



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Programa de Doctorado en Biomedicina

**TESIS DOCTORAL**

**Sistemas de detección ultrasensible de moléculas  
de distinta naturaleza para la detección temprana  
del cáncer**

**Ultrasensitivity detection system of different nature  
molecules to early cancer detection**

Memoria presentada por

**Tania García Maceira**

Los directores,

Dr. José Antonio González Reyes

Dra: Fé Isabel García Maceira

**Córdoba 2022**

TITULO: *SISTEMAS DE DETECCIÓN ULTRASENSIBLE DE MOLÉCULAS DE  
DISTINTA NATURALEZA PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DEL  
CÁNCER*

AUTOR: *Tania García Maceira*

---

© 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](mailto:ucopress@uco.es)

---



## UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Don José Antonio González Reyes, Doctor en Ciencias y Catedrático de la Universidad del Área de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba y Dra. Fé Isabel García Maceira, Doctora en Genética y directora de I+D de la empresa Canvax Biotech

### INFORMAN

Que D<sup>a</sup> Tania García Maceira, Licenciada en Microbiología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Sistemas de detección ultrasensible de moléculas de distinta naturaleza para la detección temprana del cáncer”**, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Biomedicina

Y para que conste, firmo la presente en Córdoba, a 20 de febrero de 2022.

Fdo.: Dr. José Antonio González Reyes

Fdo.: Dra. Fé Isabel García Maceira





**TÍTULO DE LA TESIS:** Sistemas de detección ultrasensible de moléculas de distinta naturaleza para la detección temprana del cáncer

**DOCTORANDO/A:** TANIA GARCÍA MACEIRA

**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).

Los inmunoensayos para la detección de biomarcadores continúan siendo hoy en día los ensayos más utilizados en la clínica, tanto para la detección como para la monitorización de enfermedades. El trabajo de tesis de la doctoranda ha estado enfocado hacia el desarrollo de sistemas ultrasensibles de medición de moléculas de diversa naturaleza asociadas a procesos tumorales. Se ha planteado como objetivo general del proyecto desarrollar una metodología para la obtención de un ELISA más sensible y multiplex que permita reducir el impacto de la baja afinidad de un anticuerpo por su analito específico y, además, sea capaz de detectar simultáneamente analitos de distinta naturaleza.

La Memoria de tesis está bien estructurada, presentándose en distintos capítulos los distintos enfoques planteados para la consecución del objetivo central del trabajo. Para ello, la introducción que les precede expone de manera clara la compleja temática de los inmunoensayos y es exhaustiva en lo relativo a la inmovilización de anticuerpos a las superficies soporte. Cada capítulo incluye su propia discusión de los resultados lo que permite un mayor análisis de estos dentro del contexto científico actual.

El trabajo realizado ha exigido de la ejecución de un amplio abanico de técnicas que incluyen metodologías de biología molecular, de expresión y purificación de proteínas, así como de procedimientos químicos de modificación de superficies y de derivatización de moléculas.

Como resultados del trabajo fueron desarrolladas dos estrategias de inmovilización de anticuerpos a un sustrato sólido: una que involucra la reacción de alta eficiencia y especificidad entre la tetracina y el trans-cicloocteno con el fin de aumentar la densidad del anticuerpo en la superficie; y otra, la afinidad del dominio de unión a quitina por su sustrato, como método para lograr la correcta orientación del anticuerpo inmovilizado. En ambos casos se logra un aumento significativo de la sensibilidad del ensayo a través del anclaje covalente y orientado de los anticuerpos a la superficie. También con resultados muy interesantes, se obtiene un sistema multiplex que permite la medición paralela de dos analitos de distinta naturaleza: una proteína (el antígeno carcinoembrionario) y un ácido nucleico, el miRNA-29b.

Parte de los resultados obtenidos han sido publicados en dos artículos: uno en la revista Biosensors (2021) (<https://doi.org/10.3390/bios11120524>) (Q1, JCR 2021) y el otro en la revista BMC Biotechnology (2020) (<https://doi.org/10.1186/s12896-020-00640-z>) (Q3, JCR 2020). En ambos casos el doctorando fue primer autor. Estas publicaciones avalan la originalidad, la calidad de los resultados y ofrece una nueva perspectiva para el desarrollo de ELISAs más sensibles, incluso cuando se dispone de anticuerpos de baja afinidad.

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, la doctoranda Tania García Maceira ha superado satisfactoriamente los objetivos formativos y de investigación exigidos. De tal modo y por todo lo anteriormente expuesto, consideramos que la Tesis presentada por Dña. Tania García Maceira cumple los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor, por lo que se autoriza su presentación.

Córdoba, 8 de febrero de 2022-02-06

Firma de los directores

Fdo. José Antonio González Reyes

Fdo. Fé Isabel García Maceira

*“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.  
The important thing is not to stop questioning.”*

*Albert Einstein*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, querría agradecer a mi tutor de tesis, el Dr José Antonio González Reyes, por el esfuerzo y el tiempo que me ha dedicado. He tenido la suerte de contar en dos ocasiones con este excelente profesor, como tutor de Máster y como tutor de Doctorado, y en ambas ha sido un gran apoyo para llegar a cumplir mis objetivos. Muchas gracias.

Mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra Fé Isabel García Maceira, y al director de Canvax Biotech, Elier Paz Rojas, por ser mis guías profesionales desde mis primeros estudios universitarios. Han sido siempre mi ejemplo, mi voluntad, han dirigido mi desarrollado como científica y por supuesto, me han llevado hasta la culminación de este trabajo doctoral. Además, de pertenecer ambos a mi vida personal donde siempre han sido un espacio de confianza.

Me gustaría agradecer a todos los compañeros de Canvax Biotech que de alguna manera han contribuido al desarrollo de esta tesis: María del Valle, María José Piedras, Ana Quesada, Vanesa Ramírez, Verónica Luna, Aurora Márquez. Y en especial, a quienes han estado directamente involucrados directamente en el desarrollo técnico de esta tesis: Ana Belén Aragón y Rafel Almagro. Finalmente, a Sara Gómez por instarme a continuar hacia adelante a pesar de los obstáculos.

Agadecer en especial a toda mi familia, mis padres y hermanas, quienes son mi compañía en los buenos y malos momentos, siempre tienen palabras positivas de aliento y optimismo. Agradezco a mi esposo Luis, mi sustento emocional, y a mi hijo Enzo, mi mayor alegría.

Muchas gracias a todos.



## Abreviaturas y acrónimos empleados en esta Memoria

- APTES:** 3-(aminopropil)-trietoxisilano
- BSA:** Albúmina de suero bovino
- ChBD:** Dominio de unión a quitina  
(*Chitin binding domain*)
- DBCO:** Dibenzo-ciclooctino
- DTT:** Ditioneitol
- EC50:** Concentración media máxima efectiva
- EDTA:** Ácido etilendiaminatetracético
- ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas  
(*Enzyme linked immunosorbent assay*)
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- GST:** Glutathion S-transferasa
- HRP:** Peroxidasa de rábano
- IgG:** Inmunoglobulina G
- IL6h:** Interleuquina 6 humana
- IL8h:** Interleuquina 8 humana
- IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
- Kd:** Constante de disociación
- LOD:** Límite de detección
- LOQ:** Límite de cuantificación
- miRNA:** micro ácido ribonucleico
- MW:** Peso molecular promedio en peso
- NHS:** N-hidroxisuccinimida
- PBS:** Tampón fosfato salino
- PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- TAMRA:** Tetrametil-rodamina
- TCO:** Trans-cicloocteno
- TMB:** 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina
- VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

En esta memoria se empleó el anglicismo *anti mouse*, usado ampliamente en Inmunología.



## INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	5
1.1. Sistemas de detección de moléculas para el diagnóstico temprano del cáncer	5
1.2. Inmunoensayos	7
1.2.1. ELISA	8
1.2.2. AlphaLISA	12
1.2.3. Ensayos multiplex	13
1.3. Anticuerpos	16
1.3.1. Estructura de los anticuerpos	17
1.4. Estrategias de inmovilización de un anticuerpo a una superficie	19
1.4.1. Modificación de las superficies	21
1.4.1.1. Tratamiento con gases ionizados	22
1.4.1.2. Monocapas auto ensambladas	22
1.4.1.3. Química en mojado	23
1.4.2. Inmovilización covalente de los anticuerpos	25
1.4.2.1. Uniones a la superficie utilizando los grupos NH <sub>2</sub> y COOH de los anticuerpos	27
1.4.2.2. Uniones covalentes a través de los grupos SH creando enlaces tipos tiol	30
1.4.2.3. Uniones covalentes a través de los grupos carbohidratos	31
1.4.2.4. Uniones de los anticuerpos a través del sitio de unión a nucleótidos	32
1.4.2.5. Uniones de los anticuerpos utilizando reacciones de química clic	32
1.4.3. Inmovilización de los anticuerpos a las superficies por afinidad o inmovilización sitio específica	35
1.4.3.1. Inmovilización de los anticuerpos a través de la unión avidina-biotina	36
1.4.3.2. Inmovilización de anticuerpos a través de péptidos de unión específica a materiales	36
1.4.3.3. Inmovilización de los anticuerpos a las superficies recubiertas con proteína A, proteína G y proteína L	38
1.4.3.4. Inmovilización de los anticuerpos a través de la unión entre sustratos y enzimas	39
1.5. Detección de ácidos nucleicos mediante reacciones inmunoenzimáticas	40
1.5.1. Ensayos inmunoenzimáticos para la cuantificación de productos de PCR	40
1.5.2. Ensayos inmunoenzimáticos para la detección de micro RNA	43
<b>HIPÓTESIS</b>	46
<b>OBJETIVOS</b>	47

<b>II. AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA ELISA MEDIANTE QUÍMICA CLIC</b>	48
<b>2.1. INTRODUCCIÓN</b>	48
<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	50
2.2.1. Obtención de proteínas recombinantes utilizadas en los ELISAs modelos para la validación de las superficies	50
2.2.1.1. Clonación y expresión de la proteína recombinante c-myc-IL6h en células de mamíferos. Cuantificación y detección mediante ELISA	50
2.2.1.1.1. Análisis de los resultados obtenidos en ensayos tipo ELISA	51
2.2.1.2. Clonación y expresión de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h en <i>Escherichia coli</i> . Purificación usando columna de afinidad y detección mediante ELISA	52
2.2.2. Modificación de anticuerpos y BSA para la incorporación de grupos funcionales involucrados en reacciones de tipo química clic	53
2.2.2.1. Incorporación del grupo funcional trans-ciclooctano en los anticuerpos anti c-myc y anti CEA a través de la reacción N-hidoxisuccinimida con los grupos amino libres del anticuerpo	53
2.2.2.1.1. Detección de la actividad del anticuerpo modificado anti c-myc-TCO mediante ELISA	54
2.2.2.1.2. Detección de la actividad del anticuerpo modificado anti CEA-TCO mediante ELISA	55
2.2.2.2. Incorporación del grupo funcional tetracina en la albúmina de suero bovina	55
2.2.3. Preparación de superficies con alta densidad del grupo funcional tetracina	56
2.2.3.1. Exposición del grupo tetracina en superficies de poliestireno previamente aminadas mediante química en mojado	56
2.2.3.2. Exposición del grupo tetracina en superficies de poliestireno aminadas usando poli-lisina-tirosina	57
2.2.3.3. Exposición del grupo tetracina en superficies estándar de ELISA mediante la proteína BSA-Tetracina	58
2.2.4. ELISAs desarrollados para la evaluación de las superficies activadas con tetracina	58
2.2.4.1. ELISA para la detección del anticuerpo anti CEA-TCO (3C1) uniéndose a superficies tratadas con tetracina	58
2.2.4.2. ELISA comparativo de detección de la proteína CEA en superficies estándar y en superficies tratadas con tetracina	59
2.2.4.3. ELISA para la detección del anticuerpo anti c-myc-TCO uniéndose a superficies tratadas con tetracina	60
2.2.4.4. ELISA comparativo de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h en superficies estándar y en superficies tratadas con tetracina	61
2.2.4.5. ELISA comparativo de detección de la proteína c-myc-IL6h en superficies estándar y en superficies tratadas con tetracina	62
<b>2.3. RESULTADOS</b>	64
2.3.1. Obtención de proteínas recombinantes utilizadas en los ELISAs modelos para la validación de las superficies	64
2.3.1.1. Clonación y expresión de la proteína recombinante c-myc-IL6h en células de	64

mamíferos. Cuantificación y detección mediante ELISA	
2.3.1.2. Clonación y expresión de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h en <i>E. coli</i> . Purificación usando columna de afinidad y detección mediante ELISA	65
2.3.2. Modificación de anticuerpos y BSA para la incorporación de grupos funcionales involucrados en reacciones de tipo química clic	67
2.3.2.1. Incorporación del grupo funcional trans-cicloocteno en los anticuerpos anti c-myc y anti CEA a través de la reacción N-hidroxisuccinimida con los grupos amino libres del anticuerpo	67
2.3.2.1.1. Detección de la actividad del anticuerpo anti c-myc-TCO mediante ELISA	68
2.3.2.1.2. Detección de la actividad del anticuerpo anti CEA-TCO mediante ELISA	70
2.3.2.2. Incorporación del grupo funcional tetracina en la albúmina de suero bovina	70
2.3.3. Preparación de superficies con alta densidad del grupo funcional tetracina	71
2.3.3.1. Exposición del grupo tetracina en superficies de poliestireno previamente aminadas mediante la técnica de química en mojado	71
2.3.3.2. Exposición del grupo tetracina en superficies de poliestireno aminadas usando poli-lisina-tirosina	72
2.3.3.3. Exposición del grupo tetracina en superficies estándar de ELISA usando la proteína BSA-Tetracina	74
2.3.4. ELISAs desarrollados para la evaluación de las superficies activadas con tetracina	75
2.3.4.1. ELISA para la detección del anticuerpo anti CEA-TCO uniéndose a superficies tratadas con tetracina	75
2.3.4.2. ELISA comparativo de detección de la proteína CEA en superficies estándar y superficies tratadas con tetracina	76
2.3.4.3. ELISA para la detección del anticuerpo anti c-myc-TCO uniéndose a superficies tratadas con tetracina	78
2.3.4.4. ELISA comparativo de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h en superficies estándar y en superficies tratadas con tetracina	79
2.3.4.5. ELISA comparativo de detección de la proteína recombinante c-myc-IL6h en superficies estándar y en superficies tratadas con tetracina	82
<b>2.4. DISCUSIÓN</b>	<b>84</b>
<b>III. DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS</b>	<b>89</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>89</b>
<b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>91</b>
3.2.1. Unión de BSA con oligos a través de una reacción de tipo química clic	91
3.2.1.1. Incorporación del grupo reactivo DBCO en la proteína albúmina de suero bovina	91
3.2.1.2. Unión de diferentes oligos con la proteína BSA-DBCO	91
3.2.2. Detección de un oligo por complementariedad a través de la técnica de ELISA	92
3.2.2.1. Prueba de concepto de la detección a través de una reacción inmunoenzimática de la hibridación <i>in situ</i> de dos oligos complementarios	92

3.2.2.2. Optimización del tampón utilizado en el paso de unión de los oligos por complementariedad	93
3.2.2.3. Ensayo 2 PLEX de detección de la unión entre dos oligos. Bases para el multiplexado	94
3.2.2.4. Detección del miRNA-205 a través de una técnica de hibridación <i>in situ</i> ligado a un ensayo inmunoenzimático	94
3.2.3. Detección de un miRNA a través de una PCR ligada a la técnica ELISA	95
3.2.3.1. Amplificación del miRNA-29b mediante PCR con cebadores marcados	95
3.2.3.2. Eliminación del exceso del cebador marcado con hapteno usando partículas magnéticas de estreptavidina	96
3.2.3.2.1. Preparación de las partículas magnéticas de estreptavidina	96
3.2.3.2.2. Eliminación del cebador marcado con el hapteno	97
3.2.3.3. ELISA de cuantificación del miRNA amplificado por PCR	97
3.2.4. ELISA de 2 plex para detectar moléculas de distinta naturaleza en el mismo ensayo	98
3.2.4.1. ELISA de detección de CEA y miRNA-29b	98
<b>3.3. RESULTADOS</b>	99
3.3.1. Unión de BSA con oligos a través de una reacción de tipo química clic	99
3.3.1.1. Incorporación del grupo reactivo DBCO en la proteína BSA	99
3.3.1.2. Unión de diferentes oligonucleótidos con la proteína BSA-DBCO	99
3.3.2. Detección de la hibridación entre dos oligos mediante la técnica ELISA	100
3.3.2.1. Prueba de concepto para la detección de hibridación entre dos oligos usando la técnica ELISA	100
3.3.2.2. Optimización del tampón utilizado en el paso de hibridación de los oligonucleótidos por complementariedad	101
3.3.2.3. Ensayo 2 PLEX de detección de la hibridación entre dos oligos. Bases para el multiplexado	102
3.3.2.4. Detección del miRNA-205 a través de una técnica de hibridación <i>in situ</i> ligado a un ensayo inmunoenzimático	103
3.3.3. Detección de miRNA a través de una PCR ligada a la técnica ELISA	104
3.3.3.1. Amplificación del miRNA-29b mediante PCR con cebadores marcados	104
3.3.3.2. Eliminación del exceso de oligos usando partículas magnéticas de estreptavidina	104
3.3.3.2.1. Preparación de las partículas magnéticas de estreptavidina	104
3.3.3.3. ELISA de cuantificación del miRNA-29b amplificado por PCR	105
3.3.4. ELISA de 2 plex para detectar moléculas de distinta naturaleza en el mismo ensayo	106
3.3.4.1. ELISA de detección de CEA y miRNA-29b	106
<b>3.4. DISCUSIÓN</b>	108
<b>IV. AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA ELISA MEDIANTE UNA TECNOLOGÍA BASADA EN LA QUITINA Y EL DOMINIO DE UNIÓN A QUITINA</b>	113
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	113

