

ANTICUERPOS Y NANOCUERPOS CONTRA EL SARS-CoV-2*

Dulce Carolina Lugo-Gil y Edgar Morales-Ríos**

Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México. **Autor de correspondencia correo E: edgar.morales@cinvestav.mx

RESUMEN

COVID-19 es una enfermedad infecciosa causada por el virus SARS-CoV-2. Han fallecido millones personas en todo el mundo a causa de esta enfermedad. SARS-CoV-2 utiliza a la proteína espiga (S) para ingresar a las células huésped por medio del dominio de unión al receptor (RBD). El RBD interacciona directamente con las células humanas mediante la unión a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) lo que comprende el primer paso en el proceso de infección del virus. El RBD representa un objetivo de estudio para la neutralización de la interacción con ACE2 mediada por anticuerpos. En la presente revisión se analiza el posible uso clínico de diferentes anticuerpos y nanocuerpos que tienen la capacidad de neutralizar la unión entre el dominio RBD de SARS-CoV-2 y la ACE2. Se encontraron un gran número de nanocuerpos candidatos a ser utilizados individualmente o en conjunto para el tratamiento de la COVID-19, los cuales han probado ser útiles para neutralizar la interacción del virus con el receptor ACE2 presente en células humanas. De esta manera, detienen el ciclo de replicación viral en pacientes contagiados, disminuyendo las cargas del virus y disminuyen la probabilidad de presentar síntomas severos.

PALABRAS CLAVE:

SARS-CoV-2,
COVID-19,
Anticuerpos,
Nanocuerpos.

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus. Millions of people around the world have died due to this disease. SARS-CoV-2 uses its spike protein (S) to enter the host cells through the receptor binding domain (RBD). RBD interacts directly with human cells through the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) as the first step in the virus infection process. RBD represents an object of study for the antibody mediated neutralization of its interaction with ACE2. This review analyzes the possible use of different antibodies and nanobodies that can neutralize the interaction between the RBD domain of SARS-CoV-2 and ACE2. We found several nanobodies candidates to be used alone or combined for the treatment of COVID-19, which have proven useful in neutralizing the interaction of the virus with the ACE2 receptor found in human cells. Thus, stopping the replication cycle of the virus in infected patients and helping to decrease viral loads during the development of the disease and diminishes the probability of severe symptoms.

KEY WORDS:

SARS-CoV-2,
COVID-19,
Antibodies,
Nanobodies.

El SARS-CoV-2 (por sus siglas en inglés “severe acute respiratory syndrome coronavirus 2”) es un nuevo tipo de coronavirus que causa una enfermedad respiratoria llamada enfermedad por coronavirus y comúnmente denominada COVID-19. Esta se detectó por primera vez en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei,

China. Desde entonces se ha dispersado por todo el mundo y ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la primera pandemia de coronavirus en la historia de la humanidad.

La mayoría de los pacientes con COVID-19 tienen síntomas leves como fiebre, tos, dificultad para respirar y/o dolor muscular, pero alrededor del

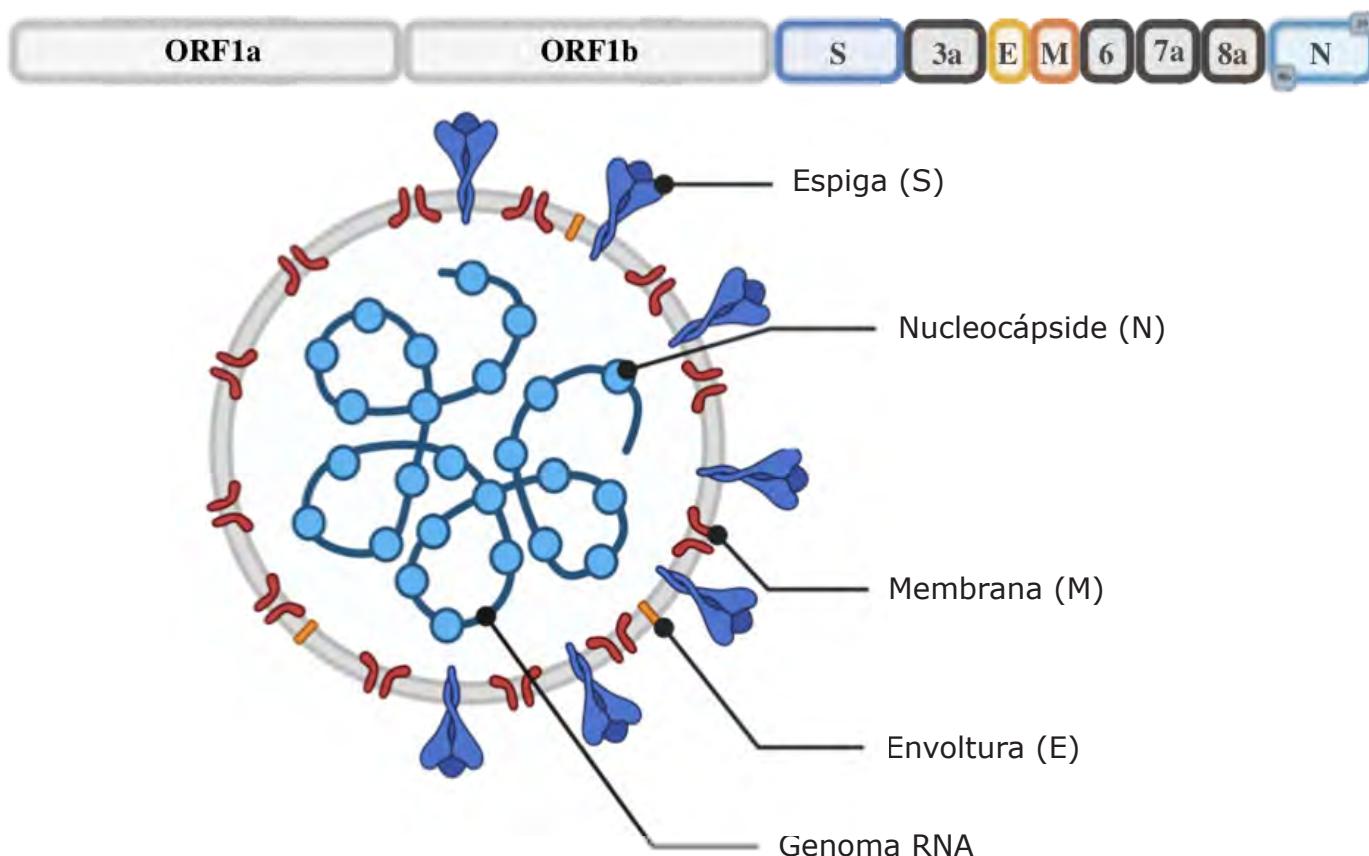


Figura 1. a. Proteínas encontradas en el genoma del SARS-CoV-2. b. Componentes estructurales del SARS-CoV-2. Creado en BioRender.

20 %, desarrollan la enfermedad de moderada a grave, y presentan mayores síntomas que pueden incluir síndrome de dificultad respiratoria aguda, choque séptico e insuficiencia orgánica múltiple que puede conllevar a la muerte (1). La gravedad de COVID-19 se ha asociado con la edad, el sexo y las comorbilidades del paciente, donde los hombres mayores con hipertensión, diabetes y obesidad se encuentran entre quienes tienen mayor riesgo de desarrollar insuficiencia respiratoria y morir (2).

