peso molecular	Alto (~150 kDa)	Bajo (< 1 kDa)
Producción	Células de mamífero	Síntesis química
Homogeneidad	Heterogéneo	Muy homogéneo (> 99%)
Sitio de acción	Principalmente extracelular con exposición muy limitada al SNC	Nuclear, intracelular y extracelular Capaces de atravesar la BHE
Afinidad por la diana	Alta (fmol/L-pmol/L)	Moderada (nmol/L- μ mol/L)
Selectividad de la diana	Muy alta	Moderada-alta
Modo de acción	Inhibición o depleción de dianas solubles y células Interacciones proteína-proteína Agonismo (completo, alostérico, parcial) o antagonismo	Activadores o inhibidores enzimáticos Agonistas de receptor (parcial, completo), antagonistas y moduladores alostéricos
Administración	Parenteral IV, SC o IM Biodisponibilidad oral muy baja	Oral Ocasionalmente IV, SC, intranasal o inhalada
Absorción y distribución	Linfa y capilares sanguíneos	Sistema portal entero-hepático y capilares del sistema circulatorio
Vida media	Semanas	4-24 horas
Eliminación	Degradación lisosomal intracelular	Vía hepática, renal o biliar
Interacción fármaco-fármaco	Bajo riesgo	Posibles interacciones
Multi-diana	Bivalente de alta afinidad Multivalente incluidos receptores Fc por ingeniería	Afinidad moderada de doble diana Baja afinidad multi-diana
Seguridad	Efectos adversos relacionados con la diana Reacciones en el sitio de la inyección	Normalmente efectos adversos no relacionados con la diana y relacionados con compuestos químicos

BHE: barrera hematoencefálica; IM: intramuscular; IV: intravenoso; SC: subcutáneo; SNC: sistema nervioso central.

Los mAbs no tienen buena biodisponibilidad oral (<1%), por lo que habitualmente se administran por vía parenteral, principalmente a través de inyecciones por vía intravenosa (IV), subcutánea (SC) e intramuscular (IM). Debido a la lenta absorción en la circulación sistémica, el pico de concentración en plasma es alcanzado entre 3-7 días después de la administración de una dosis por vía SC e IM [128]. Además, muestran una vida media plasmática prolongada, de 11-30 días en humanos, y tienen funciones efectoras terapéuticas para la destrucción de células defectuosas, como células tumorales y células infectadas, mostrando una elevada capacidad de modulación farmacológica en comparación con las pequeñas moléculas [127], [128].

Al ser producidos por células, los mAbs presentan una mayor variabilidad a diferencia de las pequeñas moléculas que son producidas por síntesis química. Las modificaciones postraduccionales pueden depender de la línea celular utilizada; por ejemplo, la glicosilación de proteínas expresadas de modo recombinante difiere al usar células renales embrionarias humanas 293 (HEK293) y células de ovario de hámster chino (CHO). Por tanto, los mAbs tienen una composición dependiente del proceso obteniéndose mezclas más heterogéneas [128].

Los mAbs quiméricos y humanizados, que son los que han entrado predominantemente en estudios clínicos, tienen tasas de éxito de aprobación más altas (18% y 24%, respectivamente) que las nuevas entidades químicas (NCEs), que incluyen a las pequeñas moléculas (5%), especialmente en el campo de la oncología [129].

En comparación con los fármacos químicos, los anticuerpos terapéuticos tienen muchas ventajas en términos de mayor especificidad de diana, afinidad, selectividad y otras propiedades farmacológicas y, por tanto, muestran menos efectos secundarios. La aplicación terapéutica de mAbs es conocida desde la aprobación del primer mAb para uso en humanos en 1986 y actualmente se incluyen en las carteras de desarrollo de empresas biotecnológicas y farmacéuticas como terapia frente a múltiples enfermedades [125], [127], [128], [130].

3.2. Inmunógenos

La obtención de anticuerpos relevantes contra GPCRs que tengan la especificidad y funcionalidad requerida sigue siendo un reto. Un factor crítico es obtener suficiente cantidad de antígeno funcional en un formato biológicamente relevante. Los GPCRs a menudo tienen una baja expresión en células y son muy inestables cuando se purifican. El formato ideal de antígeno debería ser homogéneo, estable y contener las modificaciones postraduccionales más relevantes. Habitualmente los anticuerpos obtenidos no tienen efecto sobre la función del receptor y tienen una utilidad limitada como agentes terapéuticos [14], [131], [132].

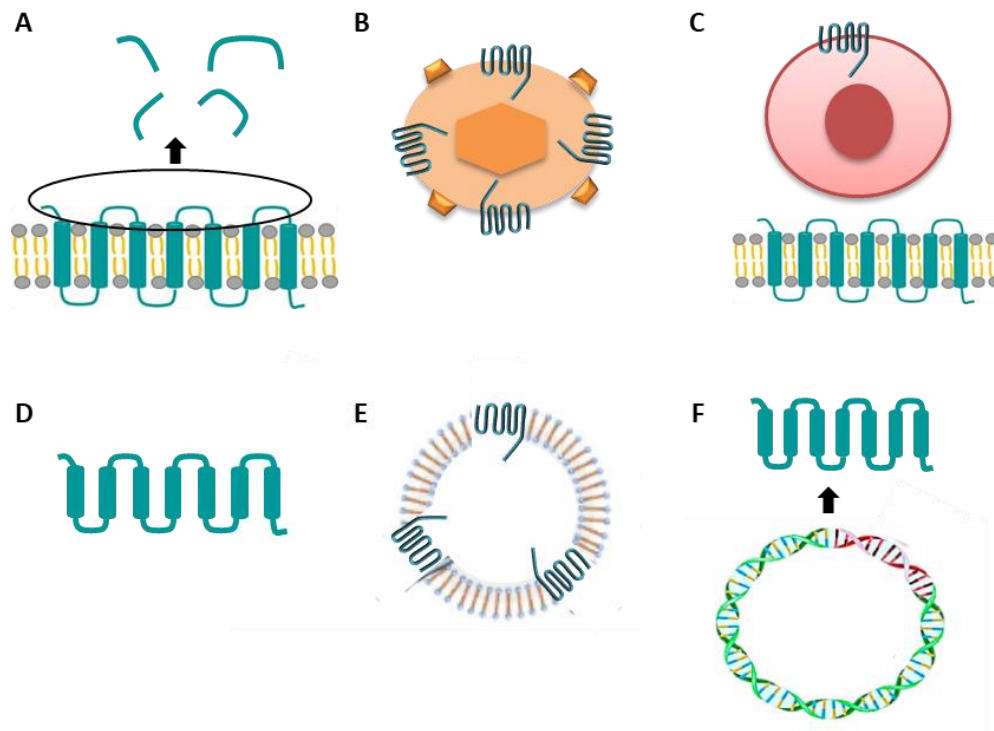


Figura 18. Antígenos para la obtención de anticuerpos contra GPCRs. (A) Péptidos de regiones extracelulares del receptor. (B) Partículas semejantes a virus (VLP) con el GPCR en su superficie. (C) Células enteras y fracciones de membrana expresando el GPCR en su superficie. (D) GPCR purificado. (E) Proteoliposoma en el que el GPCR está embebido en una bicapa lipídica. (F) Molécula de ADN que codifica para un GPCR. *Modificado de [130].*

Los formatos de antígenos utilizados (Figura 18) en la obtención de anticuerpos contra GPCRs son los siguientes [14], [127], [130], [132]:

- Péptidos. Es el antígeno más barato y simple de generar. Se utilizan péptidos derivados de los bucles extracelulares o del dominio N-terminal. Rara vez reflejan la conformación nativa de la proteína, dando como resultado anticuerpos con falta de especificidad, de actividad funcional o de idoneidad para el mapeo de receptores.
- Partículas semejantes a virus (*Virus Like Particles*, VLPs). Muchas proteínas virales estructurales pueden autoensamblarse en partículas que se asemejan a virus infecciosos, pero carecen de genoma viral y, por tanto, no son infecciosas. Los antígenos mostrados en la superficie de estas partículas son extremadamente inmunogénicos y pueden inducir un alto título de anticuerpos en respuesta a bajas dosis, incluso en ausencia de adyuvantes exógenos.

- Células completas o membranas celulares. Este enfoque tiene inconvenientes ya que es necesario un elevado número de células, las regiones extracelulares contra las que se generan los anticuerpos son pequeñas y, a menudo, el nivel de expresión de los GPCRs en las células no es muy alto. Además, en la superficie celular hay otras proteínas contra las que se pueden generar anticuerpos. Sin embargo, inmunizando con células cultivadas que expresan el antígeno o con membranas procedentes de estas células es más probable que se obtengan anticuerpos contra la conformación nativa de las proteínas de membrana.
- Proteína purificada. Los GPCRs purificados empleados como antígenos son muy inestables y se degradan con facilidad. Para ello, el GPCR debe solubilizarse en un detergente resultando a menudo en la proteína no plegada o agregada. Como resultado los anticuerpos generados normalmente no son funcionales. Además, se pueden producir anticuerpos contra epítomos intracelulares, como los bucles intracelulares o el extremo carboxilo terminal, que no son adecuados como agentes terapéuticos, aunque pueden ser de interés en inmunohistoquímica o cristalografía.
- ADN. Tiene la ventaja de que el antígeno es producido en el entorno natural del animal huésped, maximizando la probabilidad de que la proteína forme su verdadera estructura nativa a través de la síntesis intracelular con las correctas modificaciones postraduccionales y el correcto plegamiento tridimensional. Una desventaja es que se generan bajos niveles de anticuerpos, lo que limita severamente la tasa de éxito. Además, el ADN inyectado puede ser degradado por la respuesta inmune de los animales.
- Proteoliposomas. En ellos el receptor se estabiliza en una vesícula lipídica (liposoma). El antígeno se muestra altamente concentrado y purificado con bajo riesgo de obtener anticuerpos contra antígenos diferentes al deseado.

Las ventajas y desventajas de los distintos formatos de antígenos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 6. Ventajas y desventajas de los diferentes formatos de antígenos. Adaptado de [131].

Formato de antígeno	Ventajas	Desventajas
Péptidos	Diana en epítomos específicos Baratos	No replican las características estructurales y conformacionales
VLP	Altamente inmunogénicos	La conformación y topología puede diferir de la natural Prevalencia de antígenos impredecible
Células o membranas celulares	Imitan la conformación nativa	Baja expresión Poco inmunogénicas Fondo alto
Receptor purificado	Alta pureza	Se obtiene poca cantidad Vida corta en la forma correctamente plegada Fácilmente degradable
ADN	Método simple No requiere de proteína Probabilidades de plegamiento correcto	Poca eficiencia Baja inmunogenicidad
Proteoliposomas	Poco fondo Altos niveles de expresión	Difícil de formular Proteínas mal plegadas Exposición de epítomos internos

3.3. Técnicas para la obtención de anticuerpos

Los anticuerpos terapéuticos pueden generarse a través de diferentes técnicas como son: la tecnología del hibridoma inmunizando ratones sin modificar o transgénicos, la presentación de proteínas en la superficie de fagos (*Phage display*) y la tecnología *Single B cell* (Figura 19).

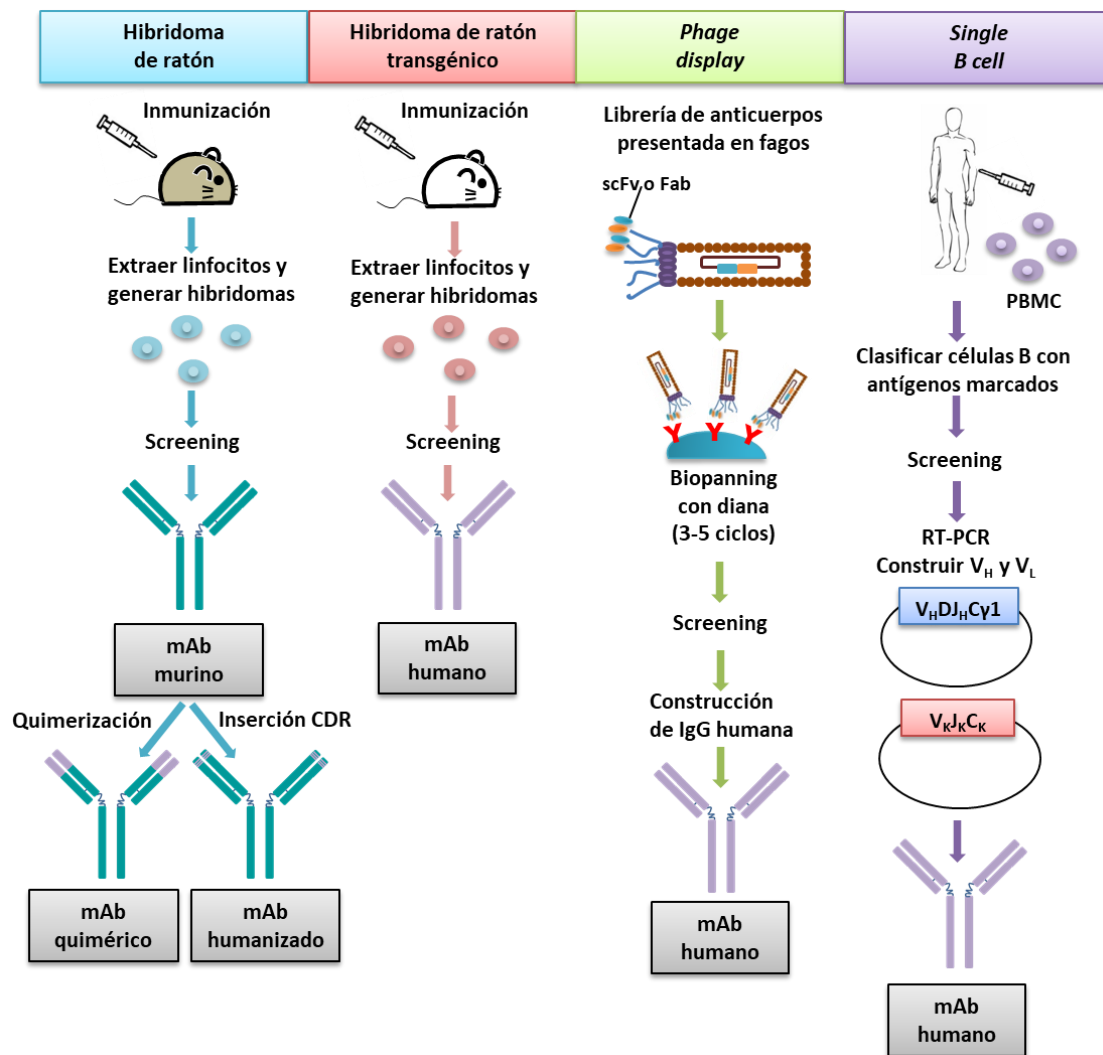


Figura 19. Enfoques para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos. (A) Tecnología tradicional de obtención de hibridomas. Comienza con la inmunización de animales con el antígeno deseado para desencadenar una respuesta inmune. Tras el programa de inmunización, los esplenocitos son extraídos y fusionados con células de mieloma para producir los hibridomas que secretan los anticuerpos. Tras un cribado, los hibridomas seleccionados son usados como base para generar anticuerpos quiméricos o humanizados. **(B)** Tecnología de obtención de hibridomas usando ratones transgénicos. Similar a la técnica del hibridoma pero con ratones transgénicos que generan directamente el anticuerpo humano. **(C)** *Phage display*. Se usa una librería de fagos presentadores de anticuerpos humanos para seleccionar las dianas de interés mediante selección por afinidad (biopanning). Después de 3-5 rondas de biopanning, aquellos fagos inmuno-positivos son cribados por ELISA, y las secuencias de ADN de los clones seleccionados son analizadas para construir y expresar IgGs humanas. **(D)** *Single B cell*. A partir de donadores infectados o vacunados, se aíslan por citometría de flujo las células B deseadas de los PBMCs. Seguidamente, mediante RT-PCR, se extrae la información de las regiones V_H y V_L de cada célula B para la generación de mAbs humanos. CDR: región determinante de la complementariedad, scFv: anticuerpos de cadena simple, Fab: fragmento de unión al antígeno, V_L: región variable de la cadena ligera, V_H: región variable de la cadena pesada. Tomado de [133].

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales específicos contra un antígeno mediante inmunización y posterior obtención de hibridomas. La tecnología del hibridoma fue pionera en la década de los setenta y fue desarrollada por Köhler y Milstein [134]. Está basada en la inmunización de animales con el antígeno deseado

seguida de la fusión de los linfocitos B específicos con células inmortales de mieloma. Las células híbridas generadas, llamadas hibridomas, son clonadas para obtener líneas celulares monoclonales estables. Frecuentemente, la fusión de los linfocitos B con las células de mieloma se obtiene usando el compuesto químico polietilenglicol (PEG). La tecnología del hibridoma se ha mantenido a la vanguardia en el campo de la generación de mAbs. Actualmente, más del 90% de los anticuerpos aprobados para uso terapéutico se han generado mediante esta tecnología, la mayoría de ellos en versiones quiméricas o humanizadas [135].

Para su uso terapéutico, los anticuerpos aislados de los animales de laboratorio deben ser humanizados para evitar la inmunogenicidad. Para humanizar los anticuerpos las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de unión al GPCR se unen a las secuencias del anticuerpo humano. Alternativamente, se pueden usar animales transgénicos que producen la secuencia humana completa del anticuerpo [127]. Los ratones transgénicos Xenomouse™ (Abgenix) y HuMab-Mouse® (Medarex) han sido desarrollados en paralelo y, en ambos, los genes de las cadenas endógenas pesadas y ligeras kappa son inactivados y reemplazados por las secuencias equivalentes de la línea germinal humana. La inyección de antígenos en estos animales genera anticuerpos “humanos completos” [136].

Un método *in vitro* para generar anticuerpos humanos completos consiste en la clonación y cribado de grandes y diversas librerías de genes de anticuerpos humanos en combinación con la tecnología de la presentación de proteínas. Hoy en día, hay disponibles diferentes tecnologías de presentación como son la presentación en ribosomas, células de mamíferos, fagos o superficie de levaduras, siendo la presentación por fagos (*Phage display*) la más establecida [137]. La presentación por fagos implica la expresión de proteínas en la superficie del fago filamentoso a través de la fusión de la secuencia genética de la proteína del fago con la secuencia de anticuerpos ScFv. Cuando se combina con librerías de anticuerpos, permite la rápida selección *in vitro* de anticuerpos antígeno específicos, y favorece la obtención de la correspondiente secuencia codificante [136].

En las últimas décadas, los avances técnicos han permitido la detección y aislamiento de células B individuales desde poblaciones celulares primarias heterogéneas, así como la amplificación del gen del anticuerpo y clonación sin necesidad de inmortalizar la célula seleccionada secretora del anticuerpo. Este enfoque que hace uso de células B individuales se conoce como “*Single B antibody technology*” y ha sido revelada como una técnica atractiva y útil para generar mAbs neutralizantes de manera rápida para varias aplicaciones [135].

A pesar de que han emergido nuevas tecnologías prometedoras para la generación de anticuerpos monoclonales, parece que hasta ahora ninguna de ellas ha sido capaz de provocar un cambio tecnológico, quedando las estrategias basadas en hibridomas en una posición de liderazgo [135].

4. GPCRs como diana farmacéutica

4.1. Mecanismos de acción de los fármacos dirigidos a GPCRs

El objetivo, al diseñar un fármaco dirigido hacia un GPCR, es encontrar un ligando que no sólo se una a la diana, sino que también logre un perfil particular de señalización. Se podría buscar un agonista completo que estimule fuertemente la activación y señalización del receptor, un agonista parcial que estimule la señalización del receptor en menor grado, un antagonista neutral que no señalice por sí solo pero que bloquee la unión de los agonistas nativos o un agonista inverso que reduzca la señalización por debajo de sus niveles basales (sin ligando) [20].

El mecanismo de acción ofrecido por la terapéutica basada en anticuerpos incluye otros efectos funcionales mediados específicamente por la región Fc como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Comparados con las pequeñas moléculas, los anticuerpos tienen diferentes mecanismos de acción que tienen gran potencial, tales como los conjugados anticuerpo-fármaco (aprovechando la endocitosis mediada por receptor), la biespecificidad o la multiespecificidad de diana [131].

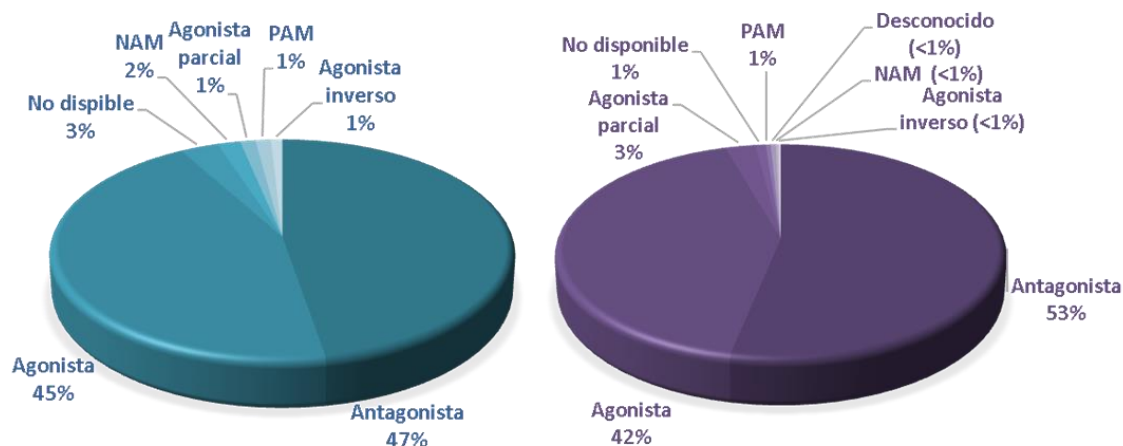


Figura 20. Modos de acción de fármacos dirigidos hacia GPCRs. Se muestran los modos de acción de los fármacos en ensayos clínicos (verde) y aprobados (violeta) dirigidos hacia GPCRs. PAM: modulador alostérico positivo, NAM: modulador alostérico negativo. Datos obtenidos de <https://gpcrdb.org/drugs/drugstatistics>.

Los compuestos dirigidos hacia GPCRs son en su mayoría agonistas que activan GPCRs o antagonistas que inhiben la acción de los agonistas naturales (Figura 20). Sin embargo, en la actualidad, los fármacos como moduladores alostéricos han ido ganando atención en la industria y se han desarrollado con éxito una serie de fármacos basados en este mecanismo [138].

Farmacológicamente, el efecto clásico de un modulador alostérico es aumentar (PAM) o disminuir (NAM) la afinidad de los ligandos ortostéricos. Los moduladores alostéricos también pueden alterar la eficacia de los ligandos ortostéricos, es decir, la medida en que estos ligandos activan el GPCR. En algunos casos, los ligandos alostéricos también pueden inducir la activación del receptor, incluso en ausencia de un ligando ortostérico, y por lo tanto podrían ser considerados agonistas por derecho propio [20]. El desarrollo de moduladores alostéricos para receptores de quimioquinas representa un profundo avance para los moduladores alostéricos dirigidos a GPCRs de clase A con fármacos comercializados como maraviroc, que es un NAM de CCR5, o plerixafor, que es un NAM de CXCR4 [37].

Como se muestra en la Figura 20, el 47% de los fármacos en ensayos clínicos y el 53% de los fármacos aprobados dirigidos hacia GPCRs tienen actividad antagonista.

Los inhibidores del eje CCR6-CCL20 incluyen: anticuerpos contra CCL20 o CCR6, pequeñas moléculas inhibitoras de CCL20 o de CCR6 y ARN pequeño de interferencia

(*small interfering RNA*, siRNA) que hibrida con el ácido nucleico que codifica CCL20 o CCR6 [46].

En los últimos años, se han identificado varios ligandos de GPCRs que señalizan selectivamente por la vía de la proteína G sobre la vía de la β -arrestina y viceversa. Los ligandos que activan preferentemente una vía sobre otra se llaman agonistas sesgados de la vía preferente. Aunque el campo del agonismo/antagonismo sesgado de los GPCRs es todavía relativamente nuevo, la última década ha visto un enorme progreso en la investigación que busca arrojar luz sobre las vías de señalización específicas de los GPCRs y de cómo se activan y se relacionan con fisiopatologías y enfermedades, para que puedan ser atacadas mediante fármacos [139]. Además, con la comprensión más profunda de la función de los GPCRs de hoy en día, hay un gran interés por el desarrollo de ligandos sesgados que selectivamente activen vías celulares terapéuticamente beneficiosas, evitando al mismo tiempo las vías que conducen a efectos secundarios no deseados. De hecho, se ha descubierto que fármacos clínicamente aprobados que se desarrollaron como antagonistas o agonistas inversos poseen propiedades de señalización sesgada [138].

4.2. Situación actual del mercado farmacológico dirigido a GPCRs

La superfamilia de los GPCRs comprende aproximadamente 950 genes del genoma humano y modula una amplia gama de procesos fisiológicos. Juegan un papel clave en prácticamente todos los niveles de comunicación intracelular y cuando el ligando se une a su receptor se producen cambios conformacionales y se generan reacciones intracelulares que regulan una amplia variedad de funciones fisiológicas como el olfato, el gusto, la vista, la secreción, la neurotransmisión, el metabolismo, la diferenciación y crecimiento celular y la respuesta inflamatoria. En consecuencia, un mal funcionamiento de las vías de señalización de los GPCRs puede causar diversas enfermedades como cáncer, diabetes, obesidad, inflamación, disfunción cardíaca y trastornos en el SNC [13]. Por estos hechos, los GPCRs son unas de las dianas farmacológicas más importantes en la actualidad y los anticuerpos dirigidos contra ellos albergan un gran potencial científico y económico (Figura 21).

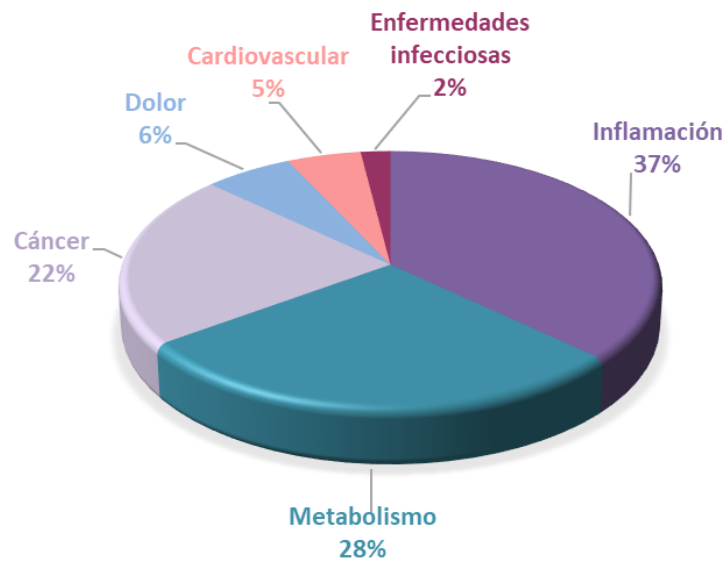


Figura 21. Oportunidades de los anticuerpos terapéuticos dirigidos a GPCRs. Áreas terapéuticas en las que se han identificado GPCRs adecuados como dianas para fármacos basados en anticuerpos. En total, 88 de 370 GPCRs tienen una fuerte implicación en enfermedades y un perfil adecuado para ser diana de interés para el desarrollo de anticuerpos como fármacos. Tomado de [14].

Las mutaciones en los genes que codifican estos receptores están implicadas en numerosas enfermedades, convirtiendo a estos receptores en la mayor clase de dianas terapéuticas [140]. Dada su importancia en la salud y la enfermedad, junto con su potencial para la intervención terapéutica a través de pequeñas moléculas, los GPCRs representan la mayor familia de dianas modulables por fármacos (Figura 22).



Figura 22. GPCRs como dianas de fármacos. Dianas con fármacos establecidos (rojo) y en ensayos clínicos en fase I-III (verde) a través de la clasificación de los GPCRs según las clases, tipos de ligando y familias de receptores (del centro al anillo exterior). El diámetro de los círculos representa el número de fármacos. Para las familias de receptores, se superponen dos círculos concéntricos uno rojo que indica el número de fármacos aprobados y un círculo verde que indica el número de fármacos en ensayos clínicos para las dianas de esa familia. El área en el que superponen ambos círculos se muestra en verde oscuro. A nivel de familia, los fármacos que modulan múltiples receptores en la familia solo se cuentan una vez para calcular el diámetro del círculo. Para los receptores individuales, se usan diferentes tonos de verde para cada fase del ensayo clínico. Tomado de <https://gpcrdb.org/drugs/drugmapping>.

Se conocen alrededor de 825 GPCRs, pero más de la mitad son receptores olfativos o sensoriales, quedando aproximadamente 370 que pueden ser considerados dianas farmacológicas [14]. De los miembros no olfatorios, considerados como modulables por fármacos, 165 son objetivos farmacológicos validados. Los últimos datos estadísticos indican que hay 527 medicamentos aprobados por la FDA y aproximadamente 60 candidatos a fármacos, actualmente en ensayos clínicos, dirigidos contra los GPCRs

[125]. En la actualidad, estos receptores son el objetivo de más del 50% de los agentes terapéuticos del mercado, incluyendo más de una cuarta parte de los 100 medicamentos más vendidos, con beneficios de billones de dólares cada año [7].

Dada su amplia gama de efectos fisiológicos, los GPCRs de la clase A son los más empleados como diana terapéutica. Más de 500 fármacos contra GPCRs se dirigen a la clase A y muchos de ellos actúan en más de un receptor [125]. Tal y como se muestra en la Figura 23, el 94% de los fármacos aprobados y el 86% de los fármacos en ensayos clínicos se dirigen a receptores de la clase A.

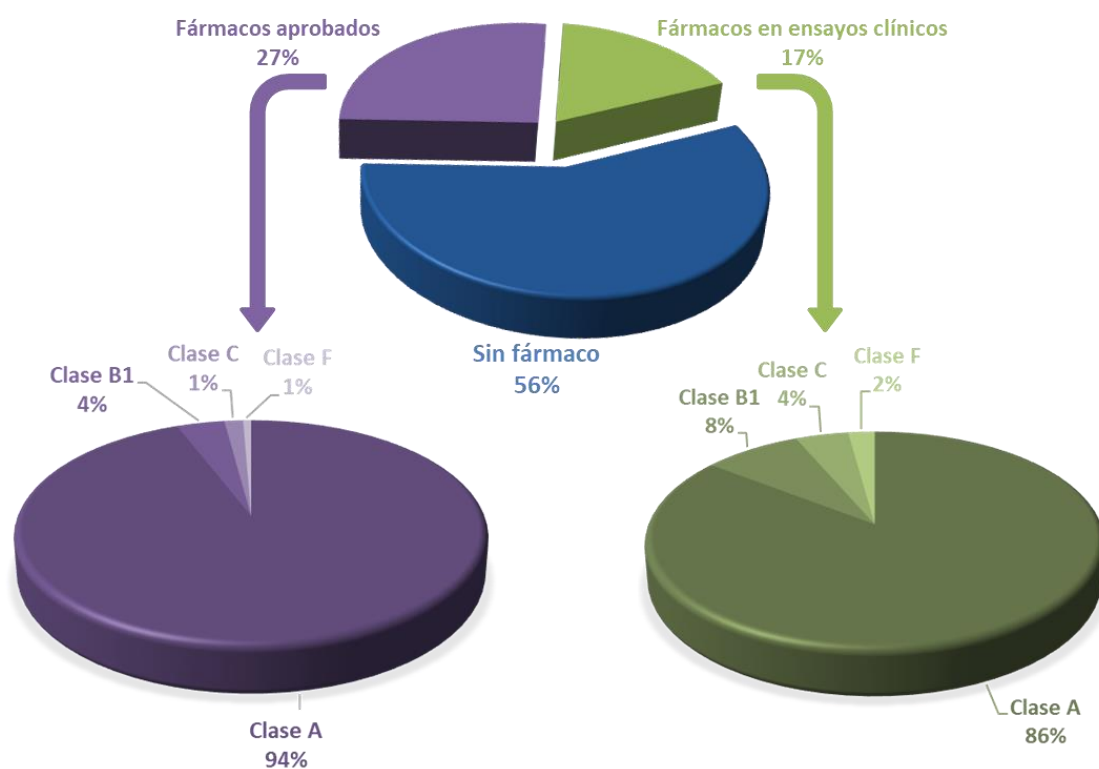


Figura 23. Principales clases de GPCRs que son objetivo de fármacos aprobados y de fármacos en ensayos clínicos. Existen aproximadamente 400 GPCRs no olfatorios, de los cuales 107 tienen fármacos aprobados (violeta), 67 tienen fármacos que han alcanzado los ensayos clínicos, pero no tiene fármacos aprobados aún (verde) y 227 aún no son diana de fármacos en ensayos clínicos (azul). Datos obtenidos de <https://gpcrd.org/drugs/drugstatistics>.

Dentro de la clase A de los GPCRs se encuentran los receptores de quimioquinas, entre los que está CCR6, considerados durante mucho tiempo como dianas farmacológicas atractivas debido a su papel en el sistema inmune. Sin embargo, las más de dos décadas de esfuerzo en el descubrimiento de fármacos hacia estos receptores acumulan un amplio historial de fracasos clínicos [40]. Actualmente, tan sólo existen tres fármacos aprobados dirigidos a receptores de quimioquinas que

incluyen dos pequeñas moléculas, aprobadas hace más de 10 años, y un anticuerpo monoclonal, el mogamulizumab.

4.3. Anticuerpos terapéuticos dirigidos a GPCRs

A pesar de ser una de las mayores clases de proteínas, la mayoría de GPCRs permanece sin fármacos. En 2013, ChemoCentryx fue la primera empresa en identificar una pequeña molécula antagonista de CCR6, CCX587, que aún continúa en ensayos preclínicos. Le siguen Pfizer y Sosei Heptares con la molécula PF-07054894 que actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase 1 (ClinicalTrials.gov: NCT04388878). En la actualidad, los proyectos de empresas biotecnológicas y farmacéuticas con antagonistas de CCR6 siguen siendo escasos y ninguna de las moléculas estudiadas ha sido aprobada aún. Los anticuerpos dirigidos a GPCRs ofrecen una alternativa a los fármacos convencionales constituidos por pequeñas moléculas, que a menudo no tienen éxito, y podrían proporcionar valiosas opciones para nuevos tratamientos [23].

Hasta la fecha tan solo tres mAbs dirigidos hacia GPCRs, mogamulizumab, erenumab y eptinezumab, han sido aprobados como fármacos por la FDA (Tabla 7) [125].

Tabla 7. Anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA dirigidos contra GPCRs. Tomado de [125].

Fármaco	Marca (Fabricante)	Indicación	GPCR diana	Clase GPCR, tipo de ligando, familia GPCR	Fecha aprobación
Mogamulizumab	Poteligeo (Kyowa Kirin)	Linfoma no-Hodgkin	CCR4	A, proteína, quimioquina	08/08/2018
		ATLL			30/03/2012
Erenumab	Aimovig (Amgen)	Migraña (prevención)	CGRPR	B1, péptido, calcitonina	17/05/2018
Eptinezumab	Vyepti (Lundbeck)	Migraña (prevención)	CGRPR	B1, péptido, calcitonina	21/02/2020

CGRPR: receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina, ATLL: leucemia/linfoma de células T del adulto.

El mogamulizumab es un mAb anti-CCR4 defucosilado que actúa mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) [141]. Fue aprobado por primera vez en 2012 en Japón para la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL) recidivantes o refractarias y desde 2018 también está aprobado en los Estados Unidos

y la Unión Europea para el tratamiento clínico de linfomas cutáneos de células T, como el síndrome de Sezary y la micosis fungoide [40], [131].

El erenumab es un mAb dirigido contra el receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, *calcitonin gene related peptide*) tipo 1, co-desarrollado por Amgen y Novartis para el tratamiento de la migraña crónica. El anticuerpo humanizado es una IgG1 producida en células de la levadura *Pichia pastoris* [142].

Tanto el mogamulizumab como el erenumab fueron generados mediante inmunización de ratones con el dominio N-terminal del receptor. En el caso del mogamulizumab se usó un péptido lineal sintético (aminoácidos 2-29) como antígeno, debido al corto y relativamente desestructurado dominio N-terminal de CCR4, mientras que el erenumab fue generado usando la forma purificada recombinante soluble del largo N-terminal de CGRP, co-purificado con la proteína accesoria RAMP1 usando un proceso patentado [142].

Al igual que el erenumab, el eptinezumab ha sido aprobado para el tratamiento de la migraña en adultos [143]. Es un mAb humanizado que se une a CGRP, bloqueando su unión al receptor.

Otros anticuerpos anti-GPCR están en etapa de pre-registro o en las últimas etapas de los ensayos clínicos. Actualmente hay dos anticuerpos contra GPCRs en ensayos clínicos fase III, ambos dirigidos hacia receptores de quimioquinas, un anti-CCR5, el leronlimab (PRO 140), y un anti-CXCR4, el ulocuplumab [40]. El leronlimab es un mAb anti-CCR5 humanizado sometido a revisión regulatoria como tratamiento para la infección por VIH, con ensayos clínicos adicionales en progreso o planificados para la enfermedad del injerto contra huésped (GvHD) aguda (fase 2) y el cáncer de mama metastásico triple negativo (fase 1b/2)[142]. Además, recientemente ha entrado en dos ensayos clínicos en fase 3 (ClinicalTrials.gov: NCT04901689) y fase 2 (ClinicalTrials.gov: NCT04347239) para el tratamiento de COVID-19. Se ha demostrado que el tratamiento con leronlimab de pacientes con COVID-19 severo reduce la elevación de IL-6 en plasma y de la quimioquina ligando 5 (CCL5) y normaliza la proporción de linfocitos CD4/CD8 [144].

A pesar de que otros anticuerpos dirigidos contra otros GPCRs han tenido éxito, hasta la fecha no existe ningún anticuerpo terapéutico aprobado dirigido contra CCR6h [131]. El desarrollo de un mAb antagonista podría ser una alternativa a los fármacos convencionales constituidos por pequeñas moléculas hacia esta potencial diana y una estrategia efectiva para el tratamiento de numerosas enfermedades en las que se encuentra implicado.

II. HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual

El eje CCR6–CCL20 posee una amplia participación a diferentes niveles en numerosas patologías y, en consecuencia, su manipulación molecular podría conllevar la reversión parcial o incluso total de los mecanismos subyacentes a dichas patologías.

Hipótesis operativa

La obtención de un anticuerpo monoclonal capaz de incidir en el receptor CCR6h puede suponer una herramienta terapéutica con potencial acción sobre las enfermedades relacionadas con dicho receptor.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Ante la ausencia de opciones terapéuticas efectivas en la situación clínica de las enfermedades relacionadas con el eje CCR6h-CCL20, nos planteamos el objetivo general de desarrollar un anticuerpo monoclonal dirigido hacia el receptor CCR6h con capacidad de neutralizar la actividad de dicho receptor y, por tanto, con un alto potencial terapéutico. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollo de un método de inmunización que permita la obtención de anticuerpos dirigidos contra el receptor CCR6h.
2. Caracterización del anticuerpo obtenido, en términos de:
 - 2.1. Evaluación de su especificidad por el receptor.
 - 2.2. Localización del epítipo de unión.
 - 2.3. Evaluación del efecto antagonista sobre diferentes vías de señalización.
3. Determinación de los efectos funcionales del anticuerpo seleccionado sobre procesos biológicos relacionados con células CCR6⁺ en dos vertientes:
 - 3.1. Efecto sobre la quimiotaxis.
 - 3.2. Efecto sobre la producción y expresión de citoquinas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico empleado y mantenimiento

1.1. Bacterias

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α (F⁻, Φ 80 Δ (*lacZ*) M15, Δ (*lacZYA-argF*), U169, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*(*r_k⁻*, *m_k⁻*), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96* (Nal^R), *relA1*, *phoA*) fue empleada en la construcción de todos los vectores obtenidos como cepa para la transformación de las mezclas de ligación. Esta cepa permite la transformación de ADN exógeno, pues está mutada en el sistema de metilación-restricción (*hsdR17* (*r_k⁻*, *m_k⁻*)), y permite la purificación eficiente de los plásmidos obtenidos, dado que carece de la endonucleasa no específica endonucleasa I (*endA*).

Las células fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%) suplementado, en todos los casos, con ampicilina (*Duchefa*) a una concentración final de 50 μ g/mL. Cuando fue requerido el uso de medio sólido, el medio LB fue preparado con agar al 1,5%. La temperatura de incubación fue de 37 °C durante 18 horas.

1.2. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC), a excepción de la ExpiCHO-S que fue adquirida en *Thermo Fisher*.

Estas líneas celulares son:

- P815 (ATCC, TIB-64): mastocito de ratón DBA/2. Células semiadheridas que fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (*Gibco*) y subcultivadas cada 3-4 días, al alcanzar un 80-90% de confluencia. Para levantarlas fue empleado un raspador.
- NS1 (ATCC, TIB-18): linfocito B de ratón BALB/c derivado de mieloma. Células en suspensión que fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (*Gibco*) y mantenidas a una densidad máxima de $1-5 \times 10^5$ células/mL.
- RBL-2H3 (ATCC, CRL-2256): basófilo de rata Wistar. Células adheridas que fueron cultivadas en una mezcla de medio Modified Eagle's Medium (MEM) (*Gibco*) y

RPMI-1640 en una proporción 3,4:1 y subcultivadas cada 3-4 días utilizando tripsina-EDTA, cuando alcanzaban un 80-90% de confluencia.

- ExpiCHO-S (*Thermo Fisher, A29127*): célula derivada de células de ovario de hámster chino CHO-S. Células en suspensión que fueron cultivadas en medio ExpiCHO Expression medium (*Gibco*) y subcultivadas cada 3-4 días, manteniéndolas a una densidad máxima $4-6 \times 10^6$ células/mL.
- Hibridoma MYC 1-9E10.2 (*ATCC, CRL-1729*): hibridoma productor del anticuerpo anti-c-myc. Células semiadheridas que fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (*Gibco*) y subcultivadas cada 3-4 días, manteniéndolas a una densidad máxima de 9×10^5 células/mL. Para levantarlas fue empleado un raspador.
- Hibridoma 200-3-G6-4 (*ATCC, HB-8737*): hibridoma productor del anticuerpo anti-NGFR. Células semiadheridas que fueron cultivadas en medio Iscove's modified Dubelcco's Medium (IMDM) (*Sigma Aldrich*) y subcultivadas cada 3-4 días, manteniéndolas a una densidad máxima de 9×10^5 células/mL. Para levantarlas fue empleado un raspador.

Exceptuando el medio de expresión de la línea celular ExpiCHO-S, que solo fue suplementado con penicilina y estreptomina, todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) (*Gibco*), 2 mM de L-glutamina (*Lonza*), 100 unidades/mL de penicilina (*Gibco*) y 0,1 mg/mL de estreptomina (*Gibco*). El suero fetal bovino fue inactivado a 56°C durante una hora. Todas las células fueron mantenidas a 37 °C en un incubador con atmósfera humidificada y 5% CO₂, exceptuando la ExpiCHO-S que fue mantenida en una atmósfera humidificada con 8% CO₂ en agitación constante.

1.3. Animales

Para la generación de hibridomas fueron empleados ratones BALB/C hembras de 6-8 semanas de edad suministrados por la Unidad de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de ciclos de 12 h de luz: 12 horas de oscuridad (luz a las 7 a.m.), temperatura controlada de 22 ± 2 °C y libre acceso a agua y comida.

El estudio fue llevado a cabo de acuerdo con las pautas de la Directiva del 24 de noviembre de 1986 (86/609/ECC) aprobadas por el Consejo de Comunidades Europeas y Real Decreto 53/2013 (BOE, 8 de febrero, 2013). Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Junta de Andalucía con el número 09/7/15/280.

2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en el presente trabajo para la cuantificación de la expresión de IL-17 y β -actina humanas por RT-qPCR (Tabla 8), así como para la obtención de vectores (Tabla 9), fueron sintetizados por *Metabion*.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para RT-qPCR.	
Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
pIL17A-1fw	TGGGAAGACCTCATTGGTGT
pIL17A-2rev	GGATTTCTGGGATTGTGAT
pIL17A-3fw (sonda)	6FAM-CTGCTGCTGAGCCTGGAG-BHQ1
pACTINh-1fw	GAAACTACCTTCAACTCCATC
pACTINh-3rev	CTTGCTGATCCACATCTGCTG
pACTINh-6fw (sonda)	6FAM-ACCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT-TAMRA

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para la clonación de vectores.	
Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
pCCR6mm-1fw	GAT <u>ACTCGAGA</u> ATTCCACAGAGTCCTACTTTGG
pCCR6mm-3rev	TTTT <u>CGTCTCT</u> TACCTGGTGAAGTTTCTGACC
pCCR6h-1fw	TTTT <u>CTCGAGAG</u> CGGGGAATCAATGAATTCCAGCGAT
pCCR6h-2rev	TTTT <u>CGTCTCT</u> GGTATTGTACCGATTGCCTACTCCTT
pCCR6h-5rev	GAT <u>ACGTCTCG</u> CCGGTCCATGCTAATGCAATGC
pCCR6h-6rev	GAT <u>ACGTCTCGA</u> ATTCTGAGCTTGACCAAG
pCCR6h-7fw	TTTT <u>GCGCCGCT</u> CACATAGTGAAGGACGACG

Los sitios de restricción incluidos en los oligonucleótidos aparecen subrayados.

