

## Summary

The innate immune system consists of cells including mononuclear phagocytes such as macrophages, numerous immuno-regulatory molecules, i.e. cytokines, and a range of effector molecules, forming a network aimed at (i) initiating the host inflammatory immune response, (ii) coordinating cellular and humoral responses and (iii) down-regulating mechanisms to regain homeostasis. Yet, persistence, deregulation or over-production of pro-inflammatory mediators can culminate into a wide variety of acute and chronic inflammatory diseases, tissue damage and in some instances even death. Consequently, *the innate immune system offers valuable targets to understand, diagnose, monitor and treat a variety of disease processes*. In the current thesis, we investigated the potential of Nanobodies (Nbs, i.e. single-domain antigen-binding fragments derived from camelid heavy-chain antibodies) as tools for two instances of targeting innate immunity.

In the first instance, we targeted Macrophage migration Inhibitory Factor (MIF), i.e. a pleiotropic cytokine, and its receptor (CD74). The involvement of the MIF-CD74 axis has been identified as a key culprit in initiating and prolonging inflammatory responses in a wide variety of disease processes including autoimmune diseases, metabolic disorders, systemic infections as well as sepsis and cancer. MIF's upstream actions in the inflammatory cascade, make it an attractive therapeutic target. As such, it was critical to consider that *specific antagonists of the MIF-CD74 axis may offer new therapeutic avenues for MIF-associated pathologies*. We describe herein the generation and the *in vitro* antagonistic application of Nbs targeting both MIF and its receptor CD74. We further demonstrate the use of anti-MIF Nbs to successfully enhance survival in an *in vivo* murine model of lethal endotoxemia. Unfortunately, due to technical reasons the anti-CD74 Nbs could not be validated in *in vivo* models.

In the second instance, we targeted specific biomarkers expressed on Kupffer cells (KCs), the liver resident macrophages. The liver plays a critical role in metabolic homeostasis as well as toxin clearance and immunogenic/tolerogenic immune responses. These functions however predispose the liver to a variety of diseases ranging from toxin-induced damage to metabolic disorders and (auto)-immune destruction. *The versatility of KCs to alter their phenotype in response to environmental triggers, makes these macrophages, as well as the biomarkers they express, attractive in vivo targets for non-invasive monitoring of liver inflammation/ pathology*. Herein, we investigated whether KCs can be monitored non-invasively using single-photon-emission computed tomography (SPECT) with <sup>99m</sup>Tc-labeled Nbs in two distinct types of liver disease. Nbs targeting selected biomarkers such as V-set and immunoglobulin domain-containing 4 (Vsig4) and C-type lectin 4F (Clec4F) were found to accumulate and co-localize only/specifically in the liver of homeostatic mice. However, upon induction of acute hepatitis using concanavalin A (ConA) a down-regulation of the *in vivo* imaging signal using the Nbs was observed, reflecting reduction in KC numbers as confirmed via flow cytometry. In contrast, induction of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) using the methionine choline deficient diet resulted in higher signals in the liver corresponding to a higher density of KCs. Interestingly, the Nb signals returned to normal levels upon recovery from both disease processes. Hence, Nbs targeting KCs as molecular imaging biomarkers could allow non-invasive monitoring of liver pathogenesis.

Collectively, we successfully employed the use of the Nb technology to (i) monitor liver disease progression/recovery by targeting selected KC biomarkers (Vsig4/Clec4f) and (ii) prevent/treat lethality associated with endotoxemia by targeting MIF. Hence, this work demonstrates that Nb-based targeting of innate immunity can be considered as valuable approach in both diagnosis/prognosis as well as prevention/therapy in different diseases.

## Samenvatting

Het aangeboren immuun systeem bestaat uit cellen, inclusief mononucleaire fagocyten zoals macrofagen, talloze immuno-regulerende moleculen, zoals cytokines, en een waaier aan effector moleculen die een netwerk vormen met als doel (i) het opwekken van ontstekingsreacties, (ii) cellulaire en humorale reacties te coördineren en (iii) regulerende mechanismen te initiëren om de homeostase te herwinnen. Toch kan persistentie, deregulering of overproductie van ontstekingsbevorderende mediators aanleiding geven tot een grote verscheidenheid van acute en chronische inflammatoire ziekten, weefselschade en in sommige gevallen zelfs de dood. Bijgevolg biedt het aangeboren immuunsysteem waardevolle doelwitten die toelaten om een verscheidenheid van ziekteprocessen te begrijpen, diagnosticeren, op te volgen en te behandelen. In deze thesis hebben we het potentieel van Nanobodies (Nbs, d.w.z. enkel-domein antigeenbindende fragmenten afgeleid van zware keten antilichamen uit kameelachtigen) onderzocht in twee benaderingen gericht op aangeboren immuniteit.