El SARS-CoV-2 es un miembro del género Beta-coronavirus, que incluye otros coronavirus como el SARS-CoV de 2002 y MERS-CoV de 2012, con los que comparte poco menos del 80 % de identidad en su secuencia de ARN. El RaTG13 es un tipo de coronavirus identificado solo en murciélagos, el cual parece ser el virus más cercano al SARS-CoV-2 compartiendo más del 93 % de identidad de la secuencia del gen de la proteína espiga que es la que interactúa con células humanas. Aunque el SARS-CoV-2 tiene una tasa de mortalidad más baja comparada con la del SARS-CoV-1 y del MERS-CoV, con 0.6-3 %, 9.6 % y 34.4 % respectivamente (3), se encontró que puede propagarse

mucho más rápido, incluso hasta ocho días antes de la aparición de los síntomas, lo que implicó la baja probabilidad de contener la epidemia únicamente aislando a los individuos sintomáticos (4).

El SARS-CoV-2 está conformado por una cadena de ARN monocatenario de sentido positivo (ARN+) que codifica tanto para proteínas estructurales, como para proteínas no estructurales, así como un grupo de genes accesorios. Dentro del virus se encuentra el genoma viral que está asociado con la proteína estructural nucleocápside (N) la cual se halla fosforilada e insertada dentro de la bicapa de fosfolípidos. En la envoltura membranal se encuentran las tres proteínas estructurales: la proteína espiga (S) la cual facilita la unión del virus al receptor de la célula huésped, la proteína de membrana (M) que ayuda a mantener la curvatura de la membrana y la unión con la nucleocápside, y la proteína de envoltura (E) la cual juega un papel importante en el ensamblaje y liberación del virus (Fig. 1) (5, 6). Las proteínas no estructurales (nsps por sus siglas en inglés “non-structural proteins”) están conformadas por poliproteínas que componen el complejo de replicación y transcripción

(7). El genoma del SARS-CoV-2 también contiene marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés “open reading frame”) intercalados entre los genes de las proteínas estructurales que codifican proteínas accesorias, las cuales han mostrado pueden llegar a interferir en la modulación de la patogenicidad viral y la replicación, además de actuar como inductores de muerte celular y antagonistas del interferón beta (IFN- β) (8).

Proteína espiga (S)

La proteína S es un trímero, cada monómero está compuesto por 1273 aminoácidos con un peso de 150 kDa; estructuralmente se cataloga como una proteína de fusión de membrana de tipo I con dos subunidades en su ectodominio (S1 y S2). La región S1 incluye principalmente el dominio de unión al receptor (RBD “Receptor Binding Domain”), mientras que la región S2 es necesaria para la fusión de membranas (11). La proteína S alberga un sitio de corte para furina, una proteasa de las

células humanas, que distingue a este virus del SARS-CoV y otros CoV relacionados con el SARS. Este sitio de corte es una secuencia de cuatro aminoácidos (RRAR) encontrada en el límite entre las subunidades S1/S2, que impulsa la entrada del virus a la célula (9).

Los RBD de SARS-CoV y SARS-CoV-2 se unen con afinidades similares al receptor ACE2 de la célula diana con una K_d de 31 nM y 4.7 nM respectivamente. Se ha reportado que 17 residuos pertenecientes al RBD del SARS-CoV-2 comparado con 16 residuos pertenecientes al RBD del SARS-CoV interactúan con 20 residuos del receptor ACE2 (10).

Mediante Crio-microscopía electrónica (Cryo-EM) se demostró que el trímero de la proteína S oscila entre dos conformaciones; la abierta donde uno de los RBD se encuentra arriba, y la cerrada donde los tres RBD se encuentran abajo (Figura 2). Las conformaciones se promueven mediante interacciones electrostáticas entre los dominios NTD y SD2 de la subunidad S1 con la subunidad S2 para producir a la proteína S en un estado estable (RBD abajo)

a



b

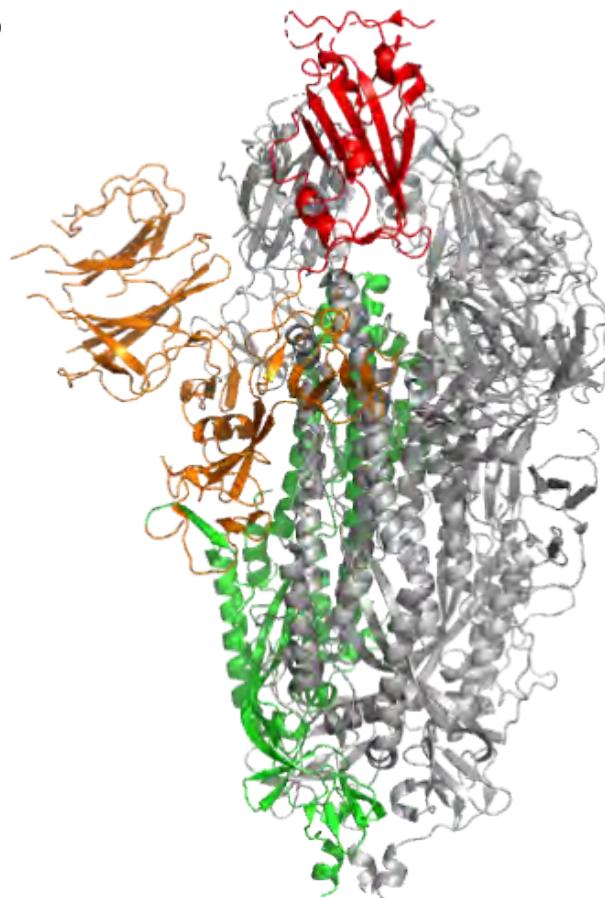


Figura 2. Estructura del homotímero de la proteína S. En colores se muestra un monómero de proteína S denotando subunidad S1 en naranja con el RBD en rojo, y subunidad S2 en verde. a. Homotímero de la proteína S con RBD abajo en conformación cerrada. b. Homotímero de la proteína S con un RBD arriba en conformación abierta. (PDB: 6VSB Y 6VXX). Creado en PyMOL.