Los oligonucleótidos utilizados en cada reacción fueron seleccionados a partir de la secuencia nucleotídica de cada gen o plásmido, utilizando para ello el programa Oligo 4.0, analizando en cada caso la formación de dímeros y horquillamientos no deseados, así como los parámetros físicos y químicos de los oligonucleótidos (T_m , T_d , ΔG).

3. Técnicas generales de biología molecular

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para subclonar los genes, estos fueron amplificados con la polimerasa de alta fidelidad Phusion (*Thermo Fisher*) en el termociclador XP Cyclex BIOER a partir de ADN, utilizando los cebadores específicos indicados en Tabla 9 (Apartado 2). Los

componentes de la reacción, así como, el programa de amplificación empleado se describen en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

Componente	Concentración final
Polimerasa Phusion	0,4 unidades
Phusion HF Buffer 5X	1x
dNTPs	500 μ M total
Cebador Forward	0.5 μ M
Cebador Reverse	0.5 μ M
ADN molde	50 ng

Paso	Temperatura	Tiempo	Número ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	3 minutos	1
Desnaturalización	98°C	10 segundos	
Anillamiento	Tm*	35 segundos	25-35
Extensión	72°C	15 segundos / kb	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

* La menor de la pareja de cebadores.

La temperatura de anillamiento (Tm) depende de la temperatura de unión de los cebadores, utilizando en la reacción la temperatura menor de la pareja de cebadores empleados.

3.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para visualizar y purificar los fragmentos de ADN fueron preparados geles de agarosa con agarosa AgaPure™ (*Canvax Biotech*) disuelta en tampón TAE 1X (Tris Base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). La concentración de agarosa varió, en función del tamaño de los fragmentos a separar, entre 0,7% y 2%. Los geles fueron teñidos con GelGreen (*Biotium*) y visualizados en un transiluminador con luz azul. Antes de cargar el gel, las muestras de ADN fueron mezcladas con tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%, glicerol 30%) en proporción 4:1. La electroforesis fue realizada en cubetas horizontales de 15 x 10 cm Wide Mini-Sub Cell GT (*Bio-Rad*) en el tampón previamente descrito, a un voltaje constante de 120 V generado por una fuente de alimentación Power Pac 300 (*Bio-Rad*). Los geles fueron fotografiados, una vez finalizada la electroforesis. Para los geles de agarosa al 0,7% fue empleado como marcador de peso molecular ADN del fago λ digerido con la enzima

HindIII (Thermo Fisher), mientras que para los geles de agarosa al 2% se usó el BrightMax™ 100-1000 pb como patrón de peso molecular (Canvax Biotech).

3.3. Digestiones con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas fueron suministradas por Thermo Fisher. Los tratamientos enzimáticos del ADN fueron llevados a cabo a la temperatura recomendada y en el tampón adecuado aportado por la casa comercial, durante al menos 1 hora, utilizando 3-4 unidades de enzima por microgramo de ADN.

3.4. Purificación de ADN

Las bandas de interés observadas en los geles de agarosa, tras ser extraídas con un bisturí, fueron purificadas con el kit Clean-Easy Agarose Purification Kit (Canvax Biotech), según las indicaciones del fabricante.

Para la extracción y purificación del ADN plasmídico se utilizó el Plasmid Purification Kit (Canvax Biotech) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

3.5. Ligación de fragmentos de ADN a vectores

Los insertos digeridos y purificados fueron ligados en los vectores digeridos con enzimas compatibles. En todos los casos se empleó la T4 DNA ligasa (Canvax Biotech) y las mezclas de ligación fueron incubadas a 22 °C durante 60 minutos, según las instrucciones del fabricante.

Para las reacciones de ligación se utilizó una relación entre el inserto y el vector 5:1, teniendo en cuenta el tamaño del inserto y el vector, según la siguiente ecuación:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vector}} \times \text{relación inserto: vector}$$

3.6. Transformación de las células competentes

Las células competentes de la cepa *E. coli DH5α* fueron adquiridas como CVX5α™ (Canvax Biotech) con una competencia de 2×10^7 CFU/μg ADN. A 50 μL de células competentes, previamente descongeladas en hielo, se les añadió 5 μL de la mezcla de ligación. La mezcla de transformación fue incubada en hielo durante 30 minutos.

Pasado ese tiempo la misma fue sembrada en placas, atemperadas a 37 °C, de LB agar suplementado con ampicilina. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche.

4. Obtención de plásmidos

Las secuencias codificantes de los GPCRs CCR6 humano (Gb: NM_004367), CCR6 de ratón (Gb: NM_001190333), CCR1 humano (Gb: NM_001295), CCR3 humano (Gb: NM_001837), CCR4 humano (Gb: NM_005508), CCR5 humano (Gb: NM_000579), CXC1R humano (Gb: NM_000634), CXC2R humano (Gb: NM_001557), CXC3R humano (Gb: NM_001504) y CXC4R humano (Gb: NM003467), fueron sintetizadas por Integrated DNA Technologies (*IDT*). Los fragmentos sintéticos estaban flanqueados por los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción 5' *Xho*I y 3' *Not*I. Dichas secuencias fueron clonadas en fase con el vector pcDNA_{3.1}-P_{EF1α}-PSIgK-HA (*Canvax Biotech*). El receptor CCR6h también fue clonado en el vector pcDNA_{3.1}-P_{EF1α}-PSIgK-c-myc (*Canvax Biotech*) para obtener las células empleadas en la inmunización.

Para obtener las quimeras CCR6h-CCR6mm fueron empleados los vectores obtenidos con el receptor CCR6 humano y murino y las secuencias sintéticas correspondientes a los bucles extracelulares ECL1mm, ECL2mm y ECL3mm (*IDT*). Los plásmidos de las quimeras fueron obtenidos mediante PCR y digestión enzimática, clonando los fragmentos correspondientes en el vector pcDNA_{3.1}-P_{EF1α}-PSIgK-HA digerido con las enzimas de restricción *Xho*I y *Not*I.

Para la quimera con ECL1 murino (Figura 24A), fue amplificado el ECL1 de ratón con los cebadores pCCR6h-1fw y pCCR6h-5rev utilizando como molde el fragmento sintético del gen. El fragmento amplificado fue digerido con las enzimas *Xho*I y *Age*I. El resto de la secuencia humana fue obtenida del plásmido con la secuencia humana completa mediante digestión con *Age*I y *Not*I.

Para la quimera con ECL2 murino (Figura 24B), fue obtenido el ECL2 de ratón mediante digestión del fragmento sintético con las enzimas *Age*I y *Not*I. La secuencia humana restante fue obtenida del plásmido con la secuencia humana completa

mediante amplificación con los cebadores pCCR6h-1fw y pCCR6h-5rev y digestión del fragmento amplificado con las enzimas *Xho*I y *Esp*3I.

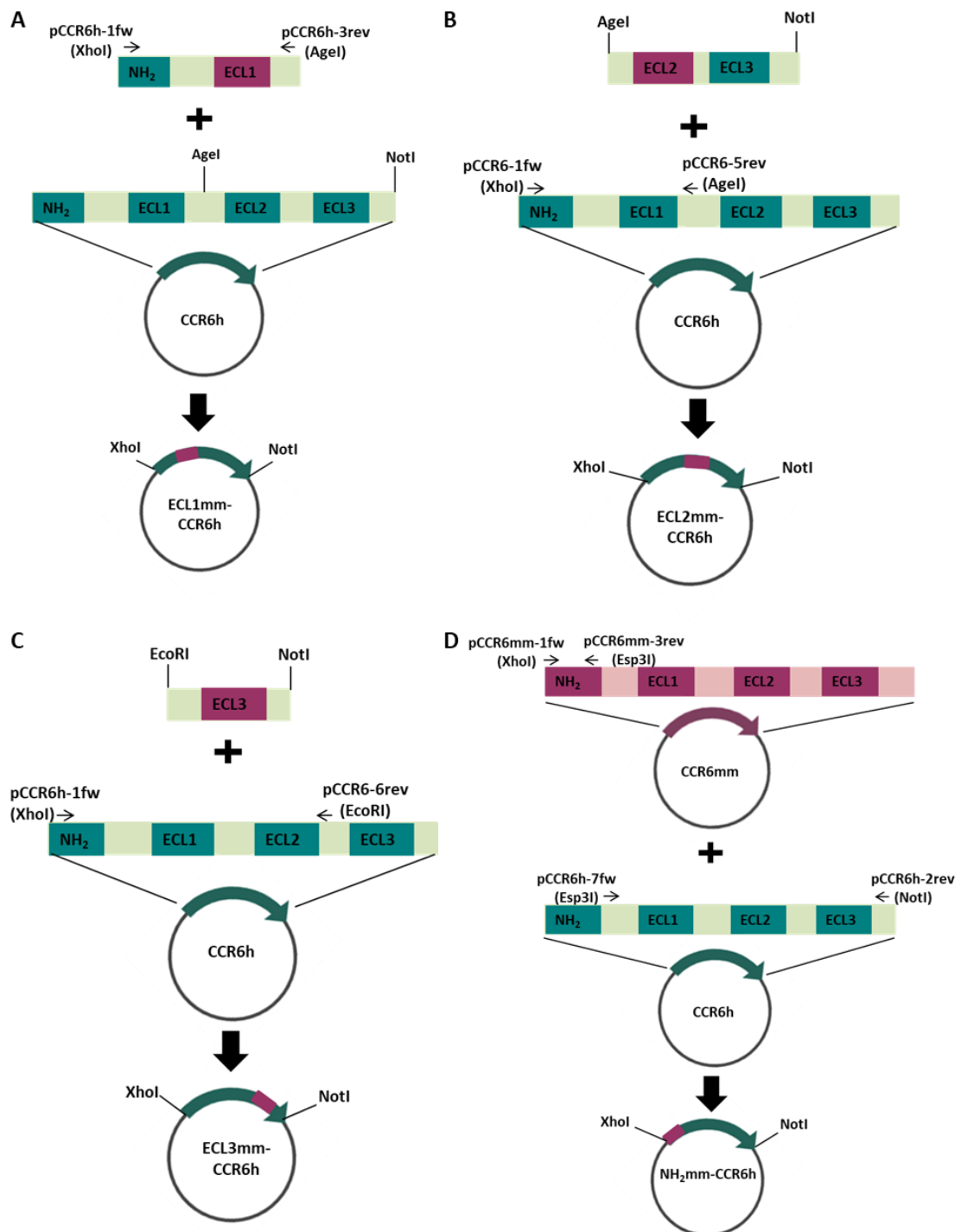


Figura 24. Obtención de quimeras. Las quimeras del receptor humano con el ECL1 murino (A), ECL2 murino (B), ECL3 murino (C) o NH₂ murino (D) se obtuvieron mediante amplificación por PCR y digestión enzimática. En verde se representan las regiones correspondientes a CCR6h y en violeta las correspondientes a CCR6mm.

Para la quimera con ECL3 murino (Figura 24C), fue obtenido el ECL3 de ratón mediante digestión del fragmento sintético con las enzimas *NotI* y *EcoRI*. El resto de la secuencia humana fue obtenida del plásmido con la secuencia humana completa mediante amplificación con los cebadores pCCR6h-1fw y pCCR6h-6rev y digestión del fragmento amplificado con las enzimas *XhoI* y *Esp3I*.

Para la quimera de CCR6 humano con NH₂ murino (Figura 24D), fue amplificado el amino terminal murino del plásmido con el CCR6 de ratón usando los cebadores pCCR6mm-1fw y pCCR6mm-3rev. El fragmento amplificado fue digerido con las enzimas *XhoI* y *Esp3I*. El resto del receptor humano fue amplificado del plásmido con la secuencia humana completa mediante los cebadores pCCR6h-7fw y pCCR6h-2rev, digiriendo el fragmento amplificado con las enzimas *Esp3I* y *NotI*.

Para obtener los plásmidos que codifican la cadena pesada y ligera del anti-CCR6h KM4706, empleado como control positivo, las secuencias de los dominios variables del anticuerpo fueron obtenidas de la patente WO/2013/005649. Las secuencias correspondientes a los dominios V_H y V_L fueron sintetizadas (*IDT*) y fusionadas en fase con el dominio constante de la IgG1 murina en los vectores de expresión pcDNA_{3.4}-PSV_H-C_H-Fcmm y pcDNA_{3.4}-PSV_L-C_L, respectivamente, empleando la enzima *Esp3I*. Dichos vectores poseen los elementos necesarios para expresar las cadenas pesada y ligera completas de la IgG en células de mamífero.

La integridad de las construcciones fue confirmada por digestión con enzimas de restricción y mediante secuenciación (*Stabvida*).

Los vectores obtenidos se muestran en el apartado de resultados.

5. Transfección de células de mamífero

Para la transfección estable de las células RBL-2H3 y P815, las mismas fueron sembradas en placas de 6 pocillos, el día anterior a la transfección, a razón de 3×10^5 células RBL-2H3 o 2×10^5 células P815 en 2 mL del medio de cultivo completo correspondiente a cada célula. Cada transfección se hizo con 2 µg ADN en 100 µL de medio de cultivo sin suplementar y 6 µL de reactivo de transfección Canfast (*Canvax Biotech*), según las recomendaciones del fabricante. Las células transfectadas fueron

seleccionadas 48 horas después de la transfección, en medio de cultivo suplementado con 0,5 mg/mL de neomicina (*Phytotechnology*) para las células RBL-2H3 o 0,9 mg/mL de neomicina para las células P815. El medio de selección fue reemplazado cada 3-4 días, hasta la formación de colonias, momento en el cual fue analizada la expresión del vector transfectado por citometría de flujo.

Para la obtención del anticuerpo control KM4703 (WO/2013/004649) los vectores obtenidos para la expresión de las cadenas V_H y V_K del anticuerpo fueron co-transfectados en la célula ExpiCHO-S. Para ello, las células fueron sembradas en Erlenmeyer a razón de 6×10^6 células/mL y transfectadas con 40 μ g de ADN total usando el kit de expresión ExpiCHO Expression System Kit (*Thermo Fisher*). Las células fueron incubadas a 32 °C y 5% CO_2 en agitación constante durante 10 días, según las instrucciones del fabricante.

Como vector control de la eficiencia de transfección para cada línea celular, fue empleado un vector de expresión de eGFP bajo el control del promotor de citomegalovirus (*Canvax Biotech*).

6. Purificación de membrana: fraccionamiento subcelular

Para obtener las membranas celulares, 2×10^7 células RBL-2H3 transfectadas con CCR6h o sin transfectar fueron resuspendidas en 4 mL de tampón de lisis (sacarosa 250 mM, HEPES 4 mM, EDTA 1,5 mM, pH 7,4) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptina 1 μ g/mL, pepstatina 1 μ g/mL, aprotinina 1 μ g/mL). Las células fueron lisadas en un homogeneizador tipo Dounce de vidrio durante 30 segundos dando 15-20 golpes, y el lisado obtenido se pasó 15 veces por una jeringa acoplada a una aguja de 25G. Los núcleos y las células no lisadas fueron eliminados mediante centrifugación a 800 g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue centrifugado nuevamente a 1.000 g durante otros 10 minutos. El sobrenadante post-nuclear obtenido fue centrifugado a 15.000 g (*Beckman Coulter, TA-10-250*) durante 25 minutos, quedando la fracción de membrana pesada (membrana plasmática y retículo endoplasmático rugoso) en el pellet y la fracción citosólica en el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en PBS y cuantificado por Bradford (*Bio-Rad*). Todos los pasos del fraccionamiento fueron llevados a cabo a 4 °C.

7. Anticuerpos

A lo largo del presente trabajo de tesis fueron utilizados los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpos comerciales: mouse anti-HA FITC (*Miltenyi Biotec*, clon GG8-1F3.3.1), goat anti-mouse IgG FITC (*Sigma Aldrich*), rabbit anti-mouse IgG HRP (*Sigma Aldrich*).
- Anticuerpos purificados del sobrenadante del cultivo de hibridomas: mouse anti-c-myc obtenido del hibridoma comercial MYC 1-9E10.2 [9E10] (*ATCC CRL-1729*), mouse anti-NGFR obtenido del hibridoma comercial 200-3-G6-4 (20.4) (*ATCC HB-8737*), mouse anti-CCR6h 1C6 obtenido del hibridoma producido en el presente trabajo.
- Anticuerpos obtenidos a partir del sobrenadante del cultivo de células ExpiCHO-S transfectadas con los vectores de expresión que codificaban la cadena pesada y ligera del anticuerpo: mouse anti-CCR6h KM4703.

8. Generación de anticuerpos monoclonales

8.1. Selección de la diana

Para la selección de la diana contra la que fueron obtenidos los anticuerpos se realizó una primera selección en base a la identidad de los GPCRs humanos frente a los de ratón, ya que si ambos receptores tuvieran una identidad muy alta los ratones inmunizados no lo reconocerían como ajeno y no se obtendrían anticuerpos. Para ello, fue calculado el porcentaje de identidad de los de los tres dominios extracelulares (ECL) y del amino terminal alineando las secuencias aminoacídicas de los GPCRs humanos frente a los de ratón, a través del portal web *National Center for Biotechnology Information*, y dividiendo el número de aminoácidos iguales en ratón y humano de la región ECL (ECL1, ECL2 y ECL3) o de la región amino terminal entre el número total de aminoácidos de la región multiplicado por 100.

Tras el cribado inicial, fueron establecidos los criterios de selección de la diana en base al estudio del interés terapéutico y del mercado farmacológico en diferentes bases de datos (Tabla 12).

Tabla 12. Bases de datos empleadas en la selección de la diana.	
Sitio Web	URL
ChEMBL	https://www.ebi.ac.uk/chembl/
GPCRdb	https://www.gpcrdb.org/
Guide To PHARMACOLOGY	https://www.guidetopharmacology.org/
Open Targets	https://www.targetvalidation.org/
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
Pharos	https://pharos.nih.gov/

A los criterios de selección establecidos les fue asignado un baremo de puntuación según los puntos considerados como fuertes en la búsqueda de un anticuerpo terapéutico (Tabla 13).

Tabla 13. Puntuación de los criterios de selección de dianas.	
Criterio	Puntuación
Artículos	<100 = 1
	100-500 = 2
	500-1000 = 3
	>1000 = 4
Ligandos	Si = 1
	No = 0
Enfermedades	<50 = 1
	50-100 = 2
	100-300 = 3
Fármacos	>300 = 4
	Si = 0
	No = 2

Los criterios considerados fueron los siguientes:

- Artículos: fue considerada positivamente la existencia de un elevado número de publicaciones de los GPCRs.
- Ligandos: fue puntuada positivamente la existencia de ligandos para el receptor, con el fin de poder evaluar la capacidad inhibitoria del anticuerpo en un ensayo.
- Enfermedades: fue puntuada positivamente la relación de los GPCRs con un alto número de enfermedades, puesto que nuestro objetivo final es la obtención de un anticuerpo terapéutico para el tratamiento de enfermedades.
- Fármacos: fue puntuada negativamente la existencia de fármacos contra el receptor, ya que podrían limitar la penetración del anticuerpo en el mercado.

8.2. Inmunización de los ratones

Cinco ratones BALB/c hembras, de 6-8 semanas de edad, fueron inmunizados con células de la línea celular P815 transfectada con el plásmido pcDNA3.1-P_{EF1 α} -PSIgK-c-

myc-CCR6h. La línea celular P815 es tumorigénica por lo que las células fueron tratadas con mitomicina C el día de la inmunización. Para ello, fue añadida mitomicina C (*Sigma Aldrich*) a 10 µg/mL al cultivo celular e incubada durante 1 hora a 37 °C y 5% CO₂. A continuación, las células fueron recogidas y lavadas tres veces con PBS mediante centrifugación a 400 g durante 4 minutos para eliminar por completo los restos de mitomicina C. Las células fueron resuspendidas en PBS y cada ratón fue inyectado con 10⁷ células/ratón por vía intraperitoneal en un volumen de 50 µL. El programa de inmunización incluyó 6 inmunizaciones cada quince días, seguidas de 3 inmunizaciones mensuales. Cuatro días previos a la fusión fue realizada una última inmunización vía intravenosa.

8.3. Extracción de suero

A los ratones inmunizados les fue extraída sangre periódicamente para aislar el suero y monitorizar el título de anticuerpos mediante ELISA. La primera extracción fue realizada tras la quinta inmunización (dejando transcurrir una semana entre la inmunización y la extracción) y fueron realizadas extracciones tras las siguientes inmunizaciones hasta obtener un título elevado de anticuerpo a una dilución 1:10.000 antes de proceder a la fusión. El suero fue obtenido recogiendo la sangre en un tubo sin anticoagulante que fue incubado durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la sangre fue centrifugada a máxima velocidad durante 15 minutos a 4°C y, a continuación, el sobrenadante, que es la fracción correspondiente al suero, fue recogido cuidadosamente.

8.4. Fusión celular y selección de hibridomas

El ratón con mayor título fue sacrificado por dislocación cervical cuatro días después de la última inmunización e, inmediatamente después, el bazo fue extraído en esterilidad con la menor cantidad de tejido conectivo posible.

Para aislar los esplenocitos el bazo fue colocado en una placa de Petri con medio, cortado en varias porciones con un bisturí y disgregado mecánicamente con el embolo de una jeringa. La solución de linfocitos fue pasada a través de un tamiz celular de nylon de 40 µm de tamaño de poro (*Falcon*) y las células obtenidas fueron

centrifugadas a 230 g durante 10 minutos. Para lisar los hematíes, las células fueron resuspendidas en 10 mL de buffer ACK (cloruro de amonio 0,15 M, bicarbonato de potasio 1 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,4) e incubadas 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, fueron añadidos 40 mL de medio y las células fueron centrifugadas a 230 g durante 10 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en medio y las células fueron contadas en la cámara de Neubauer con solución azul tripán (*Hyclone*).

Las células de mieloma NS1 fueron recogidas en fase logarítmica de crecimiento el día de la fusión. Estas fueron lavadas dos veces con medio, mediante centrifugaciones a 230 g durante 10 minutos, para eliminar el suero del medio de cultivo completo. El pellet resultante fue resuspendido en medio de cultivo y las células fueron contadas en la cámara de Neubauer.

Para la fusión celular, los esplenocitos fueron mezclados con las células NS1 en proporción 1:1 y la mezcla fue centrifugada a 190 g durante 5 minutos. A partir de este punto se continuó el protocolo en un baño a 37 °C. El pellet fue resuspendido en 0,1 mL de PEG Solution (*Sigma Aldrich*), a 37 °C, añadido gota a gota durante 1 minuto con agitación suave, seguidos de 0,9 mL de PEG Solution añadidos de la misma manera. A continuación, fueron añadidos gota a gota, durante 1 minuto y con agitación suave distintos volúmenes, 1mL (3 veces), 2mL, 5mL y 10mL (4 veces), de medio de cultivo.

En todos los casos el medio de cultivo empleado fue RPMI-1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina.

Tras la fusión celular, las células fueron centrifugadas a 190 g durante 5 minutos y resuspendidas a una densidad de 2×10^6 células/mL en medio HAT (RPMI-1640 suplementado con 20% de FBS, 2 mM L-glutamina, suplemento HAT 1X (*Sigma Aldrich*), 100 unidades/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomicina). La suspensión celular obtenida fue sembrada en placas de 96 pocillos, sembrando 200 μ L/pocillo, y las placas fueron incubadas durante 10-12 días a 37 °C y 5% CO₂.

Las placas fueron visualizadas al microscopio para seleccionar aquellos pocillos donde hubiese colonias de hibridomas y proceder a cambiar el medio HAT de los

pocillos por medio HT. Estos pocillos fueron alimentados retirando 120 μL /pocillo de sobrenadante y añadiendo 200 μL /pocillo de medio HT (RPMI-1640 suplementado con 10% FBS, 2 mM L-glutamina, suplemento HT 1X (*Sigma Aldrich*), 100 unidades/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomicina). Cuando los hibridomas crecieron por completo, estos fueron cultivados con medio RPMI-1640 suplementado con 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomicina. Para seleccionar aquellos hibridomas de interés el sobrenadante fue recogido y testado en citometría de flujo.

8.5. Obtención de clones mediante el método de la dilución limitante

Para que los anticuerpos producidos por los hibridomas sean monoclonales se debe hacer al menos un clonaje, ya que en el pocillo donde crece un hibridoma puede caer más de una célula. Para hacer el clonaje, las células del hibridoma a clonar fueron recogidas, contadas y diluidas a una concentración de 1,5 células/mL. Fueron sembradas dos placas de 96 pocillos con 200 μL /pocillo de esta solución de células, de este modo en cada pocillo fueron sembradas 0,3 células. Pasados 15 días fueron analizadas las placas en busca de clones. Estos clones fueron evaluados para seleccionar los clones productores de anticuerpos de interés.

8.6. Purificación de anticuerpos

Las células de ExpiCHO, transfectadas con las cadenas pesada y ligera del anticuerpo a purificar, o de los hibridomas productores de anticuerpos fueron crecidas hasta que el cultivo estuvo confluyente para obtener aproximadamente 100 mL de sobrenadante. Las células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación y el anticuerpo del sobrenadante fue purificado mediante afinidad con una columna de proteína G Sepharosa (*HiTrap Protein G HP, GE Healthcare*) de acuerdo con el protocolo del fabricante en el equipo AKTA Prime Plus (*GE Healthcare*). La concentración de anticuerpo fue cuantificada por absorbancia a 280 nm y el grado de pureza fue analizado mediante electroforesis en gel de acrilamida al 10% (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, según la técnica descrita por Laemmli [145], y posterior tinción con azul de Coomasie.

9. Citometría de flujo

9.1. Procedimiento general

En todos los casos, 5×10^5 células fueron recogidas mediante centrifugación durante 4 minutos a 250 g y el pellet resultante fue resuspendido en 50 μ L de anticuerpo o de sobrenadante de hibridoma. Tras una incubación durante 20 minutos en hielo, fue realizado un lavado con PBS pH 7,2 (*Canvax Biotech*). El pellet celular obtenido fue resuspendido en 50 μ L del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a FITC (*Sigma Aldrich*) diluido 1:60 en PBS y fue incubado durante 10 minutos en hielo. Tras un último lavado con PBS la señal fue analizada en el citómetro de flujo BD FACSCalibur (*Becton Dickinson*). En todos los ensayos de citometría fueron empleadas como control negativo células sin transfectar y marcadas con los anticuerpos en idénticas condiciones.

En todos los casos fueron adquiridos un total de 10.000 eventos y los datos fueron analizados con el software CellQuest (*BD Biosciences*).

9.2. Marcaje de las líneas celulares transfectadas

Para analizar la expresión de cada GPCR, en la superficie de las líneas celulares transfectadas, fue utilizado un anticuerpo específico contra el tag, c-myc o HA, según el plásmido transfectado. En el caso de c-myc, el marcaje fue realizado con el anticuerpo anti-c-myc diluido en PBS a una concentración de 50 μ g/mL y, en el caso de HA, con el anticuerpo anti-HA diluido 1:10. Los controles positivos de transfección, transfectados con el gen eGFP, fueron analizados directamente en el citómetro, sin necesidad de marcar.

9.3. Selección y caracterización de anticuerpos anti-CCR6h

Para realizar el screening de los hibridomas o la caracterización de anticuerpos anti-CCR6h, fueron marcadas las células RBL-2H3 transfectadas con el plásmido para la expresión de CCR6h y HA. Para ello, fue empleado el sobrenadante del cultivo del hibridoma sin diluir o los anticuerpos anti-CCR6h 1C6 y KM4703 purificados y diluidos en PBS a la concentración de interés y, a continuación, fue realizado el marcaje con el anti-mouse IgG FITC.

9.4. Mapeo del epítipo de unión del anticuerpo

Para mapear la región a la que se une el anticuerpo obtenido fue llevada a cabo una citometría con las líneas RBL-2H3 que expresan la primera, segunda o tercera región extracelular o la región N-terminal del CCR6mm embebidas en la secuencia del CCR6h. Para evaluar la especificidad del anticuerpo por el receptor humano, fue empleada la línea RBL-CCR6mm obtenida.

Las células fueron marcadas con 1 µg/mL del anticuerpo anti-CCR6h 1C6 seguida de la tinción con anti-mouse IgG FITC. Todas las quimeras llevaban el tag HA para validar la expresión de las células mediante el marcaje con anti-HA FITC.

9.5. Reactividad cruzada

Las células RBL-2H3 transfectadas con los plásmidos que comprenden los genes de los receptores humanos CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CXCR3 and CXCR4 fueron marcadas con el anti-CCR6h 1C6 para evaluar su especificidad.

Las células fueron marcadas con 1 µg/mL del anticuerpo anti-CCR6h seguida de la tinción con anti-mouse IgG FITC. Todas las células llevaban el tag HA para validar la expresión de las quimeras mediante el marcaje con anti-HA FITC.

10. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

10.1. ELISA sándwich

El ELISA fue realizado en una placa de poliestireno Maxisorp de 96 pocillos (*Thermo Fisher*) recubierta con 50 µL/pocillo del anticuerpo de captura en buffer coating (solución de Na₂CO₃ y NaHCO₃, 0,1M pH 9,6). Tras incubar la placa durante 16 horas a 4°C, la misma fue lavada tres veces con PBST (PBS, Tween®-20 0,05%), bloqueada con PBS-BSA 1% e incubada durante 1 hora a 37 °C. Tras desechar el bloqueo, fue añadido el antígeno diluido en PBS-BSA 0,5%, e incubado durante 2 horas a 37 °C. Tras tres nuevos lavados con PBST fue añadido el anticuerpo de detección unido a biotina, para los ELISAs de citoquinas, o a HRP, para el ELISA de isotipado, y diluido en PBS-BSA 0,5%. El anticuerpo de detección fue incubado durante 2 horas a 37 °C.

En el caso de los ELISAs de citoquinas fue incluido un paso adicional en el que, tras tres lavados, fue añadida la estreptavidina conjugada con HRP, e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, fueron realizados tres lavados y el resultado fue revelado con 100 μ L/pocillo de TMB (*EC-Blue Enhanced, Medicago AB*) incubando en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción colorimétrica fue detenida con HCl 1M. La absorbancia a 450 nm fue medida en el lector de placas FLUOStar OPTIMA (*BMG Labtech*).

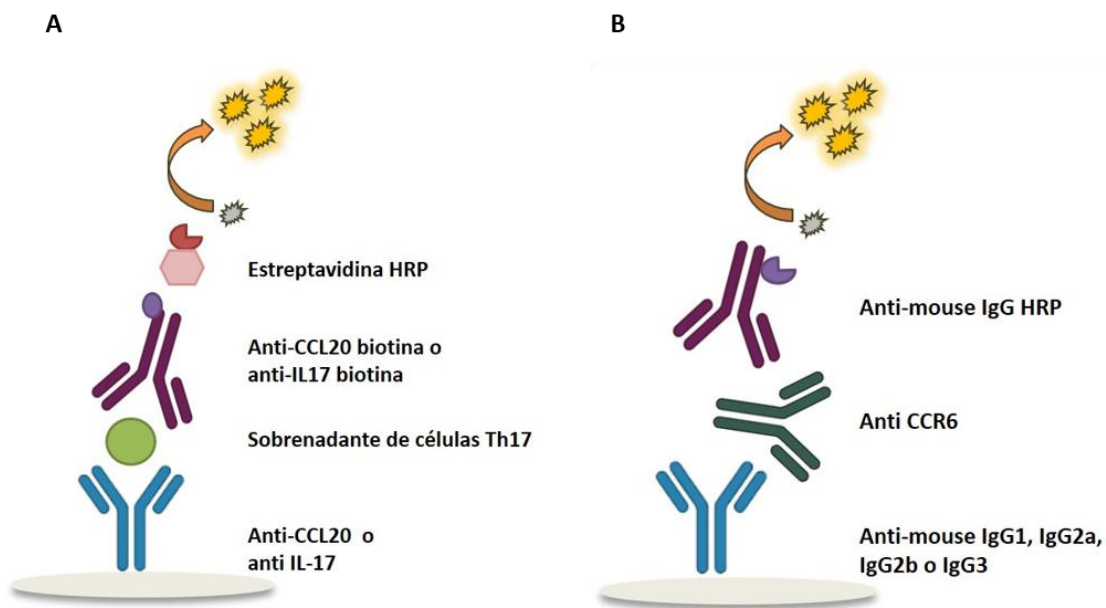


Figura 25. ELISA sándwich. (A) ELISA empleado para determinar la producción de citoquinas por las células Th17. (B) ELISA empleado para isotipar el anticuerpo 1C6.

Este tipo de ELISA fue empleado para medir las citoquinas, IL-17A y CCL20, producidas por los linfocitos Th17 (Figura 25A). Se utilizaron el Human IL-17 DuoSet ELISA y el Human CCL20/MIP-3 Alpha DuoSet ELISA (*R&D Systems*), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, mediante esta técnica fue isotipado el anticuerpo 1C6 obtenido (Figura 25B) utilizando el Mouse mAb Isotyping Kit (*SinoBiological*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10.2. ELISA indirecto

Fue recubierta una placa de poliestireno Maxisorp de 96 pocillos con 50 μ L/pocillo del antígeno en buffer coating (solución de Na_2CO_3 y NaHCO_3 , 0,1M pH 9,6) e incubada 16 horas a 4 °C. Tras tres lavados con PBST, la placa fue bloqueada con PBS-BSA 1%, en

el caso del recubrimiento con el amino terminal, o PBS-BSA 5%, en el caso del recubrimiento con membranas, e incubada durante 1 hora a 37 °C. Tras desechar el bloqueo, fue añadido el anticuerpo primario diluido en PBS-BSA 0,5%, e incubado durante 2 horas a 37 °C. Se hicieron tres lavados con TPBS tras los que fue añadido el anticuerpo secundario, anti-mouse IgG HRP, diluido 1:8.000 en PBS-BSA 0,5%, e incubado durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron tres últimos lavados con PBST y el resultado fue revelado con TMB. La reacción colorimétrica fue detenida con HCl 1 M al igual que en el ELISA tipo sándwich. La absorbancia a 450 nm fue medida usando el lector de placas FLUOStar OPTIMA (BMG Labtech).

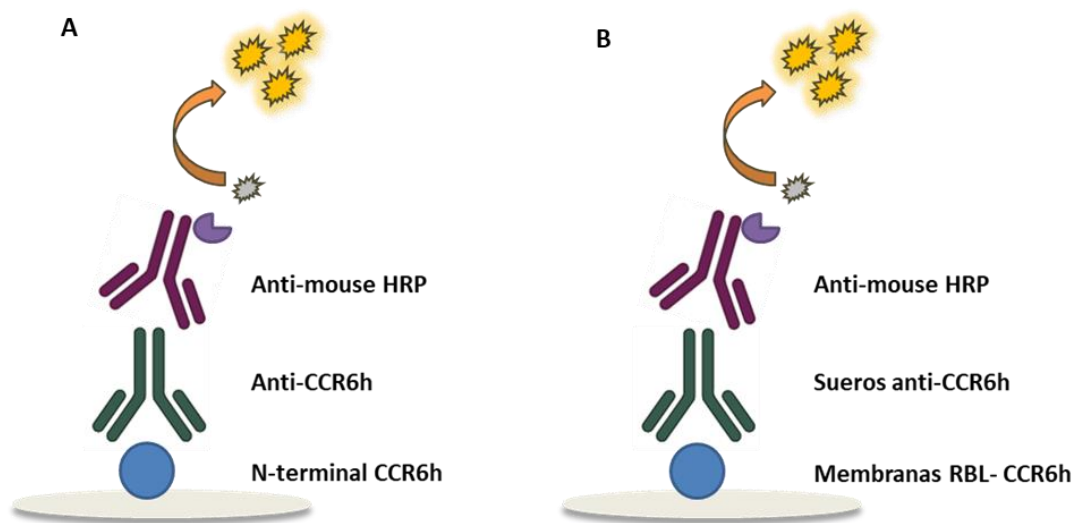


Figura 26. ELISA indirecto. (A) ELISA empleado para determinar la unión del anticuerpo anti-CCR6h al amino terminal de CCR6h. **(B)** ELISA empleado para titular los sueros de los ratones inmunizados.

Mediante este procedimiento fue confirmada la unión del anticuerpo obtenido a la región amino terminal del receptor CCR6h (Figura 26A), usando para el recubrimiento 1 µg/mL del péptido que contiene los 47 aminoácidos (M1-L47) de la región N-terminal del CCR6h (Canvax Biotech). También fue empleado para analizar el título de anticuerpos en el suero de los ratones inmunizados (Figura 26B), utilizando 10 µg/mL de membranas para el recubrimiento.

11. Caracterización de la inhibición de la señalización de los anticuerpos anti-CCR6h

11.1. Inhibición de la señalización celular a través de la ruta del flujo de calcio

Para evaluar la capacidad neutralizante de los hibridomas y de los anticuerpos obtenidos a través de vía de flujo de calcio fue empleado el ensayo FRIDA (WO/2012/013204). Fueron sembradas 5.000 células por pocillo en placas negras de 384 pocillos de fondo plano (*Corning*) e incubadas durante 48 horas. A continuación, el medio de cultivo fue reemplazado por 20 μ L/pocillo del sobrenadante de los hibridomas sin diluir o de los anticuerpos diluidos en BSS (25mM HEPES/NaOH, 1,2 mM KH_2PO_4 , 65 mM NaCl, 5,65 mM KCl, 0,6 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 5,6 mM glucosa y 0,1% BSA). Tras incubar durante 15 minutos, fueron añadidos el ligando CCL20 (*Peprotech*) a 10 nM (EC_{85}) y el sustrato 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (*Glycosynth*) a 1 mM, ambos diluidos en BSS, e incubados durante 60 minutos protegidos de la luz. Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C y 5% CO_2 . La señal del ensayo fue determinada a través de la fluorescencia a 360 nm (excitación) / 470 nm (emisión) en el lector de placas FLUOStar OPTIMA (*BMG Labtech*). Los datos fueron expresados como el porcentaje normalizado de inhibición (NPI) que fue calculado dividiendo la diferencia de la media de la señal de la muestra de interés y la de los controles positivos (EC_{85} del ligando sin muestra) entre la diferencia de la media de la señal de los controles positivos y los controles negativos (sin ligando y sin muestra).

11.2. Inhibición de la señalización celular a través de la ruta de la β -arrestina

Para evaluar la capacidad neutralizante de los hibridomas y de los anticuerpos obtenidos a través de la vía de la β -arrestina fue empleado el ensayo PathHunter de complementación (*DiscoverX Corporation*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Fueron sembradas 7.000 células por pocillo en placas blancas de 384 pocillos de fondo plano (*Greiner*) e incubadas durante 48 horas a 37 °C y 5% CO_2 . A continuación, fueron añadidos 5 μ L por pocillo del sobrenadante de los hibridomas sin diluir o de los anticuerpos diluidos BSS y 10 nM (EC_{85}) del ligando CCL20 (*Peprotech*). La placa fue incubada durante 90 minutos a 37 °C y 5% CO_2 . El sustrato GalScreen, diluido 1:125 en el buffer de ensayo del kit, fue añadido e incubado a 23 °C durante 60 minutos,

protegido de la luz. La luminiscencia fue medida en el lector de placas EnVision (*Perkin Elmer*). Al igual que en el caso del ensayo de flujo de calcio, los datos fueron expresados como el porcentaje normalizado de inhibición (NPI) y la IC_{50} de los anticuerpos fue calculada mediante el modelo 'log [inhibidor] frente a respuesta', en el cual se representó el logaritmo de la concentración del inhibidor en nanomolar frente a la luminiscencia obtenida en unidades relativas de luz (RLU).

12. Quimiotaxis

Para realizar los ensayos de quimiotaxis las células RBL-2H3 transfectadas con CCR6h fueron lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo anti-CCR6h, o con PBS para los controles negativos (sin anticuerpo), durante 30 minutos. Tras realizar un lavado con PBS, las células fueron centrifugadas a 250 g durante 4 minutos y resuspendidas a una densidad de 10^6 células/mL en buffer de ensayo (DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina y 0,2% de BSA). Sobre la parte superior de un Transwell de policarbonato de 6,5 mm con 8 μ m de poro (*Corning*) fueron depositados 200 μ L de la suspensión celular. El Transwell con la suspensión celular fue colocado en un pocillo de placa de 24 pocillos que contenía 600 μ L de buffer de ensayo con 125 nM de CCL20 humana o sin CCL20, en el caso de los controles negativos. La placa fue incubada durante 22 horas a 37 °C y 5% CO_2 . Las células que migraron a través de la membrana del Transwell fueron teñidas con 8 μ M de calceína AM (*Santa Cruz Biotechnology*). La señal de fluorescencia fue medida a 485 nm (excitación) / 530 nm (emisión) en el lector de placas FLUOStar OPTIMA (*BMG Labtech*). El índice de quimiotaxis fue calculado dividiendo la señal de las células que migraron hacia CCL20 entre las células que migraron en ausencia de CCL20.

13. Evaluación del efecto del anti-CCR6h 1C6 en células Th17

13.1. Aislamiento de linfocitos T y diferenciación a linfocitos Th17

El aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes humanos fue realizado mediante gradiente de densidad por centrifugación. La sangre extraída fue diluida 1:2 en PBS y esta mezcla fue depositada sobre el mismo volumen de Histopaque-1077 (*Sigma Aldrich*) en tubos de 50 mL. Tras una

centrifugación a 400 g durante 30 minutos a temperatura ambiente, fueron recogidas con una pipeta Pasteur las células mononucleares que formaban un halo entre la interfase del Histopaque-1077 y el plasma sanguíneo. Las células obtenidas fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 250 g durante 10 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en PBS y la suspensión celular fue filtrada a través de un tamiz celular de nylon de 40 μm de tamaño de poro.

Las células mononucleares obtenidas fueron contadas en la cámara de Neubauer usando azul tripán y los linfocitos T fueron aislados de dichas células por selección negativa usando el Pan T Cell Isolation Kit human (*Miltenyi Biotec*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los linfocitos T aislados fueron estimulados con esferas magnéticas CD3/CD28 (*Life Technologies*) usando una relación de una esfera por cada dos células. Estas células fueron cultivadas durante 8 días a 37 °C y 5% CO₂ en medio X-VIVO 15 (*Lonza*) suplementado con 10% de FBS. Para la diferenciación de los linfocitos T a Th17 fueron añadidos al medio de cultivo 20 ng/mL IL-1 β (*Peprotech*), 30 ng/mL IL-6 (*Peprotech*), 30 ng/mL IL-23 (*Peprotech*), 2,25 ng/mL TGF- β 1 (*Peprotech*) y 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-IL4 (*Mabtech*).

13.2. Inhibición de la expresión de citoquinas por el anti-CCR6h

Tras 8 días de diferenciación de linfocitos T a Th17, las células Th17 diferenciadas fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 células/mL en medio X-VIVO 15 suplementado con 10% FBS, 5 ng/mL IL-1 β , 7,5 ng/mL IL-6, 7,5 ng/mL IL-23, 0,56 ng/mL TGF- β 1 y 0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-IL4. Para ver la capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CCR6h, estos fueron añadidos al cultivo a una concentración final de 62 nM. Como control positivo fueron sembrados linfocitos Th17 a los que no se les añadió ningún anticuerpo, mientras que como control negativo fueron sembrados linfocitos T sin diferenciar a Th17. Tras el cultivo con las condiciones mencionadas durante 5 días a 37 °C y 5% CO₂, las células fueron recogidas para el aislamiento de ARN total y cuantificación de la expresión de IL-17A mediante RT-qPCR (apartado 14). Los sobrenadantes fueron conservados a -80 °C para el análisis de citoquinas mediante ELISA (apartado 10.1).

14. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN de los linfocitos Th17 o de los linfocitos T control fue extraído con el reactivo PRImeZOL™ (*Canvax Biotech*) según las instrucciones del fabricante.

El ARN total extraído se utilizó como molde para sintetizar ADN complementario (ADNc) usando los cebadores pIL17A-2rev y pACTINh-3rev y la transcriptasa reversa RevertAid Reverse Transcriptase (*Thermo Fisher*). Para la retrotranscripción fueron empleados 400 ng de ARN junto a 750 nM del cebador reverse, 4 mM dNTPs total (*Canvax Biotech*) y 4 µL de Buffer de Reacción 5X (*Thermo Fisher*) en un volumen final de 20 µL durante 1 hora a 42 °C, y a continuación, 20 minutos a 72 °C.