<b>4.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	116
4.2.1. Obtención de proteínas recombinantes	116
4.2.1.1. Obtención de la proteína recombinante Cys-His6-ChBD	116
4.2.1.2. Obtención del anticuerpo anti c-myc-CHBD en células de mamíferos	117
4.2.2. Unión del anticuerpo anti c-myc con el dominio de unión a quitina químicamente	119
4.2.2.1. Modificación química del anticuerpo anti c-myc y de la proteína de unión a quitina	119
4.2.2.2. Detección de la unión química entre ChBD y el anticuerpo anti c-myc	120
4.2.3. Preparación de superficies de quitosano acetilado	120
4.2.4. ELISAs para la validación del aumento de sensibilidad de las superficies de quitosano acetilado con respecto a las superficies estándar	121
4.2.4.1. Optimización de la unión de la proteína de unión a quitina a la superficie de quitosano acetilado	121
4.2.4.2. Comparación del ELISA de detección de c-myc-GST -IL8h realizado en placas con superficies preparadas con quitosano acetilado o superficies estándar	122
4.2.4.3. Influencia del tipo de muestras sobre el ELISA	123
<b>4.3. RESULTADOS</b>	124
4.3.1. Obtención de proteínas recombinantes	124
4.3.1.1. Obtención de la proteína recombinante His6-Cys-ChBD	124
4.3.1.2. Obtención del anticuerpo anti c-myc-ChBD en células ExpiCHO	125
4.3.2. Unión del anticuerpo anti c-myc con el dominio de unión a quitina químicamente	127
4.3.2.1. Modificación química del anticuerpo anti c-myc y de la proteína de unión a quitina	127
4.3.2.2. Detección de la unión química entre ChBD y el anticuerpo anti c-myc	128
4.3.3. Preparación de superficies de quitosano acetilado	129
4.3.4. ELISAs para la validación del aumento de sensibilidad de las superficies de quitosano acetilado con respecto a las superficies estándar	130
4.3.4.1. Optimización de la unión de la proteína de unión a quitina a la superficie de quitosano acetilado	130
4.3.4.2. Comparación del ELISA de detección de c-myc-GST-IL8h realizado en placas con superficies preparadas con quitosano acetilado o superficies estándar	131
4.3.4.3. Influencia del tipo de muestras sobre el ELISA	133
<b>4.4. DISCUSIÓN</b>	135
<b>V. CONCLUSIONES</b>	138
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	139
<b>VII. ANEXOS</b>	



## RESUMEN

La técnica ELISA (del inglés “enzyme-linked immunosorbent assay”) es el método de rutina más utilizado y fiable para la detección de marcadores proteicos relevantes en la asistencia sanitaria. Aumentar la sensibilidad de este ensayo es crucial para detectar biomoléculas relacionadas con trastornos de salud y facilitar el diagnóstico en las primeras etapas de enfermedades como el cáncer, permitiendo de esta manera una posible disminución de la mortalidad. Así, se han desarrollado varios métodos para mejorar la sensibilidad del ELISA mediante la inmovilización de anticuerpos en las placas de poliestireno.

En este trabajo hemos desarrollado dos estrategias de inmovilización de anticuerpos a un sustrato sólido con el fin de aumentar la sensibilidad en el ensayo ELISA. En una de las estrategias hemos involucrado la reacción de alta eficiencia y especificidad entre la tetracina y el trans-cicloocteno con el fin de aumentar la densidad del anticuerpo en la superficie; y en la otra, la afinidad del dominio de unión a quitina por su sustrato como método para lograr la correcta orientación del anticuerpo inmovilizado. Para la primera estrategia se prepararon superficies con tetracina, mientras que el anticuerpo fue modificado con TCO. La preparación de las superficies se llevó a cabo de tres formas diferentes: 1) partiendo de placas aminadas comerciales tratadas con glutaraldehído y lisina para aumentar el número de grupos  $\text{NH}_2$  en superficie, 2) partiendo de placas aminadas mediante un proceso de química en mojado y 3) recubriendo placas MaxiSorp con la proteína BSA marcada con 20 tetracinas por molécula. Para la evaluación de las superficies se utilizaron tres modelos de ELISA, dos de ellos recubriendo con el anticuerpo de baja afinidad anti c-myc (9E10) marcado con TCO, donde se detecta la proteína c-myc-GST-IL8h o c-myc-IL6h, y como anticuerpo de detección el específico para la citoquina correspondiente. El otro ELISA, para la evaluación de las superficies, se utilizó para detectar la proteína CEA, relacionada con el diagnóstico del cáncer colorrectal. En todos los casos se observó un aumento de la sensibilidad del ELISA desarrollado en las superficies preparadas con tetracina comparado con la superficie estándar. En la detección de c-myc-GST-IL8h se obtuvo un aumento de sensibilidad del ELISA, comparado con las superficies estándar, de 2,6 veces para las superficies preparadas a partir de placas aminadas comerciales, de 11 veces partiendo de placas aminadas mediante química en mojado y de 13,7 veces en placas previamente recubiertas con BSA-tetracina. Del mismo modo, en el ELISA de detección de c-myc IL6h se aumentó la sensibilidad 9 veces en placas con tetracina a partir de placas aminadas mediante química en

mojado y, por último, el ELISA de detección de CEA tuvo un aumento de 12 veces en placas previamente recubiertas con BSA-tetracina.

En la segunda estrategia fueron preparadas superficies de poliestireno con quitosano acetilado mediante un proceso de acetilación *in situ*, mientras que, por otro lado, fue preparado el anticuerpo anti cmyc (9E10) unido a ChBD. Esta unión fue realizada de forma química a través de una reacción de tipo química clic y de forma recombinante fusionando ChBD al carboxilo terminal del anticuerpo. Ambos anticuerpos fueron evaluados mediante el ELISA de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h, en las placas de quitosano acetilado, observándose un aumento de la sensibilidad de 6 veces ( $p < 0,0001$ ) con respecto al ELISA realizado en la superficie estándar usando el anticuerpo obtenido de forma recombinante.

Asimismo, se diseñó un método de detección de dos moléculas de distinta naturaleza en un ensayo tipo multiplex de spot en placas de ELISA. El objetivo fue determinar la concentración de dos moléculas relacionadas con el cáncer colorrectal, el miRNA-29b y la proteína CEA. Para la detección del miRNA mediante un ensayo inmunoenzimático, se desarrolló un método directo de hibridación *in situ* y otro basado en la técnica PCR-ELISA. Con esta última técnica de detección de ácidos nucleicos se logró la detección del miRNA-29b con un LOD de 1358 moléculas totales simultáneamente con la proteína CEA, con un LOD de 2,54 ng/ml.

En este trabajo se demuestra, a través de la reacción tetracina - TCO, que la sensibilidad del ensayo ELISA mejora de forma significativa usando un sistema de inmovilización de anticuerpos que permita que estos queden fijados mediante un enlace covalente a la superficie. Además, la correcta orientación de los anticuerpos en la superficie de un ensayo de ELISA mejora la sensibilidad de la técnica. Se demuestra también la detección simultánea de dos moléculas de distinta naturaleza (un miRNA y una proteína) en un ensayo inmunoenzimático.

## ABSTRACT

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most widely used and reliable clinical routine method for the detection of essential protein markers in healthcare. Improving ELISAs is crucial to detect biomolecules related to health disorders and facilitating diagnosis at the early disease stages such as cancer, thus allowing the possibility of a decrease in mortality. Several methods have been carried out to improve the ELISA sensitivity through antibodies immobilization on the microtiter plates.