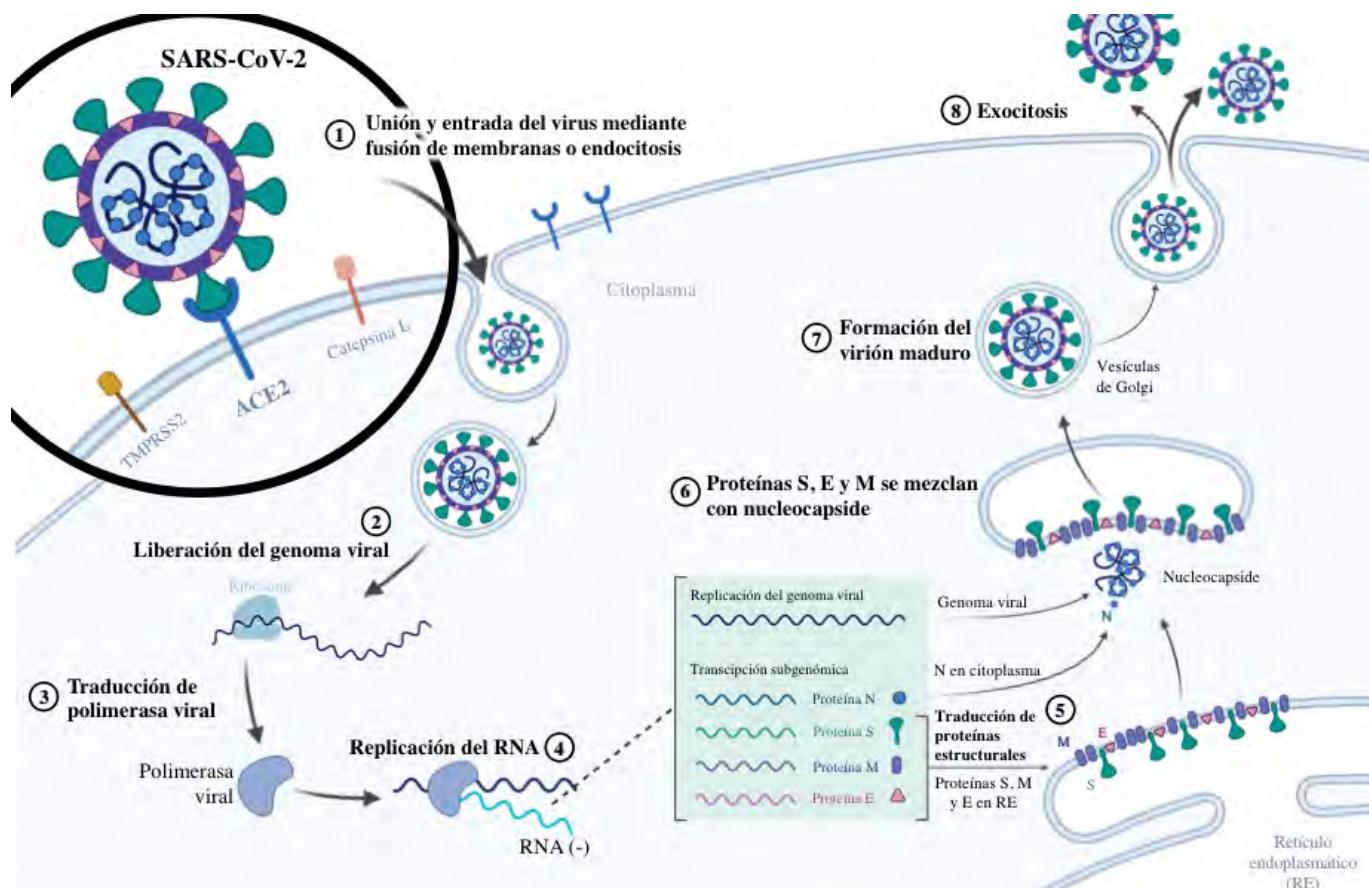


Figura 3. Ciclo de replicación del virus SARS-CoV-2. Creado en BioRender.

o uno infectivo (RBD arriba) (11). Para que se presente la interacción entre el receptor ACE2 y el RBD del SARS-CoV-2, este último debe encontrarse en una conformación abierta. De las tres copias que hay en la proteína S, solo un RBD a la vez se posiciona en la conformación “arriba”, al efectuarse el movimiento de un RBD hacia la conformación abierta se generan movimientos conformatacionales en el resto de la proteína S, entre las subunidades S1 y S2 que interaccionan con las otras proteínas del homotímero, lo que no permite que los otros RBD se coloquen en la posición “arriba” (12).

Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación viral se desencadena cuando el SARS-CoV-2, mediante el RBD localizado en la subunidad S1 de la proteína S, se une a un receptor ACE2 llamado ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) expresado en células humanas como endotelios, arterias, pulmón, corazón, riñón e intestinos (Figura 3) (12). La posterior entrada del virus a la célula huésped puede darse por las proteasas TMPRSS2 (proteasa transmembrana de

superficie serina 2) y la catepsina L. La TMPRSS2 realiza una escisión del sitio encontrado entre las subunidades S1 y S2 de la proteína S, este corte expone una serie de aminoácidos hidrofóbicos de S1 que interaccionan adosándose la membrana de la célula huésped. La subunidad S1 extendida se vuelve a doblar sobre sí misma, como un cierre, obligando a las membranas viral y celular a fusionarse, expulsando su genoma directamente a la célula (13). Una alternativa a este mecanismo es que el virus entra a la célula por medio de endosomas dependientes de catepsina L, posterior a la entrada del endosoma la catepsina L escinde a la proteína S y libera al virus del endosoma. Se ha observado que el SARS-CoV-2 promueve la transcripción del gen de la catepsina L aumentando la infección (14).

Una vez liberado el material genético, los ribosomas presentes en el citoplasma traducen a las proteínas de la replicasa viral en ORF1a y ORF1b y consecuentemente a las poliproteínas de pp1a y pp1ab (Figura 3) que después de ser procesadas, forman un complejo de replicación y transcripción (15). La replicación comienza en vesículas de doble

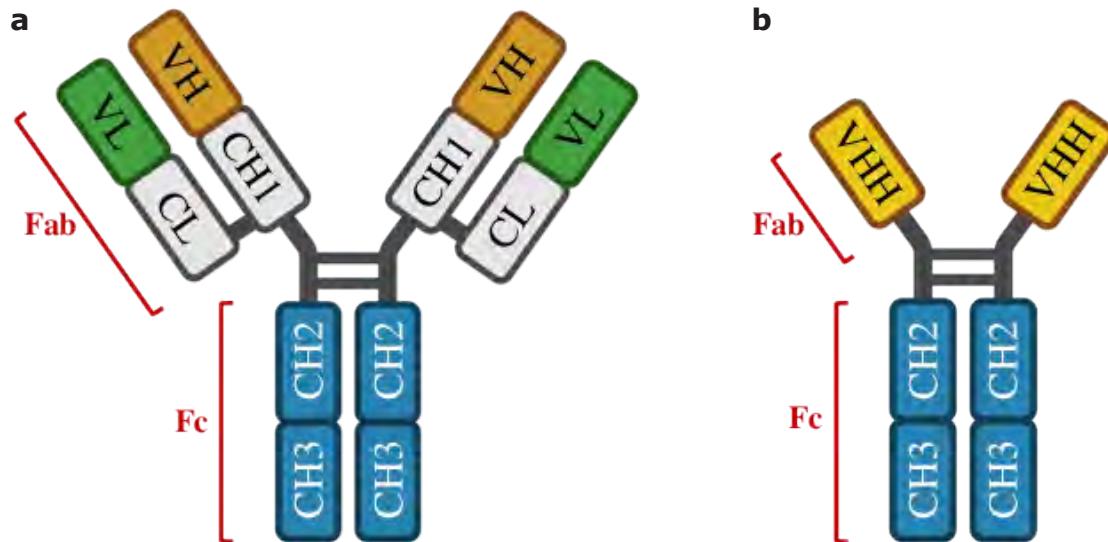


Figura 4. Comparación entre la estructura de: a. anticuerpo convencional de mamífero; b. HCAb de camélido. (Recuperado de Smolalek et al., 2012). Creado en BioRender.

membrana derivadas del retículo endoplásmico, que se integran formando una serie de redes de membranas donde el genoma viral de cadena positiva entrante sirve como plantilla para el ARN de cadena negativa utilizado como molde durante a replicación del ARN+ y los ARN subgenómicos. Se ha observado que las redes parecen conectar a las estructuras de membrana involucradas en la síntesis de ARN+ del SARS-CoV con sitios en los que se produce el ensamblaje de nuevos viriones (16). La traducción de los ARN subgenómicos da como resultado a las proteínas estructurales de membrana S, M y E que se insertan en el retículo endoplásmico (ER), desde donde viajan al compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC) para ensamblar a los nuevos viriones (17). A la par, la proteína N es traducida en el citoplasma para posteriormente dar forma a la nucleocápside a partir de la interacción con los ARN+ replicados y la posterior fusión con los componentes de membrana, formando viriones maduros por gemación en el ERGIC. Finalmente, los viriones maduros se secretan en vesículas de paredes lisas o sacos de Golgi a través de la membrana plasmática mediante exocitosis (19, 21, 7).

Respuesta inmune

El receptor ACE2 se encuentra mayormente enriquecido en células epiteliales de la lengua, por lo que las mucosas de la cavidad oral presentan un riesgo alto de infección por SARS-CoV-2 (19). Se ha observado que los síntomas de la enfermedad COVID-19 se presentan de 3-5 días después de ser

expuesto e infectado por SARS-CoV-2, alrededor de la primera semana luego de la aparición de los síntomas se presenta el pico más alto de carga viral en saliva. Posteriormente, esta disminuye con el tiempo y es detectable hasta por 14 días, no obstante, se ha encontrado carga viral hasta 25 días después del pico (20).