El ADNc obtenido fue empleado como molde para realizar una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con la que se midió la expresión de IL-17A y de β-actina de las muestras usando el equipo StepOne Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*). Para ello se emplearon 525 nM de cada cebador y 300 nM de sonda junto a 10 µL de qMAXSen Probe qPCR Master Mix 2X (*Canvax Biotech*) y 5 µL de ADNc siguiendo el programa recogido en la Tabla 14. Los cebadores y sondas empleados para amplificar los retrotranscritos de IL-17A y β-actina se recogen en la Tabla 8 (apartado 2).

Paso	Temperatura	Tiempo	Número ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 segundos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40
Anillamiento y extensión*	58°C	60 segundos	

*Adquisición de datos al final de este paso.

Los niveles de expresión relativos en las muestras fueron determinados usando las curvas estándar preparadas utilizando diluciones seriadas 1:5 de una mezcla de ADNc de las muestras del ensayo. La expresión relativa de los genes fue normalizada respecto a la expresión del gen β-actina de las muestras. Para la cuantificación fue empleado el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [146]. Todas las muestras fueron medidas por duplicado y la media aritmética de los duplicados se usó como el valor cuantitativo. Fueron llevadas a cabo dos repeticiones biológicas del ensayo.

15. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico fue utilizado el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 (GraphPad Software). Las diferencias estadísticas fueron calculadas con un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey. Se consideró que existían diferencias significativas cuando el nivel de significación fue igual o menor a 0,05 ($p < 0,05$).

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Selección de la diana para la obtención de anticuerpos terapéuticos

El principal objetivo de la investigación ha sido la obtención de anticuerpos terapéuticos contra CCR6h para el tratamiento de enfermedades relacionadas con dicho receptor.

El GPCR diana fue seleccionado a partir de un listado inicial de 262 GPCRs no olfatorios, de entre los que se hizo un primer cribado en base al porcentaje de identidad de los tres dominios extracelulares (ECL) y del dominio amino terminal del receptor humano frente al de ratón. De este modo, fueron escogidos aquellos GPCRs humanos con identidad reducida frente a los GPCRs ortólogos de ratón. Fueron seleccionados aquellos receptores cuyo porcentaje de identidad medio de las regiones ECL1, ECL2, ECL3 y amino terminal fue menor del 65%, reduciendo la lista inicial a los 12 GPCRs humanos que se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. GPCRs seleccionados en base a los porcentajes de identidad de los receptores humanos frente a los de ratón.

GPCR	Familia	Referencia NCBI	Identidad (%)
C3AR1	Receptor de anafilatoxinas	NP_00405	59
ACKR1	Receptor de quimioquinas	NP_002027	52
CCR6	Receptor de quimioquinas	NP_004358	55
CXCR1	Receptor de quimioquinas	NP_000625	53
CysLT ₂	Receptor de cisteinil leucotrienos	NP_065110	59
FPR1	Receptor de péptido N-formílico	NP_002020	53
FPR3	Receptor de péptido N-formílico	NP_002021	58
NMUR1	Receptor de neuromedina U	NP_006047	60
HCA ₂ R	Receptor de ácido nicotínico	NP_808219	61
DP1	Receptor de prostaglandinas	NP_000944	62
GPR132	Receptor sensible a protones	NP_037477	48
SUCNR1	Receptor de succinato	NP_149039	62

El siguiente paso consistió en establecer una lista ordenada de estos GPCRs puntuando sus características en base a los criterios de selección establecidos en la Tabla 13 (Material y Métodos). Para llevar a cabo esta puntuación, fue realizada una extensa revisión bibliográfica de los 12 GPCRs seleccionados (Tabla 15) y fueron evaluadas positivamente aquellas características que confirieran un elevado interés

terapéutico de la diana y aquella información relevante que relacionara a los receptores con enfermedades. También fue puntuada negativamente la existencia de otros anticuerpos terapéuticos o fármacos en el mercado mediante una búsqueda de anticuerpos y fármacos existentes. La puntuación fue enfocada a encontrar una diana para la que existiera un número limitado de candidatos a fármacos en desarrollo y que nos proporcionara un alto grado de penetración en el mercado y disponer de mayor libertad de movimientos para operar.

Tabla 16. Evaluación de dianas.					
GPCR	Artículos	Ligando	Enfermedades	Fármacos	Total
CCR6	4	1	4	2	11
CXCR1	4	1	4	0	9
C3AR1	2	1	4	2	9
DP1	4	1	3	0	8
ACKR1	2	0	4	2	8
GPR132	1	1	3	2	7
SUCNR1	1	1	3	2	7
CysLT ₂	2	1	3	0	6
FPR1	2	1	3	0	6
FPR3	1	1	2	2	6
NMUR1	1	1	1	2	5
HCA ₂ R	1	1	2	0	4
Puntuación	<100 = 1 100-500 = 2 500-1000 = 3 >1000 = 4	<50 = 1 50-100 = 2 100-300 = 3 >300 = 4	Si = 1 No = 0	Si = 0 No = 2	

Tras un exhaustivo análisis, el receptor CCR6 fue el que obtuvo mayor puntuación (Tabla 16). Se valoró su implicación en numerosas enfermedades (artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, esclerosis múltiple, cáncer,...), la existencia de ligandos conocidos con los que poder realizar ensayos de evaluación de la actividad de los anticuerpos y la ausencia de fármacos en el mercado. Este conjunto de características determinó que el receptor CCR6 fuera seleccionado como diana para la obtención de anticuerpos terapéuticos.

2. Plásmidos y líneas celulares obtenidas

Todos los plásmidos de expresión obtenidos para los diferentes GPCRs, para los receptores quiméricos CCR6h-CCR6mm y para el V_H y V_L del anticuerpo control KM4703 (WO/2013/004649) se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Plásmidos de expresión obtenidos.

Plásmido	Línea celular transfectada	Objetivo
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-c-myc-CCR6h	P815	Inmunización
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CCR6h	RBL-2H3	Screening de hibridomas y caracterización de anticuerpos anti-CCR6h
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CCR6mm	RBL-2H3	Caracterización de la especificidad de anticuerpos anti-CCR6h
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CCR1h	RBL-2H3	Caracterización de la reacción cruzada de anti-CCR6h con otros receptores
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CCR3h		
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CCR4h		
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CCR5h		
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CXC1Rh		
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CXC2Rh		
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CXC3Rh		
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-CXC4Rh		
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-NH ₂ mm-CCR6h	RBL-2H3	Caracterización de la unión al epítipo del anti-CCR6h
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-ECL1-CCR6h		
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-ECL2-CCR6h		
pcDNA _{3.1} -P _{EF1α} -PSIgK-HA-ECL3-CCR6h		
pcDNA _{3.4} -PSV _H -V _H KM4703-C _H -Fcmm	ExpiCHO-S	Producción del anticuerpo anti-CCR6h control (clon KM4703)
pcDNA _{3.4} -PSV _L -V _L KM4703-C _L		

Exceptuando los plásmidos para la producción del anticuerpo KM4703, las secuencias fueron clonadas en fase con el péptido señal IgK, que es una pequeña secuencia para mejorar la expresión del GPCR (WO/2013/113370), y también llevaban la secuencia del tag c-myc (EQKLISEEDL) o HA (YPYDVPDYA) para monitorizar los niveles de expresión de las transfecciones.

Para la inmunización de los ratones, fue transfectada la línea celular P815 con el vector pcDNA_{3.1}-P_{EF1α}-PSIgK-c-myc-CCR6h (Figura 27A) para conseguir células que sobre-expresaran de manera estable el receptor CCR6h. La línea obtenida tuvo un 68% de expresión del tag c-myc empleado para evaluar el resultado de la transfección (Figura 27B).

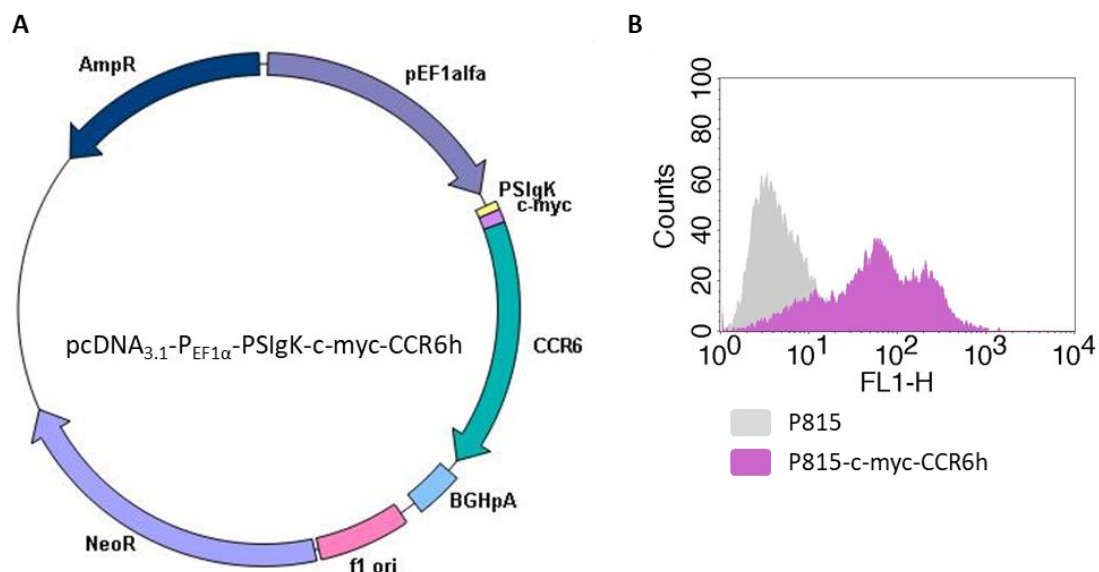


Figura 27. Plásmido y citometría de flujo de la línea obtenida para inmunizar. (A) Vector transfectedo en la célula P815 para la inmunización de los ratones. **(B)** Citometría de flujo del marcaje del tag c-myc en células P815 transfectadas (histograma morado) y sin transfectar (histograma gris).

Para el screening de los hibridomas obtenidos, fue transfectedo el plásmido pcDNA_{3.1}-P_{EF1α}-PSiGK-HA-CCR6h (Figura 28A) en la línea celular RBL-2H3 en lugar de en la P815 para evitar seleccionar aquellos hibridomas que hubieran generado algún anticuerpo contra la célula empleada para la inmunización. El plásmido contenía el tag HA con el objetivo de evitar escoger aquellos hibridomas productores de anticuerpos contra el tag c-myc incluido en la línea de inmunización. Al igual que la línea empleada para la inmunización, esta línea tenía altos niveles de expresión del tag con un 90% de expresión de HA (Figura 28B). Sobre el mismo vector base también fue clonado el ortólogo de ratón (Figura 28C), con un nivel de expresión del receptor de un 51% según el marcaje del tag HA (Figura 28D). Ambas líneas obtenidas con los receptores CCR6 humano y de ratón también fueron empleadas para testar la especificidad de los anticuerpos obtenidos.

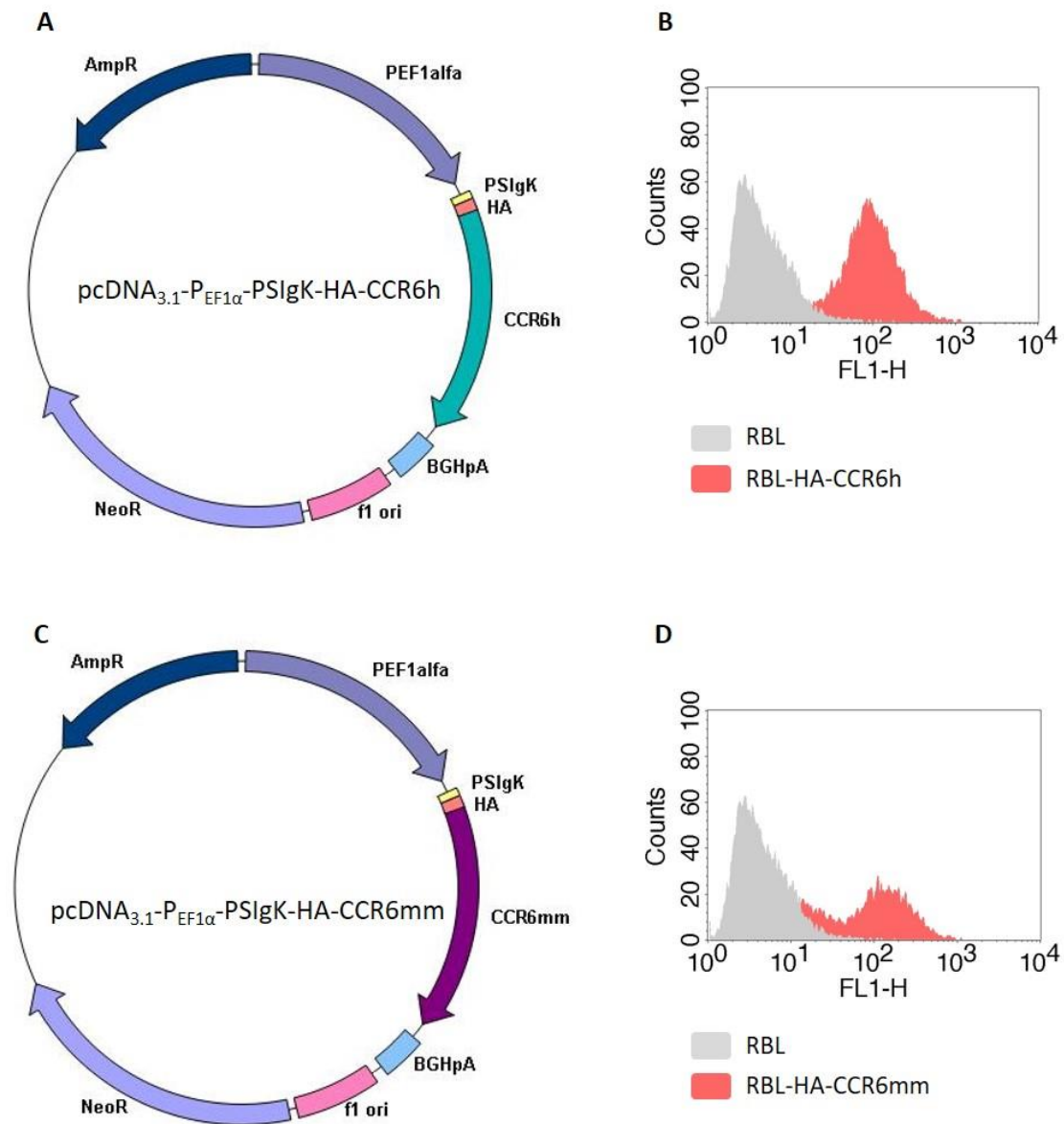


Figura 28. Plásmidos y citometría de flujo de las líneas obtenidas para el screening de los hibridomas y caracterización de anticuerpos anti-CCR6h. Vectores de expresión de CCR6h (A) y CCR6mm (C) transfectados en la célula RBL-2H3. Citometría de flujo del marcaje del tag HA en las células RBL transfectadas (histograma naranja) con CCR6 humano (B) o de ratón (D) y sin transfectar (histograma gris).

Para la caracterización del epítipo de unión del anticuerpo, fueron generados plásmidos con diseños quiméricos CCR6h-CCR6mm (Figura 29A). Para la obtención de todos los plásmidos fue empleado como vector base el plásmido pcDNA_{3.1}-P_{EF1α}-PSIgK-HA. Los plásmidos obtenidos fueron transfectados en la línea celular RBL-2H3 para obtener las quimeras de CCR6h-CCR6mm y los porcentajes obtenidos en citometría marcando el tag HA fueron un 66% para la línea que expresaba CCR6h con el dominio ECL1 de ratón, un 63% para la línea con ECL2 de ratón, un 46% para la línea con ECL3 de ratón y un 97% para la línea con NH₂ de ratón (Figura 29B-E).

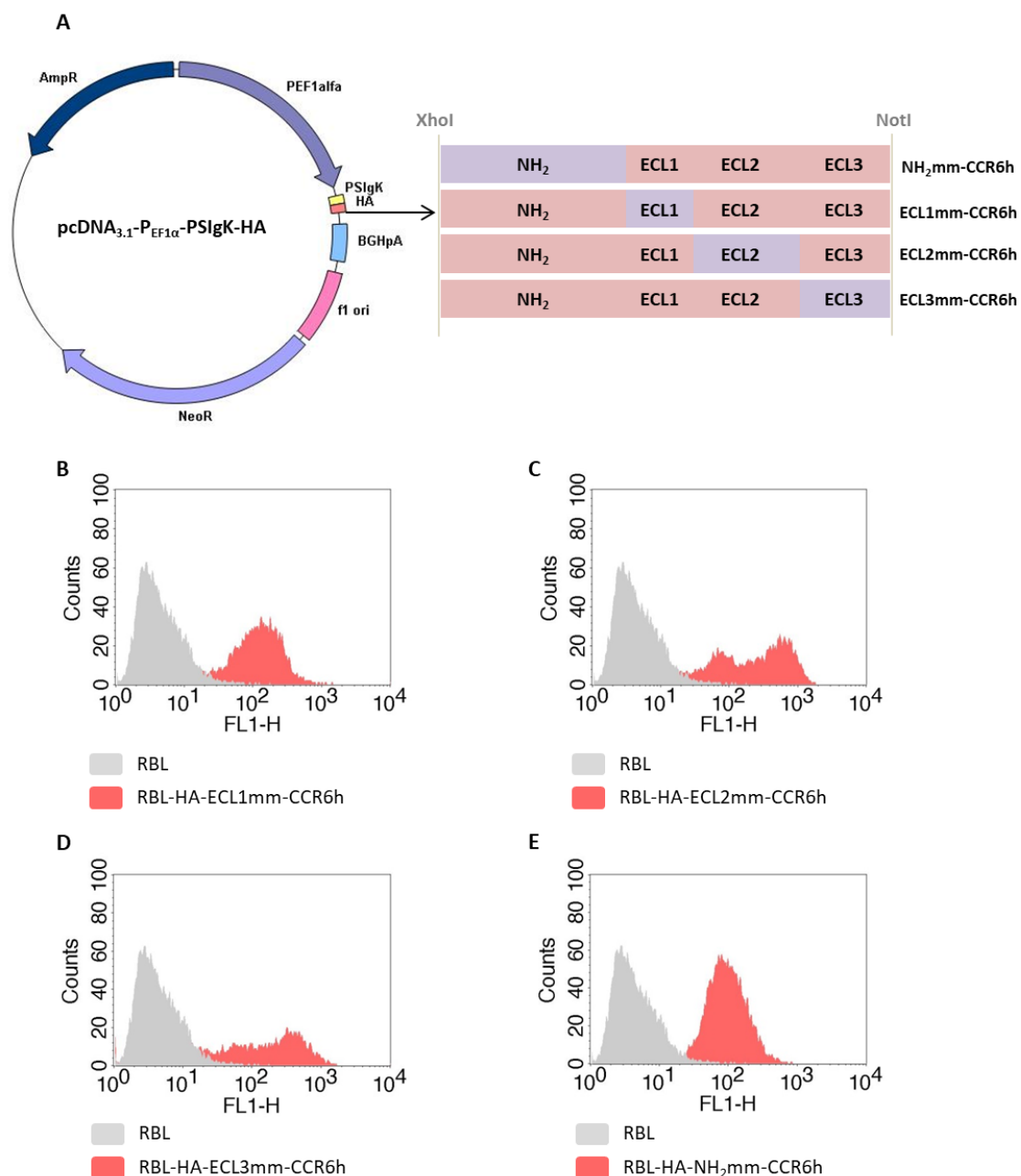


Figura 29. Plásmidos y citometría de flujo de las quimeras CCR6h-CCR6mm. (A) Vectores para la obtención de las quimeras transfectados en la célula RBL-2H3. El vector base utilizado fue el mismo en todos los casos. En rojo se muestran las zonas de CCR6h y en violeta las de CCR6mm. **(B - E)** Citometría de flujo del marcaje del tag HA en las células RBL transfectadas (histograma naranja) y sin transfectar (histograma gris).

Sobre el mismo vector base utilizado para la construcción de las quimeras, fue construido un set de 8 plásmidos para expresar diferentes receptores de quimioquinas (Figura 30A). Estos vectores fueron utilizados en la obtención de líneas celulares destinadas a evaluar la reacción cruzada del anticuerpo anti-CCR6 obtenido con GPCRs incluidos en la familia de los receptores de quimioquinas. Estos plásmidos fueron transfectados en la célula RBL-2H3 y se obtuvieron los siguientes porcentajes de

expresión del tag HA: 90% para la línea con CCR1h, 70% para la línea con CCR3h, 71% para la línea con CCR4h, 85% para la línea con CCR5h, 36% para la línea con CXCR1h, 65% para la línea con CXCR2h, 80% para la línea con CXCR3h y 68% para la línea con CXCR4h (Figura 30B-I).

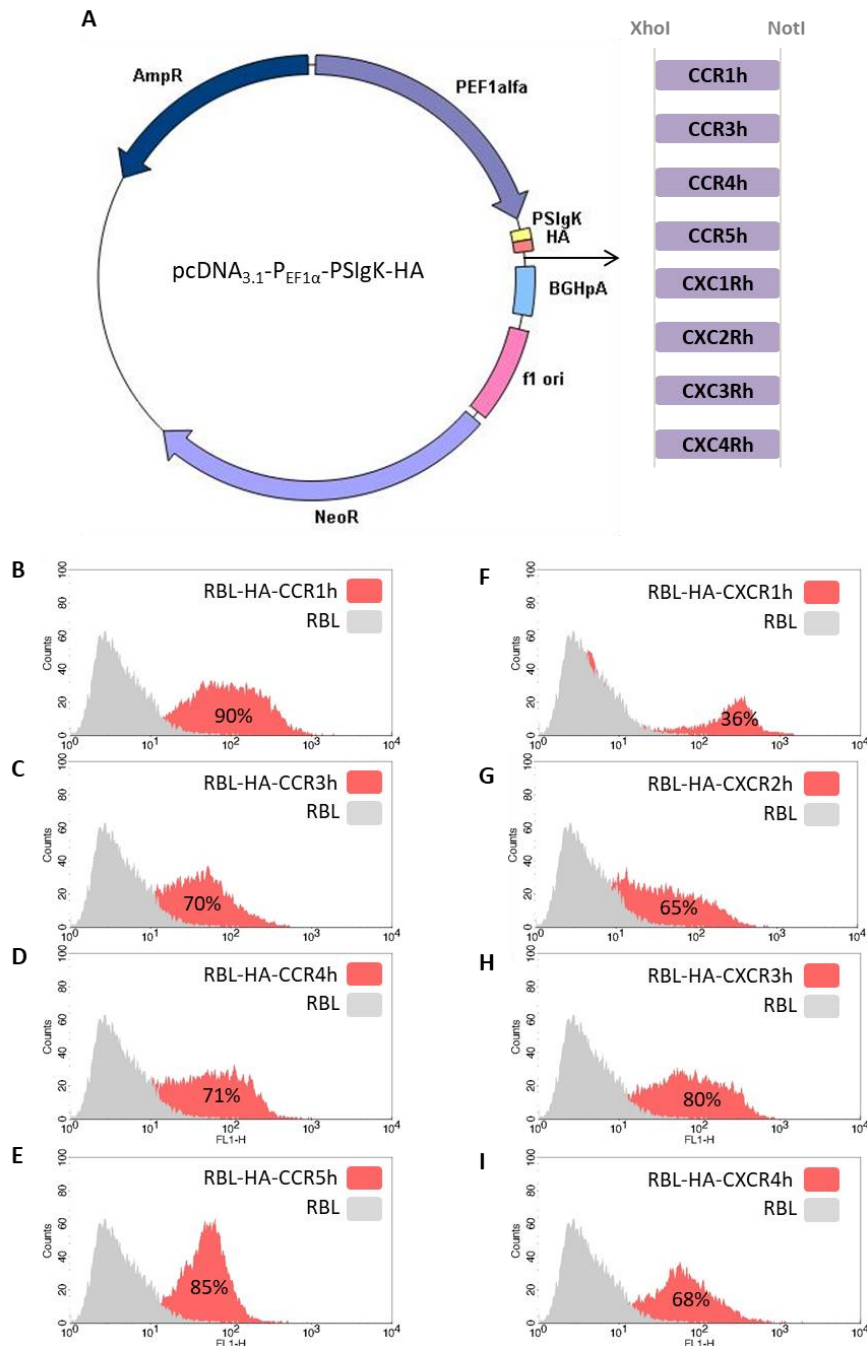


Figura 30. Plásmidos y citometría de las líneas para la expresión de receptores de quimioquinas. (A) Vectores para la expresión de los GPCRs CCR1h, CCR3h, CCR4h, CCR5h, CXCR1h, CXCR2h, CXCR3h y CXCR4h. **(B - I)** Citometría de flujo del marcaje del tag HA en las células RBL-2H3 transfectadas (histograma naranja) y sin transfectar (histograma gris). Se indica el porcentaje de expresión del tag HA en la línea transfectada.

Para la producción del anticuerpo control anti-CCR6h KM4703 fueron obtenidos dos plásmidos, uno para la expresión del V_H (Figura 31A) y otro para la expresión de V_L (Figura 31B). Ambos vectores fueron co-transfectados en la célula ExpiCHO-S.

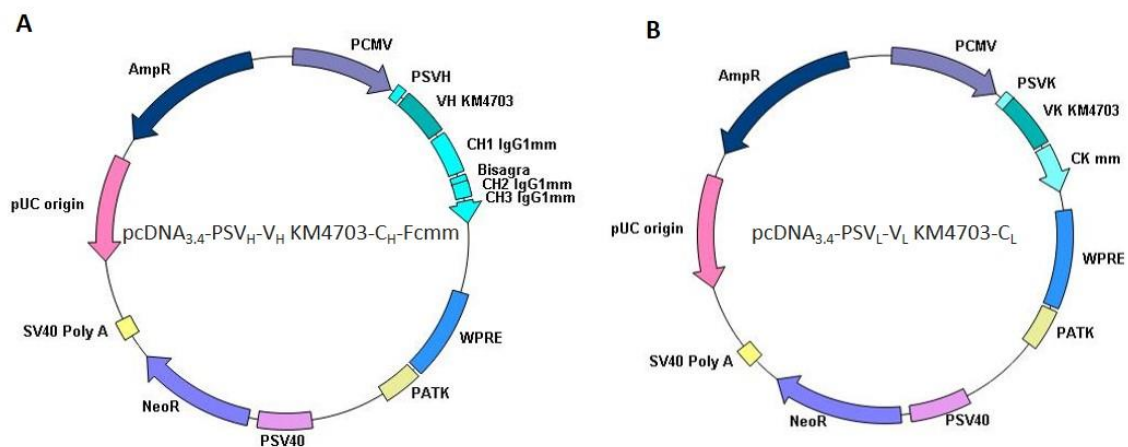


Figura 31. Plásmidos para la obtención del anticuerpo KM4703. (A) Vector para la expresión de V_H. **(B)** Vector para la expresión de V_L.

3. Obtención del anti-CCR6h

3.1. Titulación del suero de los ratones inmunizados

En primer lugar, el suero de los ratones inmunizados fue titulado para seleccionar aquel ratón del que se extraería el bazo para realizar la fusión. Para ello, se realizó un ELISA con los sueros extraídos a diferentes tiempos de inmunización. Para la realización del ELISA las placas fueron recubiertas con membranas celulares, obtenidas de la célula RBL-HA-CCR6h, con un alto nivel de expresión de CCR6h (Figura 28B). Como control negativo fueron empleadas membranas de células sin transfectar, ya que los sueros procedían de ratones inmunizados con células completas y, por tanto, podían contener otros anticuerpos que reaccionasen con las membranas celulares dando falsos positivos. Los sueros fueron titulados a partir de la quinta dosis obteniendo una buena señal en todos los ratones inmunizados hasta la dilución 1:10.000. Tras la sexta y séptima dosis del programa de inmunización, tan solo se consiguió un leve aumento del título con respecto a la quinta dosis para todos los ratones, por lo que, tras realizar dos últimas inmunizaciones más para reforzar la producción de anticuerpos, se sacrificó el ratón con mayor título de anticuerpos para dilución 1:10.000 del suero (Figura 32).

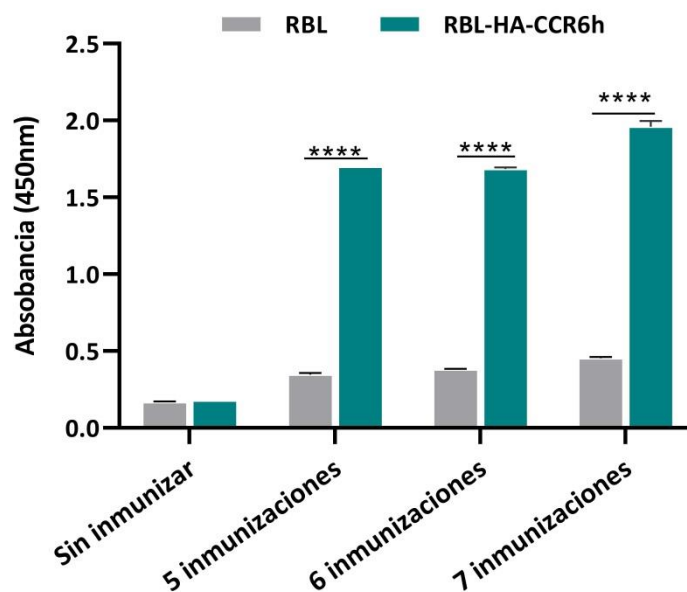


Figura 32. Titulación de anticuerpos anti-CCR6 en el suero del ratón seleccionado para la fusión. Título de anticuerpos, en el suero del ratón seleccionado, obtenido mediante ELISA recubriendo con membranas extraídas de células RBL o RBL-HA-CCR6. Se testaron los sueros del ratón diluidos 1:10.000 tras diferentes inmunizaciones o sin inmunizar, como control. Se muestran las medias y desviaciones estándar de los triplicados. **** $p < 0,0001$.

3.2. Selección de hibridomas productores de anti-CCR6h

Tras la fusión de los esplenocitos del ratón seleccionado con las células de mieloma NS1 fueron obtenidos 750 hibridomas. Los hibridomas fueron cribados por citometría de flujo utilizando la célula RBL-2H3 que expresaba CCR6h (Figura 28B). De los 750 hibridomas fueron seleccionados 18, utilizando como punto de corte para la selección tres veces la desviación estándar de la media de los valores obtenidos en citometría en el marcaje con los sobrenadantes de los hibridomas (5,5%). De este modo fueron escogidos aquellos hibridomas cuyo sobrenadante contenía una cantidad de anticuerpo suficiente como para marcar más de un 5,5% de células CCR6h⁺ (Figura 33).

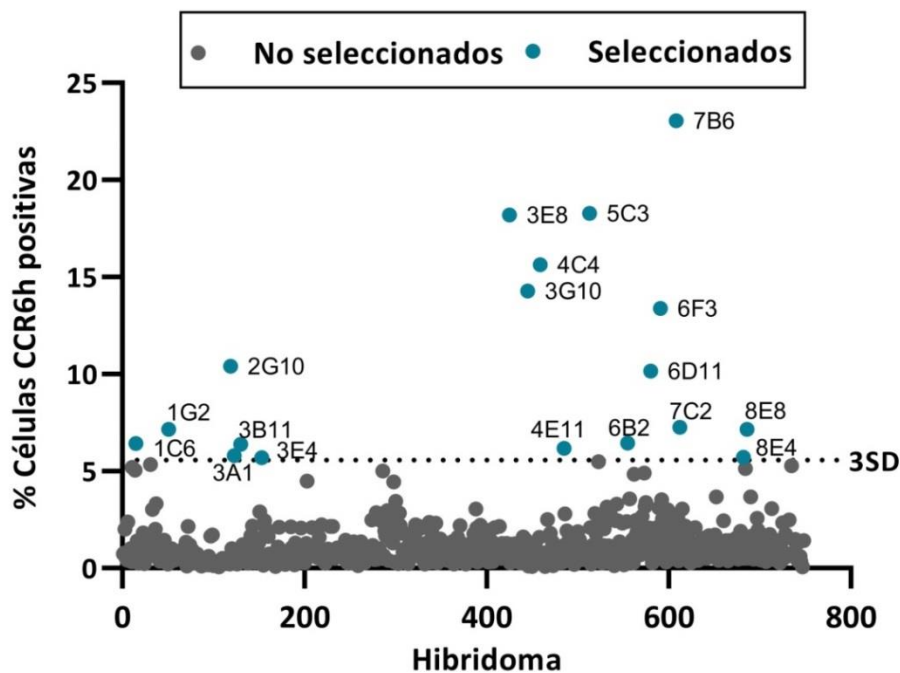


Figura 33. Screening de los hibridomas por citometría de flujo. Se analizó el marcaje de la línea celular RBL-HA-CCR6h con los sobrenadantes producidos por los hibridomas obtenidos. Fueron seleccionados aquellos hibridomas cuyo sobrenadante marcara al menos al 5,5% de las células. Con la línea punteada se indica el punto de corte establecido del 5,5% (3 veces la desviación estándar de los datos).

3.3. Selección de anti-CCR6h antagonistas

Con los hibridomas seleccionados en el screening por citometría de flujo, fue realizado un segundo cribado evaluando la capacidad antagonista de los anticuerpos producidos en el sobrenadante de dichos hibridomas. Fueron realizados ensayos para medir la inhibición de la señalización a través de dos vías diferentes: la ruta de flujo de calcio y la señalización mediada por β -arrestina. De los 18 hibridomas obtenidos en el primer cribado, fueron seleccionados aquellos con un porcentaje de inhibición (NPI) superior al 10% en alguno de los ensayos (Figura 34). De tal modo, fueron seleccionados tres hibridomas productores de anticuerpos con capacidad de inhibir la vía de señalización por calcio (hibridomas 1G2, 6D11 y 8E8), cinco con actividad inhibitoria sobre la vía de señalización mediada por β -arrestina (hibridomas 1C6, 3A1, 3E4, 6F3 y 7B6) y dos hibridomas con actividad sobre ambas vías (los hibridomas 2G10 y 4C4).

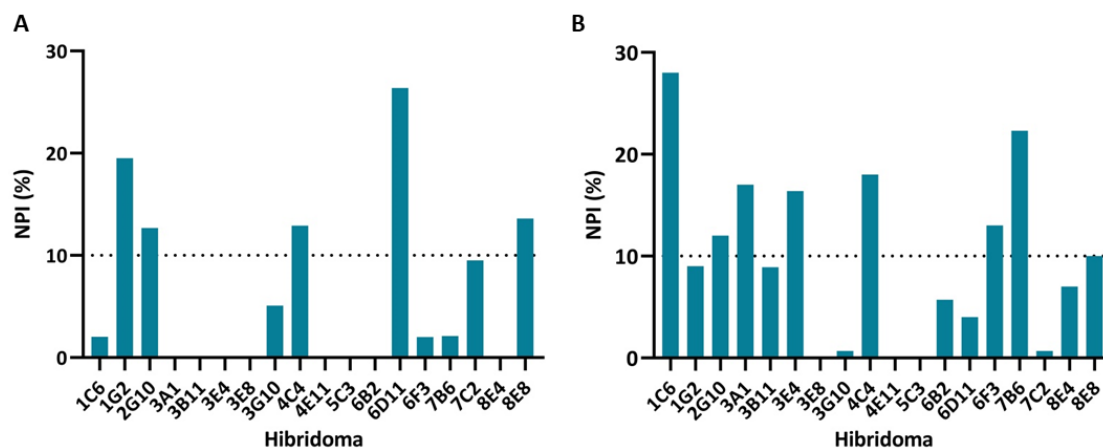


Figura 34. Screening de hibridomas productores de anticuerpos antagonistas. (A) Ensayo FRIDA de inhibición de la señal de flujo de calcio. **(B)** Ensayo *DiscoverX* de inhibición de la señal mediada por β -arrestina.

Los 10 hibridomas seleccionados fueron clonados mediante el método de dilución limitante para la obtención de anticuerpos monoclonales. Finalmente, por mostrar mayor capacidad antagonista y mejor señalización en citometría que los otros clones, el anticuerpo del clon 1C6 fue purificado y caracterizado en mayor profundidad.

3.4. Purificación de anticuerpos

El anticuerpo 1C6 fue purificado del sobrenadante del cultivo del hibridoma para poder hacer una exhaustiva caracterización.

El anticuerpo anti-CCR6h KM4703, que fue empleado como control de los ensayos, fue purificado del sobrenadante de la célula ExpiCHO-S transfectada con los plásmidos necesarios para producir dicho anticuerpo.

Los anticuerpos anti-NGFR, empleado como control de isotipo IgG1, y anti-c-myc, empleado para marcar el tag c-myc, fueron purificados del sobrenadante del cultivo de hibridomas comerciales.

El rendimiento de la purificación de todos los anticuerpos rondó los 1-2 mg por cada 100 mL de cultivo (Tabla 18).

Tabla 18. Rendimiento de la purificación de anticuerpos por 100 mL de cultivo.

Anticuerpo	Clon	mg
Anti-CCR6h	1C6	2,2
Anti-CCR6h	KM4703	1
Anti-c-myc	9E10	1,2
Anti-NGFR	20.4	2

Todos los anticuerpos obtenidos fueron cargados en un gel de acrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes para analizar su pureza (Figura 35).

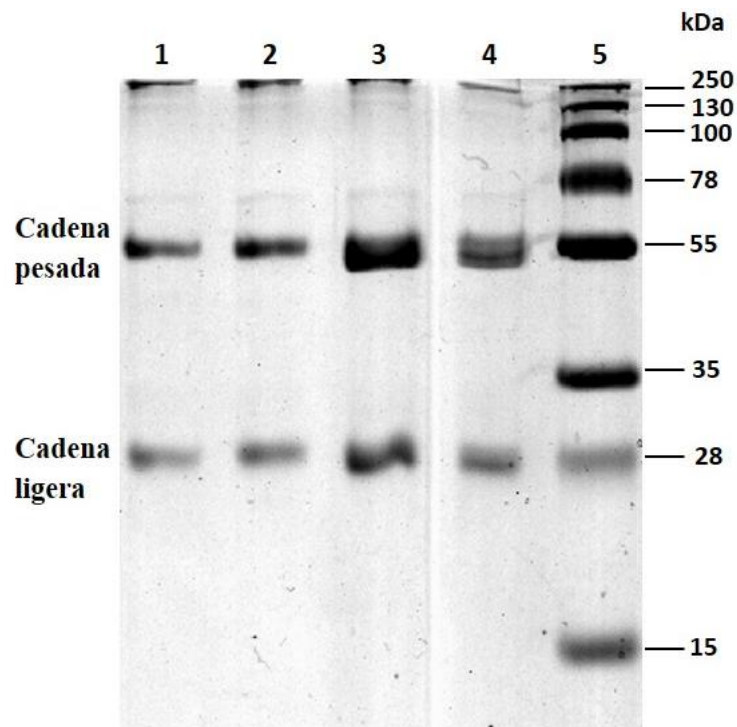


Figura 35. Análisis de la pureza de los anticuerpos purificados. Electroforesis SDS-PAGE 10%. Carril 1: 2 µg de anti-c-myc. Carril 2: 2 µg de anti-NGFR. Carril 3: 2 µg de anti-CCR6h KM4703. Carril 4: 2 µg de anti-CCR6h 1C6. Carril 5: patrón de peso molecular. Las muestras fueron cargadas en tampón con β-mercaptoetanol.

4. Caracterización del anticuerpo anti-CCR6h 1C6

4.1. Isotipado

El anticuerpo 1C6 fue isotipado mediante ELISA resultando ser una IgG1 (Figura 36).

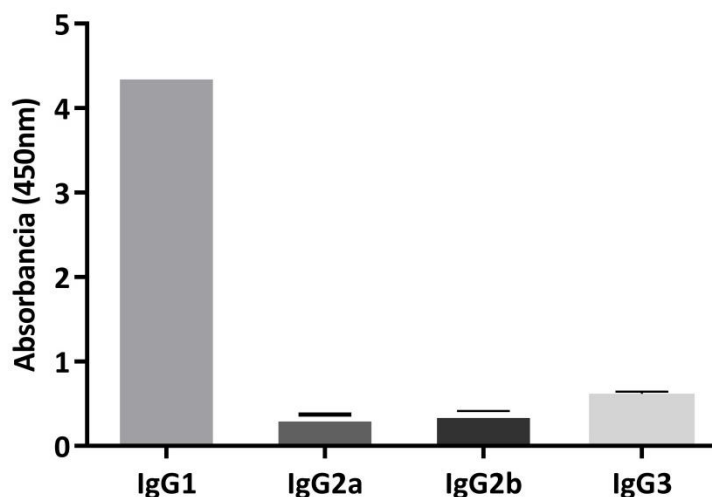


Figura 36. Isotipado del anticuerpo 1C6. Isotipado mediante ELISA sándwich. Se muestran las medias y desviaciones estándar de los triplicados.

4.2. Caracterización de la unión del anticuerpo 1C6 al receptor CCR6 humano

4.2.1. Especificidad por el receptor CCR6h

La especificidad del anticuerpo 1C6 para reconocer al receptor CCR6h expresado en la superficie de las células RBL-2H3, usando como control células sin transfectar, fue evaluada por citometría de flujo. Fue comparado el marcaje con el anticuerpo anti-CCR6h 1C6 obtenido frente al marcaje con el anticuerpo control anti-CCR6h KM4703. Como control de isotipo las células también fueron marcadas con el anticuerpo anti-NGFR. El marcaje de las células con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo, mostró una intensidad de fluorescencia media (MFI) de 97,3 con el anticuerpo 1C6 frente a 68,8 de MFI con el anticuerpo KM4703; esto supone un incremento de 1,4 veces en la fluorescencia obtenida con el anticuerpo 1C6 frente al KM4703 (Figura 37). Las células sin transfectar no mostraron afinidad por ninguno de los anticuerpos y el anticuerpo control de isotipo no marcó a las células transfectadas indicando que la señal obtenida es específica para el marcaje de CCR6h.

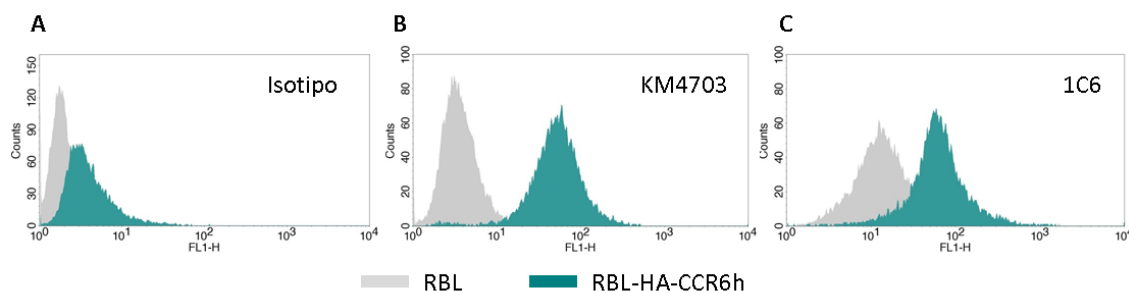


Figura 37. Unión del anti-CCR6h a células RBL-2H3 transfectadas con CCR6h. Comparación de la reactividad en las células RBL-HA-CCR6h (histograma verde) que sobre-expresan CCR6h frente a las células control sin transfectar, RBL (histograma gris), del marcaje con un anticuerpo control de isotipo (A), el anti-CCR6h KM4703 control (B) y el anti-CCR6h obtenido del hibridoma 1C6 (C), todos a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se muestra un análisis representativo de tres experimentos independientes.

A concentraciones inferiores (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el anticuerpo 1C6 continuó marcando a más del 75% de las células (Figura 38), incluso a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demostrando la gran afinidad del anticuerpo 1C6 por el receptor CCR6h.