In this work we have developed two strategies of antibodies immobilization on a solid support to improve the ELISA sensitivity. To increase antibody density on the surface, one strategy was related to the highly efficient and specific reaction between tetrazine and trans cyclooctene. The second strategy was based on the affinity between chitin binding domain and its substrate to promote the adequate capture antibody orientation. To develop the first strategy, surfaces with exposed tetrazine groups were prepared, while antibody was modified with TCO. The surfaces with tetrazine were carried out in three different ways: 1) from commercial aminated plates treated with glutaraldehyde and lysine to increase the  $\text{NH}_2$  groups, 2) from aminated plates after a wet chemical process and 3) from Maxisorp plates coated with BSA modified with 20 tetrazine per molecule. The surfaces were evaluated using three ELISA models, two of them using the low affinity antibody anti c-myc (9E10) modified with TCO as a capture antibody. This procedure was carried out to detect the recombinant proteins c-myc-GST-IL8h and/or c-myc-IL6h, and the detection was performed with the corresponding specific cytokine biotinylated antibody. The third ELISA for the evaluation of surfaces was a CEA detection ELISA, a protein related with colorectal cancer. The sensitivity increased in all the surfaces treated with tetrazine in comparison with the standard unmodified surfaces. Thus, in commercial aminated plates treated with tetrazine, the detection sensitivity of c-myc-GST-human IL8 was 2.6-fold increase, on tetrazine surfaces previously aminated with a wet chemical process 11-fold and 13.7-fold on plates coated with BSA-tetrazine. On the other hand, the sensitivity of c-myc IL6h detection ELISA increased 9-fold in tetrazine treated surfaces using aminated plates after a wet chemical process, while CEA ELISA detection increased 12-fold on surfaces plates previously coated with BSA-tetrazine.

For the second strategy, we combined polystyrene surfaces coated with acetylated chitosan prepared by an *in-situ* acetylation process. In this case, the anti-cmyc antibody (9E10) was linked to ChBD. The anti c-myc-ChBD antibody was obtained using a click chemistry reaction or cloning

a recombinant protein with ChBD attached to the end carboxyl of anti c-myc. Both anti cmc-ChBD antibodies were evaluated on chitosan acetylated surfaces using a sandwich detection ELISA to detect c-myc-GST-IL8h. The ELISA assays developed on chitin surfaces were 6-fold more sensitive ( $p < 0.0001$ ) than those performed on standard surface.

Besides, a spot multiplex ELISA was designed to detect two molecules of different nature in the same assay: the CEA protein and the miRNA-29b, both related with colorectal cancer. The immunoenzymatic detection of miRNA was developed through *in situ* hybridization or by a PCR-ELISA technique. Using a PCR-ELISA a LOD of 1.358 molecules to miRNA-29b was obtained, while the LOD of CEA detection was 2.54 ng/ml, both molecules were simultaneously detected in the same well.

In this work we show that it is possible to improve the ELISA sensitivity using an immobilization system through a tetrazine-TCO reaction, which allow the capture antibodies to bind covalently on to surfaces. Moreover, the adequate capture antibody orientation on surfaces also improves the ELISA technique sensitivity. On the other hand, we also demonstrate, the simultaneous detection of a miRNA and a protein, two different nature molecules, by mean of an immunoenzymatic assay.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## CAPÍTULO 1

### 1.1. Sistemas de detección de moléculas para el diagnóstico temprano del cáncer

El cáncer es la segunda enfermedad con más incidencia del mundo con una tasa de mortalidad creciente en los últimos años. Muchos factores como la exposición a productos químicos, a radiaciones ionizantes y las infecciones, entre otros, pueden alterar las células y dar como resultado una modificación y proliferación anómala provocando la generación de cáncer en diferentes partes del organismo. Aunque necesario, el diagnóstico clínico basado en sintomatologías puede en ocasiones llevarse a cabo sólo en etapas más avanzadas de la enfermedad, cuando ya no es posible la aplicación eficaz de terapias. Por lo tanto, sería deseable el desarrollo de herramientas que permitieran un diagnóstico temprano para lograr una supervivencia más prolongada de los pacientes (Walter *et al.*, 2019). Con este objetivo, los investigadores han propuesto como tal, la detección de proteínas y oligonucleótidos liberados en el organismo durante las primeras etapas del cáncer, los cuales no están presentes en las mismas concentraciones en individuos sanos. Estas moléculas son conocidas como “biomarcadores” y son específicas de diferentes tipos de cánceres, por lo que su detección y estimación pueden proporcionar información muy valiosa sobre el tipo de cáncer y su estadio (Gion, Trevisiol and Fabricio, 2020).

Durante los últimos 15-20 años, los biomarcadores han desempeñado un papel cada vez más destacado en el desarrollo de fármacos y en la evaluación de pacientes con cáncer. Estos se utilizan en todas las etapas del desarrollo de fármacos, desde el enriquecimiento, la estratificación y la selección de pacientes hasta la evaluación de la seguridad, la eficacia y el rendimiento. Si bien en algunos ensayos clínicos se reclutan pacientes en función de la presencia de biomarcadores específicos ("enriquecimiento"), otros ensayos examinan biomarcadores específicos para el uso en investigación que generan un panel de datos clínico-genómicos que permitan la toma interna de decisiones (Vivot *et al.*, 2017).

Los biomarcadores tienen muchas aplicaciones potenciales en oncología, incluida la evaluación de riesgos, el cribado, el diagnóstico diferencial, la determinación del pronóstico, la predicción de la respuesta al tratamiento y el seguimiento de la progresión de la enfermedad (Henry and Hayes, 2012; van Brummelen *et al.*, 2017; Doroshov *et al.*, 2021). Algunos ejemplos de biomarcadores y su relación con su aplicación se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Potencial uso de los biomarcadores de cáncer		
Usos	Ejemplos de biomarcadores	Tipo de cáncer
Estimación del riesgo del desarrollo del cáncer	<ul style="list-style-type: none"> <li>BRCA1</li> </ul>	Cáncer de ovario y mama
Cribado	<ul style="list-style-type: none"> <li>PSA</li> </ul>	Cáncer de próstata
Predicción de la respuesta a las terapias	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mutación de KRAS y anticuerpo anti EGFR</li> </ul>	Cáncer colorrectal
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Expresión de HER2 y terapia anti HER2</li> </ul>	Cáncer de mama y gástrico
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Expresión del receptor de estrógenos</li> </ul>	Cáncer de mama
	<ul style="list-style-type: none"> <li>PD-1 y PD-L1</li> </ul>	Tumores sólidos
	<ul style="list-style-type: none"> <li>BRAF</li> </ul>	Melanoma
Monitoreo de la recurrencia de la enfermedad	<ul style="list-style-type: none"> <li>CEA</li> <li>AFP, LDH, bHCG</li> <li>HE4</li> </ul>	Cáncer colorrectal Tumor de células madres Cáncer de ovario
Monitoreo de la respuesta o progresión en metástasis	<ul style="list-style-type: none"> <li>CA15-3 y CEA</li> </ul>	Cáncer de mama

BRCA1: proteína de susceptibilidad al cáncer de mama 1; PSA: antígeno específico de próstata; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER2:Receptor del factor de crecimiento epidémico humano; CEA: antígeno carcinoembrionario; AFP:  $\alpha$  fetoproteína; hCG: gonadotropina coriónica humana; LDH: lactato deshidrogenasa; HE4: proteína secretora 4 del epidídimo humano; PD-1: proteína 1 de muerte celular programada; PD-L1: ligando 1 de la proteína de muerte celular programada; BRAF: B-Raf quinasa

Los biomarcadores son fundamentales en el desarrollo de medicamentos personalizados y han agregado más complejidad al diseño, ejecución y análisis de datos de ensayos clínicos. Comprender el panorama de los biomarcadores, incluida la actividad de investigación clínica, es crítico a medida que los departamentos de I + D de los sistemas de salud y de la industria farmacéutica se alinean con los avances científicos (Gion, Trevisiol and Fabricio, 2020).

Debido al papel fundamental que tiene la detección de los biomarcadores, ha sido importante el desarrollo de sistemas de detección que sean simples, de bajo coste y que puedan proporcionar una estimación sensible y específica de dichos biomarcadores. Además, teniendo en cuenta la variabilidad de la población, la etapa del cáncer y los bajos niveles de biomarcadores en las primeras etapas del cáncer, es recomendable identificar y probar paneles de múltiples biomarcadores para una mejor precisión en el diagnóstico (Ranjan, Esimbekova and Kratasyuk, 2017).

En la actualidad, los métodos para el diagnóstico del cáncer incluyen análisis de biopsias, imágenes del tumor mediante radiografías, monitorización de biomarcadores a través de inmunoensayos ya sea ligados a enzimas, radio inmunoensayos o inmunoensayos electroforéticos y técnicas proteómicas basadas en espectroscopia de masas (Marrugo-Ramírez, Mir and Samitier, 2018). Los inmunoensayos para la detección de biomarcadores continúan siendo hoy en día los ensayos más utilizados en la clínica, tanto para la detección como para la monitorización de enfermedades (Vashist and Luong, 2018b).