Las cargas virales en pacientes infectados con SARS-CoV-2 disminuyen después del desarrollo de los anticuerpos IgM, IgG e IgA, existiendo una correlación inversa entre las cargas virales y los anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2, para el momento en que se desarrollan los anticuerpos las cargas virales comienzan a disminuir, indicando la presencia de inmunidad adaptativa innata y/o celular contribuyendo a la contención del virus (21).

Se ha detectado la presencia de anticuerpos IgG, IgM o IgA desde el cuarto día después de la aparición de los síntomas, con una media de 10 días para IgG y una media de 11 días para IgM e IgA. Se ha observado la presencia de IgG durante más de 28 días, mientras que los niveles de IgM e IgA comienzan a disminuir 3-4 semanas después del inicio de la enfermedad. Los anticuerpos IgM, IgG e IgA específicos contra proteínas del SARS-CoV-2 alcanzan su pico aproximadamente dos semanas después de la aparición de los síntomas (24, 25, 26, 27).

En individuos asintomáticos, la concentración de anticuerpos puede ser muy baja, se encontró que los niveles de IgG específicos contra SARS-CoV-2 fueron significativamente más bajos ($P = 0.005$) en relación con el grupo sintomático en la fase aguda de la enfermedad. Se observó que el

cuarenta por ciento de los individuos asintomáticos se volvió seronegativo para IgG en la fase de convalecencia temprana, en comparación con el 12.9 % del grupo sintomático. Además, los individuos asintomáticos exhibieron niveles más bajos de 18 citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (24). Por otro lado, a partir del conteo de partículas virales presentes en muestras tomadas con hisopos de la garganta de pacientes infectados, se encontró que tanto pacientes asintomáticos, como los sintomáticos tienen cargas virales similares al inicio de la infección. Sin embargo, el sistema inmunitario de las personas asintomáticas neutraliza al virus más rápido (6-9 días) en comparación con los sintomáticos (8-32 días) (25).

Se identificaron células T CD8+ y CD4+ específicas al SARS-CoV-2 en aproximadamente el 70 % y el 100 % de los pacientes con COVID-19, respectivamente (26). Las proteínas S, M o N pueden activar a estas células T con una respuesta más energética de CD4+ en comparación CD8+. Se ha observado que la proteína M induce una mayor respuesta en células T CD4+, mientras que en células T CD8+ la proteína S induce una respuesta superior al de las otras proteínas (30). Se encontró que en pacientes positivos, las células T CD4+ productoras de IFN γ , IL2 y TNF α reactivos a las proteínas S, M o N constituyan más del 50 % de los linfocitos T CD4+ encontrados. Mientras que los linfocitos T CD8+ citotóxicos productores de Granzima B y que expresan TNF α constituyan el 25 %. Finalmente, se encontró que en la mayoría de las células T CD8+ se produjo la molécula efectora citotóxica Granzima B, frecuentemente en combinación con IFN γ y TNF α (30).

Se han propuesto diferentes tratamientos para combatir la infección ocasionada por el SARS-CoV-2. En un estudio Gautret y colaboradores reportaron una disminución significativa en la carga viral en pacientes tratados durante 6 días con hidroxicloroquina, una 9-aminoquinolina utilizada en la terapia de la malaria, comparado con los no tratados, resultando eficaz en el tratamiento de pacientes con COVID-19 (27). Sin embargo, actualmente la OMS no recomienda el uso de hidroxicloroquina ya que estudios recientes han demostrado que el uso de hidroxicloroquina no previene ni favorece al tratamiento de la COVID-19 (28), incluso se ha reportado que puede aumentar el riesgo de diarrea, náuseas, dolor abdominal, somnolencia y dolor de cabeza (29).

Se han realizado ensayos terapéuticos administrando plasma procedente de pacientes convalecientes, no intubados y con títulos altos de anticuerpos contra el virus, particularmente cuando se administran dentro de las 72 horas posteriores al

diagnóstico de COVID-19 se observa una mejoría notoria en la mayoría de los pacientes (30).

Anticuerpos

Se han reportado anticuerpos monoclonales (mAb por sus siglas en inglés "Monoclonal Antibody") producidos contra la proteína S de SARS-CoV-1 los cuales pueden neutralizar al nuevo virus tanto *in vitro* como *in vivo*, bloqueando la unión al receptor ACE2. Tal es el caso del mAb CR3022, el cual interacciona con la proteína S logrando inhibir la interacción con el receptor ACE2 a pesar de que su epítopo no se superpone con el sitio de unión del dominio RBD de SARS-CoV-2 con el receptor ACE2 (31).

Existen múltiples estudios donde se aislaron y caracterizaron mAb contra SARS-CoV-2, tal como P2C-1F11/P2B-2F6/P2A-1A3, 47D11, 311mab-31B5/32D4 (Tabla 1). Los cuales mostraron una actividad de neutralización prometedora contra el virus, incluso los mAb 311mab-31B5/32D4 y P2C-1F11/P2B-2F6/P2A-1A3 se encuentran en etapa preclínica (36, 37, 38).

El uso de mAb contra SARS-CoV-2 resulta benéfico ya que tienen la capacidad de ser utilizados como herramientas terapéuticas en la prevención o manejo de la enfermedad COVID-19. Sin embargo, son costosos y difíciles de producir, resultando en una pesada carga para los presupuestos de investigación y salud. Además, son moléculas grandes (alrededor de 150 kDa), lo que puede restringir su estabilidad, penetración y biodistribución en los tejidos, así como provocar reacciones inmunes que neutralizan sus actividades lo que puede limitar su uso a largo plazo. Finalmente, otra característica que limita su uso es que suelen tener una vida media corta de aproximadamente unos días (35).

Nanocuerpos

En mamíferos los tipos de anticuerpos son muy similares entre sí, excepto por los anticuerpos producidos en camélidos, una familia de mamíferos artiodáctilos, donde se encuentran el camello, la alpaca, la llama, el guanaco, entre otros. Los camélidos, además de tener anticuerpos convencionales conformados por dos cadenas pesadas y dos ligeras (Figura 4a), cuentan con una clase de anticuerpo conformado únicamente dos cadenas pesadas (HCAb por sus siglas en inglés "Heavy Chain Antibody"). Este se forma por los dominios constantes CH2 y CH3, una región de bisagra, y la porción que reconoce al antígeno denominada dominio VHH (Figura 4b), lo que se conoce como nanocuerpo (Nb por sus siglas en inglés "Nanobo-

TABLA 1
Anticuerpos y nanocuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2

Nombre	Especie donde se originó	Especie donde se expresa	Constante de disociación de equilibrio	Referencia
			Kd (nM)	
Anticuerpos:				
47D11	ratones H2L2	HEK-293-T	10.8	(37)
CR3022	-	<i>E. coli</i> HB2151	6.3	(35)
18F3	ratón	HEK-293-T	-	(59)
7B11	ratón	HEK-293-T	-	(59)
S309	Células B humanas	Células expiCHO	-	(60)
CB6	Células PBMC	HEK293T	2.49	(61)
BD23-Fab	Células PBMC	HEK293	-	(62)
B38	Células PBMC	HEK293T	70.1	(63)
H4	Células PBMC	HEK293T	4.48	(63)
P2B-2F6	Células B humanas	293T	5.14	(36)
P2C-1F11	Células B humanas	293T	-	(36)
P2C-1A3	Células B humanas	293T	-	(36)
rRBD-15	Células B humanas	HEK 293-F	3.8	(64)
311mab-31B5	Células PBMC	HEK-293-T	-	(38)
311mab-32D4	Células PBMC	HEK-293-T	-	(38)
Nanocuerpos:				
2F2	Biblioteca Camélido	BL21(DE3) <i>E. coli</i>	5.175	(60)
5F8	Biblioteca Camélido	BL21(DE3) <i>E. coli</i>	0.996	(60)
3F11	Biblioteca Camélido	BL21(DE3) <i>E. coli</i>	3.349	(60)
VHH-72	Camélido	<i>Pichia pastoris</i>	38.6	(59)
H11-H4	Camélido	HEK293T cells	12±1.5	(46)
H11-D4	Camélido	HEK293T cells	39±2	(46)
n3021	base de datos IMGT	<i>E. coli</i> HB2151	0.63	(65)
n3088	base de datos IMGT	<i>E. coli</i> HB2151	3.7	(65)
Ty1	Alpaca	TG1 cells (Lucigen)	9	(61)
Nb20	Llama	BL21(DE3) <i>E. coli</i>	0.048	(66)
Nb6	Camélido	BL21(DE3) <i>E. coli</i>	2.5	(67)
VHH E	Camélido	<i>E. coli</i> WK6	1.86	(58)
VHH U	Camélido	<i>E. coli</i> WK6	21.4	(58)
Nb11-59	Camélido	<i>Pichia pastoris</i>	21	(53)
Nb30	Llama	TG1	6.9	(68)
WNb2	Alpaca	-	≤80	(69)
WNb10	Alpaca	-	≤80	(69)