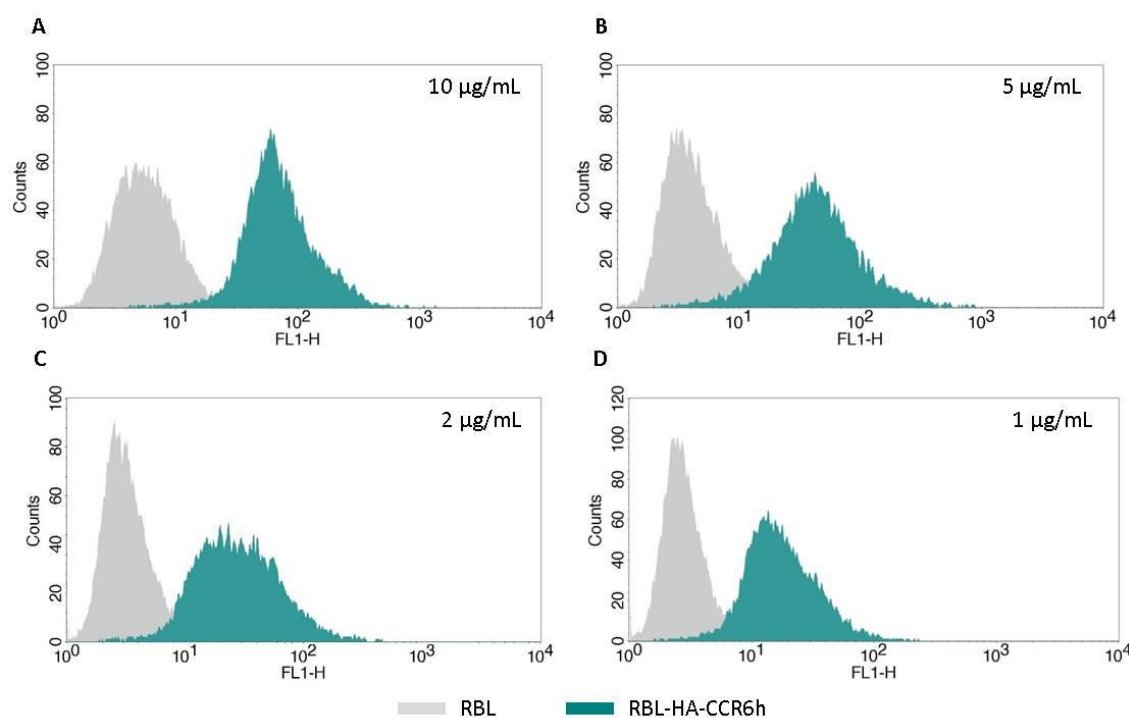


Figura 38. Análisis por citometría de flujo del marcaje con el anticuerpo 1C6. Marcaje de las células RBL-HA-CCR6h (histograma verde) y de células sin transfectar (histograma gris) con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D) del anticuerpo 1C6. Se muestra un análisis representativo de tres experimentos independientes.

Se hizo un análisis por citometría de flujo de la reacción cruzada del anticuerpo 1C6 con otros receptores de quimioquinas diferentes a CCR6h. Este análisis reveló que el anticuerpo no reconocía a otros GPCRs humanos expresados en la célula RBL-2H3 de manera estable y que sí que tenían altos porcentajes de expresión del tag HA (Figura

39). Por lo tanto, no existe reacción cruzada del anticuerpo 1C6 con otros receptores humanos de quimioquinas, entre los que se incluyen los receptores CCR1h, CCR3h, CCR4h, CCR5h, CXCR1h, CXCR2h, CXCR3h y CXCR4h que tienen entre un 25% y un 45% de identidad con el receptor CCR6h. Estos datos demuestran que el anticuerpo 1C6 es específico del receptor CCR6h y no se une a otros receptores de la misma familia.

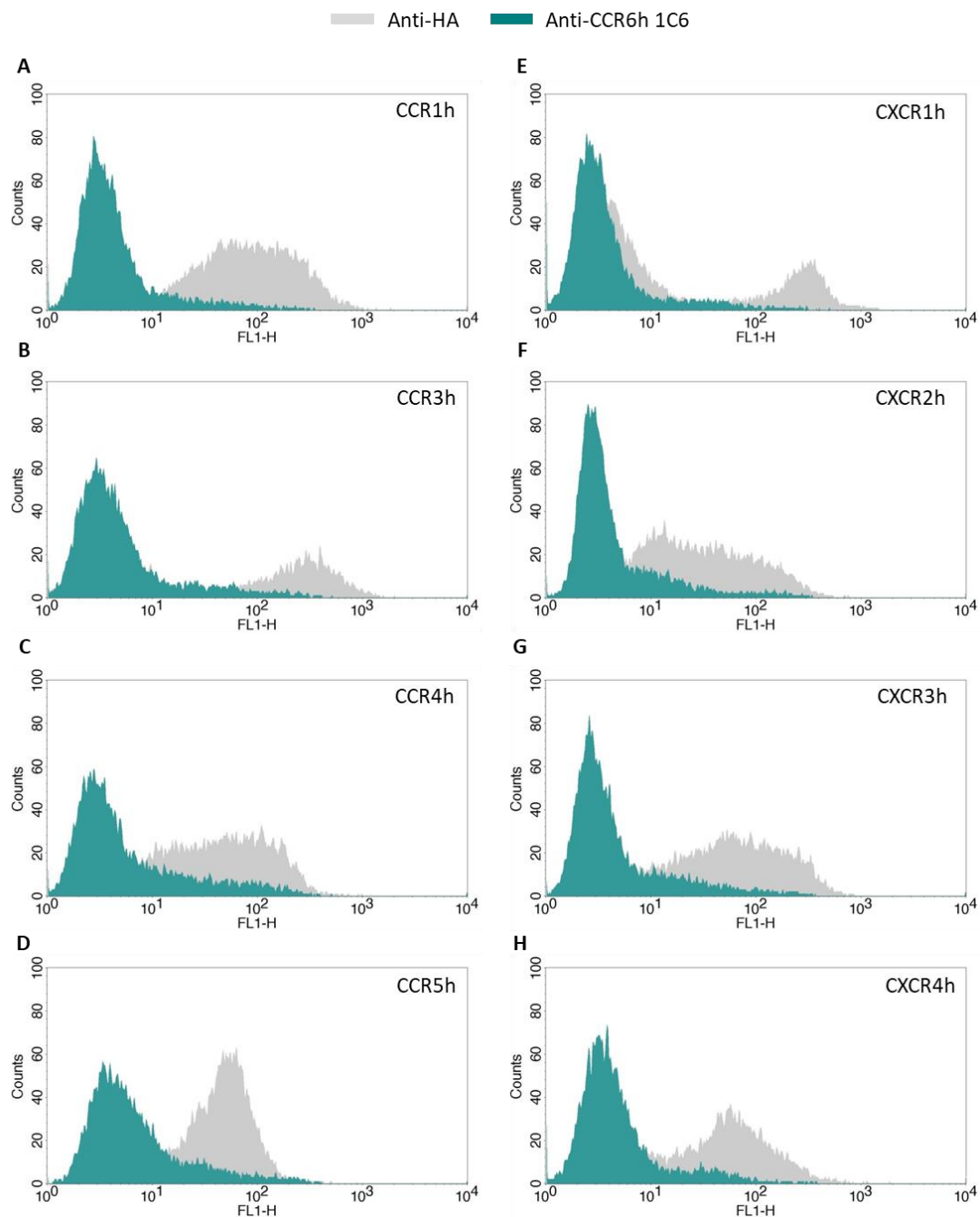


Figura 39. Reacción cruzada del anticuerpo 1C6 con otros GPCRs humanos. Se analizaron por citometría de flujo el marcaje de células RBL-2H3 transfectadas, que expresaban establemente el tag HA junto a los receptores CCR1h (A), CCR3h (B), CCR4h (C), CCR5h (D), CXCR1h (E), CXCR2h (F), CXCR3h (G) y CXCR4h (H), con los anticuerpos anti-CCR6h 1C6 (histograma verde) o anti-HA (histograma gris). Se muestra un análisis representativo de tres experimentos independientes.

También fue evaluada la posibilidad de que el anticuerpo 1C6 reconociera al receptor CCR6 de ratón, ya que comparten un 26% de la secuencia de aminoácidos. De nuevo fue demostrada la alta especificidad del anticuerpo 1C6 que no se unía al receptor ortólogo en ratón y si mostraba un fuerte marcaje de las células que expresaban el receptor CCR6 humano (Figura 39).

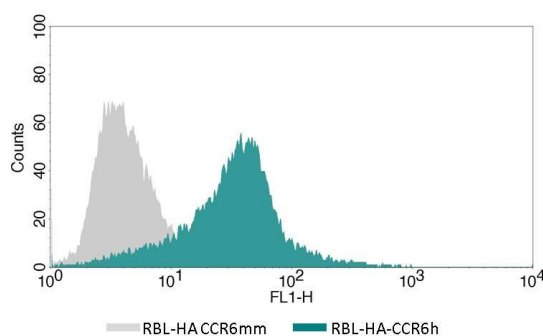


Figura 40. Especificidad del anticuerpo 1C6 por el receptor humano. Análisis por citometría de flujo del marcaje con el anticuerpo 1C6 de las células que expresan el receptor humano (histograma verde) o de ratón (histograma gris). Se muestra un análisis representativo de tres experimentos independientes.

4.2.2. Determinación de la unión al epítipo

Para determinar a qué epítipo se une el anticuerpo 1C6 fueron generadas líneas celulares con expresión de CCR6h modificado con las regiones extracelulares, ECL1, ECL2 y ECL3, o amino terminal del CCR6 de ratón. Las identidades de las regiones extracelulares y amino terminal humanas frente a las de ratón, así como la región de aminoácidos que comprenden se muestran en la Tabla 19. Dado que el anticuerpo anti-CCR6h 1C6 no se une al receptor de ratón (Figura 40), al reemplazar la región humana responsable de la unión del anti-CCR6h 1C6 al receptor por la región homóloga de ratón se debe observar una reducción en el marcaje con el anticuerpo.

Tabla 19. Porcentaje de identidad de las regiones extracelulares y amino terminal del receptor CCR6h frente al de ratón.

Región	Aminoácidos	Porcentaje de identidad
Amino terminal	M1-L47	38 %
ECL 1	S105-K119	66 %
ECL 2	S181-K211	65 %
ECL 3	N280-V303	54 %

Como se muestra en la Figura 41D-F, al reemplazar los dominios ECL1, ECL2 y ECL3 humanos por los dominios de ratón, la unión del anti-CCR6h 1C6 al receptor no se vio afectada, mientras que, cuando la región amino terminal humana fue reemplazada por

la región de ratón (Figura 41C), hubo una pérdida de la unión del anticuerpo. Estos resultados indican que el epítipo de unión del anticuerpo 1C6 al receptor incluye la región amino terminal.

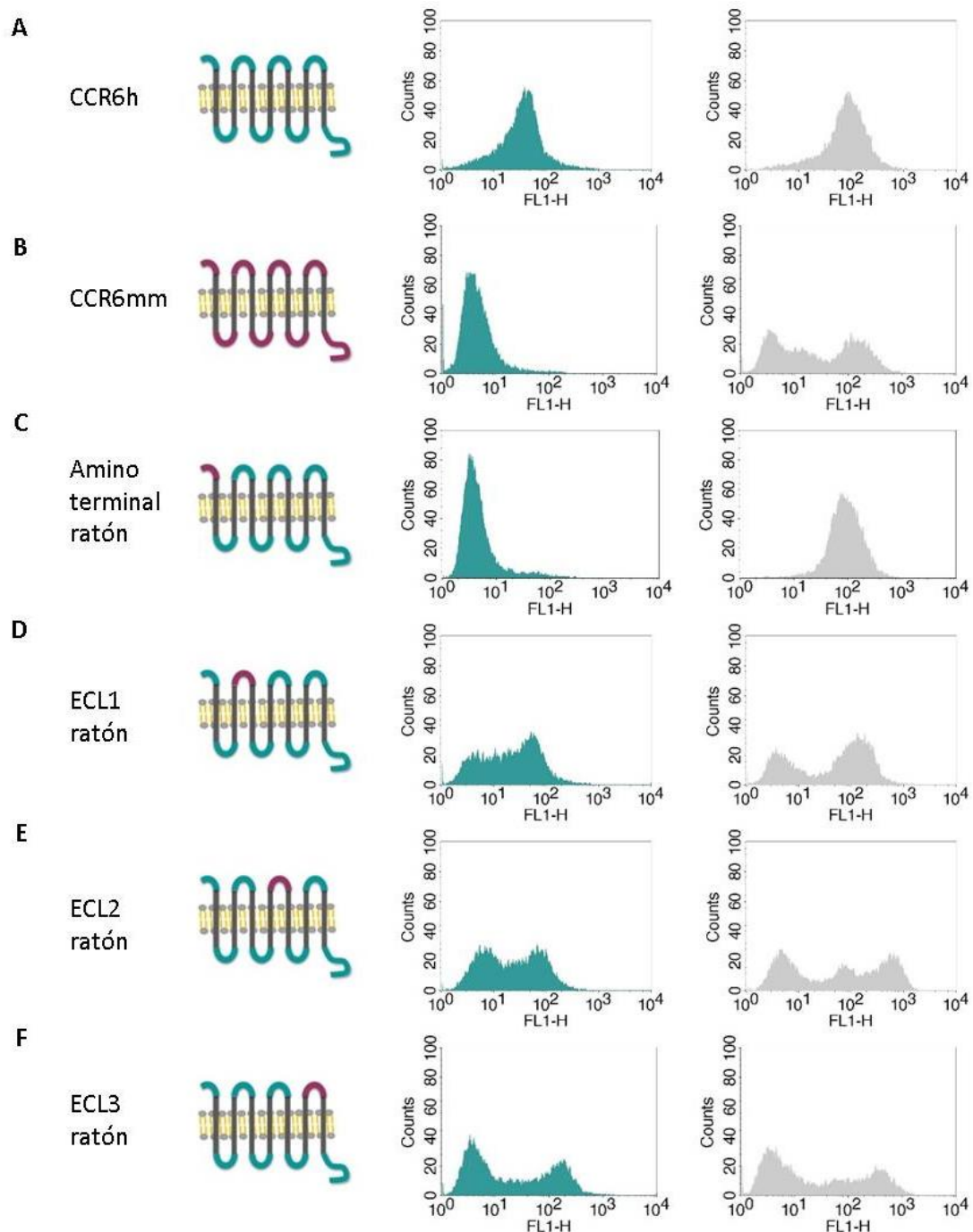


Figure 41. Mapeo del epítipo de unión al anticuerpo. Los dominios extracelulares del receptor CCR6 humano ECL1, ECL2 y ECL3, así como, el amino terminal fueron reemplazados por las regiones homólogas de ratón. Se realizó un análisis por citometría de flujo usando 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo 1C6 (histograma verde) o del anti-HA (histograma gris), empleado como control, para marcar las células RBL-2H3 tranfectadas que expresan CCR6 humano (A), CCR6 de ratón (B) o las variantes de CCR6h con los dominios intercambiados con el CCR6 de ratón (C-F), todos junto al tag HA. Se muestra un análisis representativo de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante ELISA recubriendo con la región amino terminal (aminoácidos 1-47) del CCR6h. En este análisis fue incluido también el anticuerpo anti-CCR6h KM4703 y el anticuerpo control de isotipo. Se observó que el anticuerpo KM4703, al igual que el control de isotipo, no reconocían la región amino terminal; mientras que se confirmó que el anticuerpo 1C6 se unía a la región amino terminal de receptor CCR6 humano (Figura 42).

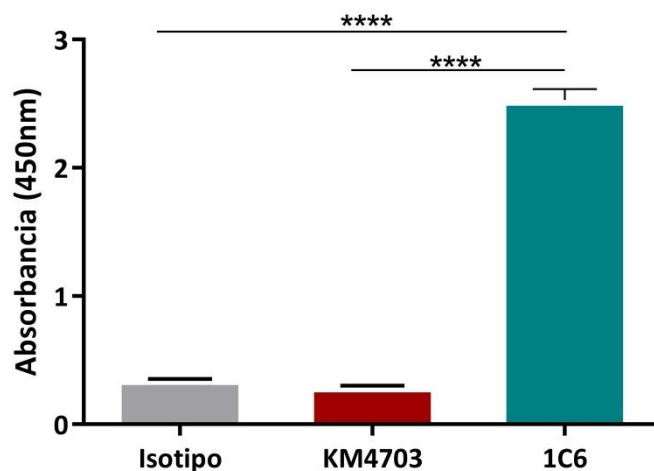


Figura 42. Determinación por ELISA de la unión del anticuerpo 1C6 a la región amino terminal del CCR6h. Unión de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de un anticuerpo control de isotipo, del anti-CCR6h KM4703 y del anti-CCR6h 1C6 a la región amino terminal mediante ELISA. Se muestran las medias y desviaciones estándar de los triplicados. **** $p < 0,0001$.

4.3. Caracterización funcional

4.3.1. Inhibición de la señal a través de la vía de flujo calcio

La capacidad para inhibir la activación de CCR6h a través de CCL20 por el anticuerpo purificado 1C6 fue evaluada a través de la vía de señalización de calcio empleando el ensayo FRIDA. Aunque en el cribado inicial no hubo inhibición de la vía de señalización de calcio empleando el sobrenadante del hibridoma 1C6 (Figura 43A); fue verificado que una vez purificado el anticuerpo el resultado fuera el mismo. En este ensayo fueron incluidos tanto un control de isotipo como el anticuerpo anti-CCR6h KM4703. A la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el anticuerpo 1C6 no reducía la señal mediada por calcio; sin embargo, el anticuerpo KM4703 inhibía la señal del ensayo un 34% (Figura 43A). Fue caracterizada la inhibición producida por el anticuerpo KM4703 a concentraciones menores (Figura 43B), observando que la señal disminuía

drásticamente a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (11%) y se perdía a concentraciones menores, por lo que la inhibición no fue suficiente como para poder hacer una curva dosis-respuesta.

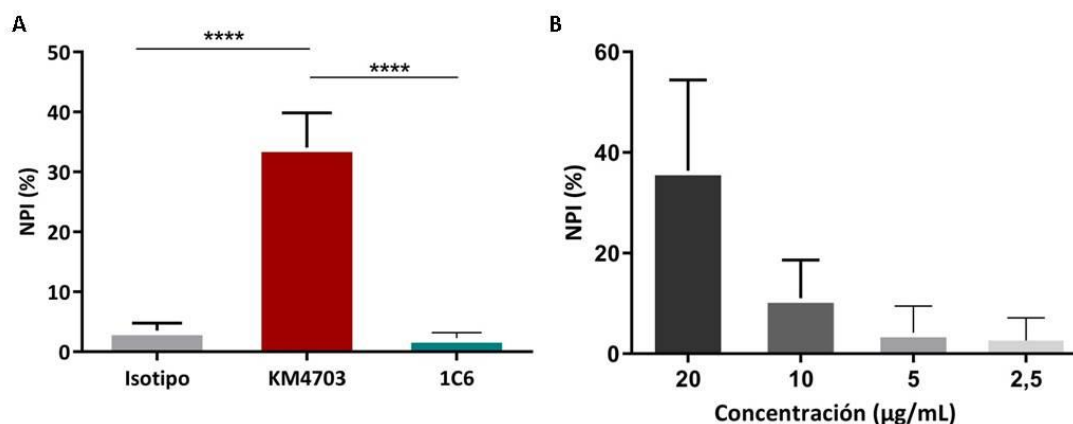


Figura 43. Caracterización de la inhibición de la vía de señalización a través de flujo de calcio. (A) Inhibición de la señal mediada por CCL20 con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los anticuerpos 1C6, KM4703 y una IgG1 de ratón como control de isotipo. Los datos son expresados como porcentaje de inhibición normalizada (NPI). **(B)** Evaluación de la inhibición en presencia de diferentes concentraciones del anticuerpo KM4703. Se representan las medias y desviaciones estándar de los triplicados. **** $p < 0,001$.

4.3.2. Inhibición de la señal a través de la vía de la β -arrestina

Para la caracterización funcional de la capacidad del anticuerpo 1C6 de inhibir la activación de CCR6h mediada por CCL20 a través de la vía de señalización de la β -arrestina se utilizó el ensayo *DiscoverX*.

El efecto de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (133 nM) de los anticuerpos anti-CCR6h KM4703 y 1C6 fue comparado en el ensayo antagonista. El anticuerpo 1C6 producía una inhibición del 32% de la señal; sin embargo, los anticuerpos KM4703 y control de isotipo no mostraron una inhibición significativa del reclutamiento de β -arrestina en respuesta a CCL20 (Figura 44A). Estos resultados sugieren que el anticuerpo 1C6 posee actividad antagonista específica de la respuesta del receptor de CCR6h en la vía de señalización de la β -arrestina. Esta capacidad inhibitoria fue evaluada mediante una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones del anticuerpo. Como se muestra en la Figura 44B la respuesta del receptor CCR6h, desencadenada por la unión de CCL20, fue inhibida por el anticuerpo 1C6 de manera dependiente a la dosis de anticuerpo; con un valor de IC_{50} de 10,23 nM y, por tanto, estos resultados indican que el anticuerpo 1C6 tiene un efecto antagonista de la vía de la β -arrestina.

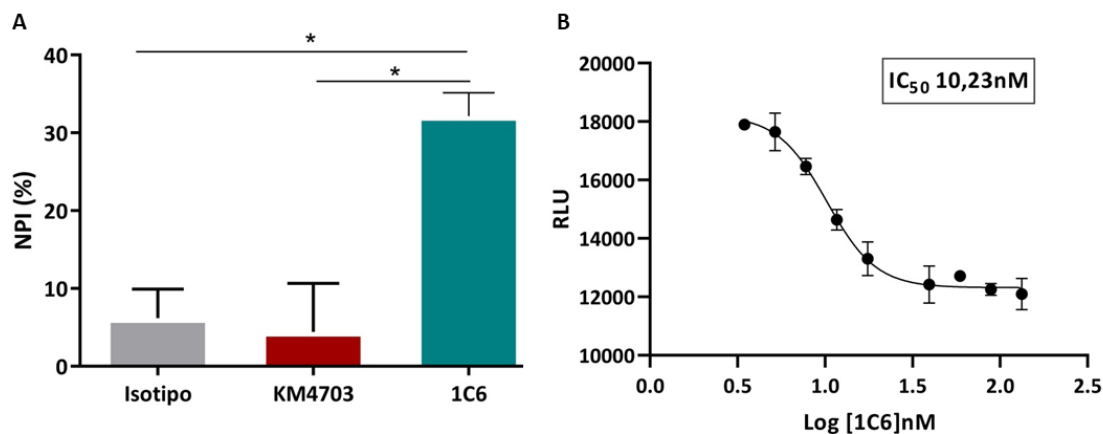


Figura 44. Caracterización de la inhibición de la vía de señalización mediada por β -arrestina. (A) Inhibición de la señal, mediada a través de CCL20, por 20 μ g/mL de los anticuerpos 1C6, KM4703 y una IgG1 de ratón como control de isotipo. Los datos son expresados como porcentaje de inhibición normalizado (NPI). (B) Curva dosis-respuesta en presencia de diferentes concentraciones del anticuerpo 1C6. Los datos son expresados como unidades relativas de luz (RLU). Se muestran las medias y desviaciones estándar de los triplicados. * $p < 0,05$.

4.3.3. Inhibición de la quimiotaxis

Se realizaron experimentos de quimiotaxis para evaluar la capacidad del anticuerpo 1C6 de bloquear la respuesta migratoria de células que expresen el receptor CCR6h hacia su ligando CCL20. Las células RBL-HA-CCR6h obtenidas anteriormente fueron empleadas para realizar los ensayos, cuantificando en primer lugar su capacidad para migrar hacia diferentes concentraciones de ligando. Las células migraron de manera dosis-dependiente, mostrando una quimiotaxis significativa hasta la concentración de 62 nM del ligando CCL20 (Figura 45A). A continuación, fue evaluada la capacidad del anticuerpo 1C6 para inhibir la migración de las células RBL-2H3 transfectadas que sobre-expresaban CCR6h en respuesta a una dosis fija de CCL20 (125 nM). Fue detectada una disminución del índice de quimiotaxis por el anticuerpo 1C6 (Figura 45B), viéndose reducida la migración celular inducida por el ligando en un 68%.

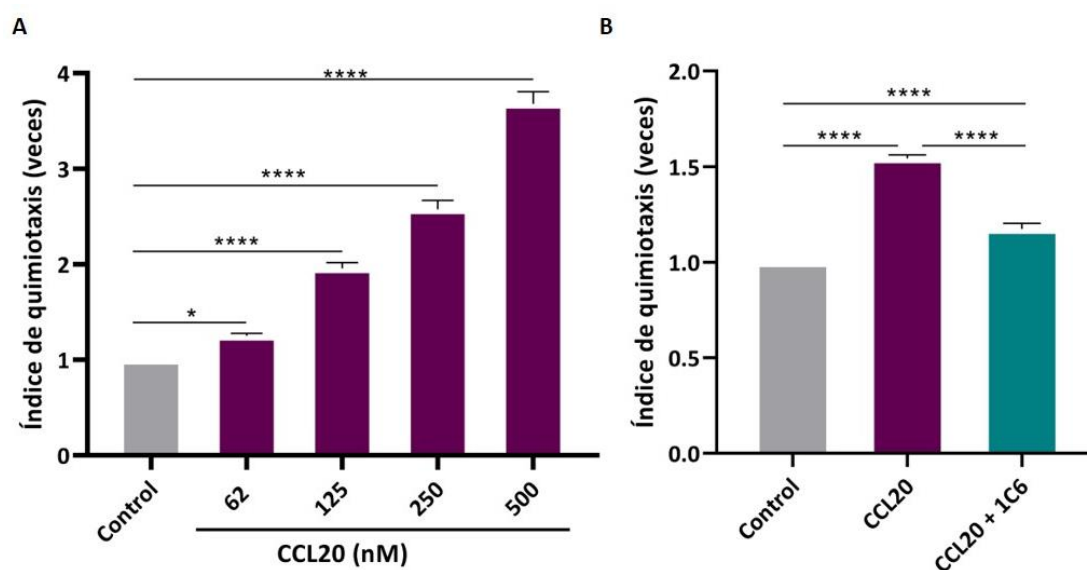


Figura 45. Inhibición de la quimiotaxis hacia CCL20. (A) Ensayo de quimiotaxis con células RBL-HA-CCR6h en presencia de concentraciones crecientes de CCL20. Se analizaron las células que migraron a las 22 horas del cultivo. (B) Evaluación de la inhibición de la migración de las células que expresan CCR6h hacia CCL20 en presencia de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo 1C6. Se calculó el índice de quimiotaxis dividiendo las células migradas en presencia de CCL20 entre aquellas migradas en su ausencia. Los datos se representan como las medias y desviaciones estándar de tres ensayos independientes. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

4.3.4. Inhibición de la producción de citoquinas

Dado que los linfocitos Th17 están implicados en numerosas enfermedades inflamatorias y expresan en su superficie el receptor CCR6, fue evaluado el efecto del anticuerpo 1C6 en la producción de las citoquinas CCL20 e IL-17A por linfocitos Th17. Para ello, las células Th17 fueron cultivadas con los anticuerpos 1C6 y KM4703 durante 5 días, tras los que fue analizada la expresión de citoquinas en el sobrenadante mediante ELISA y la expresión en el ARNm de las células por RT-qPCR.

La producción de CCL20 (Figura 46A), el ligando de CCR6, fue de aproximadamente 3 ng/mL tanto por las células Th17 control, a las que no les fue añadido ningún anticuerpo, como por las células incubadas con los anticuerpos KM4703 o 1C6. Por tanto, el anticuerpo 1C6 no afecta a la producción de CCL20 por los linfocitos Th17. El control de linfocitos T indiferenciados no mostraba producción de CCL20.

En el caso de la producción de IL-17A (Figura 46B), esta se redujo un 40%, bajando de 5,4 ng/mL a 3,2 ng/mL al añadir el anticuerpo 1C6. En el caso del anticuerpo KM4703 esta disminución fue tan solo de un 20%, bajando de 5,4 ng/mL a 4,3 ng/mL.

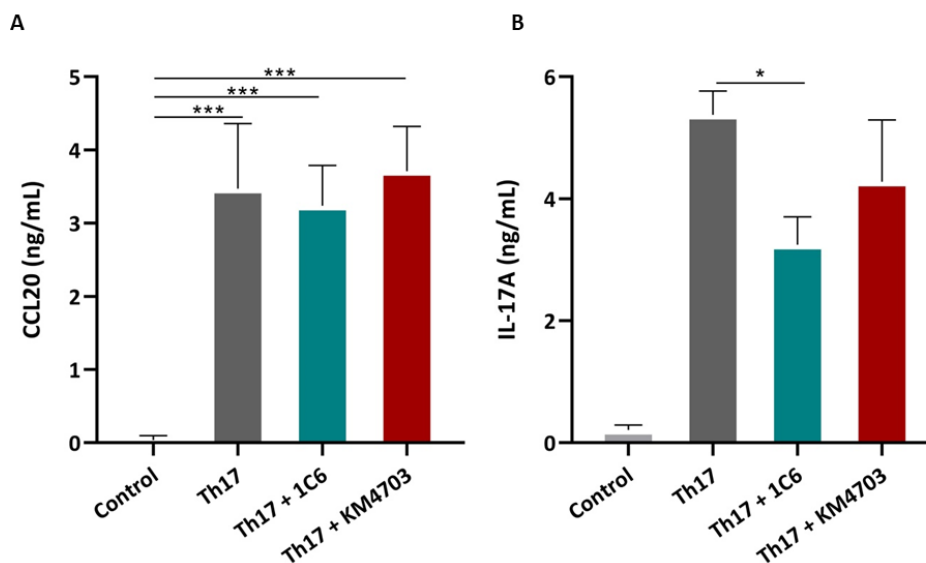


Figura 46. Efecto del anticuerpo 1C6 en la producción de citoquinas por los linfocitos Th17. Se cultivaron durante 5 días los linfocitos T indiferenciados (control) y los linfocitos Th17 con los anticuerpos anti-CCR6, 1C6 y KM4703, o sin anticuerpo. Tras dicho periodo fue analizada la concentración de las citoquinas CCL20 (A) e IL-17A (B) producidas en el sobrenadante mediante ELISA. Se representan las medias y desviaciones estándar de los triplicados. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

El efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-CCR6h sobre la expresión de IL-17A fue confirmado mediante RT-qPCR (Figura 47). El anticuerpo 1C6 mostró una fuerte inhibición de la expresión de IL-17A. Esta reducción de la expresión fue, de nuevo, superior a la obtenida por el anticuerpo KM4703.

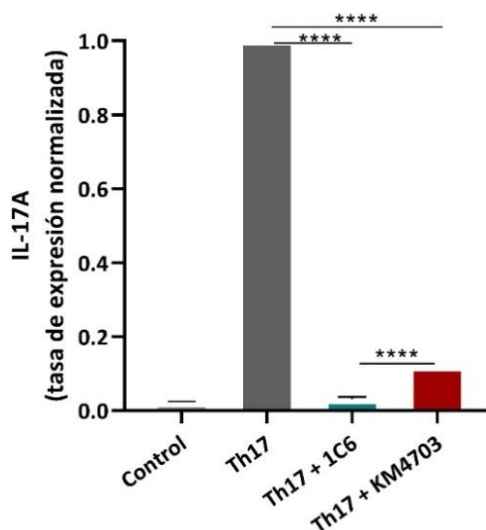


Figura 47. Inhibición de la expresión de IL-17A en linfocitos Th17 por el anticuerpo 1C6. La expresión de IL-17A en el ARNm de las células Th17 fue analizada mediante RT-qPCR. Los datos fueron normalizados respecto al gen de referencia β -actina y la tasa de expresión normalizada fue calculada usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se representan las medias y desviaciones estándar de los duplicados. **** $p < 0,0001$.

La expresión de IL-17A en el ARNm de las células Th17 fue abolida por completo con el anticuerpo 1C6, confirmando la inhibición observada mediante ELISA. El análisis de transcritos muestra una mayor sensibilidad, observándose una respuesta inhibitoria mayor que en el ELISA.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. Importancia de la selección de la diana

La decisión de comenzar un programa de obtención de fármacos se inicia porque existe una enfermedad o condición clínica sin recursos terapéuticos disponibles o ineficientes, o bien que estos posean excesivos efectos secundarios, o resulten en definitiva poco efectivos. La selección de la diana sobre la que trabajar es la piedra angular del descubrimiento de fármacos. Este es un proceso muy complejo que requiere de datos científicos para desarrollar una hipótesis de que la inhibición o activación de una proteína o vía de señalización dará lugar a uno o más efectos terapéuticos. Asimismo, es de gran valor el contexto en el que se llevará a cabo el desarrollo del principio activo, en el que se integran procesos como la realización de ensayos para la evaluación de los compuestos a valorar y de moléculas controles, la existencia en el mercado de fármacos competidores y los factores legales, como la regulación de medicamentos, entre otros. El resultado de este análisis permite la selección de una diana [147].

En este trabajo la diana fue seleccionada de entre los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) ya que su importancia biológica y médica está bien establecida y ampliamente documentada. La amplitud de la distribución de estos receptores, en casi todos los órganos y tejidos del cuerpo, y el papel celular que desempeñan como transductores de señales hacen que sean elementos clave en la regulación de una amplia gama de procesos. Además, su ubicación física y disposición, abarcando la membrana plasmática de la célula, conecta entornos extra e intracelulares proporcionando un mecanismo directo para la conversión de mensajes extracelulares en respuestas intracelulares. De este modo, junto con sus transmisores y efectores, los GPCRs funcionan para modular un amplio espectro de fenómenos celulares dictados por las necesidades de los tejidos y órganos en los que ejercen su función. Por lo tanto, los GPCRs han sido y seguirán siendo elementos clave en el descubrimiento de fármacos [148].

La selección de la diana al comienzo del proceso de obtención de un anticuerpo es esencial para aumentar las probabilidades de éxito. Uno de los criterios de selección

de la diana en el presente trabajo fue el análisis del porcentaje de identidad de los dominios extracelulares (ECL1, ECL2 y ECL3) y del amino terminal de los GPCRs humanos frente a los de ratón, ya que estos son los dominios que están expuestos y pueden actuar como epítomos en el proceso de inmunización. Además, estos dominios son sumamente importantes debido a que están implicados en la unión con el ligando. En el caso de la diana escogida, el receptor CCR6h, la identidad es reducida frente al receptor ortólogo de ratón y, por tanto, el ratón inmunizado lo reconoce como extraño ayudando a fomentar la inmunogenicidad en el proceso de inmunización, favoreciendo la capacidad del sistema inmune de producir anticuerpos contra el receptor y el éxito del proceso.

Otro punto a considerar en el proceso de selección de la diana ha sido el análisis de la implicación de la diana en enfermedades de interés. El receptor CCR6h participa en numerosas enfermedades y la disrupción del eje que forma este receptor junto a su ligando, CCL20, juega un papel crítico en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, lo que sugiere que CCR6h tiene potencial como diana terapéutica para el tratamiento de pacientes [46], [76], [107]. En ratones knockout para el receptor CCR6 se ha visto que la disminución e incluso la supresión de la expresión del receptor CCR6 no son deletéreas. Gracias a ello se puede disponer de ratones mutantes de CCR6 viables como modelo experimental. Estos muestran una respuesta inflamatoria alterada, lo que evidencia la implicación de este receptor en este tipo de enfermedades [103], [149]. Los ratones con alteraciones genéticas de CCR6 son más susceptibles a la inflamación inducida experimentalmente, por ejemplo en psoriasis, y exhiben menor resistencia a enfermedades infecciosas como la arpergilosis. Extendiendo estos estudios a humanos, se han identificado asociaciones entre variantes de CCR6 y la aparición de trastornos autoinmunes (enfermedad de Crohn y artritis reumatoide). Estas variantes de CCR6, como rs3093023, han sido asociados al aumento de la susceptibilidad a artritis reumatoide en personas europeas, japonesas y taiwanesas, pero no en afroamericanas [78].

A nivel técnico, para llevar a cabo un proceso de identificación de anticuerpos terapéuticos contra GPCRs es imprescindible contar con activadores del receptor así como disponer de ensayos funcionales que permitan el análisis de la inducción de la

vía. En el caso de CCR6 la citoquina CCL20 es su ligando de alta afinidad, mientras que las β -defensinas actúan como ligandos de baja afinidad del receptor [47]. Ambos ligandos se encuentran disponibles comercialmente (*Peprotech, Thermo Fisher*), aunque CCL20 es el ligando habitualmente empleado para realizar los ensayos funcionales. Por otro lado, existen diversos ensayos funcionales para la selección de compuestos que se unen al receptor CCR6 basados en mediciones biológicas de diferentes vías de señalización. Están disponibles ensayos comerciales para CCR6 que incluyen la medición de la acumulación de AMPc (cAMP Hunter™ eXpress CCR6 assay, *DiscoverX*), el incremento rápido de calcio (tecnología FLIPR) o el reclutamiento de β -arrestina en diferentes células (PathHunter®eXpress CCR6 assay, *DiscoverX*).

Asimismo, es necesario un estudio del mercado que evalúe las posibilidades de éxito de un fármaco dirigido hacia la diana escogida, para lo que se requiere la existencia de un nicho en el mercado. Alrededor de 16 inhibidores del eje CCR6-CCL20 han sido investigados, pero hasta la fecha no existen agentes terapéuticos que hayan progresado en la evaluación clínica [46]. La compañía ChemoCentryx ha desarrollado una pequeña molécula (CCX9664) dirigida hacia CCR6 y aunque han presentado resultados preclínicos en modelos de artritis y psoriasis, estos aún no han sido descritos en la literatura científica o con ensayos clínicos con resultados beneficiosos [150].

A diferencia de otros GPCRs, esta diana ha mostrado dificultades en el cribado de pequeñas moléculas, presumiblemente por la limitada diversidad de las librerías de compuestos, por lo que deben ser empleados otros enfoques terapéuticos, como puede ser el desarrollo de anticuerpos inhibidores [151]. Sin embargo, actualmente tan solo hay tres anticuerpos monoclonales dirigidos a GPCRs aprobados por la FDA: mogamulizumab, cuya diana es el receptor CCR4; erenumab y eptinezumab, ambos dirigidos al receptor CGRP tipo 1 [125], [131], [152], [153]. Por lo tanto, en el caso del receptor CCR6h existe un nicho en el mercado, ya que hasta la fecha no existe ningún anticuerpo terapéutico o pequeña molécula aprobados y dirigidos contra dicho receptor [131].

Una estrategia alternativa al desarrollo de anticuerpos contra CCR6h para bloquear su función es el desarrollo de mAbs neutralizantes dirigidos a su quimioquina ligando, CCL20. El antagonismo de la señalización de CCL20 a través de CCR6h ofrece una estrategia adecuada para reducir los síntomas de las enfermedades inflamatorias y, especialmente, de aquellas con implicación de las células Th17 [49], [110]. Un mAb anti-CCL20h humanizado, GSK3050002, fue administrado en un ensayo clínico de fase 1 (ClinicalTrials.gov: NCT01984047) para evaluar su seguridad, farmacocinética y farmacodinámica. El anticuerpo fue bien tolerado y no se identificaron problemas de seguridad [111] pero, dado que también se han descrito como ligandos de CCR6h las β -defensinas humanas -1 y -2 [47], la neutralización de CCL20 podría no ser suficiente para inhibir completamente la función de CCR6. De este modo la inhibición del receptor directamente por un anticuerpo anti-CCR6 sería una estrategia más adecuada, ya que aumentarían las posibilidades de inhibir la señalización de todos sus ligandos y no únicamente de CCL20.

Debido a las dificultades en el cribado de pequeñas moléculas dirigidas hacia CCR6, a la potencial modulación farmacológica del receptor, a su implicación en numerosas enfermedades y a la necesidad clínica de fármacos, CCR6h es un excelente candidato como diana para la búsqueda de anticuerpos terapéuticos, y la inhibición de sus rutas de señalización tiene un alto potencial terapéutico. En relación a los criterios anteriores se seleccionó como diana el receptor CCR6h con el objetivo de obtener un anticuerpo que inhiba la señalización mediada por el eje CCR6h-CCL20 y, por tanto, que pueda ser empleado en el tratamiento de pacientes con enfermedades relacionadas con CCR6h.

2. Importancia del proceso de inmunización

Los anticuerpos anti-GPCRs pueden ser generados a través de técnicas *in vivo*, como la inmunización animal, o a través de técnicas *in vitro*, como el *phage display* o las librerías de ScFv. La generación de anticuerpos monoclonales por la tecnología del hibridoma es un importante y necesario paso debido a la enorme demanda de anticuerpos en ciencia, diagnóstico y terapia [154]. Los enfoques de inmunización *in vivo* han sido ejemplificados para numerosos GPCRs, como PAR4 [155], CXCR2 [156],

CXCR4 [157] y β_1 AR [158], y en nuestro caso también fue el enfoque seleccionado para la obtención de un anticuerpo anti-CCR6h mediante la inmunización de ratones.

El desarrollo de anticuerpos anti-GPCRs es un proceso de gran complejidad en cuanto a la preparación de un antígeno homogéneo y funcional [127]. Por ello, la obtención de anticuerpos monoclonales con actividad funcional dirigidos contra GPCRs continúa siendo un reto. Existen múltiples formatos de antígenos para emplear en el proceso de inmunización. Estos son ADN, ARN, membranas celulares, células completas, partículas semejantes a virus (VLP), proteoliposomas y péptidos [127], [142], [159]. El método más común consiste en inmunizar animales contra la proteína diana.

Cuando tratamos de generar un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer proteínas nativas, es crítico usar la proteína diana en su conformación nativa, no solo en el paso de inmunización, sino también en el proceso de cribado [160]. La mayoría de anticuerpos anti-GPCRs han sido generados mediante la inmunización con péptidos sintéticos. Sin embargo, a menudo estos anticuerpos muestran reactividad inespecífica y/o reactividad cruzada con otras proteínas dificultando la identificación de uniones específicas anticuerpo-receptor [161]. A través de la inmunización con el dominio N-terminal del receptor han sido obtenidos los anticuerpos monoclonales terapéuticos mogamulizumab y erenumab dirigidos contra GPCRs y aprobados por la FDA [142]. Debido a la dificultad técnica para obtener la forma purificada de estos receptores transmembrana, la inmunización con CCR6h puro no es factible. Además, ha sido descrito que en el caso de CCR6 la inmunización de ratones con secuencias peptídicas de los dominios extracelulares falla en la inducción de anticuerpos que reaccionen contra el receptor CCR6 nativo [150]. Por tanto, para la obtención de anticuerpos funcionales contra CCR6h es necesario emplear un inmunógeno alternativo a los péptidos.

Las células completas que sobre-expresan CCR6h en su superficie se pueden emplear como un inmunógeno útil, teniendo la ventaja de que la línea que sobre-expresa el receptor presenta el GPCR al sistema inmune en su conformación nativa y provee el mayor nivel de estabilidad. Además, este enfoque permite inmunizar con

una célula singénica (de idéntico genotipo) que exprese el antígeno que, al ser más cercana al animal hospedador, maximiza la respuesta inmune específica contra la proteína diana de membrana [162]. En el trabajo realizado para generar anticuerpos contra CCR6h, se empleó la inmunización con células enteras de una línea celular que sobre-expresaba el receptor CCR6h manteniendo su estructura conformacional y presentando al sistema inmunitario el receptor plegado correctamente con su estructura postraducciona l correcta. Esto es esencial para los epítos conformacionales y para las proteínas transmembrana [163]. El uso de células enteras como inmunógeno es una estrategia con la que abordar este problema y con la que podrían obtenerse potentes candidatos a fármacos.

En los receptores de membrana, como CCR6, solo unos pocos residuos de los bucles extracelulares y del dominio amino terminal están expuestos como regiones potencialmente inmunogénicas [150]. Existen anticuerpos terapéuticos anti-GPCRs que han sido aislados empleando como antígeno para la inmunización células que sobre-expresaban el receptor o fracciones de membrana de dichas células. Algunos ejemplos de anticuerpos obtenidos de este modo son el glutazumab, cuya diana es GLP1R, el volagidemab, cuya diana es GCGR, plozalizumab, cuya diana es CCR2, el leronlimab (PRO 140), cuya diana es CCR5, el ulocuplumab (BMS-936564), cuya diana es CXCR4 y el avdoralimab (IPH5401), cuya diana es C5aR [130].

La expresión naturalmente baja de la mayoría de los GPCRs en la superficie celular y la exposición de pocos residuos en la superficie celular, dificulta la inmunogenicidad contra estos receptores. En el estudio realizado por Dreyer et al. documentan que existe una relación entre los clones productores de anticuerpos específicos obtenidos en una fusión y los niveles elevados de expresión del antígeno diana [160]. Por lo tanto, para la inmunización con células es muy importante que la expresión en las células de CCR6h sea alta, pues puede que este sea un factor determinante para desencadenar la respuesta inmunogénica contra el receptor. Aunque son muchos los estudios que emplean la inmunización con células para obtener anticuerpos, estos no profundizan en la expresión del antígeno en las células empleadas como inmunógeno y dicha expresión puede que tenga una trascendental importancia para la obtención de anticuerpos. En nuestro caso para monitorizar la expresión del receptor CCR6h se

evaluó mediante citometría de flujo a las células CCR6h⁺, en los días previos a la inmunización, para comprobar su expresión en la superficie celular. Probablemente nuestros resultados tengan relación con el alto nivel de expresión de CCR6h (68%) en la línea celular empleada en la inmunización. Usando estas células como antígeno obtuvimos exitosamente un anticuerpo funcional, llamado 1C6, contra el receptor CCR6h. De este modo, la inmunización con células completas que sobre-expresen la diana podría ser una poderosa herramienta para generar anticuerpos monoclonales específicos contra CCR6h y quizás contra otros GPCRs.