## 1.2. Inmunoensayos

Los inmunoensayos son métodos bioanalíticos altamente selectivos que detectan y determinan la presencia o concentración de analitos, que incluyen desde pequeñas moléculas hasta macromoléculas en una solución, a través de una reacción antígeno-anticuerpo.

En las últimas décadas, los inmunoensayos han jugado un papel significativo en el análisis biológico en diferentes ámbitos como son el diagnóstico clínico (Dixit and Twyman, 2019), el análisis biofarmacéutico (Allinson, 2011; Dinis-Oliveira, 2014), el monitoreo medioambiental de herbicidas, fungicidas e insecticidas (Lee and Kennedy, 2007), así como la seguridad y la alimentación (Ahmed *et al.*, 2020). Este gran número de aplicaciones permite prever que el mercado de los inmunoensayos tenga un crecimiento anual de un 6% en el período 2018-2023, estimando una generación de unos 27 mil millones de dólares en 2023 (“Immunoassay Market by Product & Service. Global Forecast to 2023 : Markets and Markets”, 2018). Estas previsiones son atribuidas al incremento de la incidencia de enfermedades crónicas e infecciosas, a los avances tecnológicos en los dispositivos de lectura de inmunoensayos, al crecimiento de la industria biotecnológica y biofarmacéutica y al aumento de la adopción de inmunoensayos para análisis rápidos tipo POC (*POC, point of care*) (Dave *et al.*, 2019).

Los primeros inmunoensayos fueron implementados en el año 1960 por Rosalyn Yalow y Salomon Berson, quienes desarrollaron la técnica de radioinmunoensayo (*Radio ImmunoAssay, RIA*) para la detección de antígenos o anticuerpos marcados con radioisótopos tales como  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{57}\text{Co}$  (Yalow and Berson, 1960). Esta técnica fue posteriormente mejorada por las empresas *Pierce* y *Stratis Avrameas*, con los ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA*), eliminando la necesidad de usar radioisótopos (Engvall and Perlmann, 1971). A partir de este momento, fueron desarrolladas múltiples técnicas que permiten la detección de analitos de forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa.

Gracias a los avances de la bioingeniería, la microfluídica y los biosensores han surgido diversos sistemas inmunoanalíticos (Turner, 2013; Karle *et al.*, 2016; Vashist and Luong, 2016). Concretamente, los avances en microfluídica han permitido el desarrollo de los dispositivos de inmunoensayos de flujo lateral (*Lateral Flow Immunoassays LFIA*) (Mohammed and Desmulliez, 2011) los cuales han sido ampliamente utilizados en los llamados “test rápidos” (embarazo, COVID, alergia al gluten, glucosa, etc). También la resonancia por plasmones superficiales (*Surface Plasmon Resonance, SPR*) se ha convertido en una técnica que, además de permitir la detección de los analitos, permite la búsqueda de interacciones entre diferentes

moléculas además de conocer el grado de afinidad entre ellas (Jason-Moller, Murphy and Bruno, 2006; Thillaivinayagalingam *et al.*, 2010).

Por su parte, los nuevos conceptos sobre microgravimetría han permitido el desarrollo de inmunoensayos basados en espectroscopía de masa, que han sido extensamente usados en la clínica y la industria para un gran número de analitos (Vashist and Vashist, 2011).

Entre los distintos formatos de inmunoensayos que son usados actualmente podemos citar el ELISA, el AlphaLISA, los inmunoensayos basados en nanopartículas (*Counting immunoassays*), los inmunoensayos turbidimétricos, los inmunoensayos en microarrays, los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA), entre otros (Beaudet *et al.*, 2008; Kuramitz, 2009; Cinquanta, Fontana and Bizzaro, 2017; Vashist and Luong, 2018b). Dada lo extenso de la temática, en este capítulo solo abordaremos los inmunoensayos relacionados con nuestro trabajo.

### 1.2.1. ELISA

Los ensayos ELISA son inmunoensayos bien conocidos y uno de los más utilizados en clínica para el seguimiento y detección de enfermedades debido a su alta especificidad, sensibilidad, precisión y trazabilidad. Estos ensayos son realizados generalmente en placas de 96 pocillos y permiten la detección y cuantificación de sustancias solubles como son péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. La alta especificidad de un anticuerpo con la macromolécula a cuantificar es el elemento crucial de este tipo de ensayos y la detección está asociada a la medida de la actividad de una enzima reportera tras ser incubada con su sustrato.

Esta reacción de la enzima reportera con su sustrato, a su vez, está acoplada a una reacción colorimétrica, de fluorescencia o luminiscencia, determinando de este modo tres tipos de ELISAs diferentes dependiendo de la señal obtenida. Esta enzima puede ir unida directamente al anticuerpo que se emplea en la detección del analito o puede estar unida a la estreptavidina, que a su vez se une por afinidad a la biotina que ha sido incorporada a los anticuerpos de detección del analito. Entre las enzimas utilizadas en los inmunoensayos están la peroxidasa de rábano picante (*HRP, horseradish peroxidase*), la fosfatasa alcalina de gamba y la  $\beta$ -D-galactosidasa (Vashist and Luong, 2018b) La peroxidasa es la enzima más extendida en los ELISA. Esta es la más pequeña de estas enzimas y posee la ventaja de que no se encuentra en la mayoría de las células de mamíferos, lo que evita reacciones inespecíficas. En presencia de  $H_2O_2$ , la HRP promueve la oxidación de ciertos sustratos para dar lugar a productos con propiedades ópticas fácilmente detectables, siendo los más habituales el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y la OPD (o-fenilenodiamina) entre los cromogénicos; el luminol (5-

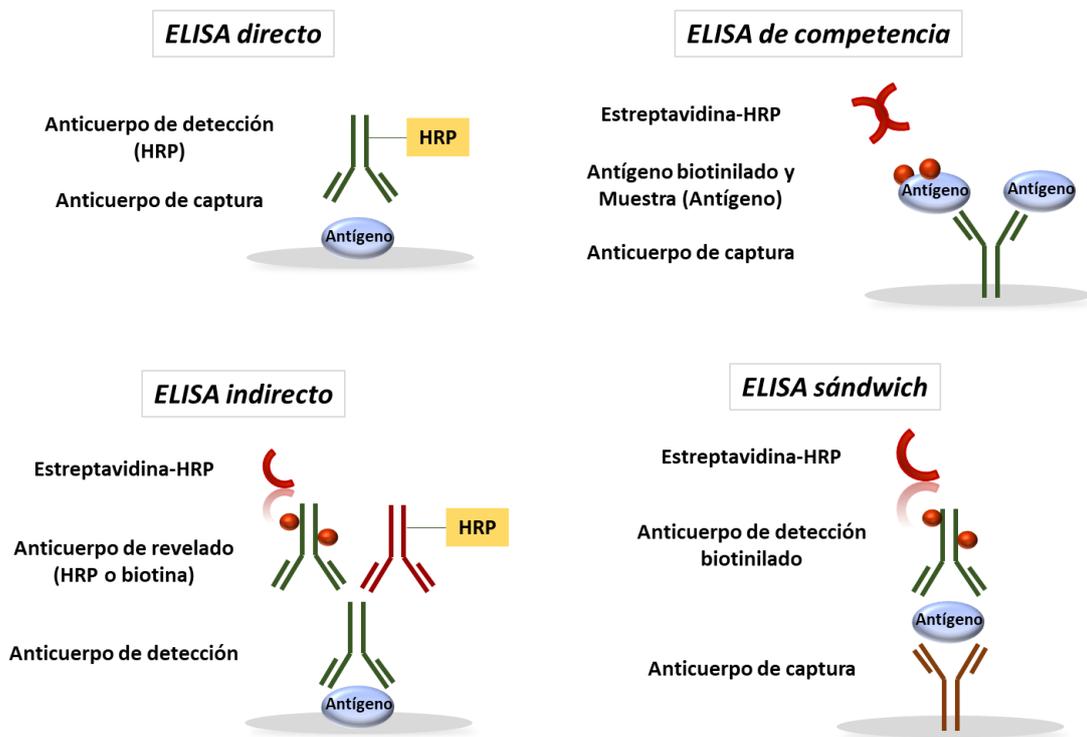
amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) entre los quimioluminiscentes y la fluoresceína, la rodamina y la umbeliferona, entre los fluorescentes.