dy") (36). Los nanocuerpos (Nbs) fueron revelados por primera vez por Hamers y col. (1993), en un estudio donde se investigó la presencia de cantidades considerables de material similar a IgG en suero de *Camelus dromedarius*. Se descubrieron moléculas compuestas de dímeros de cadena pesada que carecían de cadenas ligeras, y que a pesar de su pequeño tamaño, contaban con un extenso repertorio de unión a antígenos (41).

Los Nbs comprenden cuatro secuencias conservadas, conocidas como regiones marco (FR por sus siglas en inglés "Framework Region"), que rodean tres regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR por sus siglas en inglés "Complementarity Determining Region") (Figura 5), son los que participan en el reconocimiento y unión al antígeno. Se ha detectado que del 60-80 % del contacto con el antígeno se produce a través

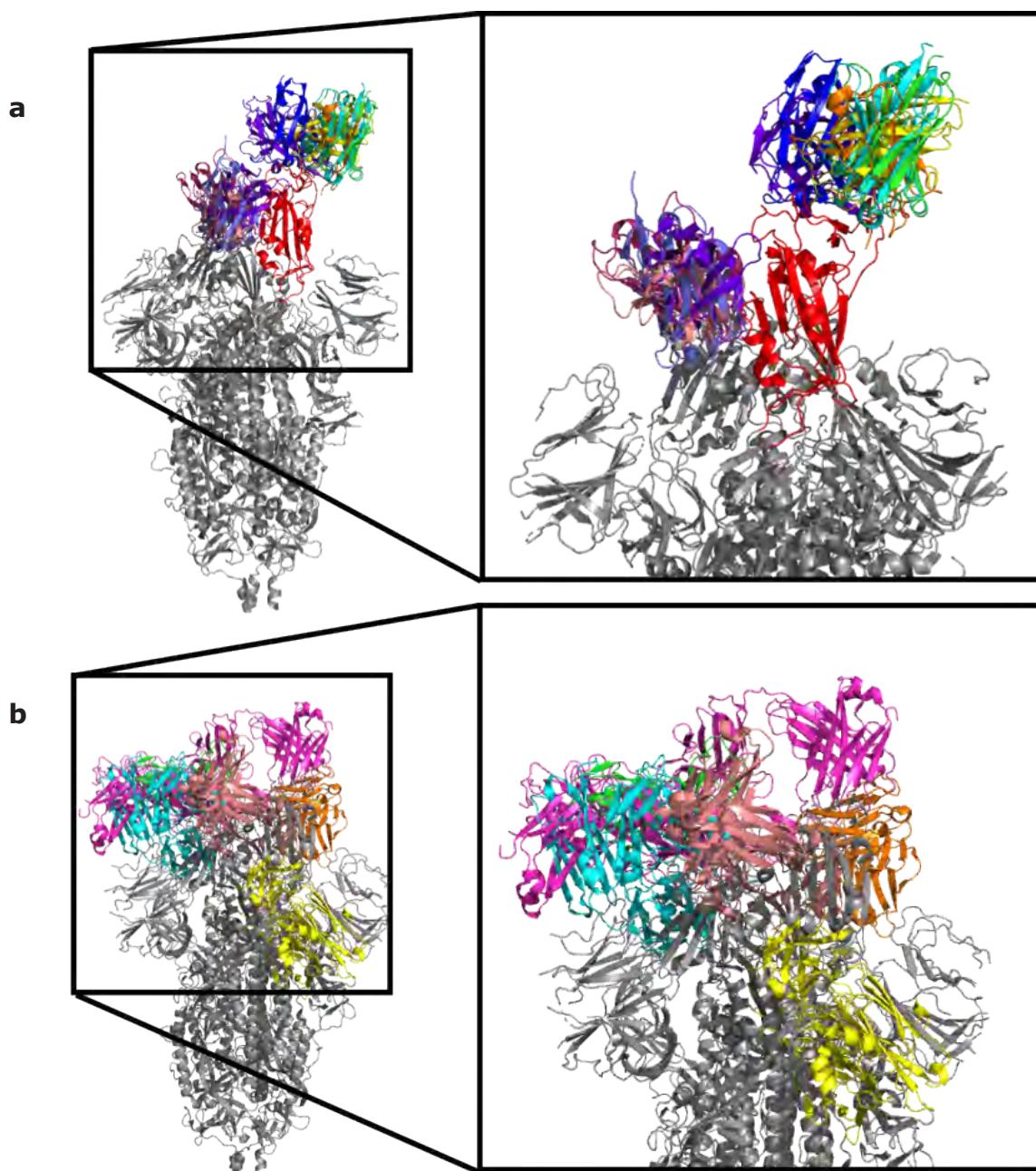


Figura 5. Proteína S (gris) en interacción con: a. Nanocuerpos: H11-D4 (verde), H11-H4 (celeste), Nb6 (azul), Nb20 (amarillo) Nb30 (rosa), Ty1 (naranja), VHH-72 (lavanda), VHH-E (fucsia), WNb2 (morado); b. Anticuerpos: BD23 (verde), 80R (celeste), CB6 (fucsia), CR3022 (amarillo), M396 (rosa), S309 (naranja). Imagen creada en PyMOL. PDB nanocuerpos: 6Z43, 6ZHD, 7KKK, 7JVB, 7MY2, 6ZXN, 6WAQ, 7KN5, 7LX5. PDB anticuerpos: 7BYR, 7BZ5, 7C01, 6W41, 2DD8, 6WPS.

de la región CDR3 siendo el principal contribuyente a la unión a antígenos y suele ser más extenso en comparación con los anticuerpos convencionales (37). Entre camélidos y otras especies, la longitud de las regiones CDR1 y CDR2 es muy similar, por otro lado, la longitud de la región CDR3 es muy variada. Por ejemplo, la región CDR3 de humanos y ratones es en promedio de 5-15 aminoácidos, mientras que en camélidos y tiburones es de 6-30 aminoácidos (38). La estabilidad de la región CDR3 se mantiene mediante un enlace disulfuro entre CDR1 y CDR3 o entre la FR2 y CDR3. Se ha observado que estas características aumentan la estabilidad y la solubilidad del Nb incluso en condiciones de desnaturalización o altas temperaturas (44, 45).

Los Nbs son moléculas de alrededor de 15 kDa, diez veces más pequeños comparados con un anticuerpo convencional y gracias a esta característica les permite acceder a epítopos ocultos o inaccesibles para los anticuerpos convencionales. Al ser estructuras pequeñas provienen de un solo fragmento de gen, lo que aunado a su carácter hidrófilo y a que no presentan modificaciones postraduccionales, se expresan bien en sistemas de producción económicos como bacterias (*Escherichia coli*) y levaduras (*Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*), resultando convenientes para producciones a gran escala. Sin embargo, su función es solamente neutralizante ya que, al carecer de dominio Fc, no activan mecanismos efectores de la respuesta inmune a menos de que sean expresados con este dominio Fc (42, 46).