3. Caracterización del anticuerpo 1C6 y efecto sobre las vías de señalización de CCR6h

Aunque se ha realizado un sustancial progreso generando anticuerpos monoclonales terapéuticos candidatos a fármaco contra distintos GPCRs [164], la especificidad y selectividad requerida es un problema para aquellos receptores en que los fármacos interfieren con otros receptores [14]. Es sabido que las pequeñas moléculas son menos selectivas y, generalmente, tienen menos efectividad y potencia que los anticuerpos monoclonales [165]. El anticuerpo 1C6 obtenido es altamente específico para el receptor CCR6h, ya que se ha demostrado que no reconoce al receptor murino y los experimentos de citometría de flujo, usando células establemente transfectadas con receptores humanos de la familia de las quimioquinas (CCR1h, CCR3h, CCR4h, CCR5h, CXC1Rh, CXC2Rh, CXC3Rh y CXC4Rh), no muestran reactividad cruzada. Esta alta especificidad es una valiosa característica del anticuerpo obtenido. Estos resultados son un dato a favor de que la inmunización con células enteras y con altos niveles de expresión del GPCR diana puede ser una estrategia útil para la obtención de anticuerpos específicos dirigidos a receptores de quimioquinas.

Como muestran los resultados de citometría de flujo, con las quimeras del receptor, y del ELISA, con el amino terminal, el anticuerpo 1C6 mapea contra un epítopo localizado en el dominio amino terminal del receptor CCR6h (M1-L47). El dominio amino terminal tiene un papel crítico en el reconocimiento del ligando y en la activación de la mayoría de los GPCRs. Varios autores sugieren que el desarrollo de fármacos o anticuerpos terapéuticos contra este dominio, cuya actividad bloquee la

unión de las quimioquinas, tiene potencial como herramienta terapéutica [153], [166]. Tanto la región amino terminal como la región ECL2 de los receptores de quimioquinas han sido identificadas como los principales dominios de unión a sus ligandos. En concreto, para CCR6 se ha demostrado en estudios moleculares que el dominio amino terminal es esencial para la unión del ligando y la transducción de señales [167]. Como el anticuerpo 1C6 se une a dicho dominio se estudió su efecto sobre la señalización mediada por la unión de CCL20 a CCR6h.

La unión de CCL20 a CCR6h provoca una combinación de respuestas, incluyendo la activación de la transducción de señales mediada por la proteína G heterotrimérica y por la β -arrestina. Las arrestinas y las proteínas G tienen diferentes funciones no solapadas y juegan importantes papeles en la señalización de los GPCRs [168]. Por este motivo, la capacidad inhibitoria del anticuerpo 1C6 fue caracterizada para ambas rutas de señalización: la vía de señalización independiente de proteína G, mediante un ensayo de reclutamiento de β -arrestina, y la vía de señalización dependiente de proteína G, empleando un ensayo de flujo de calcio.

El proceso de selección de compuestos y anticuerpos es una cuestión crítica y los cribados basados en una única vía de señalización podrían conllevar la pérdida de compuestos potencialmente valiosos que actúan sobre vías diferentes a las del cribado [7]. Los agonistas o antagonistas sesgados muestran mejores eficiencias en la activación o inhibición de unas vías sobre otras; por ello, el método de cribado es sumamente importante, ya que los anticuerpos con actividad sesgada no serán identificados si el ensayo no permite medir su funcionalidad. Debido al potencial de la señalización sesgada, el descubrimiento actual de fármacos dirigidos a GPCRs no puede basarse en una única vía de señalización [138]. En nuestro caso el cribado se basó en dos vías: la de señalización por calcio y la de señalización por β -arrestina.

Los resultados generados en la evaluación del efecto del anticuerpo 1C6 sobre la señalización nos indican que el anticuerpo obtenido funciona como un potente inhibidor de la ruta de arrestina, pero que no afecta a la señalización a través de flujo de calcio. El anticuerpo 1C6 no inhibe la ruta de señalización por calcio usando concentraciones de hasta 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (133 nM), aunque sí que tiene efecto antagonista

en la vía de señalización a través de β -arrestina. El hecho observado podría estar relacionado con la sensibilidad relativa de los ensayos que se usan para medir las respectivas vías de señalización [78]. No obstante los ensayos de β -arrestina son menos sensibles, lo cual es un elemento a favor del sesgo observado en la señalización. Los ensayos de β -arrestina pueden ser útiles para la selección en GPCRs acoplados a $G_{\alpha i}$, que tradicionalmente tiene una menor ventana de ensayo en la detección de segundos mensajeros, como calcio [7].

El anticuerpo 1C6 tiene una IC_{50} de 10,23 nM en la inhibición de la vía de β -arrestina. Existen datos para inhibidores de otros GPCRs que hablan de inhibiciones en el orden de concentración de nanomolar. Se han obtenido anticuerpos antagonistas contra el receptor de la apelina (APJ) con valores de IC_{50} de entre 50 y 200 nM para ensayos de reclutamiento de arrestina [169]. La pequeña molécula dirigida hacia CCR6 desarrollada por Chemocentryx posee una IC_{50} de 24 nM bloqueando la quimiotaxis mediada por CCR6 [95]. Aplicando esta metodología se podrían lograr anticuerpos muy potentes sin requerir una mejora adicional, de lo que resulta una disminución notoria de los tiempos de obtención de fármacos.

En la investigación realizada por Dorgham et al, se obtuvo un anticuerpo monoclonal anti-CCR6 que se unía a la región amino terminal y no bloqueaba la señalización por flujo de calcio [150], como ocurre con el anticuerpo 1C6, pero no se evaluó el efecto del anticuerpo sobre la vía de señalización por arrestina por lo que no podemos hacer una comparativa con el anticuerpo 1C6. Al contrario que el anticuerpo 1C6, el anticuerpo anti-CCR6h KM4703, empleado como control en nuestros ensayos, no se une a la región amino terminal del receptor y no inhibe la señalización mediada por β -arrestina pero, sin embargo, es capaz de bloquear la vía de flujo de calcio. Analizando conjuntamente los resultados obtenidos, podríamos hipotetizar que la actividad a través del dominio amino terminal puede estar relacionada con la vía de señalización independiente de la proteína G a través de arrestina, pero no con la vía de señalización dependiente de proteína G a través de flujo de calcio.

En los ratones knockout de CCR6 o con mutaciones del receptor con pérdida de función se ha descrito que la movilización de β -arrestina no se ve afectada. Hay

variantes de receptores de CCR6 que muestran un reclutamiento de β -arrestina comparable al del receptor CCR6 original. Hay estudios que sugieren que la función de CCR6 mediada por proteína G es muy sensible a alteraciones en la secuencia, mientras que el reclutamiento de β -arrestina parece notoriamente insensible a sustituciones de aminoácidos [78]. La asociación de receptores con la β -arrestina provee un mecanismo de señalización independiente de las proteínas G.

El sesgo en la señalización de un GPCR es un hecho documentado para los receptores de la angiotensina, los receptores β -adrenérgicos o algunos receptores de quimioquinas [33], [139], [170]. El losartan, un fármaco antagonista del receptor de la angiotensina II tipo 1 (AT_1R), es un antagonista sesgado de la señalización por proteína G, sin afectar la señalización dependiente de β -arrestina [139]. Se ha observado que el carvedilol, un bloqueador de receptores β -adrenérgicos ampliamente utilizado, si bien actúa como un antagonista para la señalización mediada por la proteína G, para la señalización mediada por β -arrestina, funciona como un agonista [33]. Los receptores de quimioquinas CCR2, CCR5, CCR7 y CCR10 muestran un sesgo significativo en la activación por sus ligandos CCL8, CCL5, CCL19 y CCL28, respectivamente, en las vías de señalización por la proteína G o a través del reclutamiento de β -arrestina [170].

Además de los compuestos con señalización sesgada, los moduladores alostéricos pertenecen a otra clase importante de compuestos en el descubrimiento de fármacos dirigidos a GPCRs. Los moduladores alostéricos pueden mostrar propiedades farmacológicas no compartidas por los ligandos ortostéricos. Por ejemplo, pueden potenciar o reducir la potencia y/o eficacia de los ligandos ortostéricos, sin actividad intrínseca propia. Pueden lograr esto mediante la modulación alostérica de la afinidad y/o eficacia funcional de otro ligando. El desarrollo de moduladores alostéricos para receptores de quimioquinas representa un profundo avance con fármacos comercializados, como el modulador de CCR5, maraviroc, o el de CXCR4, plerixafor, o candidatos clínicos, como reparixina que es un modulador de CXCR1 [171]. Maraviroc es un fármaco alostérico comercializado para el VIH que funciona estabilizando el CCR5 en una conformación inactiva que bloquea la interacción CCR5-gp120 por unión alostérica al CCR5 [171]. [138].

Actualmente están siendo investigados en estudios preclínicos, así como, en ensayos clínicos varios agentes prometedores con modulación alostérica o con señalización sesgada a través de β -arrestina o proteína G [126]. De esta manera, los moduladores alostéricos sesgados ofrecen la posibilidad de diseñar, desarrollar y producir terapias farmacológicas más seguras y dirigidas [33], [171]. El anticuerpo 1C6 disminuye notablemente la señalización por β -arrestina, pero deja intacta la señalización por proteína G. Estos resultados podrían indicar un sesgo en la actividad de nuestro anticuerpo en función de la vía de señalización.

La mayor investigación en la biología de la señalización sesgada ha permitido que se lleven a cabo cambios importantes en la forma en que se desarrollan y analizan los agentes farmacológicos [33]. La activación preferente de unas vías de señalización de los GPCRs sobre otras puede tener efectos opuestos y esta señalización sesgada se puede aplicar en el desarrollo de nuevas terapias [172], [173].

Debido a la compleja señalización de los GPCRs y a los diversos mecanismos que pueden desencadenar los diferentes tipos de respuesta serían necesarios estudios adicionales que pudiesen profundizar en el mecanismo molecular por el que el anticuerpo 1C6 ejerce su acción.

En relación a los resultados obtenidos, el anticuerpo anti-CCR6h 1C6 podría ser una herramienta farmacológica útil para dilucidar los efectos biológicos de CCL20. Dicho anticuerpo podría emplearse en modelos animales y ser útil en estudios *in vitro* e *in vivo* de enfermedades mediadas por el CCR6h. Además, el anticuerpo 1C6 tiene un gran potencial terapéutico para la neutralización del eje CCR6-CCL20 y podría utilizarse como tratamiento de una gran cantidad de enfermedades, en las que dicho eje está implicado, solo o en combinación con otras terapias.

4. Relevancia de la actividad del anticuerpo 1C6 en células Th17

Se ha descrito que el receptor CCR6h está expresado en la superficie de las células Th17 y que estas células secretan CCL20 promoviendo el reclutamiento de otras células Th17 a los sitios de inflamación [77]. Por tanto, el bloqueo de la entrada de células Th17 en un tejido, por ejemplo inhibiendo un receptor de quimioquinas, podría

ser una manera efectiva de reducir el daño inflamatorio. La regulación y la expresión estable de CCR6h son características fundamentales de la diferenciación de las células Th17 y plantean la posibilidad de que la neutralización de CCR6 podría ser beneficiosa en el tratamiento del daño tisular mediado por las células Th17 [109]. Hay datos que sugieren que CCL20 y CCR6 contribuyen a un bucle de retroalimentación positiva que involucra a las células T, células dendríticas, neutrófilos y células epiteliales y que amplifica la respuesta inflamatoria producida por las células Th17 [109].

Los ensayos de quimiotaxis realizados muestran que el anticuerpo 1C6 bloquea la migración de células que expresan CCR6h hacia CCL20 y, por tanto, como las células Th17 expresan CCR6h en su superficie el anticuerpo podría actuar inhibiendo el reclutamiento de estas células a los sitios de inflamación. Basándonos en esta inhibición de la quimiotaxis, el anticuerpo 1C6 sería un buen candidato para suprimir el reclutamiento de las células Th17 a los tejidos inflamados. Son necesarias investigaciones adicionales, utilizando linfocitos Th17 para confirmar esta hipótesis.

En la investigación realizada se ha estudiado el efecto del anticuerpo 1C6 en la producción de citoquinas por las células Th17 y se ha demostrado que dicho anticuerpo no afecta a la producción de CCL20; sin embargo, sí induce la disminución de la producción de IL-17A. La citoquina proinflamatoria IL-17A juega un papel esencial en la respuesta inflamatoria y se han asociado elevados niveles de esta citoquina con el desarrollo de enfermedades inmuno-inflamatorias [174]. Al comparar la acción del anticuerpo 1C6 con la del anticuerpo control KM4703 se observa que, aunque ambos anticuerpos reducen la expresión de IL-17A, la reducción es mayor con el anticuerpo 1C6 que con el KM4703, llegando incluso a ser abolida con el anticuerpo 1C6.

La diferencia en la inhibición de la expresión de IL-17 producida por ambos anticuerpos podría relacionarse con los resultados obtenidos de inhibición de los anticuerpos sobre las diferentes vías de señalización. Observamos que el bloqueo de la señalización que producen los anticuerpos 1C6 y KM4703 ocurre en rutas diferentes. Mientras que el anticuerpo 1C6 inhibe la vía mediada por la arrestina independiente de proteína G, el anticuerpo KM4703 inhibe la ruta de flujo de calcio dependiente de la proteína G. Estos resultados podrían indicar que la inhibición de la ruta mediada por

arrestina tiene un efecto mayor sobre la reducción de la expresión de IL-17, que la inhibición de la vía dependiente de la proteína G.

No hay una demostración clara de cómo la activación de CCR6 puede inducir la expresión de IL-17, o su inhibición reducirla. Sin embargo, además de nuestros resultados que sugieren una relación entre la actividad de CCR6 y la producción de IL-17, existen otras investigaciones que podrían apoyar dicha relación. Se sabe que hay una fuerte conexión entre la respuesta Th17 y el sistema de quimioquinas, habiéndose demostrado la asociación entre la capacidad de producir IL-17 y la expresión de CCR6 por células T humanas [109]. Hay estudios que sugieren que el bloqueo de CCR6 podría ser beneficioso en el tratamiento del daño tisular mediado por células T que producen IL-17 [109]. Otras investigaciones demuestran que el silenciamiento de β -arrestina en las células T $CD4^+CCR6^+$ da como resultado la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias. Se ha descrito que la expresión de citoquinas asociadas a Th17, como la IL-17, se ve reducida por la disminución de los niveles de β -arrestina [175]. La señalización por β -arrestina es parte de la señalización de CCR6 que se ve afectada por la actividad del anticuerpo 1C6 y, por tanto, se podría pensar que la disminución de la expresión de IL-17 observada puede estar relacionada con la inhibición del anticuerpo 1C6 en el reclutamiento de β -arrestina. Aunque estos hechos podrían sugerir que existe una conexión molecular entre la expresión de CCR6 y la producción de IL-17, son necesarios más estudios para demostrar la existencia de la vía molecular que los conecta.

Actualmente se desconoce el mecanismo molecular que vincula la expresión de CCR6 y la producción de IL-17. Todo parece indicar que puede haber una compleja red de retroalimentación entre la expresión de CCR6 y la producción de IL-17 y viceversa, en la que parece estar presente la señalización a través de arrestina. Se ha demostrado que la activación de las rutas ERK y p38 son críticas para la expresión de CCR6 y la migración celular inducidas por IL-17 [49]. Dichas rutas están relacionadas con la señalización a través del reclutamiento de arrestina [150], [176]. Otro estudio revela que la β -arrestina promueve la activación de STAT3, necesaria para la diferenciación celular de los linfocitos Th17 a través del andamiaje producido por la interacción de la quinasa Janus 1 (JAK1) y STAT3 [175]. Parece existir una compleja red que conecta la

señalización mediada por arrestina, la expresión de CCR6 y la producción de IL-17. Esta red debe ser investigada para poder esclarecer los mecanismos moleculares de conexión implicados en ella ya que tiene un fuerte impacto en aplicaciones terapéuticas.

Actualmente el tratamiento con anticuerpos anti-IL17 constituye una opción terapéutica nueva y prometedora para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias. Un ejemplo de ello es la aprobación, para el tratamiento de la psoriasis, de tres anticuerpos monoclonales anti-IL17: secukinumab, brodalumab y ixekizumab [177]. Sin embargo, la inhibición de CCR6 puede ser una alternativa a estos inhibidores más factible y eficaz, desde una perspectiva de desarrollo de fármacos, que la inhibición de las muchas isoformas de IL-17 [151]. Por tanto, el anticuerpo 1C6 podría ser una buena alternativa a los tratamientos con anticuerpos anti-IL17 inhibidores contra enfermedades inflamatorias.

En vista de las premisas anteriores y de los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos decir que el anticuerpo 1C6 podría ser un buen candidato para el tratamiento de pacientes con enfermedades relacionadas con el receptor CCR6h. Además, existe un vacío en el mercado ya que en la actualidad no hay fármacos aprobados dirigidos a CCR6h, por lo que, aunque son necesarias futuras investigaciones, el anticuerpo 1C6 representa una gran oportunidad terapéutica.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

A tenor de los objetivos inicialmente planteados y de los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. Se ha desarrollado una estrategia basada en la inmunización con células enteras que sobre-expresan el antígeno de interés en su superficie. Mediante dicho método de inmunización se ha obtenido un anticuerpo monoclonal dirigido hacia el receptor CCR6h, denominado 1C6. Este es un enfoque efectivo y eficiente para generar anticuerpos monoclonales contra el receptor CCR6h y un planteamiento similar podría aplicarse a otros GPCRs diana e impulsar el descubrimiento de nuevos anticuerpos específicos y selectivos.
2. En cuanto a la caracterización del anticuerpo obtenido:
 - 2.1. El anticuerpo 1C6 es específico del receptor CCR6h y no se une al receptor CCR6 murino, ni a otros receptores de la familia de las quimioquinas.
 - 2.2. El anticuerpo obtenido se une a un epítipo localizado en dominio amino terminal del receptor CCR6h.
 - 2.3. El anticuerpo 1C6 muestra actividad antagonista sesgada, ya que inhibe la señalización del receptor a través de la ruta mediada por arrestina, pero no a través de la vía dependiente de proteína G mediada por calcio.
3. Respecto a los efectos funcionales del anticuerpo sobre células CCR6⁺:
 - 3.1. El anticuerpo 1C6 reduce la quimiotaxis de células que expresan CCR6h.
 - 3.2. El anticuerpo 1C6 disminuye la expresión de IL-17A en células Th17.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. Purves *et al.*, *Receptor Types*. Sinauer Associates, 2001.
- [2] D. K. Vassilatis *et al.*, “The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 8, pp. 4903–4908, Apr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0230374100.
- [3] R. Fredriksson, M. C. Lagerström, L. G. Lundin, and H. B. Schiöth, “The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints,” *Molecular Pharmacology*, vol. 63, no. 6, pp. 1256–1272, Jun. 2003, doi: 10.1124/mol.63.6.1256.
- [4] R. P. Millar and C. L. Newton, “The year in G protein-coupled receptor research,” *Molecular Endocrinology*, vol. 24, no. 1. pp. 261–274, Jan. 2010. doi: 10.1210/me.2009-0473.
- [5] J. Bockaert and J. P. Pin, “Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: An evolutionary success,” *EMBO Journal*, vol. 18, no. 7. pp. 1723–1729, Apr. 01, 1999. doi: 10.1093/emboj/18.7.1723.
- [6] A. J. Y. Jones, F. Gabriel, A. Tandale, and D. Nietlispach, “Structure and dynamics of GPCRs in lipid membranes: physical principles and experimental approaches,” *Molecules*, vol. 25, no. 20. Oct. 01, 2020. doi: 10.3390/molecules25204729.
- [7] R. Zhang and X. Xie, “Tools for GPCR drug discovery,” *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 33, no. 3. pp. 372–384, Mar. 2012. doi: 10.1038/aps.2011.173.
- [8] L. F. Kolakowski, “GCRDb: A G-protein-coupled receptor database,” *Receptors and Channels*, vol. 2, no. 1. pp. 1–7, 1994.
- [9] C. S. Odoemelam *et al.*, “G-Protein coupled receptors: Structure and function in drug discovery,” *RSC Advances*, vol. 10, no. 60. pp. 36337–36348, Oct. 01, 2020. doi: 10.1039/d0ra08003a.
- [10] D. Latek, A. Modzelewska, B. Trzaskowski, K. Palczewski, and S. Filipek, “G

- protein-coupled receptors-recent advances,” *Acta Biochimica Polonica*, vol. 59, no. 4. pp. 515–529, 2012. doi: 10.18388/abp.2012_2086.
- [11] E. M. De Francesco, F. Sotgia, R. B. Clarke, M. P. Lisanti, and M. Maggiolini, “G protein-coupled receptors at the crossroad between physiologic and pathologic angiogenesis: Old paradigms and emerging concepts,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 12. pp. 1–27, Dec. 14, 2017. doi: 10.3390/ijms18122713.
- [12] C. Munk *et al.*, “GPCRdb: the G protein-coupled receptor database – an introduction,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 173, no. 14. pp. 2195–2207, 2016. doi: 10.1111/bph.13509.
- [13] G. M. Hu, T. L. Mai, and C. M. Chen, “Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-15707-9.
- [14] C. J. Hutchings, M. Koglin, and F. H. Marshall, “Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors,” *mAbs*, vol. 2, no. 6. pp. 594–606, Nov. 2010. doi: 10.4161/mabs.2.6.13420.
- [15] X. Lv *et al.*, “In vitro expression and analysis of the 826 human G protein-coupled receptors,” *Protein and Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 325–337, May 2016, doi: 10.1007/s13238-016-0263-8.
- [16] K. Palczewski *et al.*, “Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor,” *Science*, vol. 289, no. 5480, pp. 739–745, Aug. 2000, doi: 10.1126/science.289.5480.739.
- [17] V. Katritch, V. Cherezov, and R. C. Stevens, “Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 33, no. 1. pp. 17–27, Jan. 2012. doi: 10.1016/j.tips.2011.09.003.
- [18] M. Wheatley *et al.*, “Lifting the lid on GPCRs: The role of extracellular loops,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 165, no. 6. pp. 1688–1703, 2012. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01629.x.

- [19] H. B. Schiöth and M. C. Lagerström, "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 7, no. 4, pp. 339–357, 2008, doi: 10.1038/nrd2518.
- [20] N. R. Latorraca, A. J. Venkatakrisnan, and R. O. Dror, "GPCR dynamics: Structures in motion," *Chemical Reviews*, vol. 117, no. 1, pp. 139–155, Jan. 11, 2017. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00177.
- [21] D. Wacker, R. C. Stevens, and B. L. Roth, "How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology," *Cell*, vol. 170, no. 3, pp. 414–427, Jul. 27, 2017. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.009.
- [22] L. K. Yang, Z. S. Hou, and Y. X. Tao, "Biased signaling in naturally occurring mutations of G protein-coupled receptors associated with diverse human diseases," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, vol. 1867, no. 1, p. 165973, Jan. 01, 2021. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165973.
- [23] A. L. Nelson, E. Dhimolea, and J. M. Reichert, "Development trends for human monoclonal antibody therapeutics," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 10, pp. 767–774, Oct. 2010. doi: 10.1038/nrd3229.
- [24] P. B. Wedegaertner, P. T. Wilson, and H. R. Bourne, "Lipid modifications of trimeric G proteins," *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 2, pp. 503–506, 1995, doi: 10.1074/JBC.270.2.503.
- [25] S. R. Neves, P. T. Ram, and R. Iyengar, "G protein pathways," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 296, no. 5573, pp. 1636–1639, May 2002, doi: 10.1126/SCIENCE.1071550.
- [26] M. Strathmann and M. I. Simon, "G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 23, p. 9113, 1990, doi: 10.1073/PNAS.87.23.9113.
- [27] D. F. Legler and M. Thelen, "New insights in chemokine signaling," *F1000Research*, vol. 7, 2018. doi: 10.12688/f1000research.13130.1.

- [28] X. Tian, D. S. Kang, and J. L. Benovic, "β-Arrestins and G protein-coupled receptor trafficking," *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 219. pp. 173–186, 2014. doi: 10.1007/978-3-642-41199-1_9.
- [29] V. V. Gurevich and E. V. Gurevich, "GPCR signaling regulation: The role of GRKs and arrestins," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 10, no. FEB, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00125.
- [30] W. Wang, Y. Qiao, and Z. Li, "New Insights into Modes of GPCR Activation," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 39, no. 4. pp. 367–386, Apr. 01, 2018. doi: 10.1016/j.tips.2018.01.001.
- [31] Z. Bologna, J. P. Teoh, A. S. Bayoumi, Y. Tang, and I. M. Kim, "Biased g protein-coupled receptor signaling: New player in modulating physiology and pathology," *Biomolecules and Therapeutics*, vol. 25, no. 1, pp. 12–25, Jan. 2017, doi: 10.4062/biomolther.2016.165.
- [32] J. S. Smith, R. J. Lefkowitz, and S. Rajagopal, "Biased signalling: From simple switches to allosteric microprocessors," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 17, no. 4. pp. 243–260, Mar. 28, 2018. doi: 10.1038/nrd.2017.229.
- [33] J. W. Wisler, H. A. Rockman, and R. J. Lefkowitz, "Biased G protein-coupled receptor signaling: Changing the paradigm of drug discovery," *Circulation*, vol. 137, no. 22, pp. 2315–2317, 2018, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028194.
- [34] M. J. Lohse, "Dimerization in GPCR mobility and signaling," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 10, no. 1. pp. 53–58, Nov. 10, 2010. doi: 10.1016/j.coph.2009.10.007.
- [35] K. A. Jacobson, "New paradigms in GPCR drug discovery," *Biochemical Pharmacology*, vol. 98, no. 4. pp. 541–555, Dec. 15, 2015. doi: 10.1016/j.bcp.2015.08.085.
- [36] S. Terrillon and M. Bouvier, "Roles of G-protein-coupled receptor dimerization," *EMBO Reports*, vol. 5, no. 1, pp. 30–34, Jan. 2004, doi: 10.1038/sj.embor.7400052.

- [37] M. L. López-Rodríguez, B. Benhamú, and H. Vázquez-Villa, "Allosteric modulators targeting GPCRs," *GPCRs: Structure, Function, and Drug Discovery*, pp. 195–241, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-816228-6.00011-8.
- [38] E. A. Wold and J. Zhou, "GPCR Allosteric Modulators: Mechanistic Advantages and Therapeutic Applications," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 23, pp. 2002–2006, Jan. 2019, doi: 10.2174/1568026619999190101151837.
- [39] D. J. Wasilko *et al.*, "Structural basis for chemokine receptor CCR6 activation by the endogenous protein ligand CCL20," *Nature Communications*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16820-6.
- [40] S. Zhao, B. Wu, and R. C. Stevens, "Advancing Chemokine GPCR Structure Based Drug Discovery," *Structure*, vol. 27, no. 3, pp. 405–408, Mar. 05, 2019. doi: 10.1016/j.str.2019.02.004.
- [41] C. E. Hughes and R. J. B. Nibbs, "A guide to chemokines and their receptors," *FEBS Journal*, vol. 285, no. 16, pp. 2944–2971, Aug. 01, 2018. doi: 10.1111/febs.14466.
- [42] N. Reyes, I. Benedetti, J. Rebollo, O. Correa, and J. Geliebter, "Atypical chemokine receptor CCRL2 is overexpressed in prostate cancer cells," *Journal of Biomedical Research*, vol. 33, no. 1, p. 17, 2019, doi: 10.7555/JBR.32.20170057.
- [43] F. Bachelierie *et al.*, "Chemokine receptors (version 2020.5) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database," *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, vol. 2020, no. 5, Nov. 2020, doi: 10.2218/GTOPDB/F14/2020.5.
- [44] A. E. Vilgelm and A. Richmond, "Chemokines Modulate Immune Surveillance in Tumorigenesis, Metastasis, and Response to Immunotherapy," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. FEB, p. 333, 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.00333.
- [45] F. Bachelierie *et al.*, "International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors," *Pharmacological Reviews*, vol. 66, no. 1, p. 1, Jan. 2014, doi: 10.1124/PR.113.007724.

- [46] R. Ranasinghe and R. Eri, "Modulation of the CCR6-CCl20 axis: A potential therapeutic target in inflammation and cancer," *Medicina (Lithuania)*, vol. 54, no. 5. 2018. doi: 10.3390/medicina54050088.
- [47] G. E. White, A. J. Iqbal, and D. R. Greaves, "CC chemokine receptors and chronic inflammation-therapeutic opportunities and pharmacological challenges," *Pharmacological Reviews*, vol. 65, no. 1. pp. 47–89, 2013. doi: 10.1124/pr.111.005074.
- [48] T. Zhu, L. Fang, and X. Xie, "Development of a universal high-throughput calcium assay for G-protein-coupled receptors with promiscuous G-protein G α 15/16," *Acta Pharmacologica Sinica* 2008 29:4, vol. 29, no. 4, pp. 507–516, Apr. 2008, doi: 10.1111/j.1745-7254.2008.00775.x.
- [49] C. C. Chin *et al.*, "Interleukin-17 induces CC chemokine receptor 6 expression and cell migration in colorectal cancer cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 230, no. 7, pp. 1430–1437, Jul. 2015, doi: 10.1002/jcp.24796.
- [50] C. A. Power, "Knock out models to dissect chemokine receptor function in vivo," *Journal of Immunological Methods*, vol. 273, no. 1–2, pp. 73–82, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0022-1759(02)00419-2.
- [51] S. Balasubramanian, Y. Xia, E. Freinkman, and M. Gerstein, "Sequence variation in G-protein-coupled receptors: analysis of single nucleotide polymorphisms," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 5, p. 1710, 2005, doi: 10.1093/NAR/GKI311.
- [52] R. Ranasinghe and R. Eri, "Pleiotropic Immune Functions of Chemokine Receptor 6 in Health and Disease," *Medicines*, vol. 5, no. 3, p. 69, Jul. 2018, doi: 10.3390/medicines5030069.
- [53] R. Ranasinghe and R. Eri, "CCR6–CCL20-Mediated Immunologic Pathways in Inflammatory Bowel Disease," *Gastrointestinal Disorders*, vol. 1, no. 1, pp. 15–29, Aug. 2018, doi: 10.3390/gidisord1010003.
- [54] M. Y. Lu, S. S. Lu, S. L. Chang, and F. Liao, "The phosphorylation of CCR6 on distinct Ser/Thr residues in the carboxyl terminus differentially regulates

- biological function,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. MAR, p. 415, Mar. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00415.
- [55] T. Ito, W. F. Carson, K. A. Cavassani, J. M. Connett, and S. L. Kunkel, “CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut,” *Experimental Cell Research*, vol. 317, no. 5, pp. 613–619, 2011, doi: 10.1016/j.yexcr.2010.12.018.
- [56] F. Liao, R. L. Rabin, C. S. Smith, G. Sharma, T. B. Nutman, and J. M. Farber, “CC-Chemokine Receptor 6 Is Expressed on Diverse Memory Subsets of T Cells and Determines Responsiveness to Macrophage Inflammatory Protein 3 α ,” *The Journal of Immunology*, vol. 162, no. 1, 1999.
- [57] K. Hirota *et al.*, “Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 12, pp. 2803–2812, Nov. 2007, doi: 10.1084/jem.20071397.
- [58] M. Kleinewietfeld, F. Puentes, G. Borsellino, L. Battistini, O. Rötzschke, and K. Falk, “CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25+CD4+ T-cell subset,” *Blood*, vol. 105, no. 7, pp. 2877–2886, Apr. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-07-2505.
- [59] T. Kucharzik, J. T. Hudson Iii, R. L. Waikel, W. David Martin, and I. R. Williams, “CCR6 expression distinguishes mouse myeloid and lymphoid dendritic cell subsets: demonstration using a CCR6 EGFP knock-in mouse,” *European Journal of Immunology*, vol. 32, no. 1, pp. 104–112, 2001, doi: 10.1002/1521-4141.
- [60] E. P. Bowman *et al.*, “Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, no. 8, pp. 1303–1317, Apr. 2000, doi: 10.1084/jem.191.8.1303.
- [61] R. Krzysiek *et al.*, “Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 in human B cells,” *Blood*, vol. 96, no. 7, pp. 2338–2345, Oct. 2000, doi: 10.1182/blood.v96.7.2338.h8002338_2338_2345.

- [62] A. Iwasaki and B. L. Kelsall, "Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, no. 8, pp. 1381–1393, Apr. 2000, doi: 10.1084/jem.191.8.1381.
- [63] C. A. Power *et al.*, "Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3 α from lung dendritic cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 186, no. 6, pp. 825–835, Sep. 1997, doi: 10.1084/jem.186.6.825.
- [64] D. R. Greaves *et al.*, "CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3 α and is highly expressed in human dendritic cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 186, no. 6, pp. 837–844, Sep. 1997, doi: 10.1084/jem.186.6.837.
- [65] D. Yang, O. M. Z. Howard, Q. Chen, and J. J. Oppenheim, "Cutting Edge: Immature Dendritic Cells Generated from Monocytes in the Presence of TGF- β 1 Express Functional C-C Chemokine Receptor 6," *The Journal of Immunology*, vol. 163, no. 4, 1999.
- [66] A. S. Charbonnier, N. Kohrgruber, E. Kriehuber, G. Stingl, A. Rot, and D. Maurer, "Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 190, no. 12, pp. 1755–1767, Dec. 1999, doi: 10.1084/jem.190.12.1755.
- [67] H. Wen, C. M. Hogaboam, N. W. Lukacs, D. N. Cook, S. A. Lira, and S. L. Kunkel, "The chemokine receptor CCR6 is an important component of the innate immune response," *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 9, pp. 2487–2498, Sep. 2007, doi: 10.1002/eji.200737370.
- [68] C. H. Kim, B. Johnston, and E. C. Butcher, "Trafficking machinery of NKT cells: Shared and differential chemokine receptor expression among V α 24+V β 11+ NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity," *Blood*, vol. 100, no. 1, pp. 11–16, Jul. 2002, doi: 10.1182/blood-2001-12-0196.
- [69] Y. Imaizumi *et al.*, "Human T cell leukemia virus type-I Tax activates human

- macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 gene transcription via the NF- κ B pathway," *International Immunology*, vol. 14, no. 2, pp. 147–155, 2002, doi: 10.1093/intimm/14.2.147.
- [70] J. Kleeff *et al.*, "Detection and localization of Mip-3 α /LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer.," *International Journal of Cancer*, vol. 81, pp. 650–657, 1999, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19990517)81:4<650::aid-ijc23>3.0.co;2-#.
- [71] M. Akhtar *et al.*, "Identification of most damaging nsSNPs in human CCR6 gene: In silico analyses," *International journal of immunogenetics*, vol. 46, no. 6, pp. 459–471, Dec. 2019, doi: 10.1111/IJI.12449.
- [72] M. Baba *et al.*, "Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte- directed CC chemokine LARC," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 23, pp. 14893–14898, Jun. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.23.14893.
- [73] I. G. Luzina and S. P. Atamas, "CCR6 is not necessary for functional effects of human CCL18 in a mouse model," *Fibrogenesis and Tissue Repair*, vol. 5, no. 1. p. 2, Jan. 18, 2012. doi: 10.1186/1755-1536-5-2.
- [74] S. Kadomoto, K. Izumi, and A. Mizokami, "The CCL20-CCR6 axis in cancer progression," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 15. pp. 1–18, Aug. 01, 2020. doi: 10.3390/ijms21155186.
- [75] I. Comerford *et al.*, "An immune paradox: How can the same chemokine axis regulate both immune tolerance and activation?: CCR6/CCL20: A chemokine axis balancing immunological tolerance and inflammation in autoimmune disease," *BioEssays*, vol. 32, no. 12. pp. 1067–1076, Dec. 2010. doi: 10.1002/bies.201000063.
- [76] A. Y. S. Lee and H. Körner, "The CCR6-CCL20 axis in humoral immunity and T-B cell immunobiology," *Immunobiology*, vol. 224, no. 3. pp. 449–454, May 01, 2019. doi: 10.1016/j.imbio.2019.01.005.
- [77] T. Yamazaki *et al.*, "CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and

- Regulatory T Cells," *The Journal of Immunology*, vol. 181, no. 12, pp. 8391–8401, Dec. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.12.8391.
- [78] B. Julian, K. Gao, B. N. Harwood, M. Beinborn, and A. S. Kopin, "Mutation-induced functional alterations of CCR6," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 360, no. 1, pp. 106–116, Jan. 2017, doi: 10.1124/jpet.116.237669.
- [79] G. Zissel *et al.*, "CCR6 is a receptor for CCL18 expressed on human lung fibroblasts from IPF lungs," *European Respiratory Journal*, vol. 38, no. Suppl 55, 2011.
- [80] M. Facco *et al.*, "Expression and role of CCR6/CCL20 chemokine axis in pulmonary sarcoidosis," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 82, no. 4, pp. 946–955, Oct. 2007, doi: 10.1189/jlb.0307133.
- [81] J. Dellacasagrande *et al.*, "Liver metastasis of cancer facilitated by chemokine receptor CCR6," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 57, no. 6, pp. 534–544, Jun. 2003, doi: 10.1046/j.1365-3083.2003.01263.x.
- [82] L. Hammerich *et al.*, "Chemokine receptor CCR6-dependent accumulation of $\gamma\delta$ T cells in injured liver restricts hepatic inflammation and fibrosis," *Hepatology*, vol. 59, no. 2, pp. 630–642, Feb. 2014, doi: 10.1002/hep.26697.
- [83] J. E. Turner *et al.*, "CCR6 recruits regulatory T cells and Th17 cells to the kidney in glomerulonephritis," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, no. 6, pp. 974–985, 2010, doi: 10.1681/ASN.2009070741.
- [84] D. Welsh-Bacic *et al.*, "Expression of the chemokine receptor CCR6 in human renal inflammation," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 26, no. 4, pp. 1211–1220, Apr. 2011, doi: 10.1093/ndt/gfq560.
- [85] M. A. Alikhan, M. Huynh, A. R. Kitching, and J. D. Ooi, "Regulatory T cells in renal disease," *Clinical and Translational Immunology*, vol. 7, no. 1, 2018. doi: 10.1002/cti2.1004.
- [86] A. C. K. Chung and H. Y. Lan, "Chemokines in renal injury," *Journal of the*

- American Society of Nephrology*, vol. 22, no. 5. pp. 802–809, May 2011. doi: 10.1681/ASN.2010050510.
- [87] R. M. Ransohoff and F. Trettel, “Editorial research topic ‘Chemokines and chemokine receptors in brain homeostasis,’” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 9, no. APR. p. 132, Apr. 08, 2015. doi: 10.3389/fncel.2015.00132.
- [88] R. Robert *et al.*, “Essential role for CCR6 in certain inflammatory diseases demonstrated using specific antagonist and knockin mice,” *JCI insight*, vol. 2, no. 15, Aug. 2017, doi: 10.1172/jci.insight.94821.
- [89] P. Arunachalam *et al.*, “CCR6 (CC Chemokine Receptor 6) Is Essential for the Migration of Detrimental Natural Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells in Stroke,” *Stroke*, vol. 48, no. 7, pp. 1957–1965, Jul. 2017, doi: 10.1161/STROKEAHA.117.016753.
- [90] T. H. Dohlman *et al.*, “The CCR6/CCL20 axis mediates Th17 cell migration to the ocular surface in dry eye disease,” *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 54, no. 6, pp. 4081–4091, 2013, doi: 10.1167/iovs.12-11216.
- [91] M. N. Hedrick, A. S. Lonsdorf, S. T. Hwang, and J. M. Farber, “CCR6 as a possible therapeutic target in psoriasis,” *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 14, no. 9. pp. 911–922, Sep. 2010. doi: 10.1517/14728222.2010.504716.
- [92] S. Hwang, “Function and Targeting of CCR6/CCL20 in Autoimmune Psoriasiform Skin Disease.” <https://grantome.com/grant/NIH/R01-AR063091-01A1>
- [93] M. Bonelli *et al.*, “A2.14 CCR6 expression drives arthritis in a T cell dependent manner,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 75, no. Suppl 1, p. A20.3-A21, Feb. 2016, doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209124.49.
- [94] M. Bonelli *et al.*, “02.06 Ccr6 modulates severity of arthritis in T cell dependent manner,” in *Annals of the Rheumatic Diseases*, Mar. 2017, vol. 76, no. Suppl 1, p. A10.2-A10. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-211050.6.
- [95] “Inhibition Of Chemokine Receptors CCR1 and CCR6 As Promising Therapies For Autoimmune Diseases Such As Rheumatoid Arthritis and Psoriasis - ACR Meeting

- Abstracts,” 2013. <https://acrabstracts.org/abstract/inhibition-of-chemokine-receptors-ccr1-and-ccr6-as-promising-therapies-for-autoimmune-diseases-such-as-rheumatoid-arthritis-and-psoriasis/>
- [96] A. Y. S. Lee, R. Eri, A. B. Lyons, M. C. Grimm, and H. Korner, “CC chemokine ligand 20 and its cognate receptor CCR6 in mucosal T cell immunology and inflammatory bowel disease: Odd couple or axis of evil?,” *Frontiers in Immunology*, vol. 4, no. JUL. p. 194, Jul. 15, 2013. doi: 10.3389/fimmu.2013.00194.
- [97] S. H. Lee, J. eun Kwon, and M. La Cho, “Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease,” *Intestinal Research*, vol. 16, no. 1. pp. 26–42, 2018. doi: 10.5217/ir.2018.16.1.26.
- [98] M. Fakhoury, R. Negrulj, A. Mooranian, and H. Al-Salami, “Inflammatory bowel disease: Clinical aspects and treatments,” *Journal of Inflammation Research*, vol. 7, no. 1. pp. 113–120, Jun. 23, 2014. doi: 10.2147/JIR.S65979.
- [99] C. Pedros, F. Duguet, A. Saoudi, and M. Chabod, “Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases,” *World Journal of Gastroenterology*, vol. 22, no. 3. pp. 974–995, Jan. 21, 2016. doi: 10.3748/wjg.v22.i3.974.
- [100] J. Gálvez, “Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD,” *ISRN Inflammation*, vol. 2014, pp. 1–14, Mar. 2014, doi: 10.1155/2014/928461.
- [101] S. Dhaiban, M. Al-Ani, N. M. Elemam, and A. A. Maghazachi, “Targeting chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis,” *Journal of Inflammation Research*, vol. 13, pp. 619–633, Sep. 2020, doi: 10.2147/JIR.S270872.
- [102] “Neural Activation Triggers CCL20 Expression & Promotes T Cell Entry into the Spinal Cord in a Mouse Model of Multiple Sclerosis: R&D Systems.” <https://www.rndsystems.com/resources/articles/neural-activation-triggers-ccl20-expression-promotes-t-cell-entry-spinal-cord-mouse-model>

- [103] A. Liston *et al.*, "Inhibition of CCR6 Function Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Effects on the Priming Phase of the Immune Response," *The Journal of Immunology*, vol. 182, no. 5, pp. 3121–3130, Mar. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0713169.
- [104] A. Elhofy, R. W. DePaolo, S. A. Lira, N. W. Lukacs, and W. J. Karpus, "Mice deficient for CCR6 fail to control chronic experimental autoimmune encephalomyelitis," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 213, no. 1–2, pp. 91–99, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.05.011.
- [105] R. E. Kohler, A. C. Caon, D. O. Willenborg, I. Clark-Lewis, and S. R. McColl, "A Role for Macrophage Inflammatory Protein-3 α /CC Chemokine Ligand 20 in Immune Priming During T Cell-Mediated Inflammation of the Central Nervous System," *The Journal of Immunology*, vol. 170, no. 12, pp. 6298–6306, Jun. 2003, doi: 10.4049/jimmunol.170.12.6298.
- [106] M. Corvaisier *et al.*, "IL-26 Is Overexpressed in Rheumatoid Arthritis and Induces Proinflammatory Cytokine Production and Th17 Cell Generation," *PLoS Biology*, vol. 10, no. 9, Sep. 2012, doi: 10.1371/journal.pbio.1001395.
- [107] K. Furue, T. Ito, G. Tsuji, T. Nakahara, and M. Furue, "The CCL20 and CCR6 axis in psoriasis," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 91, no. 3, Mar. 01, 2020. doi: 10.1111/sji.12846.
- [108] Z. Shi *et al.*, "Targeting the CCR6/CCL20 Axis in Enthesal and Cutaneous Inflammation," *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, vol. 73, no. 12, pp. 2271–2281, Dec. 2021, doi: 10.1002/ART.41882.
- [109] S. P. Singh, H. H. Zhang, J. F. Foley, M. N. Hedrick, and J. M. Farber, "Human T Cells That Are Able to Produce IL-17 Express the Chemokine Receptor CCR6," *The Journal of Immunology*, vol. 180, no. 1, pp. 214–221, Jan. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.1.214.
- [110] J. J. Campbell *et al.*, "IL-17–Secreting $\gamma\delta$ T Cells Are Completely Dependent upon CCR6 for Homing to Inflamed Skin," *The Journal of Immunology*, vol. 199, no. 9, pp. 3129–3136, Nov. 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1700826.