De eerste benadering was gericht op Macrofaagmigratie Inhiberende Factor (MIF), een pleiotroop cytokine, en zijn receptor (CD74). De betrokkenheid van de MIF-CD74 as werd geïdentificeerd als een belangrijke factor voor het initiëren en verlengen van ontstekingsreacties in diverse ziekteprocessen zoals auto-immuunziekten, metabole stoornissen, systemische infecties evenals sepsis en kanker. Omwille van deze cruciale rol in de ontstekingscascade vormt MIF een aantrekkelijk therapeutisch doelwit. Als zodanig zouden **specifieke antagonisten van de MIF-CD74 as nieuwe therapeutische mogelijkheden kunnen bieden voor MIF-geassocieerde pathologieën**. We beschrijven hierin de generatie en de *in vitro* antagonistische toepassing van Nbs gericht tegen zowel MIF als zijn receptor CD74. We tonen verder aan dat anti-MIF Nbs de overleving verlengen in een *in vivo* murien model van lethale endotoxemie. Helaas, wegens technische redenen konden de anti-CD74 Nbs niet worden gevalideerd in *in vivo* modellen.

De tweede benadering was gericht op specifieke biomerkers uitgedrukt op Kupffer cellen (KC), zijnde de lever residente macrofagen. De lever speelt een belangrijke rol in metabole homeostase en verwijdering van toxines evenals in immunogene / tolerogene immuunresponsen. Echter, deze functies maken de lever ook vatbaar voor allerlei ziekten variërende van toxine-geïnduceerde schade tot metabole stoornissen en (auto) immuun vernietiging. **De veelzijdigheid van KC in hun vermogen hun fenotype aan te passen aan wijzigingen in hun wefselomgeving maakt dat deze macrofagen, en de biomerkers die ze uitdrukken, aantrekkelijke *in vivo* doelwitten zijn voor niet-invasieve opvolging van leverontsteking / pathologie**. Hierin hebben we onderzocht of KCs op een niet-invasieve manier, gebruikmakende van een enkele foton emissie computed tomography (SPECT) via <sup>99m</sup>Tc gemerkte Nbs, kunnen worden opgevolgd in twee verschillende types van leveraandoening. Hierbij werd aangetoond dat Nbs gericht tegen specifieke biomerkers zoals V-set en immunoglobuline-domein-bevattende 4 (Vsig4) en C-type lectine 4F (Clec4F) alleen / specifiek accumuleren en co-lokaliseren in de lever van muizen tijdens homeostase. Echter, na inductie van acute hepatitis gebruik makende van concanavoline A (ConA) werd een verminderd *in vivo* beeldvormingssignaal waargenomen met deze Nbs, wat overeenstemde met een vermindering in KC aantallen aangetoond via flowcytometrie. Daarentegen, het opwekken van niet-alcoholische steatohepatitis (NASH) gebruikmakende van een methionine choline deficiënt dieet leidde tot hogere signalen in de lever, wat overeenkwam met een hogere dichtheid van KCs. Interessant te melden is dat de Nb signalen opnieuw tot normale niveaus terugvielen na herstel van beide ziekteprocessen. Bijgevolg werd aangetoond dat Nbs die specifiek KCs herkennen als moleculaire beeldvorming biomerkers kunnen gebruikt worden voor het niet-invasief opvolgen van lever pathogenese.

Gezamenlijk werd aangetoond dat we met succes het gebruik van de Nb-technologie kunnen benutten om (i) leverziekte progressie / herstel op te volgen gebruikmakende van geselecteerde biomerkers (Vsig4 / Clec4f) en (ii) mortaliteit ten gevolge van endotoxemie te voorkomen / behandelen door MIF

te neutralizeren. Bijgevolg heeft dit werk aangetoond dat Nbs gericht tegen aangeboren immuniteit kunnen worden beschouwd als waardevolle instrumenten voor zowel diagnose / prognose en preventie / behandeling van verschillende ziekten.