En todos los formatos de ELISA, tras el recubrimiento con el anticuerpo de captura o con el antígeno, las superficies son bloqueadas con el objetivo de eliminar cualquier sitio que pueda ser ocupada por alguna de las proteínas a emplear en los pasos subsiguientes. Para esto se utiliza una solución tampón, generalmente proteica, que se adsorbe de forma pasiva a la superficie. Esta solución es efectiva si mejora la sensibilidad del ELISA debido a la reducción de la interferencia del fondo y, por consiguiente, la mejora de la relación señal: fondo. El tampón de bloqueo debería unirse a todos los sitios potenciales de la superficie que no queden cubiertos por la proteína de recubrimiento, los cuales pudiesen tener una interacción inespecífica con los anticuerpos de los pasos subsiguientes. Entre las soluciones tampón podemos citar la albúmina de suero bovino (1-5% BSA en PBS), la caseína o la leche desnatada (0.1-3%) y/o el suero animal completo (10%), entre otros. Algunos tampones de bloqueo no proteicos también han sido utilizados. Entre estos destacan el polietilenglicol (PEG), el alcohol polivinilo (PVA) y la polivinilpirrolidona, que se caracterizan por recubrir superficies hidrofóbicas inhibiendo las uniones inespecíficas (Studentsov *et al.*, 2002).

Debido a la extensa utilización de los ELISA, muchas investigaciones se han centrado en la mejora de la tecnología a través de la automatización de los ensayos usando robots de manejo de líquidos, la disminución del coste de los lectores de señales del ELISA, la ampliación del formato de las microplacas de titulación, que han pasado de 96 pocillos a formatos de 384 y 1536 pocillos, etc. Asimismo, el desarrollo de los ELISAs ha mejorado de forma significativa gracias a una mejor inmovilización de los anticuerpos (Sandeep Kumar Vashist *et al.*, 2014; Wild & Kodak, 2013; Hermanson, 2013); al desarrollo de sustratos más sensibles para las enzimas ligadas al ensayo y al uso de micro o nanomateriales (Vashist *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2014), entre otros.

Aunque el ELISA manual aún sigue en uso en países en desarrollo debido a las infraestructuras existentes, la mayoría de los inmunoensayos que se realizan en la clínica en los países desarrollados están completamente automatizados, usando equipamiento comercializado por grandes compañías como *Roche*, *Abbott* y *Siemens*. No obstante, aún quedan muchos biomarcadores asociados a enfermedades de menor prevalencia que no son determinados de forma automatizada. Las compañías líderes en el desarrollo de nuevos ELISA manuales son, entre otras, *R&D Systems*, *BD Biosciences*, *Bio-Rad Laboratories*, *Life Technologies Corporation*, *Millipore Corporation* y *BioLegend*.

Atendiendo al procedimiento utilizado, los ELISAs pueden ser clasificados en cuatro tipos: directo, indirecto, sándwich y de competencia (Fig. 1). El ELISA directo es el más sencillo de todos. En este, el analito se fija a la superficie de la placa mediante adsorción y posteriormente un anticuerpo acoplado con la enzima, generalmente la peroxidasa, forma el complejo inmune (Fig. 1).



**Figura 1.** Esquemas de los diferentes tipos de ELISA en base a su diseño.

En el ELISA indirecto, al igual que en el directo, el analito se fija a la superficie de la placa y posteriormente se añade el anticuerpo de detección específico del antígeno (Fig. 1). Se diferencia del ELISA directo en que el anticuerpo de detección no está marcado con la enzima, por lo que es necesario el uso de un anticuerpo secundario, el cual reconoce la región constante del anticuerpo específico y, a su vez, está acoplado a la enzima. Este ELISA ha sido ampliamente utilizado para la detección de anticuerpos en suero de pacientes. Un ejemplo de ELISA indirecto es el utilizado para la detección de la presencia de anticuerpos séricos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En este ELISA, las proteínas VIH-1 y/o VIH-2 del virus son absorbidas como antígenos en la superficie de los pocillos. El anticuerpo específico, que se encuentra en el suero de las personas afectadas de VIH, reconoce el antígeno y posteriormente el ELISA es revelado con un anticuerpo secundario anti IgG humano o anti IgM humano marcado con la peroxidasa (Workowski and Bolan, 2015).

Los ELISA tipo sándwich son los ensayos inmunoenzimáticos más utilizados en la clínica, por lo que existe una amplia cartera de kits diagnósticos para la cuantificación de biomarcadores. Este ELISA involucra dos anticuerpos específicos para la detección del antígeno de interés, lo que favorece la especificidad del ensayo. En este caso, en el revelado puede usarse el anticuerpo secundario o de detección unido a la enzima de la reacción, aunque en la mayoría de los casos los anticuerpos están unidos a biotina. Este paso adicional, que comprende la unión de alta afinidad de la biotina con la estreptavidina, mejora la sensibilidad de la mayoría de los ELISAs ya que la estreptavidina empleada tiene un alto número de moléculas de peroxidasa acopladas, con lo que se consigue una amplificación de la señal (Fig. 1). El procedimiento ha sido automatizado usando estaciones robóticas comerciales para un procesamiento de muestras de pacientes muy eficiente.

Actualmente los biomarcadores conocidos para la detección de enfermedades inflamatorias y del cáncer son detectados mediante ELISAs tipo sándwich realizados de forma automatizada (Tabla 2) (Vashist and Luong, 2018b). Sin embargo, continuamente van descubriéndose nuevos marcadores que no están incluidos en plataformas automatizadas y para los cuales los anticuerpos a emplear son de baja afinidad o no están disponibles (El-Khoury *et al.*, 2020).

**Tabla 2. Biomarcadores analizados mediante inmunoensayos automatizados para la detección del cáncer y enfermedades inflamatorias**

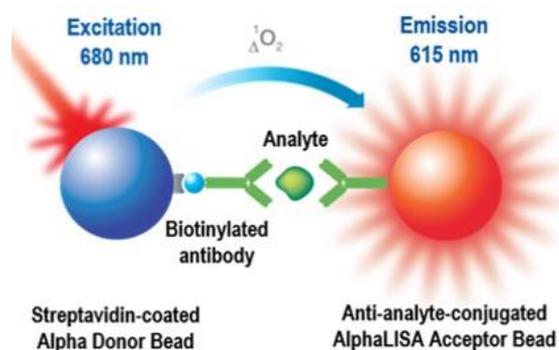
<b>Biomarcadores de inflamación</b>	<b>Biomarcadores relacionados con cáncer</b>
IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-2R, IL-6, IL-8, LBP, ASLO, TNF $\alpha$ , C3c, C4, CRP, IgA, IgE, IgG, IgM, IgA CSF, IgM CSF, prealbúmina, procalcitonina, cadena ligera kappa, cadena ligera $\lambda$	AFP, PSA libre, PSA, CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4, calcitonina, CEA, Cyfra 21-1 (KRT-19), $\beta$ -hCG, HE4, cadena ligera kappa libre, cadena ligera $\lambda$ libre, NSE, proGRP, TPS, TPA
IL: interleuquina; LBP: Proteína de unión a lipopolisacáridos; ASLO: Antiestreptolisina O; TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral; C: Complemento; CRP: Proteína C reactiva; Ig: Inmunoglobulinas; CSF: Fluido cerebroespinal;	AFP: $\alpha$ fetoproteína; PSA: Antígeno específico de próstata; CA: Antígeno de carcinoma; CEA: Antígeno carcinoembrionario; KRT: Queratina; hCG: Gonadotropina coriónica humana; HE4: Proteína del epidídimo humana; NSE: Enolasa neurona específica; proGRP: Péptido de liberación de progastina; TPS: Antígeno polipéptido tisular específico; TPA: Antígeno polipéptido tisular

Los ELISAs de competencia implican la cuantificación de una sustancia que es capaz de competir con el analito que será cuantificado existiendo, por tanto, una relación inversa entre las señales del ELISA y la concentración del analito de interés. Este formato podría ser desarrollado basándose en el ELISA directo, indirecto o sándwich (Fig. 1). Teóricamente el ELISA de competencia puede ser utilizado para cualquier analito. Sin embargo, este formato es muy común para moléculas pequeñas como son los esteroides y las moléculas que presentan pocos epitopos en su superficie. Un ejemplo de ELISA de competencia es el reportado por

Broto *et al.*, 2017 para el monitoreo de Tegafur (pro droga del 5-fluorouracilo), uno de los principales medicamentos utilizados en la terapia del cáncer.

### 1.2.2. AlphaLISA

A diferencia de los ELISA, la tecnología basada en perlas AlphaLISA es un ensayo homogéneo. El ensayo desarrollado por PerkinElmer (AlphaScreen®) se basa en la transferencia de electrones del oxígeno entre dos perlas muy próximas (Fig. 2) (Hou *et al.*, 2016). Estos ensayos no requieren de lavados entre los diferentes pasos, poseen una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico. Comparado con el protocolo de un ELISA estándar, los AlphaLISA incrementan el rendimiento a la vez que disminuyen el tiempo de ensayo y la manipulación. La plataforma AlphaLISA ha sido desarrollada para la inmunodetección de biomarcadores y es actualmente una tecnología de inmunoensayos de nueva generación para la investigación básica y estudios pre-clínicos, entre otros.