- [111] G. Bouma *et al.*, "CCL20 neutralization by a monoclonal antibody in healthy subjects selectively inhibits recruitment of CCR6 + cells in an experimental suction blister," *British journal of clinical pharmacology*, vol. 83, no. 9, pp. 1976–1990, 2017, doi: 10.1111/BCP.13286.
- [112] D. Du *et al.*, "The effects of the CCR6/CCL20 biological axis on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, no. 4, pp. 6441–6452, Apr. 2014, doi: 10.3390/ijms15046441.
- [113] F. Liu *et al.*, "CC chemokine receptor 6 expression predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 110, no. 2, pp. 151–155, 2014, doi: 10.1002/jso.23598.
- [114] N. Kapur *et al.*, "CCR6 expression in colon cancer is associated with advanced disease and supports epithelial-to-mesenchymal transition," *British Journal of Cancer*, vol. 114, no. 12, pp. 1343–1351, Jun. 2016, doi: 10.1038/bjc.2016.113.
- [115] C. Rubie *et al.*, "Involvement of chemokine receptor CCR6 in colorectal cancer metastasis," *Tumor Biology*, vol. 27, no. 3, pp. 166–174, May 2006, doi: 10.1159/000092777.
- [116] P. Ghadjar *et al.*, "Chemokine receptor CCR6 expression level and aggressiveness of prostate cancer," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 134, no. 11, pp. 1181–1189, Nov. 2008, doi: 10.1007/s00432-008-0403-5.
- [117] W. Liu, W. Wang, N. Zhang, and W. Di, "The role of CCL20-CCR6 axis in ovarian cancer metastasis," *OncoTargets and Therapy*, vol. 13, pp. 12739–12750, Dec. 2020, doi: 10.2147/OTT.S280309.
- [118] X. P. Zhang, Z. J. Hu, A. H. Meng, G. C. Duan, Q. T. Zhao, and J. Yang, "Role of CCL20/CCR6 and the ERK signaling pathway in lung adenocarcinoma," *Oncology Letters*, vol. 14, no. 6, pp. 8183–8189, Dec. 2017, doi: 10.3892/ol.2017.7253.
- [119] C. Rubie *et al.*, "CCL20/CCR6 expression profile in pancreatic cancer," *Journal of Translational Medicine*, vol. 8, May 2010, doi: 10.1186/1479-5876-8-45.

- [120] Q. Yu, X. M. Lou, and Y. He, "Preferential recruitment of Th17 cells to cervical cancer via CCR6-CCL20 pathway," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 3, Mar. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0120855.
- [121] S. Kadomoto *et al.*, "Tumor-associated macrophages induce migration of renal cell carcinoma cells via activation of the CCL20-CCR6 axis," *Cancers*, vol. 12, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/cancers12010089.
- [122] J. Korbecki, S. Grochans, I. Gutowska, K. Barczak, and I. Baranowska-Bosiacka, "CC chemokines in a tumor: A review of pro-cancer and anti-cancer properties of receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 ligands," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 20, pp. 1–34, Oct. 02, 2020. doi: 10.3390/ijms21207619.
- [123] T. Hirata *et al.*, "Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 β -, TNF- α -, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells," *Endocrinology*, vol. 151, no. 11, pp. 5468–5476, Nov. 2010, doi: 10.1210/en.2010-0398.
- [124] A. Y. S. Lee and H. Körner, "CCR6/CCL20 chemokine axis in human immunodeficiency virus immunity and pathogenesis," *Journal of General Virology*, vol. 98, no. 3, pp. 338–344, Mar. 01, 2017. doi: 10.1099/jgv.0.000691.
- [125] D. Yang *et al.*, "G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6, no. 1, Dec. 01, 2021. doi: 10.1038/s41392-020-00435-w.
- [126] A. S. Hauser, M. M. Attwood, M. Rask-Andersen, H. B. Schiöth, and D. E. Gloriam, "Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 16, no. 12, pp. 829–842, Nov. 2017, doi: 10.1038/nrd.2017.178.
- [127] M. Jo and S. T. Jung, "Engineering therapeutic antibodies targeting G-protein-coupled receptors," *Experimental & molecular medicine*, vol. 48, no. 2, p. e207, Feb. 05, 2016. doi: 10.1038/emm.2015.105.

- [128] M. S. Castelli, P. McGonigle, and P. J. Hornby, "The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies," *Pharmacology research & perspectives*, vol. 7, no. 6. p. e00535, Dec. 01, 2019. doi: 10.1002/prp2.535.
- [129] K. Imai and A. Takaoka, "Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 9. pp. 714–727, Sep. 2006. doi: 10.1038/nrc1913.
- [130] M. S. Ju and S. T. Jung, "Antigen design for successful isolation of highly challenging therapeutic anti-gpcr antibodies," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 21. pp. 1–14, Nov. 01, 2020. doi: 10.3390/ijms21218240.
- [131] C. J. Hutchings, "A review of antibody-based therapeutics targeting G protein-coupled receptors: an update," *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2020. doi: 10.1080/14712598.2020.1745770.
- [132] C. J. Hutchings, M. Koglin, W. C. Olson, and F. H. Marshall, "Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 16, no. 11. pp. 787–810, Oct. 30, 2017. doi: 10.1038/nrd.2017.91.
- [133] R. M. Lu *et al.*, "Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases," *Journal of Biomedical Science*, vol. 27, no. 1. Jan. 02, 2020. doi: 10.1186/s12929-019-0592-z.
- [134] G. Köhler and C. Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, vol. 256, no. 5517, pp. 495–497, 1975, doi: 10.1038/256495a0.
- [135] J. Z. Moraes *et al.*, "Hybridoma technology: is it still useful?," *Current Research in Immunology*, vol. 2, pp. 32–40, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.crimmu.2021.03.002.
- [136] Z. Elgundi, M. Reslan, E. Cruz, V. Sifniotis, and V. Kayser, "The state-of-play and future of antibody therapeutics," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 122. pp. 2–19, Dec. 01, 2017. doi: 10.1016/j.addr.2016.11.004.
- [137] B. Valldorf *et al.*, "Antibody display technologies: Selecting the cream of the

- crop," *Biological Chemistry*. 2021. doi: 10.1515/hsz-2020-0377.
- [138] C. S. Sum, B. J. Murphy, Z. Li, T. Wang, L. Zhang, and M. E. Cvijic, *Pharmacological Characterization of GPCR Agonists, Antagonists, Allosteric Modulators and Biased Ligands from HTS Hits to Lead Optimization*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- [139] V. L. Desimine, K. A. McCrink, B. M. Parker, S. L. Wertz, J. Maning, and A. Lymperopoulos, "Biased Agonism/Antagonism of Cardiovascular GPCRs for Heart Failure Therapy," in *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 339, 2018, pp. 41–61. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.02.007.
- [140] K. Palczewski, "G protein-coupled receptor rhodopsin," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 75, pp. 743–767, 2006. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142743.
- [141] J. M. Subramaniam, G. Whiteside, K. McKeage, and J. C. Croxtall, "Mogamulizumab: First global approval," *Drugs*, vol. 72, no. 9, pp. 1293–1298, 2012, doi: 10.2165/11631090-000000000-00000.
- [142] M. J. Scott *et al.*, "Rapid identification of highly potent human anti-GPCR antagonist monoclonal antibodies," *mAbs*, vol. 12, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1080/19420862.2020.1755069.
- [143] S. Dhillon, "Eptinezumab: First Approval," *Drugs*, vol. 80, no. 7, pp. 733–739, May 2020, doi: 10.1007/s40265-020-01300-4.
- [144] N. Agresti *et al.*, "Disruption of CCR5 signaling to treat COVID-19-associated cytokine storm: Case series of four critically ill patients treated with leronlimab," *Journal of Translational Autoimmunity*, vol. 4, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.JTAUTO.2021.100083.
- [145] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970, doi: 10.1038/227680A0.

- [146] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method," *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/METH.2001.1262.
- [147] J. P. Hughes, S. S. Rees, S. B. Kalindjian, and K. L. Philpott, "Principles of early drug discovery," *British Journal of Pharmacology*, vol. 162, no. 6. pp. 1239–1249, Mar. 2011. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- [148] J. A. Salon, D. T. Lodowski, and K. Palczewski, "The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery," *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 4. pp. 901–937, Dec. 2011. doi: 10.1124/pr.110.003350.
- [149] Y. S *et al.*, "Is CCR6 Required for the Development of Psoriasiform Dermatitis in Mice?," *The Journal of investigative dermatology*, vol. 139, no. 2, pp. 485–488, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.JID.2018.07.036.
- [150] K. Dorgham, C. Dejoui, C. Piesse, G. Gorochov, J. Pène, and H. Yssel, "Identification of the Single Immunodominant Region of the Native Human CC Chemokine Receptor 6 Recognized by Mouse Monoclonal Antibodies," *PLOS ONE*, vol. 11, no. 6, p. e0157740, Jun. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0157740.
- [151] C. R. Mackay, "Moving targets: Cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies," *Nature Immunology*, vol. 9, no. 9. pp. 988–998, 2008. doi: 10.1038/ni.f.210.
- [152] E. Dolgin, "First GPCR-directed antibody passes approval milestone," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 17, no. 7, pp. 457–459, Jul. 2018, doi: 10.1038/nrd.2018.103.
- [153] M. Szpakowska, V. Fievez, K. Arumugan, N. Van Nuland, J. C. Schmit, and A. Chevigné, "Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors," *Biochemical Pharmacology*, vol. 84, no. 10. pp. 1366–1380, Nov. 15, 2012. doi: 10.1016/j.bcp.2012.08.008.
- [154] P. Holzlöhner and K. Hanack, "Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology," *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, vol. 2017, no.

- 119, p. 54832, Jan. 2017, doi: 10.3791/54832.
- [155] M. M. Mumaw, M. De La Fuente, A. Arachiche, J. K. Wahl, and M. T. Nieman, "Development and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Protease Activated Receptor 4 (PAR4)," *Thrombosis research*, vol. 135, no. 6, p. 1165, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.THROMRES.2015.03.027.
- [156] C. J. Rossant *et al.*, "Phage display and hybridoma generation of antibodies to human CXCR2 yields antibodies with distinct mechanisms and epitopes," *mAbs*, vol. 6, no. 6, p. 1425, Nov. 2014, doi: 10.4161/MABS.34376.
- [157] M. R. Kuhne *et al.*, "BMS-936564/MDX-1338: a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis in vitro and shows antitumor activity in vivo in hematologic malignancies," *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 19, no. 2, pp. 357–366, Jan. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2333.
- [158] C. J. Hutchings *et al.*, "Monoclonal anti- β 1-adrenergic receptor antibodies activate G protein signaling in the absence of β -arrestin recruitment," *mAbs*, vol. 6, no. 1, p. 246, Jan. 2014, doi: 10.4161/MABS.27226.
- [159] R. B. Dodd, T. Wilkinson, and D. J. Schofield, "Therapeutic Monoclonal Antibodies to Complex Membrane Protein Targets: Antigen Generation and Antibody Discovery Strategies," *BioDrugs*, vol. 32, no. 4, pp. 339–355, Aug. 01, 2018. doi: 10.1007/s40259-018-0289-y.
- [160] A. M. Dreyer, J. Beauchamp, H. Matile, and G. Pluschke, "An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells," *BMC Biotechnology*, vol. 10, no. 1, p. 87, Dec. 2010, doi: 10.1186/1472-6750-10-87.
- [161] F. Talmont, L. Moulédous, J. Boué, C. Mollereau, and G. Dietrich, "Denatured G-Protein Coupled Receptors as Immunogens to Generate Highly Specific Antibodies," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, Sep. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0046348.


- [162] R. Dodd, D. J. Schofield, T. Wilkinson, and Z. T. Britton, "Generating therapeutic monoclonal antibodies to complex multi-spanning membrane targets: Overcoming the antigen challenge and enabling discovery strategies," *Methods*. 2020. doi: 10.1016/j.ymeth.2020.05.006.
- [163] E. A. Greenfield, J. DeCaprio, and M. Brahmandam, "Preparing Live Cells for Immunization," *Cold Spring Harbor protocols*, vol. 2021, no. 8, pp. 301–302, Aug. 2021, doi: 10.1101/PDB.PROT100057.
- [164] M. C. Michel, T. Wieland, and G. Tsujimoto, "How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies?," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 379, no. 4. pp. 385–388, Apr. 2009. doi: 10.1007/s00210-009-0395-y.
- [165] H. Wan, "An overall comparison of small molecules and large biologics in ADME testing," *ADMET and DMPK*, vol. 4, no. 1. pp. 1–22, Apr. 01, 2016. doi: 10.5599/admet.4.1.276.
- [166] B. A. Ersoy *et al.*, "Mechanism of N-terminal modulation of activity at the melanocortin-4 receptor GPCR," *Nature Chemical Biology*, vol. 8, no. 8, pp. 725–730, 2012, doi: 10.1038/nchembio.1008.
- [167] L.-S. Ai, S.-F. Lee, S. S. L. Chen, and F. Liao, "Molecular characterization of CCR6: Involvement of multiple domains in ligand binding and receptor signaling," *Journal of Biomedical Science*, vol. 11, no. 6, pp. 818–828, Nov. 2004, doi: 10.1007/bf02254367.
- [168] V. V Gurevich and E. V Gurevich, "Arrestin-mediated signaling: Is there a controversy?," *World Journal of Biological Chemistry*, vol. 9, no. 3, pp. 25–35, Dec. 2018, doi: 10.4331/wjbc.v9.i3.25.
- [169] H. Ren *et al.*, "Function-based high-throughput screening for antibody antagonists and agonists against G protein-coupled receptors," *Communications biology*, vol. 3, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S42003-020-0867-7.
- [170] A. E. Getschman *et al.*, "Protein engineering of the chemokine CCL20 prevents psoriasisform dermatitis in an IL-23–dependent murine model," *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 47, pp. 12460–12465, Nov. 2017, doi: 10.1073/pnas.1704958114.
- [171] W. EA, C. J, C. KA, and Z. J, “Allosteric Modulation of Class A GPCRs: Targets, Agents, and Emerging Concepts,” *Journal of medicinal chemistry*, vol. 62, no. 1, pp. 88–127, Oct. 2019, doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.8B00875.
- [172] L. Bencivenga, D. Liccardo, C. Napolitano, L. Visaggi, G. Rengo, and D. Leosco, “ β -Adrenergic Receptor Signaling and Heart Failure: From Bench to Bedside,” *Heart Failure Clinics*, vol. 15, no. 3. pp. 409–419, Jul. 01, 2019. doi: 10.1016/j.hfc.2019.02.009.
- [173] A. Y. H. Woo, Y. Song, R. P. Xiao, and W. Zhu, “Biased β 2-adrenoceptor signalling in heart failure: Pathophysiology and drug discovery,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 172, no. 23. pp. 5444–5456, Dec. 01, 2015. doi: 10.1111/bph.12965.
- [174] J. M. G. Ruiz de Morales *et al.*, “Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies,” *Autoimmunity Reviews*, vol. 19, no. 1. Jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.autrev.2019.102429.
- [175] J. Lia *et al.*, “Deficiency of β -arrestin1 ameliorates collagen-induced arthritis with impaired TH17 cell differentiation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 18, pp. 7395–7400, Apr. 2013, doi: 10.1073/pnas.1221608110.
- [176] J. S. Smith and S. Rajagopal, “The β -Arrestins: Multifunctional regulators of G protein-coupled receptors,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291, no. 17, pp. 8969–8977, Apr. 2016, doi: 10.1074/jbc.R115.713313.
- [177] C. Rafael-Vidal, N. Pérez, I. Altabás, S. Garcia, and J. M. Pego-Reigosa, “Blocking IL-17: A promising strategy in the treatment of systemic rheumatic diseases,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 19. pp. 1–14, Oct. 01, 2020. doi: 10.3390/ijms21197100.

IX. PUBLICACIONES

Article

Development of a High-Throughput Calcium Mobilization Assay for CCR6 Receptor Coupled to Hydrolase Activity Readout

Sara Gómez-Melero ^{1,*}, Fé Isabel García-Maceira ¹, Tania García-Maceira ¹, Verónica Luna-Guerrero ¹, Gracia Montero-Peñalvo ¹, Javier Caballero-Villarraso ^{2,3} , Isaac Túnez ^{2,3} and Elier Paz-Rojas ⁴

¹ Canvax Biotech, Parque Científico y Tecnológico Rabanales 21, c/Astrónoma Cecilia Payne s/n, Edificio Canvax, 14014 Córdoba, Spain; fi.garciamaceira@gmail.com (F.I.G.-M.); tagama0802@gmail.com (T.G.-M.); veronicalunaguerrero@gmail.com (V.L.-G.); gracia7432@gmail.com (G.M.-P.)

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine and Nursing, University of Córdoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain; bc2cavij@uco.es (J.C.-V.); itunez@uco.es (I.T.)

³ Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004, Córdoba, Spain

⁴ Multiplex Biopharma, Parque Científico Rabanales 21, Calle Astrónoma Cecilia Payne, 14014 Córdoba, Spain; pazrojaselier@gmail.com

* Correspondence: sara.gomez.melero@gmail.com

Abstract: CCR6 is a chemokine receptor highly implicated in inflammatory diseases and could be a potential therapeutic target; however, no therapeutic agents targeting CCR6 have progressed into clinical evaluation. Development of a high-throughput screening assay for CCR6 should facilitate the identification of novel compounds against CCR6. To develop a cell-based assay, RBL-2H3 cells were transfected with plasmids encoding β -hexosaminidase and CCR6. Intracellular calcium mobilization of transfected cells was measured with a fluorescent substrate using the activity of released hexosaminidase as readout of the assay. This stable, transfected cell showed a specific signal to the background ratio of 19.1 with low variability of the signal along the time. The assay was validated and optimized for high-throughput screening. The cell-based calcium mobilization assay responded to the specific CCR6 ligand, CCL20, in a dose-dependent manner with an EC_{50} value of 10.72 nM. Furthermore, the assay was deemed robust and reproducible with a Z' factor of 0.63 and a signal window of 7.75. We have established a cell-based high-throughput calcium mobilization assay for CCR6 receptor. This assay monitors calcium mobilization, due to CCR6h activation by CCL20, using hexosaminidase activity as readout. This assay was proved to be robust, easy to automate and could be used as method for screening of CCR6 modulators.



Citation: Gómez-Melero, S.; García-Maceira, F.I.; García-Maceira, T.; Luna-Guerrero, V.; Montero-Peñalvo, G.; Caballero-Villarraso, J.; Túnez, I.; Paz-Rojas, E. Development of a High-Throughput Calcium Mobilization Assay for CCR6 Receptor Coupled to Hydrolase Activity Readout. *Biomedicines* **2022**, *10*, 422. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020422>

Academic Editor:
Yoshitaka Hosokawa

Received: 19 December 2021

Accepted: 7 February 2022

Published: 10 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: high-throughput screening; HTS; CCR6; hexosaminidase; calcium mobilization; cell-sensor; GPCR

1. Introduction

G-protein-coupled receptors (GPCRs) represent 4% of the human genome and are one of the most attractive therapeutic targets due to their involvement in many important physiological functions [1]. Despite being one of the largest classes of proteins, the majority of GPCRs remains undrugged, with only approximately 100 GPCRs targeted with small molecules or peptides [2]. GPCR receptors do not have activity per se, but they are linked to GTPases that participate in signal transduction. Such GTPases are collectively known as G proteins and each G protein comprises three subunits, α , β , and γ . There are four families of G proteins that are classified according to their α subunit: G_s , G_i , G_q and $G_{12/13}$ where G_s and G_i participate in cAMP-dependent pathways, G_q activates phospholipase C-dependent pathways, and $G_{12/13}$ activates a small family of GTPases [3–5]. In addition, the G_q family is further divided into four G_q proteins due to the use of four different α polypeptides, α_q , α_{11} , α_{14} , and $\alpha_{15/16}$ [6]. The $G_{\alpha_{15/16}}$ polypeptide has a restricted tissue

expression and is predominantly expressed in myeloid and B-cell lineages while $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha 11}$ are ubiquitously expressed [6].

There have been extensive efforts to develop new, sensitive and simple-to-use assays to measure second messengers or molecules coupled to the signal transduction as readout for GPCR activation [7]. Based on this signal transduction cascade several assay techniques such as radioligand binding, reporter gene, cAMP detection and calcium mobilization are commonly used [8]. Calcium mobilization is the result of activation of GPCRs through specific subunit $G_{\alpha q}$ activating classical phospholipase C pathways resulting in the release of calcium from the endoplasmic reticulum into the cytoplasm [7]. In resting cells, the cytosolic calcium concentration is lower (~100–200 nM) than that in the extracellular environment (~2 mM), but when the cells are excited by the activation of GPCRs the concentration of intracellular calcium can increase in seconds to 100 μ M [9]. Because this change in the concentration of intracellular Ca^{2+} play a crucial role in GPCR-induced signaling, the develop of measurement assays based on GPCR calcium mobilization has attracted more attention in GPCR-targeted drug discovery and has widely used in the investigation of many GPCRs [10].

The human CC chemokine receptor 6, hCCR6, is a class A of GPCR expressed in a particular diverse range of leukocytes including T cells (specifically Th17 cells and Treg cells), B cell, neutrophils and subsets of dendritic cells [11]. With particular relevance in rheumatoid arthritis, psoriasis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease and cancer; inhibition of the hCCR6 signaling might prove to be a useful therapeutic strategy [11,12]. Some studies indicate that upon CCR6 binding to its ligand, CCL20 is activated a signaling pathway through calcium mobilization [13,14]. Therefore, the development of novel functional assays based on calcium mobilization is of interest for CCR6h-targeted drug discovery [10].

Extensive research has been conducted regarding the molecular determinants of coupling of each GPCR to a particular family of G proteins and today it is known that GPCR and G protein coupling selectivity involves the interaction of GPCR with both the extreme carboxyl terminus and linker I of G_{α} protein [15] and that development of chimeras of $G_{\alpha q}$ comprising the C-terminal five amino of $G_{\alpha i}$ or $G_{\alpha s}$ and a highly conserved glycine within Linker I is enough for the coupling of non- $G_{\alpha q}$ coupled GPCR to signaling through phospholipase C-dependent pathways [16]. In addition, it was previously known that $G_{\alpha 15/16}$ is a promiscuous G protein, that is, it can couple to a wide variety of GPCR to signal through phospholipase C-dependent pathways [17] and this is the molecular basis of the measurement of calcium release upon activation of many non-naturally $G_{\alpha q}$ coupled-GPCRs assays that are used in HTS today; for example, the ChemiScreen™ family of HTS products RBL-2H3 is a rat basophilic leukemia cell line that expresses the $G_{\alpha 15/16}$ of G_{α} subunit. This promiscuous $G_{\alpha 15/16}$ protein shifts the receptors coupling to the calcium mobilization pathway [18]. Mast cells release their secretory granules after aggregation of their high affinity receptors, $Fc\epsilon$ receptor I ($Fc\epsilon$ RI), by the antigen-immunoglobulin E (IgE) complexes [13,18]. Aggregation of $Fc\epsilon$ RI by antigens initiates a signaling cascade that induces the elevation of intracellular Ca^{2+} causing degranulation [18]. In this way, the $Fc\epsilon$ RI stimulation induces the release of hydrolases, such as β -hexosaminidase (HexB), from intracellular granules [13].

We hypothesized that overexpression of a GPCR receptor on the surface of RBL-HexB cells generates a cell-based sensor useful to determine calcium mobilization through GPCR ligand binding using hydrolase activity as readout of the assay. This assay can be used to measure the effect of compounds on calcium mobilization signaling of CCR6h receptor. When the cell-based sensor is incubated with the specific CCR6h ligand, CCL20, the amount of intracellular calcium increases, and the reporter polypeptide is released. The enzymatic activity of such released non-protease hydrolase reporter polypeptide is detected with the specific substrate. Herein we report the development of a precise, simple and cost-effective assay to measure calcium mobilization for the CCR6h receptor.

2. Materials and Methods

2.1. Plasmids

Coding sequence of human β -hexosaminidase (HexB, Genbank: BC017378.2) was synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT), flanked with the recognition sites of 5'XhoI and 3'NotI and cloned into the pRV retroviral vector by the restriction with the indicated enzymes. A hygromycin resistance cassette was included in the vector backbone for stable cells selection. The vector also included an IRES-NGFR cassette, cloned downstream of human HexB and, thus, under the control of the same promoter, for selection by flow cytometry of cells expressing HexB stably.

Coding sequence of human CCR6 (Gb: NM_004367) was obtained by synthesis (IDT), flanked with the recognition sites of 5'XhoI and 3'NotI. It was cloned in frame with the signal peptide IgK, a short sequence (VGS) to improve GPCR expression [19] and a tag sequence (c-myc) into the pcDNA3.1 vector by the restriction with the indicated enzymes. pcDNA3.1 vector included a neomycin resistance cassette for stable cells selection.

The integrity of the constructs was confirmed by sequence analysis (Stabvida, Caparica, Portugal).

2.2. Cell Culture

All cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). RBL-2H3 (rat basophilic leukemia, CRL-2256) cells were cultured in Eagle's minimum essential medium (EMEM)/RPMI-1640 medium. MYC 1-9E10.2 (9E10, CRL-1729) and 200-6-G3-4 (20.4, HB-8737) hybridoma cells were maintained in RPMI-1640 medium. All media (Gibco) were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, New York, NY, USA), 2 mM L-glutamine (Lonza, Basel, Switzerland), 100 U/mL penicillin (Gibco), and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.3. Antibody Purification

Mouse anti-c-myc and mouse anti-NGFR were obtained from culture supernatant of MYC 1-9E10.2 (9E10, CRL-1729) and 200-6-G3-4 (20.4, HB-8737) hybridoma cells, respectively. Immunoglobulins were affinity-purified from the culture supernatant using Protein G Sepharose columns (HiTrap Protein G HP, GE Healthcare, Madrid, Spain) according to the manufacturer's protocol in AKTA Prime Plus (GE Healthcare). The purity of purified mAbs was checked by SDS-PAGE on 10% acrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. The concentration of purified immunoglobulins was determined by UV absorbance at 280 nm.

2.4. Flow Cytometry

For positive transfected cells selection, flow cytometric analysis was performed. Mouse anti-c-myc (9E10, in house) or mouse anti-NGFR (HB-8737, in house) antibodies were incubated with RBL-2H3 transfected cells or mock transfectants for 20 min at 4 °C. After washing with PBS, cells were stained with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (1:60, Sigma, Burlington, MA, USA) for 10 min at 4 °C and were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur (Becton Dickinson, Madrid, Spain) cytometer. A total of 10,000 events were acquired and data were analyzed with BD CellQuest Pro software (BD CellQuest Pro, BD Biosciences, Madrid, Spain).

2.5. Creation of Stable RBL-2H3 Clone with β -hexosaminidase Activity and CCR6 Expression

RBL-2H3 was transfected, with 2 μ g of the expression vector pRV-PCMV-HexB-IRES-NGFR-HYG obtained, using Canfast (Canvax Biotech, Córdoba, Spain) according to the manufacturer's instructions. Following transfection, stably transfectants were selected with 2 mg/mL hygromycin B (Duchefa, Torrente, Spain). To confirm the plasmid transfection, flow cytometry against NGFR with mouse anti-NGFR (HB8737, in house) antibody was

used. Positive cells were cloned by limiting dilution in 96-well plates and wells with growing colonies were analyzed for NGFR expression by flow cytometry again.

Clones with positive expression for NGFR were expanded to six well plates for determination of HexB activity. The cells were plated in 384-well plates (Corning, 384-well flat-bottom black polystyrene microplates, Corning, New York, USA) in 30 μ L per well at 5000 cells per well and cultured for 48 h at 37 °C, 5% CO₂. Then, cell media was aspirated and replaced with a mix containing 1 μ g/mL mouse anti-TNP antibody (clone IgELb4, Creative Biolabs, Shirley, NY, USA), 1 μ g/mL of TNP-BSA (Biosearch Technologies, Hoddeston, UK) and 1 mM of 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (4MU-NGlc) substrate (Glycosynth) in BSS (25 mM HEPES/NaOH, 1.2 mM KH₂PO₄, 65 mM NaCl, 5.65 mM KCl, 0.6 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose and 0.1% BSA). Cells were incubated at 37 °C protected from light. The fluorescence was measured at 360 nm excitation and 470 nm emission wavelength in a FLUOStar OPTIMA plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) to measure exocytosis of HexB. A read was taken at 0, 15, 30, 45 and 60 min of incubation. To measure background release, 2 mM of 4MU-NGlc was used without anti-TNP antibody or TNP-BSA. Ionomycin (Sigma, Burlington, MA, USA) at 10 μ M was used as a positive control. Wells without cells were used as blank and their fluorescence was subtracted of specific and background release to calculate the specific signal-to-background (S/B) ratio. The stability of HexB expression in 1B7-RBL-2H3-HexB cells' activity in the time was measured for two months.

The selected clone, 1B7-RBL-2H3-HexB, with the best hexosaminidase activity was transfected with 2 μ g of the expression vector pcDNA3.1-PEF1 α -PSIg κ -CMyc-VGS-CCR6-Neo using Canfast (Canvax Biotech, Córdoba, Sapin) according to the manufacturer's instructions. Following transfection, stably transfectants were selected with 0.5 mg/mL G418 (Phytotechnology, Lenexa, KS, USA). Flow cytometry was used to measure surface expression of CCR6 using an anti c-myc antibody (9E10 clone, mouse antibody) followed by anti-mouse-FITC (Sigma).

2.6. CCR6h Calcium Mobilization Assay

Mobilization of Ca²⁺ by CCL20 ligand was determined using 1B7-RBL-HexB-hCCR6 cells. The cells were plated in 384-well plates (Corning, 384-well flat-bottom black polystyrene microplates) in 30 μ L per well at 5000 cells per well and cultured for 48 h at 37 °C, 5% CO₂. Then, cell media was aspirated and replaced with serial dilutions of CCL20 (Peprotech, London, UK) and 1 mM 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide substrate (Sigma) per well in BSS protected from light. Cells were incubated 60 min at 37 °C, 5% CO₂. The fluorescence was measured (excitation: 360 nm, emission: 470 nm) using a FLUOStar OPTIMA plate reader (BMG Labtech). To generate dose-response curves of CCL20 and calculate EC₅₀ and Hill slope (H) value non-linear regression analyses were performed.

EC₅₀ and H were used to calculate EC₈₀ using the following equation:

$$EC_F = \left(\frac{F}{100 - F} \right)^{\frac{1}{H}} * EC_{50} \quad (1)$$

where F is the fraction of maximal response, in this case 80.

2.7. Optimization and Performance of the HTS Assay

In order to optimize the incubation time, the assay was run as described above changing the incubation time with the ligand. Furthermore, the method of dispensing cells manually or using a Research Pro 8 Channel Electronic Multichannel Pipette (Eppendorf, Madrid, Spain) was compared. Concentration response curves of CCL20 were run to compare EC₅₀ value and signal-to-background (S/B) ratio.

The assay with optimized conditions was performed to determine the Z' factor and the signal window. The Z' factor [20] was calculated by the following equation: $Z' = 1 - ((3SD_{max} + 3SD_{min}) / |mean_{max} - mean_{min}|)$ and the signal window (SW) [21] was calculated using the equation: $SW = ((mean_{max} - 3SD_{max}) - (mean_{min} + 3SD_{min}))$

min)/SDmax. In both equations, SDmax is the standard deviation of the positive controls, SDmin is the standard deviation of the negative controls, mean max is the mean value of the positive controls and mean min is the mean value of the negative controls. CCL20 at 60 nM (approximately EC₈₀) was used as a positive control and the assay buffer (BSS) as a negative control.

2.8. Statistical Analysis

Data were represented as mean \pm SD. The statistical analysis was carried out using GraphPad Prism version 8.0.1 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Non-linear regression analyses were performed to generate dose-response curves and calculate EC₅₀ and EC₈₀ values. Linear regression was used to analyze data reproducibility. Statistical significance was evaluated with Student's *t*-test and are indicated with * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; and **** $p < 0.0001$.

3. Results

3.1. Development of Stable Cell Line Expressing Human HexB

To obtain a cell line with hexosaminidase activity, we transfected RBL-2H3 cells with a plasmid for the expression of human HexB fused to NGFR cassette (Figure 1a). Transfected cells were kept in antibiotic selection with hygromycin for two weeks, after which, cells were tested in flow cytometry. Positive cells for NGFR expression were selected and cloned to ensure their stability and, growing colonies, were analyzed for NGFR expression again.

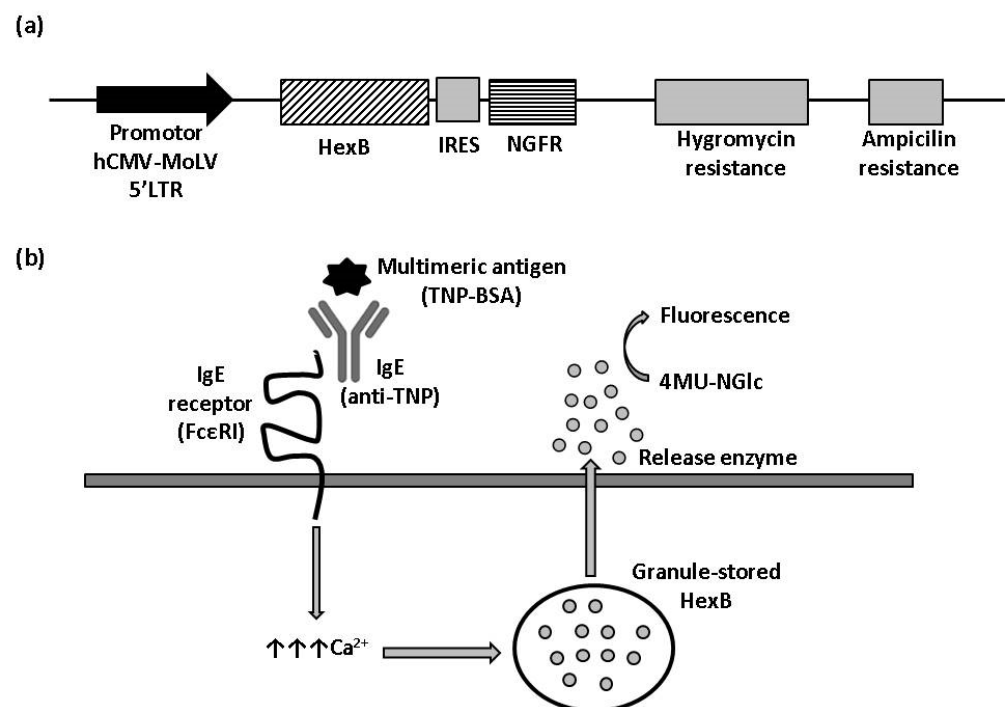


Figure 1. β -hexosaminidase cell sensor-based assay. (a) Vector construction. Plasmid vector with hygromycin resistance cassette used to stably express HexB fused to NGFR under control hCMV-MoLV-5'LTR promoter. (b) Illustration of HexB-based calcium mobilization assay. 4MU-NGlc: 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide. The arrows represent an increment of calcium.

HexB activity of three clones with positive expression for NGFR, named 1B7-RBL-2H3-HexB, 1C4-RBL-2H3-HexB and 1F10-RBL-2H3-HexB, was assayed. We measured the release of hexosaminidase due to interactions between multimeric antigen and surface-bound IgE, as described in the Materials and Methods (Figure 1b). A read of fluorescence was taken at different times of incubation, selecting 60 min as the optimal assay time (Table 1).

Table 1. β -hexosaminidase activity in different cell lines after 60 min of incubation.

Cell	Specific Exocytosis (RFU)	Background Release (RFU)
Mock	6424 \pm 584	2056 \pm 30
RBL-2H3-HexB	14,149 \pm 309	2908 \pm 77
1C4-RBL-2H3-HexB	39,185 \pm 1024	6302 \pm 132
1F10-RBL-2H3-HexB	17,378 \pm 362	4394 \pm 83
1B7-RBL-2H3-HexB	28,554 \pm 790	2611 \pm 61
Without cells (blank)	1203 \pm 42	1176 \pm 47

RFU, relative fluorescence units.

The above results indicate that overexpression of HexB into RBL-2H3 cells produces a functional enzyme, as measured with 4MU-NGlc, that is stored inside the granules and is specifically released by exocytosis through cross-linking of IgE receptor. In the stably transfected population, RBL-2H3-HexB, the specific signal is increased 2.2 times with respect to mock transfectants, while background increased 1.4 times, that is, specific signal increased more than background release and this indicates that the uses of transfected cells as sensors is better than the use of untransfected cells. The specific signal to the background (S/B) ratio of untransfected RBL-2H3 cells in this experiment was 5.9, while the S/B ratio for RBL-2H3-HexB cells was 7.5. Clones selected by limiting dilution from the RBL-2H3-HexB increased specific release, but clones 1C4 and 1F10 also increased background release having a signal-to-background ratio of 7.4 and 5. However, the signal-to-background ratio of clone 1B7 was 19.1, which is an increment of 11.6 times of RBL-HexB ratio and 13.2 times of RBL untransfected cells ratio (Figure 2a). The clone 1B7-RBL-2H3-HexB, with the best signal-to-background ratio, was chosen as our working clone.

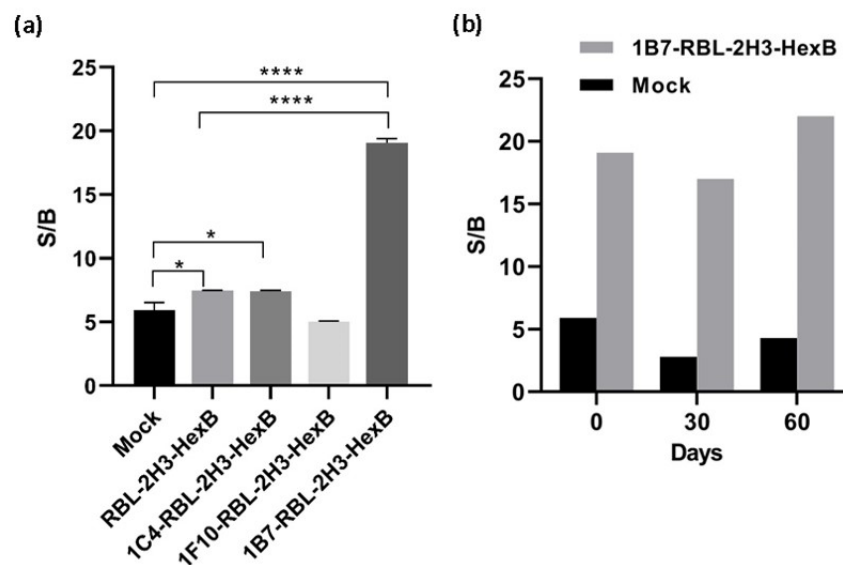


Figure 2. Activity of hexosaminidase released by transfected cells. (a) Signal-to-background ratio of mock transfectants, RBL-2H3 cells transfected with HexB and RBL-2H3-HexB clones. Means and SD of triplicates are plotted. (b) Stability of 1B7-RBL-2H3-HexB cells activity in the time. Representative data for one experiment are shown. * $p < 0.1$, **** $p < 0.0001$.

Even more important than the signal reached is the fact that production and release of hexosaminidase by the 1B7-RBL-2H3-HexB cells obtained is extremely regular while that of RBL-2H3 untransfected cells has a very strong variability over time. Both, RBL-2H3 and 1B7-RBL-2H3-HexB, cells were cultured for 2 months, and exocytosis was measured as above every 1 month. The signal-to-background ratio of RBL-2H3 cells was 5.9 (month 0), 2.8 (month 1) and 4.3 (month 2) while the signal-to-background ratio of 1B7-RBL-2H3-HexB cells was 19.1 (month 0), 17 (month 1) and 22 (month 2). A strong natural variability

was observed in RBL-2H3 cells with a reduction of 63% of S/B ratio between month 0 and month 1. But 1B7-RBL-HexB cells behaved much better and the S/B ratio, while still variable as corresponds to live cells, was more stable and the maximal variability was 22% between month 1 and month 2 (Figure 2b).

3.2. Development of Calcium Mobilization Assay for CCR6h Receptor Coupled to β -Hexosaminidase Readout

To study CCR6 activation by CCL20 with β -hexosaminidase enzymatic assay, 1B7-RBL-2H3-HexB cells were transfected with an expression plasmid containing viral glycosylation sequence (VGS) and c-myc tag fused in frame upstream of CCR6h (Figure 3a). The VGS sequence was used to enhance CCR6h surface expression [19]. Transfected cells were kept in antibiotic selection with neomycin for two weeks, after which cells were tested in flow cytometry. The cells 1B7-RBL-2H3-HexB-CCR6h had 69% c-myc and 99% NGFR expression (Figure 3b).

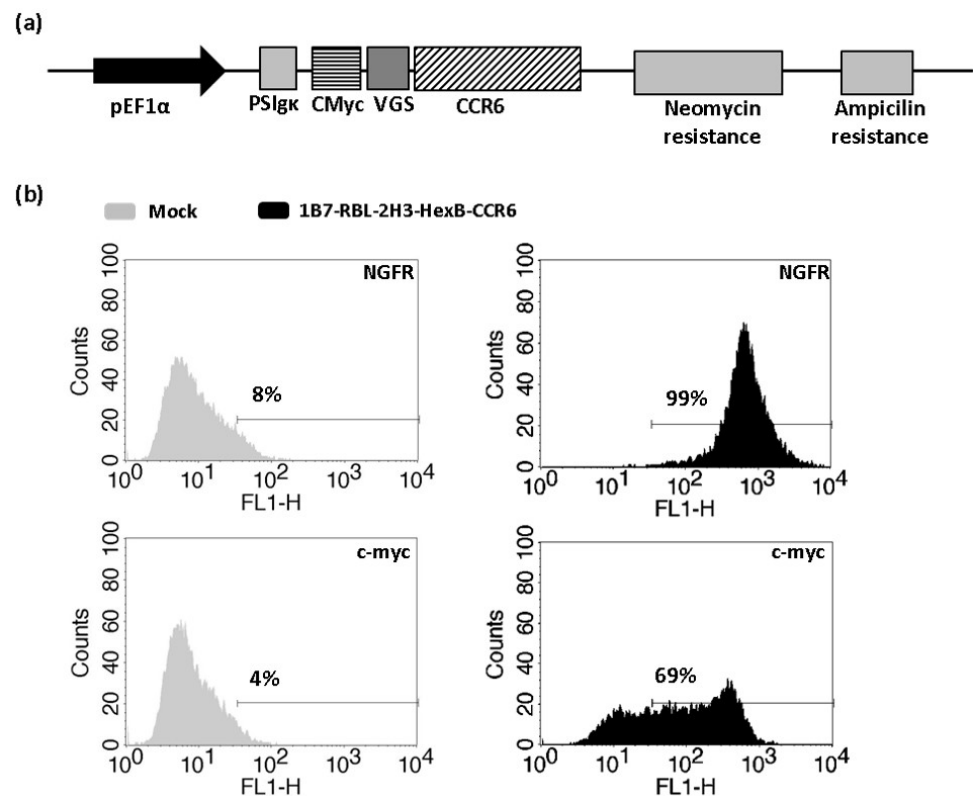


Figure 3. Obtaining of 1B7-RBL-2H3-HexB-CCR6h cells. (a) Vector construction. Plasmid vector with neomycin resistance cassette used to stably express CCR6h fused to c-myc on 1B7-RBL-2H3-HexB cells. (b) Flow cytometry. Expression level of stably transfected cells with HexB and CCR6h. One representative analysis from three independent experiments is shown. The lines represent the marker of the positive signal.

The cells were assayed in a functional calcium mobilization assay, based on HexB cells activity, incubating the 1B7-RBL-2H3-HexB-CCR6h cells with serial dilutions of CCL20 to measure specific signal of CCR6 receptor (Figure 4a). 1B7-RBL-2H3-HexB cells without CCR6h were used as negative control. A concentration-response curve was realized showing an EC₅₀ of 10.72 nM (Figure 4b).