Los Nbs son moléculas estables que pueden purificarse bajo condiciones adversas para otro tipo de proteínas, incluidas temperaturas extremas, presencia de proteasas, alta presión o pH ácido (39, 47), lo que amplía su aplicación más allá de una vía parenteral. Tras la administración *in vivo*, los Nbs difunden rápidamente por todo el cuerpo y tienen una buena penetración en los tejidos. Sin embargo, por su tamaño se encuentran por debajo del límite renal, lo que implica una rápida expulsión. Por lo anterior, se han desarrollado estrategias para extender su vida media como la unión a un dominio de fragmento cristalizable (Fc) de anticuerpos convencionales o el acoplamiento a proteínas séricas como albúmina sérica humana o IgG a través de los Nbs que los atacan (48, 39).

A diferencia de los anticuerpos convencionales, los Nbs tienen la capacidad de ser utilizados, ya sea como herramientas en investigación en cuanto a diagnóstico, agentes de imagen, herramientas para biología estructural, así como posibles terapias con la posibilidad de usarlos en combinación con otros

tratamientos para la COVID-19 (42, 46). Se ha mostrado el posible uso de Nbs como trazadores de imágenes moleculares en pacientes con cáncer, donde los Nbs se unen rápida y específicamente a los antígenos tumorales. Además, gracias a sus características propias los Nbs no unidos logran eliminarse rápidamente de la sangre. Esto a su vez resulta favorable, ya que se pueden utilizar radioisótopos PET de vida corta, como galio-68 o flúor-18 reduciendo significativamente la carga de radiación en los pacientes. Los anticuerpos convencionales no siempre son adecuados para este propósito porque tienen una vida media prolongada y una velocidad de difusión lenta. Con los Nbs se pueden obtener imágenes una hora después de la inyección, mientras que, con anticuerpos convencionales se obtienen imágenes después de días posteriores a la inyección (44).

Tratamiento de enfermedades con nanocuerpos

Por otro lado, se ha comprobado el uso de Nbs para el tratamiento a diferentes enfermedades. Pe-yvandi y col. (2017) demostraron la efectividad de un Nb humanizado conocido como Caplacizumab, que actualmente se encuentra aprobado para su venta por la FDA, el cual es capaz de reducir en un 89% el riesgo de morbilidad y mortalidad por trombocitopenia trombótica adquirida (TTP) (45).

Asimismo, ALX-0171, un Nb trimérico humanizado, es decir, expresado unido a una región Fc humano. ALX-0171 fue capaz de neutralizar el virus respiratorio sincicial (VSR) con una mayor efectividad en comparación al tratamiento convencional con el medicamento Palivizumab, un mAb comercializado (46). Estudios posteriores encontraron que ALX-0171 inhibe la replicación del virus en un 87%, en comparación del 18% observado con la administración de Palivizumab (47).

Liu y col. (2017) identificaron un grupo de Nbs capaces de reducir la carga viral de poliovirus (PV) a partir de una biblioteca de presentación de fagos inmunizados. El mecanismo por el cual estos Nbs reducen la carga viral es bloqueando directamente la interacción del virus con sus células diana (48). A través del mismo mecanismo se construyó una biblioteca de presentación de fagos a partir de una llama inmunizada con el virus del Ébola (EBOV) inactivado y una glicoproteína de la envoltura viral recombinante seleccionando y evaluando Nbs específicos para la glicoproteína del EBOV logrando neutralizar al virus (49). Del mismo modo, se generaron cinco Nbs anti-CHIKV en llamas inmunizadas. Estos Nbs neutralizantes virales se han aislado con éxito mediante selecciones contra las proteínas virales del virus CHIKV que causa dolor

articular severo que se asocia con fiebre, erupción cutánea y dolor de cabeza (50).

En otro trabajo, por medio del análisis de una biblioteca de Nbs derivada de llama inmunizada con una proteína RBD recombinante del MERS-CoV, se aisló el Nb MS10 y se investigó su efecto así como de su forma humanizada sobre la patogenicidad del virus, estos Nbs mostraron una alta afinidad por MERS-CoV. El Nb fusionado con un dominio Fc mostró una vida media aumentada *in vivo*, y fue capaz de proteger eficazmente a ratones infectados con MERS-CoV (51).

Otro estudio se encargó de identificar una serie de Nbs específicos contra MERS-CoV de la médula ósea de camellos dromedarios infectados con MERS-CoV, se encontró que a una concentración en orden picomolar, estos Nbs bloquearon eficazmente la entrada de virus a la célula Huh7, un tipo de línea de células hepáticas humanas. Los Nbs con mayor afinidad y que se unían a la proteína RBD del virus se humanizaron fusionándolos a un dominio Fc. Estas construcciones tenían una vida media prolongada en el suero y protegían a los ratones contra una infección mortal por MERS-CoV (52).

Nanocuerpos contra SARS-CoV-2

Derivado de la actual pandemia, se han desarrollado una gran cantidad de trabajos enfocados a la obtención de Nbs capaces de interactuar con el virus SARS-CoV-2 con el fin de generar posibles tratamientos contra la enfermedad que produce (Tabla 1). Se ha construido una biblioteca de Nbs a partir de camellos inmunizados, encontrando siete Nbs con una buena capacidad de unión a ocho mutantes del RBD de SARS-CoV2. Entre los candidatos, el denominado Nb11-59 exhibió la mejor actividad neutralizante con una buena estabilidad. Según estos resultados, Nb11-59 podría ser una nueva molécula terapéutica, como fármaco inhalado, para el tratamiento de COVID-19 (53).

Anteriormente, se han aislado Nbs neutralizantes a partir de llamas inmunizadas contra la proteína S de los betacoronavirus MERS-CoV y SARS-CoV-1, entre los que destacan VHH-55 y VHH-72 que interaccionan con el dominio RBD. Se demostró que estos Nbs presentan reactividad cruzada contra el dominio RBD de SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2, resultando capaces de neutralizar con alta afinidad la proteína S del SARS-CoV-2 (54).

Chi y col. (2020) produjeron una serie de Nbs humanizados contra RBD de SARS-CoV-2 a partir de una biblioteca de presentación de fagos sintética. La eficacia de inhibición sobre el SARS-CoV-2

y la cinética de afinidad se ensayaron *in vitro*, encontraron que los Nbs denominados 2F2, 3F11 y 5F8, podrían ser muy ventajosos como fármacos específicos para prevenir la infección por SARS-CoV-2 al inhibir la fusión de membranas entre los RBD del pico viral y sus receptores de células huésped y luego bloquear la entrada de SARS-CoV-2 (55).

A partir de una alpaca inmunizada con RBD de SARS-CoV-2, Hanke y col. (2020) informaron del aislamiento de un Nb monomérico llamado Ty1 humanizado y aislado a partir de la técnica de presentación de fagos. Ty1 ha confirmado una unión de alta especificidad y afinidad al dominio RBD de SARS-CoV-2 inhibiendo su interacción con ACE2. Sugiriendo que su probable generación en formatos homodiméricos o triméricos aumente aún más su actividad de neutralización (56).

Huo y col. (2020) reportaron dos anticuerpos de llama denominados H11-D4 y H11-H4 obtenidos mediante la generación de una biblioteca de Nbs utilizando tecnología de presentación de fagos *in vitro*. Estos Nbs fueron capaces de interactuar con el RBD del SARS-CoV-2 impidiendo su unión al receptor ACE2 (43).