**Figura 2.** Detección de un analito mediante la tecnología AlphaLISA de PerkinElmer. La partícula aceptora (615 nm) está recubierta por un anticuerpo que reconoce el antígeno, mientras que la partícula donadora está recubierta por estreptavidina. El anticuerpo biotinilado de reconocimiento del antígeno se encuentra en la solución junto con este. Una vez que ambas partículas se acercan debido a la detección del antígeno, ocurre la emisión de luz. *Imagen tomada de Perkin Elmer.*

Los ensayos AlphaLISA pueden ser tipo sándwich o de competencia y se basan en la emisión de luz de una partícula de 615 nm que ocurre debido a la excitación provocada por la cercanía con otra partícula de 680 nm a través de la formación de un flujo de oxígeno entre ambas. En un ensayo de detección del analito tipo sándwich, este es detectado por un anticuerpo específico biotinilado. Este anticuerpo se une a unas partículas donadoras de 680 nm recubiertas de estreptavidina. El segundo anticuerpo, que reconoce al antígeno, se encuentra recubriendo las partículasceptoras (615 nm). Cuando el analito está unido a ambos anticuerpos provoca que las partículas donadoras y receptoras se acerquen formándose un canal de oxígeno que provoca que emisión de luz por parte de las partículasceptoras (Fig. 2) (Beaudet *et al.*, 2008).

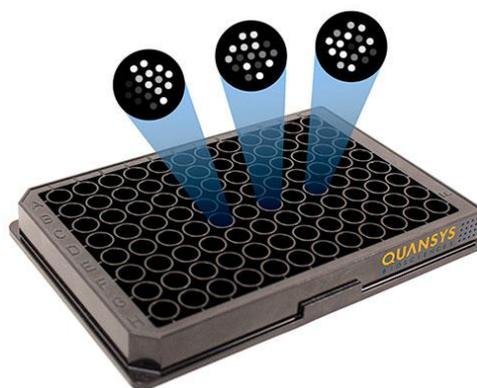
Actualmente Perkin Elmer cuenta con un catálogo que incluye cientos de kits de AlphaLISA para la detección de proteínas vinculadas con diversas enfermedades como cardiovasculares, oncológicas, diabetes, inflamatorias (interleuquinas), para la detección de marcas epigenéticas y para la determinación de fosforilaciones. Si bien todos estos ensayos se caracterizan por su elevada sensibilidad, tienen la desventaja de que es necesario un equipo de elevado coste para la lectura del ensayo.

### **1.2.3. Ensayos multiplex**

Aunque existe un significativo número de ensayos diseñados para detectar un único analito, desde hace pocos años la *multiplexación* ha adquirido gran popularidad ya que este formato no solo permite ahorrar tiempos de trabajo, sino que permite el análisis simultáneo de distintos analitos en una misma muestra. La multiplexación consiste en la detección simultánea de varios analitos de una misma muestra y en un solo ensayo.

Los métodos más comúnmente utilizados para el desarrollo de ensayos multiplex pueden ser englobados en dos categorías: 1) aquellos que se desarrollan sobre una superficie sólida plana y el ensayo para cada analito se dispone de forma separada en el soporte y 2) aquellos que son desarrollados sobre partículas y en cada una de ellas se desarrolla un ensayo diferente.

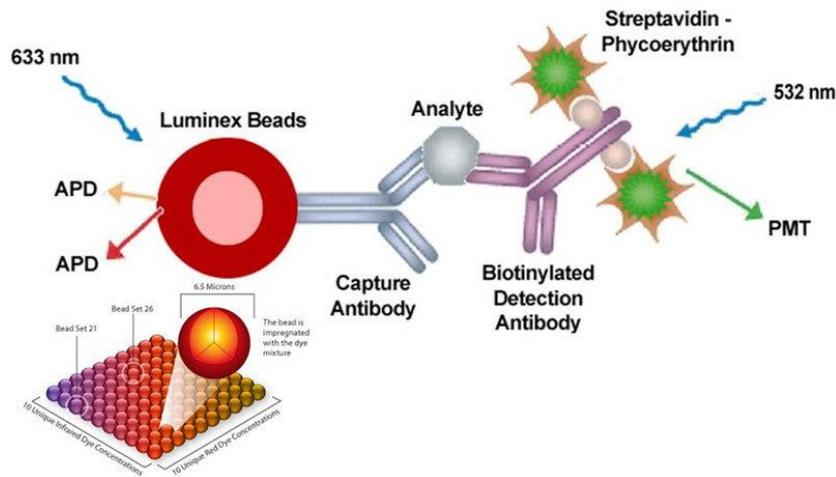
Los primeros ensayos multiplex fueron desarrollados sobre superficies sólidas y son similares al proceso de un ELISA tradicional excepto que las distintas parejas de anticuerpos, es decir, los diferentes ensayos, comparten el mismo volumen de reacción. Existen múltiples variaciones de este esquema, pero todos comparten el aislamiento físico de los anticuerpos de captura sobre la superficie de recubrimiento. Entre las diversas plataformas que incluyen este formato podemos citar la Mesoscale Discovery Technology Platform (*MSD*<sup>®</sup>) y la Q-Plex<sup>™</sup> array (*Quansys Biosciences*) (Fig. 3).



**Figura 3.** Representación de una placa de ELISA multiplex de Quansys con 17 spots. Cada spot representa un ELISA independiente. El anticuerpo de captura ha sido colocado usando un robot dispensador (20-50 nl del anticuerpo). El ensayo es determinado mediante la intensidad de luz en cada spot: si la muestra es positiva hay emisión de luz, de lo contrario el spot no es visible. *Imagen tomada de Quansys Biosciences.*

En los ensayos multiplex en suspensión, la muestra se aplica a una mezcla de partículas y cada partícula actúa como soporte de ensayo para un determinado antígeno. Para hacer corresponder cada analito con su partícula se utilizan diferentes marcadores de fluorescencia. La tecnología xMAP® (*Multiple Analyte Profiling, MAP*) de *Luminex Corporation*, es una combinación de citometría de flujo e inmunoensayos tipo sándwich. Esta técnica implica 100 conjuntos de partículas de distintos colores creados con dos colorantes fluorescentes (infrarrojo y rojo-naranja) en distintas proporciones (Cook *et al.*, 2019). La coloración de la partícula identifica el anticuerpo de captura que recubre cada microesfera, mientras que los anticuerpos de revelado están unidos a ficoeritrina para cuantificar los niveles del antígeno. La lectura se realiza con dos láseres: uno de clasificación rojo (635 nm), que identifica el código de la partícula, y un láser reportero verde (532 nm) que mide la intensidad de fluorescencia y determina la concentración del analito (Fig. 4).

Las principales ventajas del ensayo multiplex en comparación con el ELISA son el bajo volumen de muestra que es utilizado (20 µL), las condiciones idénticas de análisis, el ahorro de costes y tiempo y la amplia información obtenida sobre el proceso patológico (Adamcova and Šimko, 2018). Esta tecnología permite, con respecto a los ensayos realizados sobre superficies sólidas, la lectura simultánea de un rango más amplio de analitos usando la misma muestra. La tecnología xMAP® permite la detección simultánea de hasta 500 analitos diferentes. Sin embargo, esta tecnología tiene la limitación de requerir un equipamiento especializado ya que la lectura de las partículas exige de un citómetro de flujo especial con un elevado coste.



**Figura 4.** Representación de la tecnología Luminex® xMAP. Las partículas de poliestireno o paramagnéticas, están marcadas internamente con la combinación de dos fluoróforos (rojo e infrarrojo) a diferentes cantidades. Cada grupo de partícula que comparte un color determinado está recubierto con un anticuerpo específico para un analito. Sobre la superficie de la partícula se desarrolla un inmunoensayo tipo sandwich de detección del antígeno. Las partículas son detectadas a través de un láser a 633nm mientras que la unión del antígeno se mide a través de la ficoeritrina a 532 nm. *Imagen tomada de Luminex Corporation.*

Aunque los ensayos multiplex sobre partículas pueden ser leídos también en citómetros de flujo no especializados, ello penaliza el número de analitos que pueden ser analizados con la misma muestra. Un ejemplo de este tipo de ensayos son el FirePlex™ (Abcam) (Perea *et al.*, 2019). En ambos tipos de ensayos multiplex, la heterogeneidad de las superficies donde se desarrolla el ensayo, obligan a una exhaustiva validación para la eliminación de los posibles falsos positivos (Tighe *et al.*, 2013).