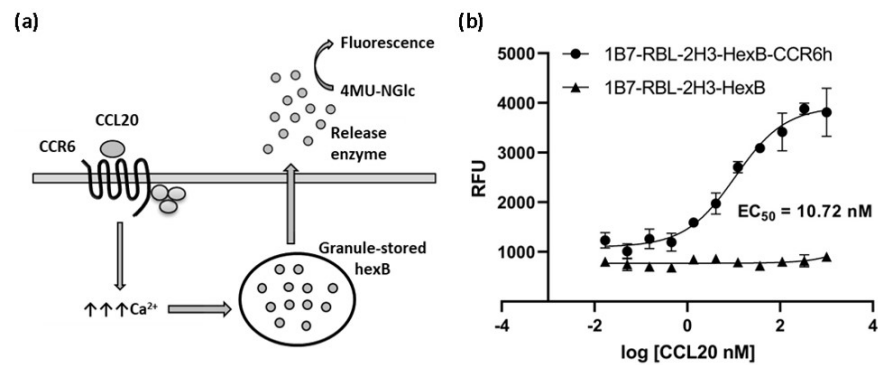


Figure 4. Calcium mobilization assay based on cell sensor. (a) Illustration of calcium mobilization assay for CCR6h. The arrows represent an increment of calcium. (b) Concentration-response curve of CCL20 in 1B7-RBL-2H3-HexB-CCR6h cells and 1B7-RBL-2H3-HexB cells. Means and SD of triplicates are plotted. RFU: relative fluorescence units.

3.3. Optimization and Performance of HTS Assay

Various experimental conditions were tested to optimize the assay for high-throughput screening (HTS). We found that the times of incubation tested (60, 70, 80 and 90 min) did not affect the EC_{50} value of the ligand CCL20 and the S/B ratio reached a plateau at 60 min of incubation (Figure 5a,b). Cells dispensing methods were examined by running the calcium mobilization assay with electronic multichannel pipette or manually plated cells. The EC_{50} value was the double when the cells were dispensed with electronic pipette and the signal-to-background ratio was better than the ratio obtained with manually plated cells (Figure 5c,d). Therefore, the final assay conditions for HTS were determined as follows: the time of ligand incubation was 60 min and the cells were dispensed with electronic pipette.

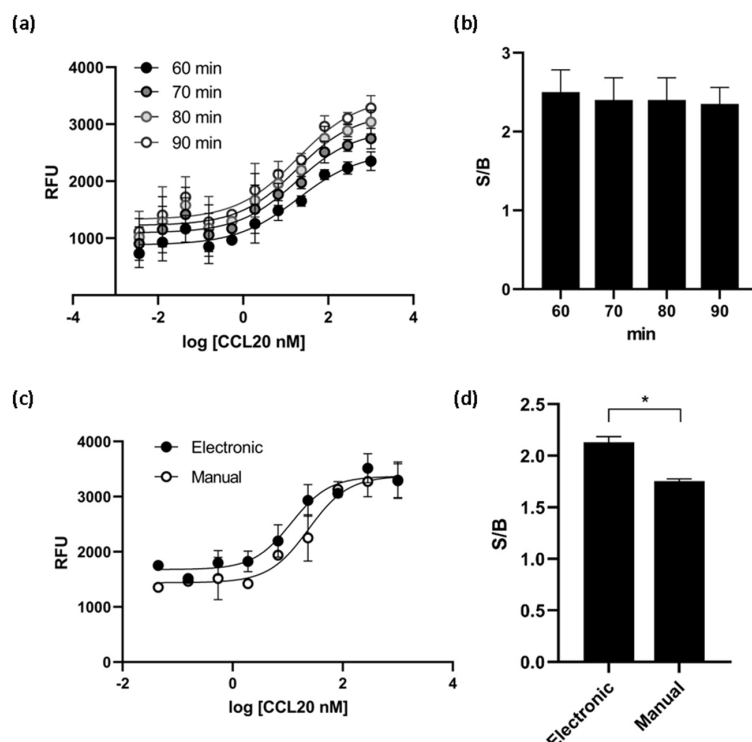


Figure 5. CCR6h calcium mobilization assay optimization. At different incubation times, the EC_{50} values obtained (a) and the S/B ratio (b) were almost the same. The cell dispensing method affect to dose response curve (c) and the S/B ratio was significantly higher with electronic method (d). * $p < 0.1$. Means and SD of triplicates are plotted. RFU: relative fluorescence units.

To see if this cell-based assay was suitable for HTS, Z' factor and signal window were calculated. Using the fully optimized assay, we generated Z' -factor and signal window of assay running 48 positive controls and 48 negative controls. The average of the positive controls was 2164 RFU with a standard deviation of 107.1 RFU and the average of the negative controls was 848 RFU with a standard deviation of 54.9 RFU. As shown in Figure 6a, the Z' factor was 0.63 and the signal window 7.75. A Z' -factor ≥ 0.5 and a signal window ≥ 2 are appropriate for HTS assay; therefore, our assay is deemed to be highly robust and reproducible, and hence suitable for HTS applications.

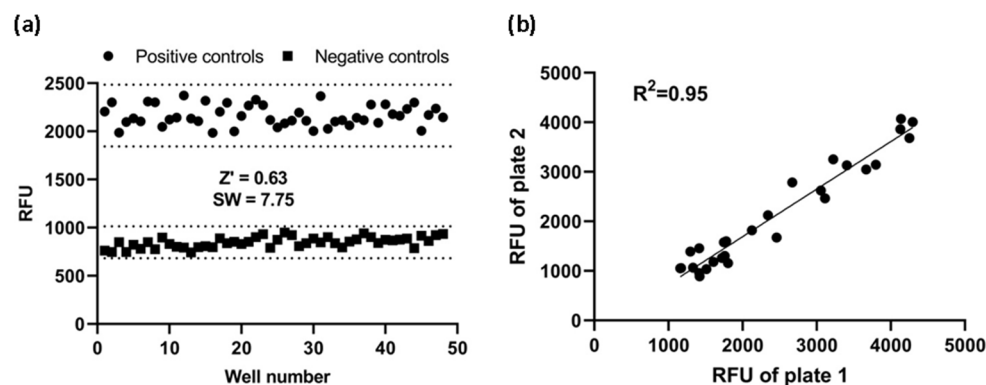


Figure 6. Assay performance. (a) Z' factor and signal window (SW) determination. At the fully optimized assay, 48 replicates of positive and negative controls were studied. Dotted lines indicate mean \pm 3SD of 48 data points. (b) Reproducibility. The same concentration of CCL20 was added to corresponding wells of two plates. Reproducibility of data from duplicates plates was investigated with a linear regression analysis. RFU: relative fluorescence units.

Furthermore, to investigate reproducibility between plates, the corresponding wells from two plates were treated with the same concentration of CCL20 and the data were investigated with linear regression analysis. The correlation coefficient was 0.95, showing a high degree of reproducibility between duplicate plates (Figure 6b).

4. Discussion

GPCRs represent the largest family of druggable targets due to their numerous physiological and pathological roles, together with their potential for therapeutic intervention via using small molecules as regulators [1]. An important focus of the pharmaceutical industry is the development of robust, reliable, nonradioactive, homogenous, cost effective and easily adapted to a microtiter plate format (96-, 384-, or 1536-well) for robotic automation assays [22]. Although in the past decades signaling-dependent cell-based functional assays have been made, biased GPCR signaling complicates drug discovery efforts. The development of biased ligands as therapeutics heralds an era of increased drug efficacy with reduced drug side effects [23].

The chemokine receptor CCR6 is a GPCR that plays an important role in immunity and is involved in numerous diseases such as inflammatory bowel disease, psoriasis, multiple sclerosis and rheumatoid arthritis [24]. This GPCR is also involved in non-autoimmune diseases such as cancer or atherosclerosis. Thus, inhibition of CCR6 signaling would be an attractive strategy for the treatment of various diseases and a small molecule inhibitor of CCR6 could be useful for both in vitro and in vivo pathophysiological studies [25]. In this manner, the availability of a simple, rapid and robust assay to monitor CCR6h activity would expedite the search for drugs against CCR6.

There are some functional assays to screen compounds that bind to CCR6 receptor based on different biological measurement corresponding to different signaling pathways. Commercially available CCR6 assays include those that measure of cAMP accumulation (cAMP Hunter™ eXpress assay), flash increment of Ca^{2+} by FLIPR technology or β -arrestin recruitment (PathHunter® eXpress CCR6 assay) in different cells: CHO-K1, cell lines like

Chem-1 with endogenous high levels of promiscuous $G_{\alpha 15}$ that promotes coupling $G_{o/i}$ receptors to an increase in intracellular calcium and CHO-K1/U2OS cell lines, respectively. But to the date, around sixteen CCR6-CCL20 inhibitors have been investigated and no therapeutic agents targeting CCR6 have progressed into clinical evaluation [12]; therefore, it seems to be necessary to develop reliable new technologies for screening of CCR6h.

β -hexosaminidase (HexB) assay is useful for detecting mast cell degranulation upon a short stimulation with drugs or chemical agents [26]. This protein is used as reporter for granule secretion but has been traditionally considered a low sensitivity reporter with a low signal-to-background ratio and a strong variability between experiments due to a large variation over time in the amount of enzyme stored in the granules [27].

In the present investigation, β -hexosaminidase was overexpressed inside the granules of hematopoietic cells, RBL-2H3, reaching an improved signal-to-background ratio assay and a stable production of HexB by transfected cells. While untransfected cells have strong variability, cells transfected with HexB gene were more stable. Thus, such mast cells overexpressing HexB become sensitive cell-based sensors with low variability to measure exocytosis.

To ensure that 1B7-RBL-2H3-HexB cells expressed CCR6 receptor on their surface, the receptor was cloned into the cells. In these cells, when CCL20 activates CCR6 there is a release of HexB, encoded by the gene that was previously overexpressed as describe above, due to the increase in intracellular calcium.

Calcium mediated degranulation of RBL-2H3 cells is induced by GPCR signaling pathways and is associated with Ca^{2+} mobilization [28]. The release of hexosaminidase contained in the granules was detected by a substrate that measures extracellular β -hexosaminidase activity due to the activation of CCR6 by CCL20 ligand calcium signaling. The untransfected cells 1B7-RBL-2H3-HexB, without expression of CCR6 in a natural manner similar to their parental cell RBL-2H3, had a very low level of hexosaminidase secretion under ligand stimulation, demonstrating that the release of hexosaminidase in transfected cells is specific of CCL20 activation. Therefore, production of Ca^{2+} in this reporter cell line, the subsequent releasing of HexB and the generation of fluorescent signal can be attributed to the activation of a particular signaling pathway, initiated by the activation of calcium mobilization signaling of CCR6 receptor by CCL20 ligand. Then, like IgE receptor, at least some GPCRs induce degranulation upon activation in RBL-2H3.

The VGS sequence has been reported [19] to enhance surface expression of GPCRs and, therefore, was used to promote CCR6 expression on the plasma membrane. In the sTable 1B7-RBL-2H3-HexB-CCR6 cells the response to CCL20 was potent and had a robust signal with an EC_{50} of 10.72 nM.

The assay was then optimized, and it tested the time of ligand incubation and the method of cell dispensing. The results indicate that the assay performance is well within 60 min of CCL20 incubation and electronic cell dispensing.

With the optimized conditions, we calculated some parameters commonly used as tools to measure assay performance during validation of an assay for HTS. The Z' factor is a useful tool used to assess the robustness of assay for screening [20] and the signal window (SW) provides a degree of separation between signals [21]. Although both parameters measure that assay signal adjusted for assay variability, is described that Z' has better precision properties than SW to measure assay performance [29]. Nevertheless, we calculated both parameters for a better support to the method developed. In general, a Z' value greater than or equal than 0.5 suggests that separation band is large and that the assay is robust enough for HTS and a signal window above 2 is recommended. Therefore, the assay was deemed robust and reproducible with a Z' value of 0.63 and a SW value of 7.75. Moreover, the correlation of two plates of assay confirms the excellent reproducibility.

An ideal GPCR screening technology should be simple, nonradioactive, with high signal-to-noise ratio, homogeneous, with minimal reagents additions and be amenable to a microtiter plate format to facilitate robotic automation [16]. We used the HexB stored inside granules of hematopoietic cells to detect CCL20 induced exocytosis on CCR6 overexpressing

cells and obtain an assay with a high signal-to-background ratio and low inter-assay variability. The assay performed very well, had a low baseline response, was reproducible and was suitable for high throughput screens. The sensor of the present investigation is faster than sensors based on inducible promoters, no lysis is needed for release of reporters, no washing or stop steps are needed thus increasing throughput, is stable and high signal to background is obtained for a robust assay with low variability between inter-assay experiments.

In theory, this calcium mobilization assay could be used to identify other ligands as well, including antagonist, inverse agonist or allosteric modulators, although further studies are needed to confirm this hypothesis. Moreover, these applications could be expanded to other GPCRs, provided their activation can also be coupled to an increase in calcium release.

Thus, we established a cell-based HTS assay system for monitoring calcium mobilization due to CCR6h activation by CCL20 using β -hexosaminidase activity. This technology represents a valuable tool in screening, counter screening and SAR characterization of compounds that modulate CCR6 activity.

5. Conclusions

In the present report, we generated a cell-based calcium mobilization assay for CCR6h receptor. The calcium mobilization assay established here, using measurement of β -hexosaminidase induced by the activation of 1B7-RBL-2H3-HexB-CCR6 cells calcium signaling by CCL20, can be reliably used to screen and study modulators of CCR6h.

This assay exhibited good values of Z' and signal window and- thus can be applied in high-throughput screening formats. It has been demonstrated that the assay described here is robust, time saving and cost effective, generating highly reproducible results. Moreover, the assay could be easily extended to study modulators of other GPCRs. In conclusion, our approach provides an alternative strategy for ligand screening of CCR6h.

Author Contributions: Conceptualization, E.P.-R. and F.I.G.-M.; methodology, S.G.-M.; software, T.G.-M.; validation, I.T., E.P.-R. and F.I.G.-M.; formal analysis, J.C.-V.; investigation, V.L.-G. and S.G.-M.; resources, G.M.-P. and S.G.-M.; data curation, T.G.-M. and S.G.-M.; writing—original draft preparation, S.G.-M.; writing—review and editing, E.P.-R. and F.I.G.-M.; visualization, I.T.; supervision, F.I.G.-M.; project administration, E.P.-R.; funding acquisition, F.I.G.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministry of Economic Affairs and Digital Transformation (MINECO) of Spain, grant number PCB-010000-2010-23.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Zhang, R.; Xie, X. Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 372–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nelson, A.L.; Dhimolea, E.; Reichert, J.M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 767–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wedegaertner, P.B.; Wilson, P.T.; Bourne, H.R. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 503–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Neves, S.R.; Ram, P.T.; Iyengar, R. G protein pathways. *Science* **2002**, *296*, 1636–1639. [[CrossRef](#)]
5. Strathmann, M.; Simon, M.I. G protein diversity: A distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9113–9117. [[CrossRef](#)]
6. Wilkie, T.M.; Scherle, P.A.; Strathmann, M.P.; Slepak, V.Z.; Simon, M.I. Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: Expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10049–10053. [[CrossRef](#)]
7. Woszczek, G.; Fuerst, E. Ca^{2+} mobilization assays in GPCR drug discovery. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1272*, 79–89. [[CrossRef](#)]

8. Zhu, T.; Fang, L.; Xie, X. Development of a universal high-throughput calcium assay for G-protein-coupled receptors with promiscuous G-protein G α 15/16. *Acta Pharmacol. Sin.* **2008**, *29*, 507–516. [[CrossRef](#)]
9. Liu, K.; Southall, N.; Titus, S.A.; Inglese, J.; Eskay, R.L.; Shinn, P.; Austin, C.P.; Heilig, M.N.; Zheng, W. A multiplex calcium assay for identification of GPCR agonists and antagonists. *Assay Drug Dev. Technol.* **2010**, *8*, 362–374. [[CrossRef](#)]
10. Ma, Q.; Ye, L.; Liu, H.; Shi, Y.; Zhou, N. An overview of Ca²⁺ mobilization assays in GPCR drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, *12*, 511–523. [[CrossRef](#)]
11. Ranasinghe, R.; Eri, R. Pleiotropic Immune Functions of Chemokine Receptor 6 in Health and Disease. *Medicines* **2018**, *5*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ranasinghe, R.; Eri, R. Modulation of the CCR6-CCl20 axis: A potential therapeutic target in inflammation and cancer. *Medicina (Lithuania)* **2018**, *54*, 88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Puri, N.; Roche, P.A. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2580–2585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gómez-Melero, S.; García-Maceira, F.I.; García-Maceira, T.; Luna-Guerrero, V.; Montero-Peñalvo, G.; Túnez-Fiñana, I.; Paz-Rojas, E. Amino terminal recognition by a CCR6 chemokine receptor antibody blocks CCL20 signaling and IL-17 expression via β -arrestin. *BMC Biotechnol.* **2021**, *21*, 41. [[CrossRef](#)]
15. Heydorn, A.; Ward, R.J.; Jorgensen, R.; Rosenkilde, M.M.; Frimurer, T.M.; Milligan, G.; Kostenis, E. Identification of a Novel Site within G Protein α Subunits Important for Specificity of Receptor-G Protein Interaction. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 250–259. [[CrossRef](#)]
16. Kostenis, E.; Martini, L.; Ellis, J.; Waldhoer, M.; Heydorn, A.; Rosenkilde, M.M.; Norregaard, P.K.; Jorgensen, R.; Whistler, J.L.; Milligan, G. A Highly Conserved Glycine within Linker I and the Extreme C Terminus of G Protein α Subunits Interact Cooperatively in Switching G Protein-Coupled Receptor-to-Effector Specificity. *J. Pharmacol. Experim. Ther.* **2005**, *313*, 78–87. [[CrossRef](#)]
17. Offermanns, S.; Simon, M.I. G α 15 and G α 16 Couple a Wide Variety of Receptors to Phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 15175–15180. [[CrossRef](#)]
18. Matsubara, M.; Masaki, S.; Ohmori, K.; Karasawa, A.; Hasegawa, K. Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1315–1326. [[CrossRef](#)]
19. Rojas, E.P.; Maceira, F.I.G.; Guerrero, V.I.L.; Peñalvo, M.G.M.; Maceira, T.G.; Martínez, J.A.M.; Morales, A.M.M. GPCR with Improved Cell Surface Expression. U.S. Patent 9,499,584, W02013113370, 8 August 2013.
20. Zhang, J.H.; Chung, T.D.; Oldenburg, K.R.J. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen* **1999**, *4*, 67–73. [[CrossRef](#)]
21. Lister, M.D.; Sittampalam, G.S.; Iversen, P.W.; Boadt, J.A.; Kahl, S.D.; Bright, S.; Janzen, W.P. Design of Signal Windows in High Throughput Screening Assays for Drug Discovery. *J. Biomol. Screen.* **1997**, *2*, 159–169. [[CrossRef](#)]
22. Thomsen, W.; Frazer, J.; Unett, D. Functional assays for screening GPCR targets. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 655–665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Smith, J.S.; Lefkowitz, R.J.; Rajagopal, S. Biased signalling: From simple switches to allosteric microprocessors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 243–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Meitei, H.T.; Jadhav, N.; Lal, G. CCR6-CCL20 axis as a therapeutic target for autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **2021**, *20*, 102846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tawaraishi, T.; Sakauchi, N.; Hidaka, K.; Yoshikawa, K.; Okui, T.; Kuno, H.; Chisaki, I.; Aso, K. Identification of a novel series of potent and selective CCR6 inhibitors as biological probes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3067–3072. [[CrossRef](#)]
26. Huang, L.; Pi, J.; Wu, J.; Zhou, H.; Cai, J.; Li, T.; Liu, L. A rapid and sensitive assay based on particle analysis for cell degranulation detection in basophils and mast cells. *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 374–383. [[CrossRef](#)]
27. Paz-Rojas, E.; de Gracia Montero-Peñalvo, M.; Luna-Guerrero, V.I.; Maceira, F.I.G.; Morales-Martínez, J.A.; Maceira, T.G.; Aragón-Gómez, A.B.; Quesada-Molina, A.; Marquez-Morales, A.M. Novel Ultrasensitive Cell based Sensors and Use Thereof. U.S. Patent 9,347,942, W02012013204, 2 February 2012.
28. Chen, Y.C.; Chang, Y.C.; Chang, H.A.; Lin, Y.S.; Tsao, C.W.; Shen, M.R.; Chiu, W.T. Differential Ca²⁺ mobilization and mast cell degranulation by Fc ϵ RI- and GPCR-mediated signaling. *Cell Calcium* **2017**, *67*, 31–39. [[CrossRef](#)]
29. Iversen, P.W.; Eastwood, B.J.; Sittampalam, G.S.; Cox, K.L. A comparison of assay performance measures in screening assays: Signal window, Z' factor, and assay variability ratio. *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11*, 247–252. [[CrossRef](#)]

RESEARCH

Open Access



Amino terminal recognition by a CCR6 chemokine receptor antibody blocks CCL20 signaling and IL-17 expression via β -arrestin

Sara Gómez-Melero^{1*}, Fé Isabel García-Maceira¹, Tania García-Maceira¹, Verónica Luna-Guerrero¹, Gracia Montero-Peñalvo¹, Isaac Túnez-Fiñana² and Elier Paz-Rojas¹

Abstract

Background: CCR6 chemokine receptor is an important target in inflammatory diseases. Th17 cells express CCR6 and a number of inflammatory cytokines, including IL-17 and IL-22, which are involved in the propagation of inflammatory immune responses. CCR6 antagonist would be a potential treatment for inflammatory diseases such as psoriasis or rheumatoid arthritis. The aim of this study is to develop an antagonistic monoclonal antibody (mAb) against human CCR6 receptor (hCCR6).

Results: We generate monoclonal antibodies against hCCR6 immunizing Balb/c mice with hCCR6 overexpressing cells. The antibodies were tested by flow cytometry for specific binding to hCCR6, cloned by limiting dilution and resulted in the isolation and purification monoclonal antibody 1C6. By ELISA and flow cytometry, was determined that the antibody obtained binds to hCCR6 N-terminal domain. The ability of 1C6 to neutralize hCCR6 signaling was tested and we determined that 1C6 antibody were able to block response in β -arrestin recruitment assay with IC₅₀ 10.23 nM, but did not inhibit calcium mobilization. In addition, we found in a chemotaxis assay that 1C6 reduces the migration of hCCR6 cells to their ligand CCL20. Finally, we determined by RT-qPCR that the expression of IL-17A in Th17 cells treated with 1C6 was inhibited.

Conclusions: In the present study, we applied whole cell immunization for successfully obtain an antibody that is capable to neutralize hCCR6 signaling and to reduce hCCR6 cells migration and IL-17 expression. These results provide an efficient approach to obtain therapeutic potential antibodies in the treatment of CCR6-mediated inflammatory diseases.

Keywords: Th17 cells, CCR6, Inflammation, Therapeutic antibody, GPCR, Bias signaling

* Correspondence: sara.gomez.melero@gmail.com

¹Canvax Biotech, Parque Científico y Tecnológico Rabanales 21, c/Astrónoma Cecilia Payne s/n, Edificio Canvax, 14014 Córdoba, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

G-protein-coupled receptors (GPCRs) represent 4% of the human genome and are one of the most attractive therapeutic targets due to mediate many important physiological functions [1]. These receptors are characterized by seven transmembrane helices with three intracellular loops, three extracellular loops, an extracellular N-terminal domain and an intracellular C-terminus. The human CC chemokine receptor 6, hCCR6, is a class A of GPCR expressed in a particular diverse range of leukocytes including T cells (specifically Th17 cells and Treg cells), B cell, neutrophils and subsets of dendritic cells [2].

Chemokine–chemokine receptor interaction supports numerous inflammatory, autoimmune conditions and metastatic process in many cancers. In inflammatory diseases, the critical function of hCCR6 is maintaining leukocyte homeostasis through the recruitment of Th17 and Treg cells to sites of inflammation [3]. The only known endogenous chemotactic ligand for hCCR6 is CC chemokine ligand 20 (CCL20) which is produced by Th17 cells. The axis hCCR6/CCL20 influences in the respiratory, gastrointestinal, skeletal, and reproductive systems through pleiotropic immune mechanisms. Some studies indicated that upon CCR6-CCL20 binding is activated a myriad of signaling pathway through heterotrimeric G protein (α), calcium mobilization, PLC- β , phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, ERK1/2 phosphorylation, actin polymerization, and beta arrestins [4]. Of particular relevance in rheumatoid arthritis, psoriasis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease and cancer; inhibition of the hCCR6 signaling might prove to be a useful therapeutic strategy [2, 5].

Despite being one of the largest classes of proteins, the majority of GPCRs remains undrugged, with only approximately 100 GPCRs targeted with small molecules or peptides. Antibodies against GPCRs offer an alternative to conventional small molecule drugs, that are often unsuccessful, and could provide valuable new treatment options [6]. Nevertheless, to date, there is no therapeutic antibody against hCCR6 approved [7] and develop an antagonizing monoclonal antibody (mAb) should be a potential alternative to conventional small molecule drugs and an effective strategy for the treatment of certain inflammatory and autoimmune diseases.

The generation of relevant antibodies against GPCRs with the required specificity and functionality remains a challenge. A critical factor is obtaining sufficient amounts of functional antigen in biologically relevant formats. GPCRs often expressed at low levels in cells and are very unstable when purified. The ideal antigen format would be homogenous, stable and must contain the relevant post translational modifications. Usually,

antibodies obtained have no effect on receptor function and have limited utility as therapeutic agents [7–9].

In the present study, we used immunization with whole cells overexpressing hCCR6 receptor to establish a monoclonal antibody against hCCR6. Antibodies that bind human CCR6 were identified and, the best antibody obtained, was selected for further detailed in vitro characterization which is described here. We successfully obtained a monoclonal antibody antagonistic of β -arrestin signaling that recognizes the N-terminal domain, inhibits the migration of hCCR6 cells to CCL20 and reduces the expression of IL-17A on Th17 cells.

Materials and methods

Plasmids

Coding sequences of human CCR6 (Gb: NM_004367), mouse CCR6 (Gb: NM_001190333), human CCR1 (Gb: NM_001295), human CCR3 (Gb: NM_001837), human CCR4 (Gb: NM_005508), human CCR5 (Gb: NM_000579), human CXC1R (Gb: NM_000634), human CXC2R (Gb: NM_001557), human CXC3R (Gb: NM_001504) and human CXC4R (Gb: NM003467) were obtained by synthesis flanked with the recognition sites of 5'*Xho*I and 3'*Not*I. They were cloned in frame with the signal peptide IgK, a short sequence to improve GPCR expression [10], and a TAG sequences (c-myc or HA) into the pcDNA3.1 vector by the restriction with the indicated enzymes.

Construction of chimeric receptors was carried out by overlap extension polymerase chain reaction using human CCR6 or murine CCR6 vectors. The integrity of the constructs was confirmed by sequence analysis (Stabvida).

Cell culture and transfection

All cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). P815 (murine mastocytoma, ATCC TIB-64) cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), RBL-2H3 (rat basophilic leukemia, CRL-2256) in Eagle's minimum essential medium (EMEM)/RPMI-1640 medium and NS1 (murine myeloma cell, ATCC TIB-18) in RPMI-1640 medium. Hybridoma cells were maintained in RPMI-1640 medium. All media (Gibco) were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 2 mM L-glutamine (Lonza), 100 U/mL penicillin (Gibco), and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

RBL and P815 cells were transfected with the expression vectors obtained using Canfast (Canvax Biotech) according to the manufacturer's instructions. Following transfection, stably transfectants were cultured with 0.5 mg/mL G418 (Phytotechnology). The GPCRs expression levels were determined using FACSCalibur flow cytometer

(Becton Dickinson). To confirm the plasmid transfection, we used flow cytometry against c-myc (EQKLISEEDL) tag or HA tag (YPYDVPDYA), using anti-HA FITC (Miltenyi Biotech) and mouse anti c-myc (9E10, in house) antibodies, respectively.

Animals

Balb/C mice were used to the immunization program. Animals were housed in the Animal Experimentation Unit of Cordoba University (Cordoba, Spain) under standard colony conditions: 12 h light: 12 h darkness cycle (lights on at 7:00 a.m.), controlled room temperature (22 ± 2 °C), with free access to food and water.

This study was carried out according to the guidelines of the Directive of 24 November 1986 (86/609/ECC) approved by the European Communities Council and RD 53/2013 passed by the Presidency Minister of Spain (BOE, 8 February, 2013). The protocols were approved by the Bioethics Committee of the Junta de Andalucía with the number 09/7/15/280.

Immunization and hybridoma generation

To establish an anti-hCCR6 mAb, female BALB/c mice of 8 weeks old were immunized with P815 cells c-myc tagged overexpressing the human CCR6 receptor. For immunizations, P815-c-myc-hCCR6 cells were harvested and incubated with 10 µg/mL of mitomycin C (Sigma) for 60 min at 37 °C and then washed three times and re-suspended in phosphate-buffered saline (PBS). Each mouse was injected intraperitoneally with 10^7 mitomycin C-treated cells six times at 2-week intervals, followed by three injections once a month. One week after the last boost, sera were collected by centrifugation and titers for specific antibodies were determined by cell membrane ELISA. Selected mouse was boosted intravenously with 10^7 cells 4 days prior to sacrifice. Collected splenocytes were fused to NS1 mouse myeloma cells using the polyethylene glycol (Sigma) fusion method [11]. Two weeks post-fusion, culture supernatants were screened by flow cytometry for hCCR6-specific antibodies using RBL-HA-hCCR6 cells to remove the clones that reacted with c-myc and with P815 cells. Positive hybridomas were subcloned by limiting dilution.

Flow cytometry

For the screening of hybridoma cells and characterization of purified mAbs against hCCR6 flow cytometric analysis was performed. Undiluted hybridoma supernatants or different concentrations of purified mAbs were incubated with RBL cells stably expressing HA-hCCR6 or mock transfectants for 20 min at 4 °C. After washing with PBS, cells were stained with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (1:60, Sigma) for 10 min at 4 °C and were analyzed by flow cytometry using a

FACSCalibur (Becton Dickinson). A total of 10,000 events were acquired and data were analyzed with BD CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Anti-hCCR6 control antibodies

The sequences of the variable domains of the anti hCCR6 control positive, KM4703 (WO/2013/005649, [12]), were retrieved from the patent literature available in open access. The V_H and V_L domains corresponding sequences were synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT) and they were fused in frame with the mouse heavy chain constant domains or mouse light chain (κ) constant domains together with elements to express whole IgG heavy chain in mammalian cells. Heavy and light chain IgG expressing vectors were transfected into ExpiCHO cell line (Gibco) and the antibody was purified of culture supernatant. Anti-NGFR (HB8737, in house) was used as an isotype control antibody.

Antibody purification

Immunoglobulins were affinity-purified from the culture supernatant using Protein G Sepharose columns (HiTrap Protein G HP, GE Healthcare) according to the manufacturer's protocol in AKTA Prime Plus (GE Healthcare). Affinity-purified mAbs were separated by SDS-PAGE on 10% acrylamide gels and stained with Coomassie brilliant blue. The concentration of purified immunoglobulins was determined by UV absorbance at 280 nm. The isotype of the 1C6 antibody was determined using a mouse mAb isotyping kit (SinoBiological) according to the manufacturer's instructions.

Cell membrane extraction

To extract the membrane fractions, cell pellets (2×10^7 cells) from RBL-HA-hCCR6 or mock transfectants were resuspended in 4 mL of lysis buffer (Sucrose 250 mM, HEPES 4 mM, EDTA 1.5 mM, pH 7.4) with protease inhibitors (PMSF 1 mM, leupeptin 1 µg/mL, pepstatin 1 µg/mL, aprotinin 1 µg/mL). The cells were then transferred into Dounce homogenizer and 15–20 strokes were applied to produce cell lysates. Unbroken cell, nuclei and cell debris were removed by centrifuging the lysates twice at 800 g for 10 min. The supernatants were then centrifuged at 1000 g for 10 min. Finally, the supernatant obtained was centrifuged at 15,000 g for 25 min. The membrane pellet was resuspended in PBS and protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad). All fractionation steps were carried out at 4 °C.

ELISA

Sera from immunized mice and binding of purified mAbs to hCCR6 N-terminal region were analyzed by ELISA. To test the serum titer, cell membrane solutions

were coated directly at 10 µg/mL in buffer coating (Na₂CO₃ and NaHCO₃, 0.1 M, pH 9.6) onto 96-well maxisorp plates (Thermo) overnight at 4 °C. To assess binding of mAb against to the hCCR6 N-terminal region, a peptide with the N-terminal fragment of hCCR6 (aa M1–L47, Canvac Biotech) was coated at 1 µg/mL in buffer coating onto a 96-well plate overnight at 4 °C. Then, the plate was washed 3 times with PBS containing 0.05% Tween-20 and blocked for 1 h at 37 °C with PBS plus 5% bovine serum albumin (BSA). Following this, the plate was incubated for 2 h with serially diluted serum or 0.5 µg/mL of purified mAbs in PBS-0.5% BSA. After washing with PBS-0.05% Tween 20, the plate was incubated for 1 h at 37 °C with a 1:8000 dilution of horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma). After final washes, bound IgG was detected using the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system (Medicago). The absorbance was measured at 450 nm using a FLUOStar OPTIMA plate reader (BMG Labtech).

The concentration of CCL20 in conditioned media was measured using a specific Human CCL20/MIP-3 Alpha Duoset ELISA (R&D Systems) following the manufacturer's instructions.

Epitope mapping

RBL HA tagged cells expressing the first, second and third extra-cellular loops, (ECL1, ECL2, and ECL3) and N-terminal region of hCCR6 embedded into mCCR6 sequence were obtained and used in a standard flow cytometry to elucidate epitope mapping of the mAb 1C6. The cells were stained with 1 µg/mL of hCCR6 antibody 1C6 followed by goat anti-mouse IgG FITC antibody (Sigma). Interaction between mAb and swapped mutants was analyzed by flow cytometry. To validate expression of swapped mutants, mouse anti-HA FITC antibody (Miltenyi Biotech, 1:10) was used.

Cross-reactivity

Stably transfected RBL HA tagged cells with pcDNA3.1 plasmid comprising synthetic gene of human CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CXCR3 and CXCR4 receptors were obtained. To validate expression of chemokine receptors on transfected cells, mouse anti-HA FITC antibody (Miltenyi Biotech, 1:10) was used. These cell lines were labeled with the hCCR6 antibody obtained to evaluate their specificity by flow cytometry.

Calcium flux assay

To assess antagonistic activity of anti-hCCR6 1C6 antibody in calcium mobilization we used FRIDA assay (WO/2012/013204, [13]). Mobilization of Ca²⁺ was determined using RBL-hCCR6 cells. The cells were plated in 384-well plates (Corning, 384-well flat-bottom black

polystyrene microplates) at 5000 cells per well and cultured for 48 h at 37 °C, 5% CO₂. Then, cell media was aspirated and replaced with 20 µL anti-hCCR6 antibodies diluted in BSS (25 mM HEPES/NaOH, 1.2 mM KH₂PO₄, 65 mM NaCl, 5.65 mM KCl, 0.6 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5.6 mM Glucose and 0.1% BSA) per well. Cells were incubated 15 min at 37 °C, 5% CO₂. Then, the cells were incubated at 37 °C for 60 min with CCL20 (Peprotech) ligand at EC₈₅ concentration (10 nM) and 1 mM 4-Methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide substrate (Glycosynth) in BSS protected from light. The fluorescence was measured (excitation: 360 nm, emission: 470 nm) using a FLUOStar OPTIMA plate reader (BMG Labtech). Data was expressed as normalized percent inhibition (NPI) in which the difference between the sample measurement and the mean of the positive controls (ligand at EC₈₅ without antibody) is divided by the difference between the means of the measurements on the positive and the negative controls (without ligand).

β-Arrestin recruitment assay

The PathHunter™ protein complementation assay (DiscoverX Corporation) was performed according to the manufacturer's instructions with minor modifications to evaluate antagonistic activity of anti-hCCR6 1C6 antibody in β-arrestin recruitment. The cells were plated in 384-well plates (Greiner bio-one, 384-well flat-bottom white polypropylene microplates) at 7000 cells per well and cultured for 48 h at 37 °C, 5% CO₂. Next, the cells were incubated at 37 °C for 90 min with anti-hCCR6 antibodies and CCL20 (Peprotech) ligand at EC₈₅ concentration (10 nM) in assay media. Gal-Screen substrate (Applied Biosciences) was then added and incubated at 23 °C protected from light for 60 min before measuring luminescence using a plate reader (Perkin Elmer EnVision). The normalized percent inhibition (NPI) was calculated as described above and the IC₅₀ value was generated using GraphPad Prism software using a model 'log [inhibitor] vs. response'.

Chemotaxis assay

Chemotaxis was assayed using 6.5 mm transwell tissue culture polycarbonate inserts with 8 µm pores (Corning). For the assay, RBL-2H3 cells stably expressing hCCR6 were washed once with PBS and, for inhibition assay, incubated with 1C6 antibody for 30 min. Then, cells were washed with PBS, resuspended at a density of 10⁶ cells/mL in assay buffer (DMEM containing 2 mM glutamine and 0.2% BSA) and two hundred of cells were added into the upper chamber of transwell which was contained in a well with 600 µL of assay buffer with or without 125 nM of human CCL20. The assay was incubated for 22 h at 37 °C (5% CO₂). Cells that migrated to the lower chamber were collected and stained with 8 µM of calcein

AM (Santa Cruz Biotechnology) and the fluorescence signal was measured (excitation: 485 nm, emission: 530 nm) using a FLUOStar OPTIMA plate reader (BMG Labtech). The chemotactic index was calculated by dividing the number of migrated cells to CCL20 by that in absence of chemokine (background).

Human T cells isolation, culture and Th17 cells differentiation

Buffy coats were obtained from healthy human donors (Hospital Reina Sofia, Córdoba) with fully informed consent, conducted in accordance with ethical standards of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Hospital Reina Sofia (CEIC4603/310/30062020).

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified by density gradient centrifugation using Histopaque-1077 (Sigma) for 30 min at 400 g, at room temperature. T cells were isolated by negative selection using Pan T Cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotec) and were stimulated via CD3/CD28 (Life technologies) at 1:2 bead to cell ratio. Cells were culture at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in X-VIVO 15 (Lonza) medium supplemented with 10% FBS and, for Th17 polarizing conditions, 20 ng/mL IL-1 β (Peprotech), 30 ng/mL IL-6 (Peprotech), 30 ng/mL IL-23 (Peprotech), 2.25 ng/mL TGF- β 1 (Peprotech) and 2.5 μ g/mL anti-IL4 (Mabtech) were added. After 8 days, cells were plated at 5 \times 10⁵ cells/mL in media containing 5 ng/mL IL-1 β , 7.5 ng/mL IL-6, 7.5 ng/mL IL-23, 0.56 ng/mL TGF- β 1 and 0.625 μ g/mL anti-IL4 or in absence of polarizing conditions for control cells and with or without 62 nM of anti-CCR6 antibodies for additional 5 days. Then, cells were collected for total RNA isolation and supernatants were collected and stored at -80 °C for further cytokine measurement.

Quantitative real-time PCR

RNA was extracted from Th17 cells o control T cells according to the manufacturer's protocol for PRIMEZOL reagent (Canvax Biotech). Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Canvax Biotech) was used to synthesize cDNA from the total RNA using reverse primers. Quantitative Real-Time PCR assay (qRT-PCR) for measurement IL-17A and β -actin mRNA expression was performed using StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The following primers and probes sequences were used (5'-3'): IL-17A forward TGGGAA GACCTCATTTGGTGT, IL-17A reverse GGATTTCTGTG GGATTGTGAT, IL-17A probe FAM-CTGCTGCTGA GCCTGGAG-BHQ1, β -actin forward GAAACTACCT TCAACTCCATC, β -actin reverse CTTGCTGATC CACATCTGCTG and β -actin probe FAM-ACCCAGCA CAATGAAGATCAAGATCAT-TAMRA. Relative RNA

levels in the samples were determined using standard curves prepared from five-fold serial dilutions of cDNA from the pool of the samples. Relative expression levels of gene were normalized to β -actin in the samples and quantification was performed using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. All samples were measured in duplicate and the average value of both duplicates was used as the quantitative value.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using GraphPad Prism version 8.0.1 software (GraphPad Software). The statistical differences for the mean values were analyzed using one way ANOVA with Tukey test and are indicated with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; and ****, $p < 0.0001$.

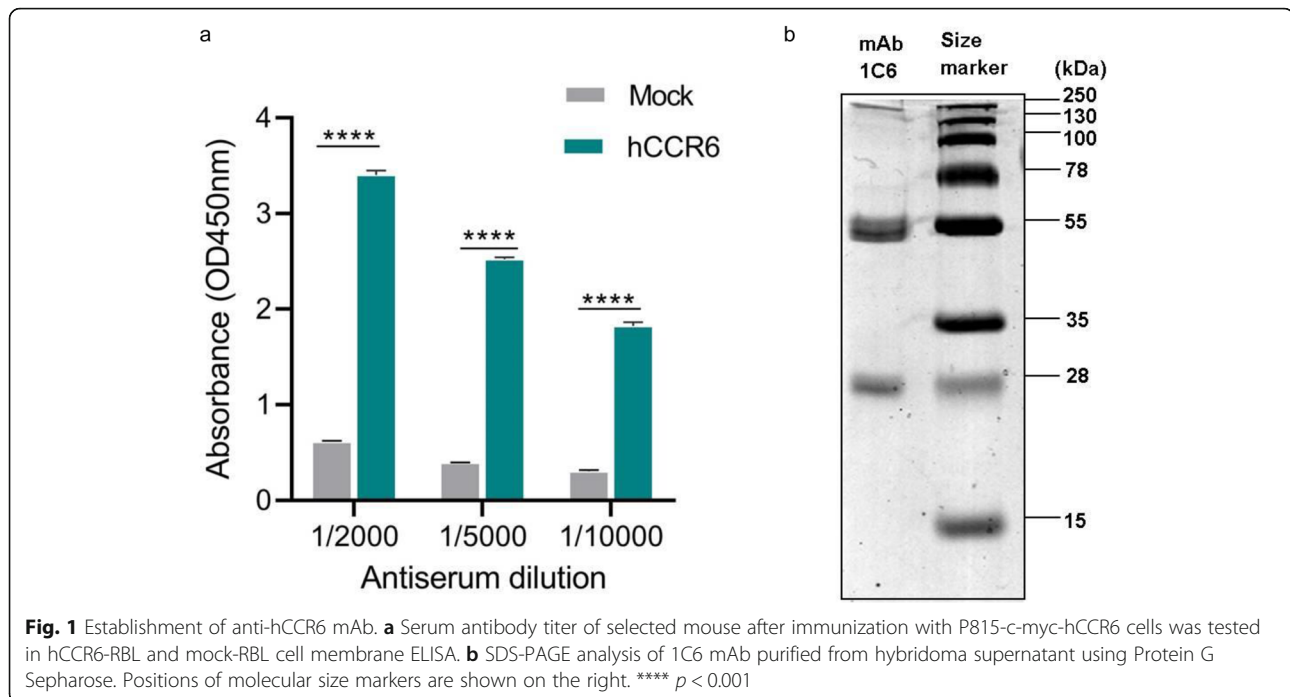
Results

Generation of monoclonal antibodies to human CCR6 by immunization with cells

To generate antibodies against hCCR6, Balb/C mice were immunized with whole P815 cells which express high levels of transfected c-myc tagged hCCR6. Immunization of mice induced high serum titers of human CCR6 specific antibodies, as demonstrated by cell membrane ELISA. Serum antibodies were found to bind to cell membrane of RBL-HA-hCCR6 up to 1:10,000 dilutions, but not to cell membrane of mock-transfected RBL cells (Fig. 1A). Mouse with the highest hCCR6 specific antibody titer was sacrificed and a fusion was carried out. Approximately 679 hybridoma clones were generated by fusing NS1 myeloma cells with splenocytes from immunized mouse. Flow cytometry screening of hybridoma supernatants with HA-tagged hCCR6 RBL cells was used to remove the hybridomas that reacted with c-myc tag or P815 cells. Screening resulted in the identification of nine hybridoma candidates and, following by the limiting dilution step, one specific clone to hCCR6, 1C6, was obtained. The selected mAb 1C6 bound to hCCR6 cells but not to mock-transfected cells. These results indicate that mAb 1C6 was specific for the hCCR6 receptor protein and not for the c-myc-tag or the immunization P815 cells. Immunoglobulin was purified from the 1C6 hybridoma culture supernatant using Protein G Sepharose, and the purity and recovery of mAb 1C6 was analyzed by SDS-PAGE (Fig. 1B). The average yield of functional mAb 1C6 was approximately 2.2 mg from 100 mL of culture supernatant. The isotype of the mAb 1C6 was determined to be IgG1.