En otro estudio, se aislaron un grupo de Nbs que interactúan con el dominio RBD, a partir de llama inmunizada con el virus SARS-CoV-2. Un Nb denominado NIH-CoVnb-112 resultó ser el candidato terapéutico principal ya que mostró una alta afinidad en forma monomérica y bloqueó la interacción entre ACE2 en diferentes variantes de la proteína S (57).

A partir de la construcción de una biblioteca de Nbs por medio de tecnología de fagos, Gay y col. (2021) descubrieron un grupo de siete Nbs con la capacidad de bloquear la interacción que se da entre la ACE2 y la RBD del SARS-CoV-2, donde resaltó el Nb Nb11-59 el cual exhibió la mayor actividad contra el SARS-CoV-2. Además, es altamente estable al administrarse por nebulización, por lo que podría ser una molécula profiláctica y terapéutica prometedora contra la COVID-19, especialmente mediante la administración por inhalación (53).

Del mismo modo, partiendo de la construcción de una biblioteca de Nbs obtenida a partir de tecnología de fagos, se aislaron cuatro nanocuerpos, donde los denominados VHH E y VHH U resultaron tener mayor actividad al interactuar con la proteína S del SARS-CoV-2 logrando neutralizar el virus. Mediante crio-ME, las estructuras reportadas muestran que VHH E y VHH U se dirigen a dos epítopos distintos en la proteína S del SARS-CoV-2 (58).

El resumen de las estructuras de los nanocuerpos y anticuerpos que neutralizan la unión del

SARS-CoV-2 con el receptor ACE2, se resumen en la figura 5. En todos los casos, estos nanocuerpos y anticuerpos, se unen al RBD ya sea en cualquiera de sus dos conformaciones, "arriba" o "abajo". Esta interacción nanocuerpo/anticuerpo-RBD es la que evita el contacto RBD-ACE2.

En conclusión, revisamos que se han producido un gran número de anticuerpos y nanocuerpos a ser utilizados solos o en combinación, los cuales han probado ser útiles para neutralizar infecciones causadas por patógenos. Estas moléculas participan deteniendo el ciclo de replicación, ayudando a disminuir las cargas del patógeno durante el desarrollo de la enfermedad. El uso de anticuerpos y

nanocuerpos solos o de manera combinada puede ser eficaz contra la COVID-19 al interactuar con el RBD de la proteína espiga del SARS-CoV-2 y así evitar que se una al receptor en células humanas, la enzima ACE2. Los nanocuerpos presentan beneficios en comparación con los anticuerpos convencionales como son: una mayor estabilidad durante su producción, un proceso de fabricación más rentable, la capacidad de acceder a epítopos ocultos debido a su tamaño, además de ser altamente estables bajo diferentes condiciones de almacenamiento lo que los hace adecuados para uso terapéutico y producción a gran escala, representando una alternativa útil para el tratamiento de la COVID-19 entre otras. 

REFERENCIAS

- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* [Internet]. 2020 Feb;395(10223):507–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620302117>
- Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev* [Internet]. 2020 Jun 1;7(6):998–1002. Available from: <https://academic.oup.com/nsr/article/7/6/998/5804736>
- Wilson N, Kvalsvig A, Barnard LT, Baker MG. Case-Fatality Risk Estimates for COVID-19 Calculated by Using a Lag Time for Fatality. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2020 Jun;26(6). Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/6/20-0320_article.htm
- Ferretti L, Wymant C, Kendall M, Zhao L, Nurtay A, Abeler-Dörner L, et al. Quantifying SARS-CoV-2 transmission suggests epidemic control with digital contact tracing. *Science* (80-) [Internet]. 2020 May 8;368(6491):eabb6936. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abb6936>
- Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2020 Jul;14(4):407–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871402120300849>
- Pastrian-Soto G. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *Int J Odontostomatol* [Internet]. 2020 Sep;14(3):331–7. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2020000300331&lng=en&nrm=iso&tIng=en
- Kaur N, Singh R, Dar Z, Bijarnia RK, Dhingra N, Kaur T. Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2021 Apr;89:104490. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713482030321X>
- McBride R, Fielding B. The Role of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-Coronavirus Accessory Proteins in Virus Pathogenesis. *Viruses* [Internet]. 2012 Nov 7;4(11):2902–23. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/4/11/2902>
- Xia S, Lan Q, Su S, Wang X, Xu W, Liu Z, et al. The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020 Dec 12;5(1):92. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41392-020-0184-0>
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* [Internet]. 2020;581(7807):215–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- Yan R, Zhang Y, Li Y, Ye F, Guo Y, Xia L, et al. Structural basis for the different

- states of the spike protein of SARS-CoV-2 in complex with ACE2. *Cell Res* [Internet]. 2021 Jun 18;31(6):717-9. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41422-021-00490-0>
12. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* (80-). 2020;367(6483):1260-3.
 13. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* [Internet]. 2020 Apr;181(2):271-280.e8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420302294>
 14. Zhao M-M, Yang W-L, Yang F-Y, Zhang L, Huang W-J, Hou W, et al. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2021 Dec 27;6(1):134. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41392-021-00558-8>
 15. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. In 2016. p. 59-126. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352716300471>
 16. Knoops K, Kikkert M, Worm SHE van den, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, et al. SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. Emerman M, editor. *PLoS Biol* [Internet]. 2008 Sep 16;6(9):e226. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0060226>
 17. Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. In 2006. p. 193-292. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352706660053>
 18. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* [Internet]. 2020 Dec;41(12):1100-15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490620302337>
 19. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2020 Dec 24;12(1):8. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41368-020-0074-x>
 20. To KK-W, Tsang OT-Y, Leung W-S, Tam AR, Wu T-C, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020 May;20(5):565-74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920301961>
 21. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-9.
 22. Hsueh P-R, Huang L-M, Chen P-J, Kao C-L, Yang P-C. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2004 Dec;10(12):1062-6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14638477>
 23. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, Wu G-C, Deng K, Chen Y-K, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* [Internet]. 2020 Jun 29;26(6):845-8. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41591-020-0897-1>
 24. Long Q-X, Tang X-J, Shi Q-L, Li Q, Deng H-J, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* [Internet]. 2020 Aug 18;26(8):1200-4. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41591-020-0965-6>
 25. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV Viral Load Dynamics, Duration of Viral Shedding and Infectiousness: A Living Systematic Review and Meta-Analysis. *SSRN Electron J* [Internet]. 2020; Available from: <https://www.ssrn.com/abstract=3677918>
 26. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* [Internet]. 2020 Jun;181(7):1489-1501.e15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420306103>
 27. Gautret P, Lagier J-C, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Mailhe M, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2020 Jul;56(1):105949. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857920300996>

28. WHO. Coronavirus disease (COVID-19): Hydroxychloroquine [Internet]. 2021. Available from: [https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-hydroxychloroquine](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-hydroxychloroquine)
29. Mitjà O, Corbacho-Monné M, Ubals M, Alemany A, Suñer C, Tebé C, et al. A Cluster-Randomized Trial of Hydroxychloroquine for Prevention of Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Feb 4;384(5):417-27. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2021801>
30. Gharbharan A, Jordans CCE, GeurtsvanKessel C, den Hollander JG, Karim F, Mollema FPN, et al. Effects of potent neutralizing antibodies from convalescent plasma in patients hospitalized for severe SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 27;12(1):3189. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-021-23469-2>
31. Tian X, Li C, Huang A, Xia S, Lu S, Shi Z, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2020 Jan 1;9(1):382-5. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1729069>
32. Ju B, Zhang Q, Ge J, Wang R, Sun J, Ge X, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature* [Internet]. 2020 Aug 26;584(7819):115-9. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2380-z>
33. Wang C, Li W, Drabek D, Okba NMA, van Haperen R, Osterhaus ADME, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 4;11(1):2251. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-16256-y>
34. Chen X, Li R, Pan Z, Qian C, Yang Y, You R, et al. Human monoclonal antibodies block the binding of SARS-CoV-2 spike protein to angiotensin converting enzyme 2 receptor. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2020 Jun 20;17(6):647-9. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41423-020-0426-7>
35. Steeland S, Vandenbroucke RE, Libert C. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today* [Internet]. 2016 Jul;21(7):1076-113. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644616301076>
36. Smolarek D, Bertrand O, Czerwinski M. Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine? *Postepy Hig Med Dosw* [Internet]. 2012 Jun 14;66:348-58. Available from: <https://publisherspanel.com/icid/1000334>
37. Muylldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2009 Mar;128(1-3):178-83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242708004017>
38. Wang F, Ekiert DC, Ahmad I, Yu W, Zhang Y, Bazirgan O, et al. Reshaping Antibody Diversity. *Cell* [Internet]. 2013 Jun;153(6):1379-93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413005254>
39. Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LGJ, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* [Internet]. 2009 Apr 13;11(3):500-15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1110/ps.34602>
40. Conrath K, Vincke C, Stijlemans B, Schymkowitz J, Decanniere K, Wyns L, et al. Antigen Binding and Solubility Effects upon the Veneering of a Camel VHH in Framework-2 to Mimic a VH. *J Mol Biol* [Internet]. 2005 Jul;350(1):112-25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605004845>
41. Hussack G, Hirama T, Ding W, MacKenzie R, Tanha J. Engineered Single-Domain Antibodies with High Protease Resistance and Thermal Stability. Mitraki A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Nov 30;6(11):e28218. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028218>
42. Harmsen MM, Van Solt CB, Fijten HPD, Van Setten MC. Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine* [Internet]. 2005 Sep;23(41):4926-34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X05005372>
43. Huo J, Le Bas A, Ruza RR, Duyvesteyn HME, Mikolajek H, Malinauskas T, et al. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27(9):846-54.
44. Vaneycken I, D'huyvetter M, Hernot S, De Vos J, Xavier C, Devoogdt N, et al. Immuno-imaging using nanobodies. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2011 Dec;22(6):877-81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911006215>
45. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, Knöbl P, Cataland S, De Beuf K, et al. Caplacizumab reduces the frequency of major thromboembolic events, exacerbations and

- death in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2017 Jul 5;15(7):1448-52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jth.13716>
46. Detalle L, Stohr T, Palomo C, Piedra PA, Gilbert BE, Mas V, et al. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Jan;60(1):6-13. Available from: <https://aac.asm.org/content/60/1/6>
47. Li H, Wang S, He X, Li N, Yu F, Hu Y, et al. A novel nanobody specific for respiratory surfactant protein A has potential for lung targeting. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2015 Apr;2857. Available from: <http://www.dovepress.com/a-novel-nanobody-specific-for-respiratory-surfactant-protein-a-has-pot-peer-reviewed-article-IJN>
48. Strauss M, Schotte L, Thys B, Filman DJ, Hogle JM. Five of Five VHJs Neutralizing Poliovirus Bind the Receptor-Binding Site. Dermody TS, editor. *J Virol* [Internet]. 2016 Apr;90(7):3496-505. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.03017-15>
49. Liu JL, Shriver-Lake LC, Anderson GP, Zabetakis D, Goldman ER. Selection, characterization, and thermal stabilization of llama single domain antibodies towards Ebola virus glycoprotein. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2017 Dec 12;16(1):223. Available from: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0837-z>
50. Liu JL, Shriver-Lake LC, Zabetakis D, Anderson GP, Goldman ER. Selection and characterization of protective anti-chikungunya virus single domain antibodies. *Mol Immunol* [Internet]. 2019 Jan;105:190-7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589018306710>
51. Zhao G, He L, Sun S, Qiu H, Tai W, Chen J, et al. A Novel Nanobody Targeting Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Receptor-Binding Domain Has Potent Cross-Neutralizing Activity and Protective Efficacy against MERS-CoV. Gallagher T, editor. *J Virol* [Internet]. 2018 Sep 15;92(18). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00837-18>
52. Stalin Raj V, Okba NMA, Gutierrez-Alvarez J, Drabek D, van Dieren B, Widagdo W, et al. Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection. *Sci Adv* [Internet]. 2018 Aug 8;4(8):eaas9667. Available from: <https://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.aas9667>
53. Gai J, Ma L, Li G, Zhu M, Qiao P, Li X, et al. A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential. *MedComm* [Internet]. 2021 Mar 4;2(1):101-13. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mco2.60>
54. Wrapp D, De Vlieger D, Corbett KS, Torres GM, Wang N, Van Breedam W, et al. Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies. *Cell* [Internet]. 2020 May;181(5):1004-1015.e15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420304943>
55. Chi X, Liu X, Wang C, Zhang X, Li X, Hou J, et al. Humanized single domain antibodies neutralize SARS-CoV-2 by targeting the spike receptor binding domain. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 10;11(1):4528. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-18387-8>
56. Hanke L, Vidakovics Perez L, Sheward DJ, Das H, Schulte T, Moliner-Morro A, et al. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 4;11(1):4420. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-18174-5>
57. Esparza TJ, Martin NP, Anderson GP, Goldman ER, Brody DL. High affinity nanobodies block SARS-CoV-2 spike receptor binding domain interaction with human angiotensin converting enzyme. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 22;10(1):22370. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-79036-0>
58. Koenig P-A, Das H, Liu H, Kümmeler BM, Gohr FN, Jenster L-M, et al. Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Feb 12;371(6530). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abe6230>
59. Tai W, Zhang X, He Y, Jiang S, Du L. Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2. 2020;(January).
60. Pinto D, Park Y-J, Beltramello M, Walls AC, Tortorici MA, Bianchi S, et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature* [Internet]. 2020 Jul 9;583(7815):290-5. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2349-y>

61. Shi R, Shan C, Duan X, Chen Z, Liu P, Song J, et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature* [Internet]. 2020 Aug 26;584(7819):120-4. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2381-y>
62. Cao Y, Su B, Guo X, Sun W, Deng Y, Bao L, et al. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. *Cell* [Internet]. 2020 Jul;182(1):73-84.e16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420306206>
63. Wu Y, Wang F, Shen C, Peng W, Li D, Zhao C, et al. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Jun 12;368(6496):1274-8. Available from: <https://www.science.org/lookup/doi/10.1126/science.abc2241>
64. Zeng X, Li L, Lin J, Li X, Liu B, Kong Y, et al. Isolation of a human monoclonal antibody specific for the receptor binding domain of SARS-CoV-2 using a competitive phage biopanning strategy. *Antib Ther* [Internet]. 2020 Apr 30;3(2):95-100. Available from: <https://academic.oup.com/abt/article/3/2/95/5827124>
65. Wu Y, Li C, Xia S, Tian X, Kong Y, Wang Z, et al. Identification of Human Single-Domain Antibodies against SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2020 Jun;27(6):891-898.e5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193131282030250X>
66. Xiang Y, Nambulli S, Xiao Z, Liu H, Sang Z, Duprex WP, et al. Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Nov 5;eabe4747. Available from: <https://www.science.org/lookup/doi/10.1126/science.abe4747>
67. Schoof M, Faust B, Saunders RA, Sangwan S, Rezelj V, Hoppe N, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Nov 5;eabe3255. Available from: <https://www.science.org/lookup/doi/10.1126/science.abe3255>
68. Xu J, Xu K, Jung S, Conte A, Lieberman J, Muecksch F, et al. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants. *Nature* [Internet]. 2021 Jul 8;595(7866):278-82. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-021-03676-z>
69. Pym P, Adair A, Chan L-J, Cooney JP, Mordant FL, Allison CC, et al. Nanobody cocktails potently neutralize SARS-CoV-2 D614G N501Y variant and protect mice. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2021 May 11;118(19). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2101918118>