1C6 mAb specifically recognizes the hCCR6 without cross-reaction with other GPCRs

To confirm the specificity observed during the screening procedure with hybridoma supernatants, we checked the



ability of the purified mAb hCCR6 to recognize hCCR6 expressed at the surface of RBL or mock-transfected cells. The staining with the control isotype antibody, control KM4703 antibody, 1C6 antibody and control anti-HA antibody were compared (Fig. 2A–D). At the same mAb concentration (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1C6 showed 1.4-fold higher mean fluorescence intensity than KM4703 (MFI 97.3 vs. 68.8), but not stain mock transfectants. At lower concentrations (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 1C6 still stained more than 75% of hCCR6 cells (Fig. 2E–H), this indicates high mAb 1C6 affinity for hCCR6.

Moreover, flow cytometry analyses revealed that mAb 1C6 did not recognize other human GPCRs. We observed that 1C6 did not cross-react with stable RBL transfectants expressing other humans GPCRs, including chemokine (C-C motif) receptors CCR1, CCR3, CCR4, CCR5 and chemokine (C-X-C motif) receptors CXC1R, CXC2R, CXC3R, CXC4R (Fig. 3), which have 25–45% identity with hCCR6. These data demonstrate that 1C6 is a specific mAb for hCCR6.

The 1C6 mAb recognizes the N-terminal region of hCCR6

Although human and mouse CCR6 share only 26% amino acid sequence identity (264 amino acid substitutions out of a total of 356 amino acid residues), the possibility that the mAb 1C6 recognized mouse CCR6 still remained. We showed, using mCCR6-stably transfected RBL cells, that the mAb 1C6 only recognized cells expressing human CCR6 and we observed no appreciable binding to cells expressing murine CCR6 (Fig. 4B).

To determine the epitope of mAb 1C6, we generated loop-swapped mutants of hCCR6 and stably transfected RBL cells with them, in which one of the three extracellular loops (ECLs) or N-terminus was changed to the corresponding region of mCCR6. The identity of ECLs and N-terminus for hCCR6 to mCCR6 was as follows: N-terminus (M1 to L47), 38%; ECL1 (S105 to K119), 66%; ECL2 (S181 to K211), 65%; and ECL3 (N280 to V303), 54%. As shown in Fig. 4 replacement of ECL1, ECL2 or ECL3 of hCCR6 did not affect the binding of mAb 1C6 to the chimeric CCR6, whereas replacement of the N-terminus of hCCR6 with mCCR6 resulted in loss of the binding of mAb 1C6 to hCCR6 (Fig. 4C), indicating that the epitope of 1C6 included N-terminal domain.

These results were confirmed by ELISA against peptide to the N-terminal (aa 1–47) region of hCCR6. When compared 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of KM4703 and 1C6 antibodies, we observed that KM4703 not recognized N-terminal peptide while mAb 1C6 bound to N-terminal region (Fig. 4G).

Functional characterization of 1C6 antibody

For functional characterization of antibody 1C6 potency to inhibit the activation of hCCR6, β -arrestin recruitment and calcium flux were performed.

First, the capacity of the mAb 1C6 to inhibit hCCL20-mediated Ca^{2+} flux in CCR6-expressing cells was determined. The addition of mAb 1C6, even at a concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, did not reduce a Ca^{2+} flux in hCCR6-RBL cells (Fig. 5A), showing that mAb 1C6 did

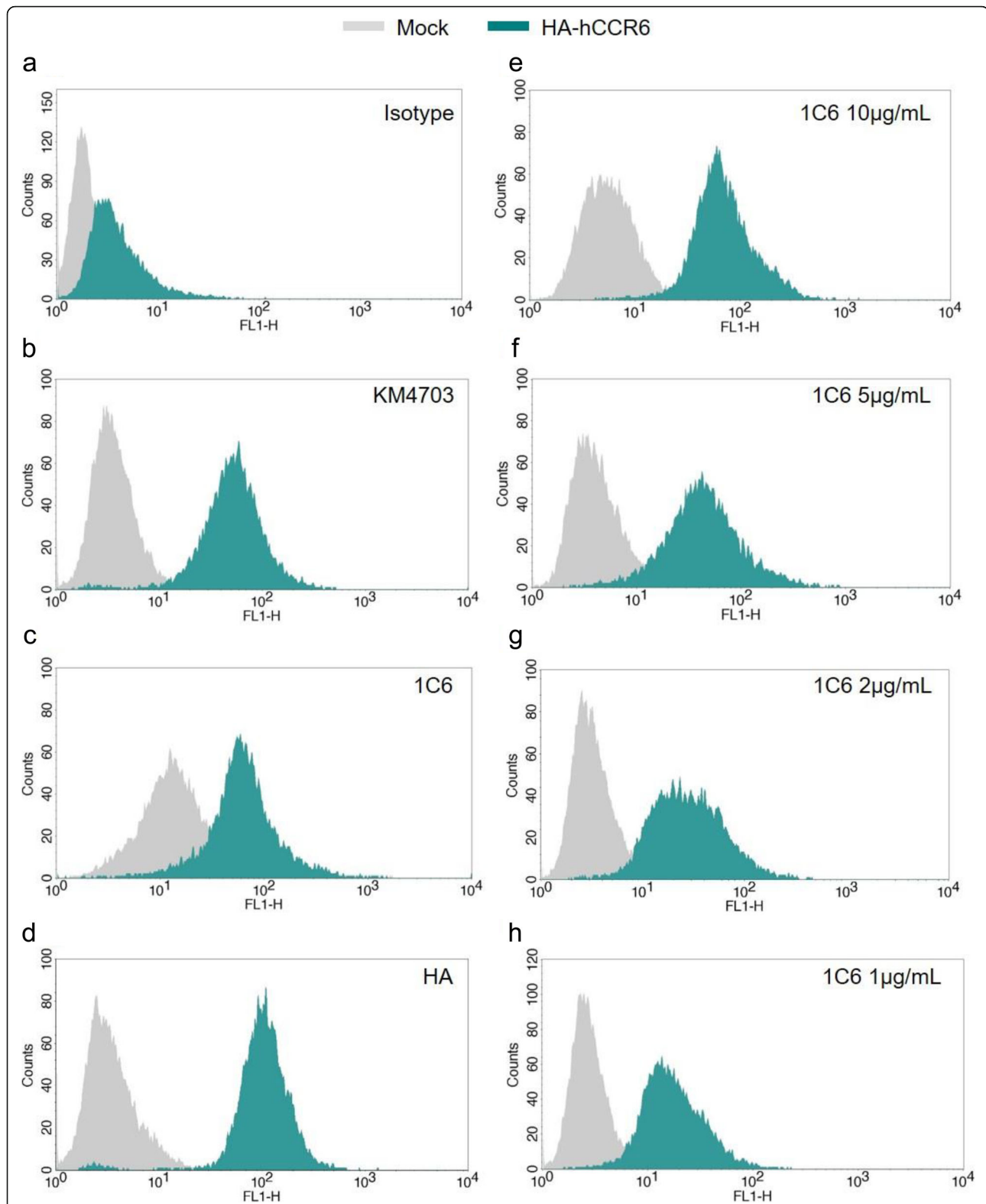
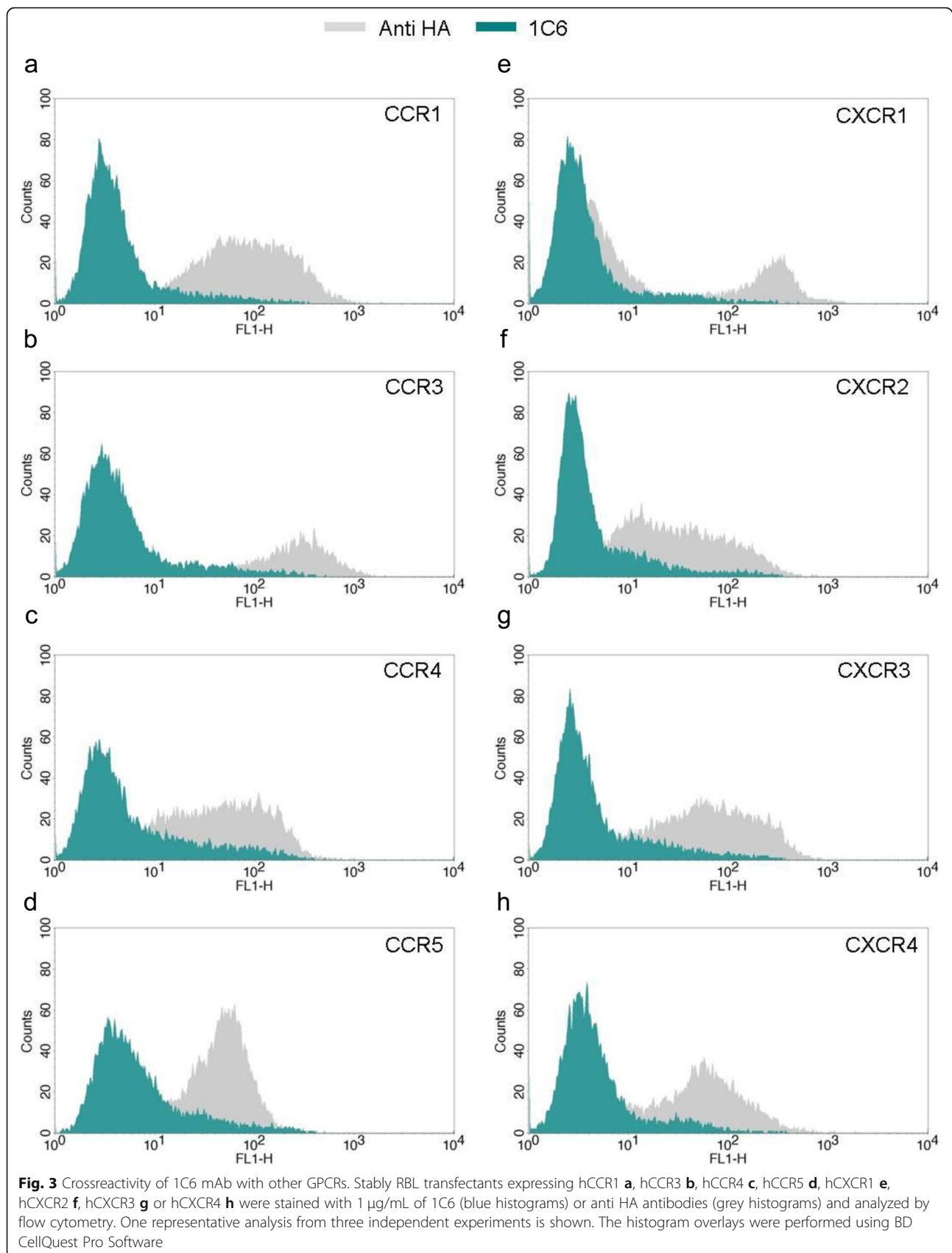


Fig. 2 Binding of anti-hCCR6 mAb to RBL transfected cells with hCCR6. **a-d** Comparison of the reactivity against mock cells and HA-hCCR6-expressing RBL cells between control isotype **a**, KM4703 **b**, 1C6 **c** and HA **d** antibodies at 20 µg/mL. **e-h** Representative flow cytometry analysis of RBL-hCCR6 and mock cells stained with different doses of mAb 1C6 (1–10 µg/mL). Blue histograms of hCCR6⁺ cells are superimposed over grey histograms from mock transfectants. One representative analysis from three independent experiments is shown. The histogram overlays were performed using BD CellQuest Pro Software



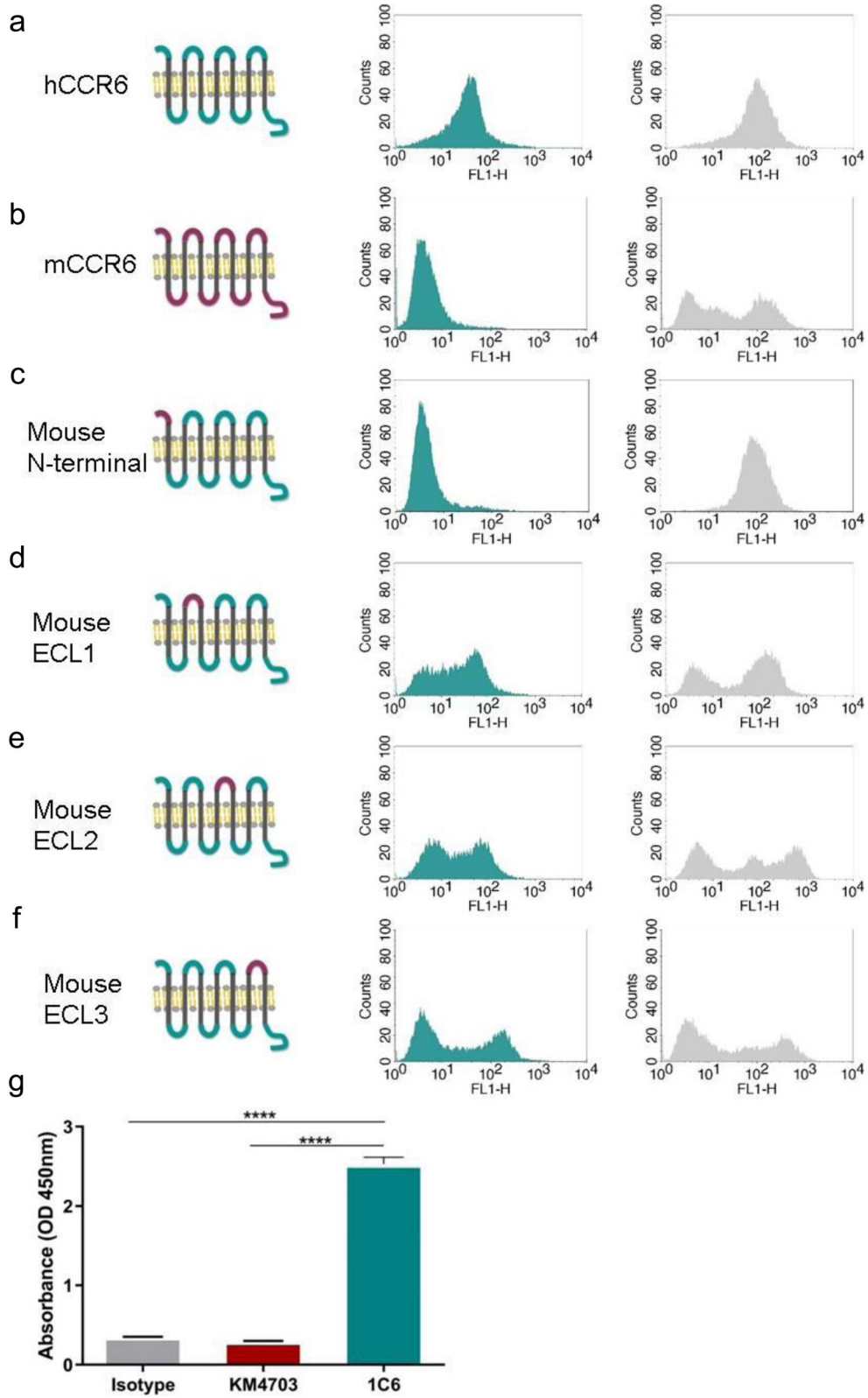


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 4 Epitope mapping. **a–f** Extracellular domains and N-terminal of hCCR6 were swapped with the homologous region of mCCR6. Flow cytometric analysis was performed using 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of mAb 1C6 (blue histograms) or anti-HA (grey histograms) for staining hCCR6 **a**, mCCR6 **b** or swapped hCCR6 mutants **c–f** expressing HA tagged RBL cells. One representative analysis from three independent experiments is shown. **g** Binding of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of isotype, KM4703 and 1C6 antibodies to human CCR6 N-terminal region by ELISA. Means and SD of triplicates are plotted. **** $p < 0.001$

not have antagonistic activity on calcium signal. In contrast, KM4703 anti-hCCR6 control, at a concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was an inhibitor of Ca^{2+} response.

β -arrestin recruitment was also measured with PathHunter β -arrestin GPCR assay system. In the antagonist assay, when compared the effect of mAbs at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ we observed that mAb 1C6 showed 32% inhibition of signal, however, KM4703 and isotype showed minimal inhibition of CCL20 response (Fig. 5B). These results suggest that mAb 1C6 had antagonistic activity specifically for hCCR6 in this assay. In addition, the capacity of mAb 1C6 to inhibit the CCL20 induced β -arrestin recruitment was also determined at various concentrations. As shown in Fig. 5C, mAb 1C6 inhibited CCL20-

induced arrestin recruitment in a dose-dependent manner, with IC_{50} value of 10.23 nM. These results indicate that mAb 1C6 has antagonist effect via β -arrestin.

1C6 Inhibits the chemotaxis of CCR6⁺ cells

To determine the ability of 1C6 to block the migratory response of RBL-HA-hCCR6 cells to CCL20, chemotaxis experiments were performed. In order to quantify the cell migration ability to the hCCR6 ligand, cells were assayed with different concentration of CCL20 showing significant migration to CCL20 in a dose-dependent manner (Fig. 6A). The effect of 1C6 on transfected over-expressing hCCR6 cells migration in response to CCL20 was investigated and a decrease of chemotactic index

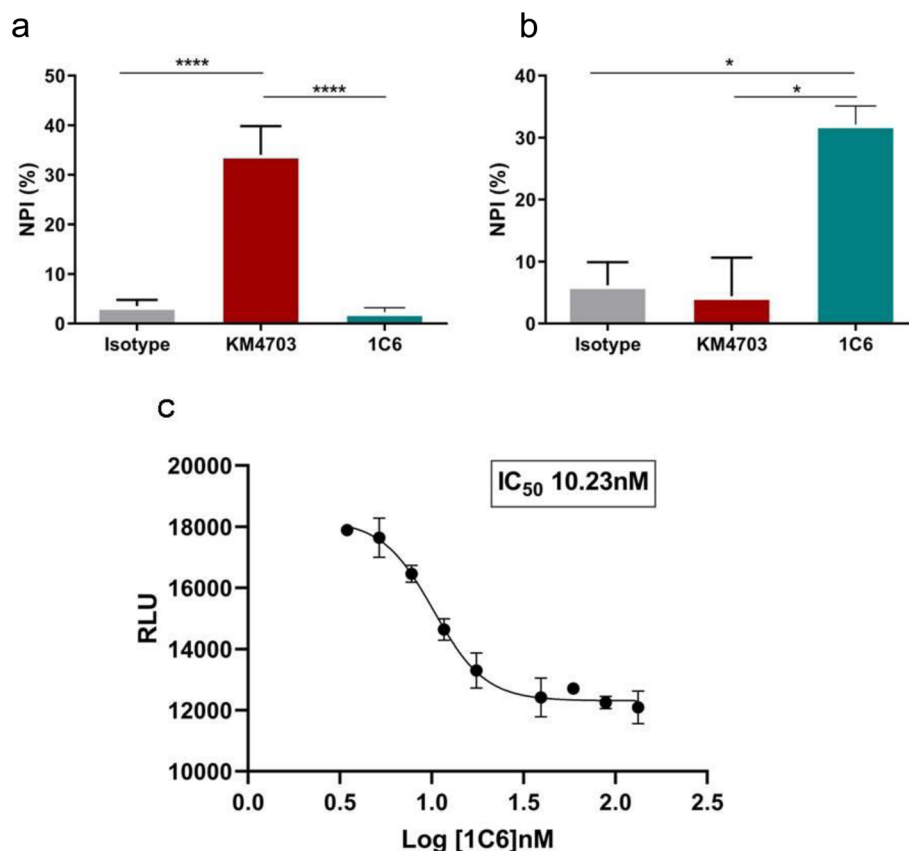


Fig. 5 Characterization of mAb 1C6 effect on ligand-induced signaling. **a, b** Antagonistic potency of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1C6, KM4703 and mouse IgG1 was assessed against 10 nM of CCL20 on calcium flux **a** and β -arrestin **b** assays. Data were expressed in terms of normalized percent inhibition (NPI). **c** Assessment of inhibition was carried out in the presence of increasing concentrations of purified 1C6 antibody. Data from β -arrestin assay were expressed in terms of relative luminescence units (RLU). Means and SD of triplicates are plotted. * $p < 0.05$; **** $p < 0.001$

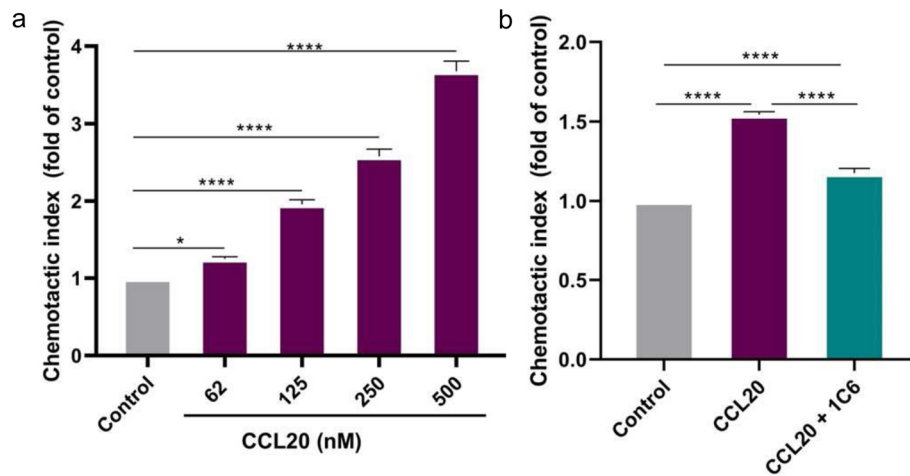


Fig. 6 Inhibition of CCL20 mediated chemotaxis by 1C6 antibody. **a** Transwell chemotaxis assay on RBL-HA-CCR6 cells in the presence of increasing concentration of CCL20. The migrated cells were analyzed at 22 h of culture. **b** Assessment of hCCR6 cells chemotactic response to 125 nM CCL20 was carried out in presence or absence of 20 μ g/mL 1C6. The chemotaxis index was calculated using the cells migrated in presence of CCL20 by the cells migrated in absence of CCL20 (control). All data are expressed as the mean \pm SD of triplicated samples. * $p < 0.05$; **** $p < 0.001$

was detected. As shown in Fig. 6B the 1C6 antibody inhibits ligand-induced chemotaxis, decreasing 68% of cell migration to ligand at this chemokine concentration.

1C6 reduce IL-17A expression by Th17 cells but not affect CCL20 production

The expression of CCL20, the only known ligand for CCR6, was analyzed by/in ELISA. In Th17 cells, CCL20, was produced a 3 ng/mL and there was no production in undifferentiated control T cells. The treatment of Th17

cells with 1C6 and KM4706 antibodies did not affect CCL20 production (Fig. 7A).

Effects of anti-CCR6 antibodies on IL-17A expression by human Th17 cells or undifferentiated control cells were determined by real-time PCR. IL-17A mRNA was specifically expressed in Th17 cells, which indicated proper differentiation of Th17 cells in vitro. To determine the effect of anti-CCR6 antibodies on IL-17A expression, human Th17 cells or undifferentiated control cells were culture with 1C6 or KM4703 antibodies for up to 5 days and then analyzed IL-17A mRNA

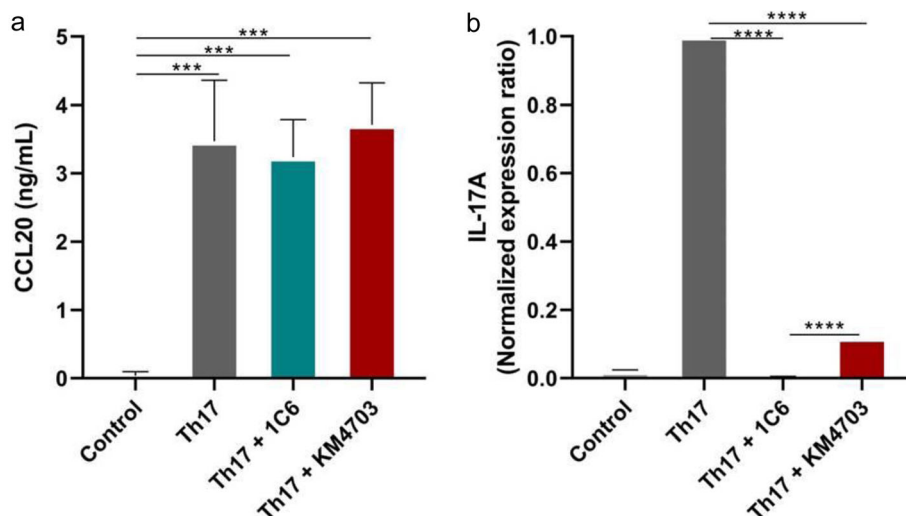


Fig. 7 Effect of 1C6 antibody on Th17 cells. Human Th17 cells or control cells without Th17 polarizing conditions were culture with anti-CCR6 antibodies for 5 days. **a** The concentration of CCL20 in the cell culture supernatants was measured by ELISA. Means and SD of triplicates are plotted. *** $p < 0.01$. **b** The mRNA expression of IL-17A was measured by real-time PCR. Data were normalized to the reference gene β -actin and the normalized expression ratio was calculated using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Means and SD of duplicates are plotted. **** $p < 0.001$

expression. Although KM4703 decreased the expression of IL-17A, the antibody 1C6 showed strong response and completely abolished IL-17A expression (Fig. 7B).

Discussion

Homeostasis disruption of CCR6/CCL20 axis plays a critical role in inflammation and autoimmune diseases, suggesting the potential of CCR6 as therapeutic target for patient treatment [5, 14, 15]. Antagonism of CCL20 binding to hCCR6 provides a suitable strategy to reduce symptoms of Th17-type inflammatory diseases [16, 17]. In the study reported here, we describe the generation and characterization of a specific anti-human CCR6 antibody with antagonistic activity.

When attempting to generate monoclonal antibodies capable of recognizing the native protein, it is also critical to use the target protein in its native conformation, not only in the immunization step, but also for the screening procedure [18]. Immunization with the purified form of the native receptors is not feasible due to the technically difficult to obtain this immunogen [19]. Only a few residues of extracellular loops and N-terminal domain are exposed as potentially immunogenic regions but the immunization of mice with peptides sequences of extracellular domains failed to induce antibodies reactive against native CCR6. Therefore, obtain monoclonal antibodies with functional activity remains a challenge. There are multiple antigen formats for immunization such a DNA, membranes, whole cells, virus-like particles (VLP), proteoliposomes, peptides and lipid nanodiscs [19–21]. Whole cells over-expressing GPCRs on the surface may be used as a useful immunogen because this method of immunization has the advantage that the over-expressing cell line presents the GPCR to the immune system in its native conformation and provides the highest level of stability. Moreover, this approach allows immunize with an antigen syngeneic expressing cell, which is more closely matched genetically to the host animal, maximizing specific immune response to the target membrane protein [22].

To generate hCCR6 antibody, we applied whole cells immunization with cell line overexpressing human CCR6 receptor that maintaining the conformational structure of hCCR6. Using these cells as antigen, we successfully obtained a functional antibody, 1C6, against hCCR6. Dreyer et al. reported a relation in the specific clones obtained in a fusion with elevated levels of target antigen expression [18]. Probably our results are related with the high level of CCR6 expression in our immunization cell line. Therefore, whole cells overexpressing target immunization could be a powerful approach to generate specific monoclonal antibodies against CCR6, and maybe against others GPCRs.

Although substantial progress has been made in generating therapeutic mAb candidates against a broad range of GPCR targets [23] the required specificity and selectivity is a problem for receptors in which drugs interfering with more receptors than the interest receptor [8]. Small molecules are known to be less selective and, generally, have less efficacy and potency than monoclonal antibodies [24]. The antibody 1C6 generated here was highly specific for human receptor, did not recognize the murine receptor and flow cytometry experiments, using stably transfected cells with other human chemokine receptors, showed that did not cross-react with related chemokine GPCRs. This unique specificity is an important advantage against small molecules, because they often bind non-specifically to other family members of GPCRs [8]. These data demonstrate that immunization using transfected cells with high levels of GPCR expression can be a useful strategy to obtain antibodies specific for the chemokine receptor target.

The N-terminal domain has a critical role for ligand recognition and activation of most GPCRs. Several authors suggested that the development of drugs or therapeutic antibodies against N-terminal, which have their activity blocking the chemokine binding, have potential as therapeutic tools [25, 26]. As shown with chimeric transfectants in flow cytometry and ELISA, 1C6 antibody mapped to an epitope located in the human CCR6 N-terminal domain. Because molecular characterization of CCR6 demonstrates that N-terminal domain is essential for ligand binding and signal transduction [27], it was interesting to study whether our antibody, that binds to N-terminal domain, was could inhibit any signaling pathway mediated by the binding of CCL20 to CCR6.

Binding of CCL20 to hCCR6 elicit a combination of responses, including activation of heterotrimeric G proteins and β -arrestin mediated signal transduction. Arrestins and G proteins have different non-overlapping functions and play important roles in GPCRs signaling [28]. G protein dependent mechanism result in GDP to GTP exchange on the $G_{\alpha i}$ subunit and triggers the activation of second messenger signaling and multiple intracellular pathways such a cyclic adenosine 3', 5' monophosphate (cAMP), inositol triphosphate (IP3), Ca^{2+} , diacylglycerol (DAG), mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) and Rho/Rac [29]. Whereas arrestins mechanism involve the GPCRs phosphorylation by GPCR kinases (GRK), which trigger the recruitment of β -arrestins causing GPCR desensitization and internalization, initiating a G-protein independent wave of downstream signaling [30]. If a functional assay capturing only one signaling pathway is selected for screening neutralizing activity of our antibody, potentially inhibitory activity could be no detected if the antibody does display biased activity. Therefore, antagonistic activity of

our antibody may be elucidated using arrestin and G protein dependent pathways. Thus, we characterized the antagonism of 1C6 antibody in β arrestin and calcium flux assays. Although 1C6 showed no antagonistic effect in calcium signaling pathway at concentration up to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (133 nM), it did have an antagonistic effect in β -arrestin recruitment assay (IC_{50} 10.23 nM). Therefore, we demonstrated inhibition of CCL20 induced signaling on β -arrestin recruitment but not on calcium flux assay. These results could be due to the activity of our antibody differs in dependence on signaling pathway. One molecule can act as agonist, partial agonist or antagonist according to the signaling pathway investigated [31]. Biased agonists display better efficacies in activating one pathway over others and screening of these compounds is a critical issue because assays based on one signaling pathway might miss potentially valuable compounds acting on other pathways [1]. These examples show that biased ligands can have markedly different signaling properties compared to the endogenous ligand which activates both pathways. It is known that activation of different signaling pathways in GPCRs may have opposite effects and this biased signaling can be applied in the development of novel therapies [32, 33]. β -adrenergic receptor is a paradigm of this fact and many other examples have been reviewed [34]. CCR-chemokine receptors CCR2, CCR5, CCR7, CCR10 displayed significant bias in terms of G protein activation and β -arrestin recruitment for their ligands CCL8, CCL5, CCL19/CCL27 and CCL28, respectively. There are partial or biased agonist of chemokine receptors, which are characterized by a selective loss of efficacy in certain types of signaling [35]. Biased allosteric modulators offer the possibility of designing, developing, and producing safer, more targeted pharmacologic therapies [36]. Biased signaling pathways have been described for some specific GPCRs such as angiotensin and β -adrenergic receptors. A drug described as biased antagonist is losartan, an angiotensin II antagonist, that was found to be a G-protein biased antagonist, leaving β -arrestin signaling largely unaffected [37]. We obtained a biased antagonist which has neutralizing activity on arrestin signaling, but not on calcium flux, and function as potent inhibitor of this pathway. The control antibody KM4703 did not bind to N-terminal region and not inhibit the arrestin signaling, but was able to block calcium flux pathway. Dorgham et al., obtained mAb that bind to N-terminal and did not block calcium flux signal but arrestin via was not assayed [38]. Taken the results together, we hypothesized that the antagonistic activity via N-terminal domain is related with arresting signaling but not with the calcium flux signaling.

Th17 cells are a subset of T lymphocytes and their differentiation is mediated by TGF- β and IL-6 signaling.

Th17 cells provoke a wide range of inflammatory reactions via their specific cytokines IL-17 and IL-22. It has been reported that hCCR6 is expressed on surface of Th17 cells and secrete CCL20 promoting the recruitment of another Th17 cells to the sites of the inflammation [3]. Our antibody blocks the migration of CCR6 expressing cells to CCL20 and could be acting inhibiting the recruitment of Th17 cells to inflammatory tissues. Based on the inhibition of chemotaxis of CCR6 expressing cells to CCL20 showed in this study, 1C6 antibody could be a good candidate for suppress the recruitment of Th17 cells to inflamed tissues, although further studies with Th17 cells are needed to confirm our hypothesis.

IL-17A is a pro-inflammatory cytokine that plays an essential role in inflammatory response and elevated levels of this cytokine have been associated with the development of immune-inflammatory diseases [39]. In our study we demonstrate that 1C6 antibody not affects to CCL20 production by Th17 cells, however the expression of IL-17A on these cells was abolished by our antibody. We observed, higher reduction of IL-17A expression with 1C6 than KM4703 antibody, these differences in expression inhibition it could be due to antibodies blocks different signaling pathways. Although further research is needed to demonstrate the molecular connection between CCR6 expression and IL17 production, it has been demonstrated the association between the ability to produce IL-17 and the expression of CCR6 by human T cells [40]. In addition, it has been described that decrease of β -arrestin levels reduce expression of Th17-associated cytokines, such as IL-17 [41]. While antibody 1C6 inhibits arrestin pathway, antibody KM4703 inhibits G protein dependent pathway and it could be indicating that inhibition of arrestin pathway produces a greater response than inhibition of G protein dependent pathways. IL-17 inhibitors are a new and promising therapeutic option for treatment of inflammatory diseases and three anti-IL17 monoclonal antibodies, secukinumab, brodalumab and ixekizumab, are approved for psoriasis treatment [42]. Based on the results obtained, 1C6 antibody it could be an alternative to treatments with anti-IL-17.

There are currently only two monoclonal antibodies against GPCRs, mogamulizumab and erenumab which target CCR4 and CGRP type 1 receptor respectively, approved by the Food and Drugs Administration (FDA) [7, 26, 43]. Around sixteen CCR6-CCL20 inhibitors have been investigated but to the date no therapeutic agents targeting CCR6 have progressed into clinical evaluation [5]. The company ChemoCentryx has developed a small molecule (CCX9664) against CCR6 but they have not yet released clinical results. Unlike others GPCRs, this target has proven difficult in small molecules screen and

other therapeutics approaches, like the development of blocking antibodies, have to be explored [44]. In summary, the antibody reported here represents a potential therapeutic opportunity.

Conclusion

In the present report we generated a monoclonal antibody, 1C6, which bound to N-terminal domain of hCCR6. 1C6 antibody was shown to be suitable for flow cytometric detection and was shown CCR6 biased and selective antagonistic activity on arresting signaling. Moreover, the chemotaxis of CCR6 expressing cells and the expression of IL-17A on Th17 cells were reduced with 1C6 antibody. Therefore, 1C6 will be a helpful pharmacological tool for elucidating the biological effects of CCL20 in various mouse model systems and should become useful in vitro and in vivo studies of hCCR6-mediated diseases.

We demonstrated that whole cells immunization is an efficient and effective approach to generate specific and selective monoclonal antibodies against hCCR6 and a similar approach could be applied to other GPCRs targets and could drive the discovery of selective GPCR antibodies with high therapeutic potential.

In conclusion, the results described here demonstrate that the generated 1C6 antibody blocks functional activity of ligand-induced CCR6-mediated signaling. Therefore, 1C6 has therapeutic potential for the targeted neutralization of CCR6⁺ cells and could be used as treatment of inflammatory diseases alone or in combination with other therapies.

Abbreviations

mAb: Monoclonal antibody; hCCR6: Human CC chemokine receptor 6; GPCRs: G-protein-coupled receptors; CCL20: CC chemokine ligand 20; Th17: T helper 17; Treg: T regulatory; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; FBS: Fetal bovine serum; BSA: Bovine serum albumin

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00699-2>.

Additional file 1.

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

SGM, FIGM, EPR and ITF participated in the design of the study and the interpretation of the results; SGM executed the experiments with the help of TGM, VLG, GMP; and FIGM and ITF wrote the first draft of the manuscript, generated the figures and contributed to editing the manuscript; the study was conceived and directed by EPR and SGM. All authors read and approved the manuscript on its current form.

Funding

This work was partially supported by the Center for the Development of Industrial Technology (CDTI) of Spain (project reference 00102149/CIIP-2015006). The funders had no role in study design, data collection, and

interpretation, preparation of the manuscript or decision-making in relation to submission for publication.

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The research involving human samples were complied with the relevant national regulations, institutional policies, in accordance with the Helsinki Declaration and have been approved by Hospital Reina Sofía (Córdoba, Spain) (CEIC4603/310/30062020). Blood samples were collected following written informed consent.

All the animal procedures used in the present study were approved by Bioethics Committee of the Junta de Andalucía (number 09/7/15/280) and were carried out in compliance with Animal Research Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mix of ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg animal weight, respectively) and sacrificed by cervical dislocation.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Canvax Biotech, Parque Científico y Tecnológico Rabanales 21, c/Astrónoma Cecilia Payne s/n, Edificio Canvax, 14014 Córdoba, Spain. ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Córdoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain.

Received: 29 January 2021 Accepted: 25 May 2021

Published online: 05 July 2021

References

- Zhang R, Xie X. Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2012; 33(3):372–84. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.173>.
- Ranasinghe R, Eri R. Pleiotropic immune functions of chemokine receptor 6 in health and disease. *Medicines.* 2018;5(3):69. <https://doi.org/10.3390/medicines5030069>.
- Yamazaki T, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol.* 2008;181(12):8391–401. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8391>.
- Lu MY, Lu SS, Chang SL, Liao F. The phosphorylation of CCR6 on distinct Ser/Thr residues in the carboxyl terminus differentially regulates biological function. *Front Immunol.* 2018;9:415. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00415>.
- Ranasinghe R, Eri R. Modulation of the CCR6-CCL20 axis: A potential therapeutic target in inflammation and cancer. *Medicina (Lithuania).* 2018; 54(5):88 MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/medicina54050088>.
- Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(10):767–74. <https://doi.org/10.1038/nrd3229>.
- Hutchings CJ. A review of antibody-based therapeutics targeting G protein-coupled receptors: an update. *Exp Opin Biol Ther.* 2020;20(8):925–35. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1745770>.
- Hutchings CJ, Koglin M, Marshall FH. Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs.* 2010;2(6):594–606. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.6.13420>.
- Hutchings CJ, Koglin M, Olson WC, Marshall FH. Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Disc.* 2017;16(11):787–810. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.91>.
- Paz Rojas E et al. GPCR with improved cell surface expression. 2013.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495–7. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.
- Yuya I, Mami K, Yutaka K, Kazuya Y. Anti-human CCR6 antibody; 2013.

13. Paz-Rojas E et al. Novel ultrasensitive cell based sensors and uses thereof. 2012.
14. Furue K, Ito T, Tsuji G, Nakahara T, Furue M. The CCL20 and CCR6 axis in psoriasis. *Scand J Immunol.* 2020;91(3):e12846. <https://doi.org/10.1111/sji.12846>.
15. Lee AYS, Körner H. The CCR6-CCL20 axis in humoral immunity and T-B cell immunobiology. *Immunobiology.* 2019;224(3):449–54. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.01.005>.
16. Chin CC, et al. Interleukin-17 induces CC chemokine receptor 6 expression and cell migration in colorectal cancer cells. *J Cell Physiol.* 2015;230(7):1430–7. <https://doi.org/10.1002/jcp.24796>.
17. Campbell JJ, et al. IL-17-secreting $\gamma\delta$ T cells are completely dependent upon CCR6 for homing to inflamed skin. *J Immunol.* 2017;199(9):3129–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700826>.
18. Dreyer AM, Beauchamp J, Matile H, Pluschke G. An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 2010;10:87. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-87>.
19. Jo M, Jung ST. Engineering therapeutic antibodies targeting G-protein-coupled receptors. *Exp Mol Med.* 2016;48(2):e207. <https://doi.org/10.1038/emmm.2015.105>.
20. Dodd RB, Wilkinson T, Schofield DJ. Therapeutic monoclonal antibodies to complex membrane protein targets: antigen generation and antibody discovery strategies. *BioDrugs.* 2018;32(4):339–55. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0289-y>.
21. Scott MJ, et al. Rapid identification of highly potent human anti-GPCR antagonist monoclonal antibodies. *MAbs.* 2020;12. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1755069>.
22. Dodd R, Schofield DJ, Wilkinson T, Britton ZT. Generating therapeutic monoclonal antibodies to complex multi-spanning membrane targets: overcoming the antigen challenge and enabling discovery strategies. *Methods.* 2020;180:111–26. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2020.05.006>.
23. Michel MC, Wieland T, Tsujimoto G. How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009;379(4):385–8. <https://doi.org/10.1007/s00210-009-0395-y>.
24. Wan H. An overall comparison of small molecules and large biologics in ADME testing. *ADMET DMPK.* 2016;4(1):1–22. <https://doi.org/10.5599/aadmet.4.1.276>.
25. Ersoy BA, et al. Mechanism of N-terminal modulation of activity at the melanocortin-4 receptor GPCR. *Nat Chem Biol.* 2012;8(8):725–30. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1008>.
26. Szpakowska M, Fievez V, Arumugan K, Van Nuland N, Schmit JC, Chevigné A. Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(10):1366–80. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.008>.
27. Ai L-S, Lee S-F, Chen SSL, Liao F. Molecular characterization of CCR6: involvement of multiple domains in ligand binding and receptor signaling. *J Biomed Sci.* 2004;11(6):818–28. <https://doi.org/10.1007/bf02254367>.
28. Gurevich VV, Gurevich EV. Arrestin-mediated signaling: is there a controversy? *World J Biol Chem.* 2018;9(3):25–35. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v9i3.25>.
29. Ayoub MA. Small molecules targeting heterotrimeric G proteins. *Eur J Pharmacol.* 2018;826:169–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.03.003>.
30. Kumari P, Ghosh E, Shukla AK. Emerging approaches to GPCR ligand screening for drug discovery. *Trends Mol Med.* 2015;21(11):687–701. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.09.002>.
31. Corbisier J, Huszagh A, Galés C, Parmentier M, Springael JY. Partial agonist and biased signaling properties of the synthetic enantiomers J113863/UCB35625 at chemokine receptors CCR2 and CCR5. *J Biol Chem.* 2017;292(2):575–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757559>.
32. Bencivenga L, Liccardo D, Napolitano C, Visaggi L, Rengo G, Leosco D. β -adrenergic receptor signaling and heart failure: from bench to bedside. *Heart Fail Clin.* 2019;15(3):409–19. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2019.02.009>.
33. Woo AYH, Song Y, Xiao RP, Zhu W. Biased β 2-adrenoceptor signalling in heart failure: pathophysiology and drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2015;172(23):5444–56. <https://doi.org/10.1111/bph.12965>.
34. Seyedabadi M, Ghahremani MH, Albert PR. Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): molecular determinants of GPCR/transducer selectivity and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2019;200:148–78. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.006>.
35. Getschman AE, et al. Protein engineering of the chemokine CCL20 prevents psoriasisform dermatitis in an IL-23-dependent murine model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(47):12460–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704958114>.
36. Wisler JW, Rockman HA, Lefkowitz RJ. Biased G protein-coupled receptor signaling: changing the paradigm of drug discovery. *Circulation.* 2018;137(22):2315–7. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028194>.
37. Desimine VL, McCrink KA, Parker BM, Wertz SL, Maning J, Lymperopoulos A. Biased agonism/antagonism of cardiovascular GPCRS for heart failure therapy. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;339:41–61.
38. Dorgham K, Dejoui C, Piessse C, Gorochov G, Pène J, Yssel H. Identification of the single immunodominant region of the native human CC chemokine receptor 6 recognized by mouse monoclonal antibodies. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157740>.
39. Ruiz de Morales JMG, et al. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: an updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmun Rev.* 2020;19(1):102429. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102429>.
40. Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN, Farber JM. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol.* 2008;180(1):214–21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.214>.
41. Lia J, et al. Deficiency of B-arrestin1 ameliorates collagen-induced arthritis with impaired TH17 cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(18):7395–400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221608110>.
42. Rafael-Vidal C, Pérez N, Altabás I, Garcia S, Pego-Reigosa JM. Blocking il-17: a promising strategy in the treatment of systemic rheumatic diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19) MDPI AG:1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21197100>.
43. Dolgin E. First GPCR-directed antibody passes approval milestone. *Nat Rev Drug Discov.* Jul. 2018;17(7):457–9. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.103>.
44. Mackay CR. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol.* 2008;9(9):988–98. <https://doi.org/10.1038/ni.f.210>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