A pesar de la capacidades de multiplexación teórica de las plataformas, los paneles disponibles parecen aprovechar solo una fracción de esta capacidad y rara vez superan los 20 analitos individuales (Backen *et al.*, 2009; Bastarache *et al.*, 2014). Actualmente en el mercado hay disponibles varios ensayos multiplex (Tabla 3) (Tighe *et al.*, 2015). Sin embargo, de estos, relativamente pocos han sido validados en aplicaciones de diagnóstico in vitro (IVD).

**Tabla 3. Ejemplos de ensayos multiplex disponibles comercialmente para una variedad de indicaciones. FDA (U.S. Food and Drug Administration).**

INDICACIONES	ANALITO	COMPAÑÍA	PRODUCTO	FORMATO PLATAFORMA	FDA
Enfermedades Autoinmunes (lupus, celiacía)	Anticuerpos	INOVA Diagnostics	QUANTA Plex®	Luminex xMAP	+
Alergia	Anticuerpos	Immune Tech	MyAllergyTest	Luminex xMAP	+
Múltiple (Ej. drogas)	Proteínas	Randox	Biochip Array	Soporte sólido plano	+
Perfil de proteínas de fase aguda	Proteínas	Quansys	Q-Plex™ array	Soporte sólido plano	-
Múltiple	Proteínas	eBioscience	FlowCytomix™ Multiplex	Citometría de flujo	-
Enfermedades infecciosas (EBV, HSV 1 y 2)	Anticuerpos	Focus Diagnostics	Plexus™ Multiplexed	Luminex xMAP	+

FDA: Food and Drug administration; EVB: virus Epstein-Barr; HSV: virus herpes simple 1 y 2

### 1.3. Anticuerpos

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son el componente crítico de un inmunoensayo ya que son los que ofrecen la sensibilidad y especificidad de detección del analito de interés. Poseen una alta afinidad de unión por su correspondiente antígeno lo cual los hace excelentes para el desarrollo de biosensores. Se ha demostrado que los anticuerpos pueden ser inmovilizados sobre diversos soportes manteniendo su estructura y actividad en la mayoría de los casos. Por tanto, para el desarrollo de cualquier inmunoensayo, el primer paso es la búsqueda y generación de uno o más anticuerpos que reconozcan de forma específica al analito.

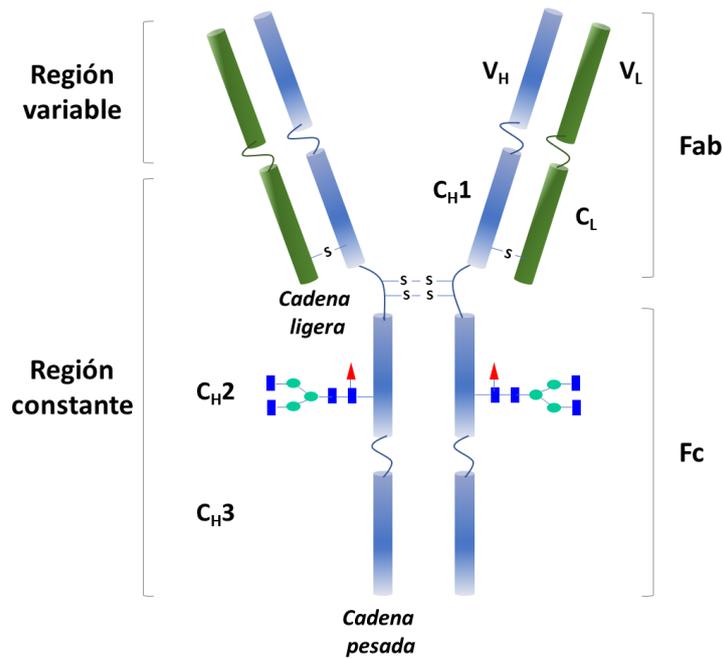
Los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales son producidos por diferentes clones de linfocitos B en un animal (conejo, cabra, oveja, etc) que ha sido inyectado con un inmunógeno. Como resultado los mismos reconocen varios sitios (epitopos) de un mismo antígeno y son una mezcla heterogénea de anticuerpos. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales son producidos en el laboratorio mediante cultivos de hibridomas o de forma recombinante en células de mamíferos (Zhang and Shen, 2012) u otros sistemas de células superiores como levaduras, células de insecto y plantas (Diamos *et al.*, 2020). Para el desarrollo de métodos inmunoenzimáticos, los anticuerpos monoclonales son preferibles a los policlonales debido a que presentan una alta especificidad de unión, ya que reconocen un solo epitopo del antígeno, y a que tienen una estructura homogénea y su producción puede ser escalada.

Para su uso en inmunoensayos, los anticuerpos deben ser caracterizados por su especificidad y afinidad, además de por las posibles reacciones cruzadas que pueda tener con otros analitos relacionados con el de interés. Una pareja de anticuerpos para un ensayo tipo sándwich consiste en dos anticuerpos que reconocen diferentes epitopos de un mismo antígeno. Esta pareja debe de ser compatible, de forma que no haya impedimento estérico en el reconocimiento (Gao *et al.*, 2018).

### **1.3.1. Estructura de los anticuerpos**

Existen distintos tipos de anticuerpos o isotipos basados en el tipo de cadena pesada que posean. En mamíferos, se conocen cinco clases diferentes de isotipos que desempeñan funciones diferentes: IgA, IgG, IgD, IgE e IgM. La IgG es la inmunoglobulina predominante en humanos, constituyendo el 75% del total de las inmunoglobulinas presentes en el suero. En humanos existen 4 subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 (Salfeld, 2007).

Estructuralmente, los anticuerpos contienen cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas (50 kDa) y dos cadenas ligeras idénticas de menor tamaño (25 kDa). Cada cadena pesada contiene un dominio variable ( $V_H$ ) y tres dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ) mientras que cada cadena ligera contiene solo un dominio variable ( $V_L$ ) y un dominio constante  $C_L$ . Las cadenas pesadas y ligeras se une entre sí mediante enlaces disulfuro intracatenarios además de otras interacciones no covalentes (Fig. 5) (Frazer and Capra, 1998). Las regiones variables de los anticuerpos se encuentran en el extremo amino terminal de las cadenas, mientras que las regiones constantes están hacia el carboxilo terminal.



**Figura 5.** Esquema de la estructura de un anticuerpo tipo IgG. Se muestra la región variable y constante del anticuerpo. F<sub>C</sub>: fracción constante; Fab: Fragmento de unión al antígeno. *Imagen adaptada de Shen, Rusling and Dixit, 2017.*

Han sido descritas dos tipos de cadenas ligeras:  $C_k$  (cadena ligera kappa) y  $C_\lambda$  (cadena ligera lambda). Como consecuencia de que las cadenas ligeras son idénticas entre sí, en mamíferos sólo un tipo de cadena ligera,  $\kappa$  o  $\lambda$ , está presente en el mismo anticuerpo. En cepas de ratones de laboratorio, las cadenas ligeras lambda representan sólo el 5% de las cadenas ligeras mientras que en humanos, las cadenas ligeras lambda son mucho más abundantes (alrededor de 40%) (Salfeld, 2007).

La región variable de una cadena ligera y de una cadena pesada forman entre ellas el sitio de reconocimiento del antígeno y como son cuatro cadenas, existen dos sitios de unión del antígeno por anticuerpo, lo que determina que los anticuerpos de tipo IgG sean bivalentes. El epítipo es el sitio del antígeno donde se une el anticuerpo, mientras que el paratopo es el sitio del anticuerpo donde se une el antígeno. En el estudio molecular de los anticuerpos, estos han sido divididos en dos regiones: los dominios de reconocimiento del antígeno (Fab) y el dominio o fragmento cristalizante (Fc) (Fig. 5). Las regiones Fab son distintas en composición, punto isoeléctrico y estructura física de la región Fc (Welch, Scoble, *et al.*, 2017).

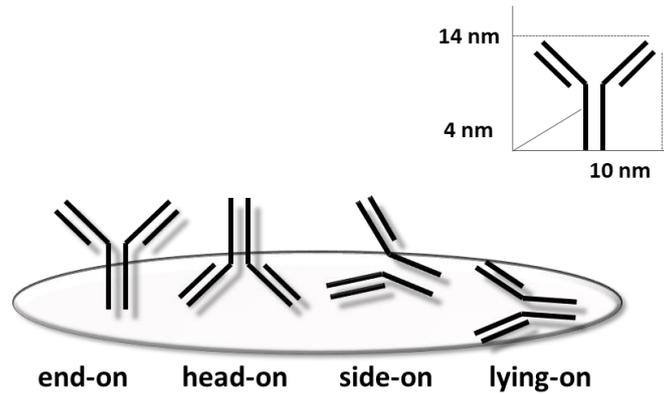
En las inmunoglobulinas aparece, además de las cuatro cadenas polipeptídicas básicas, un componente glucídico que representa el 2-14 % del peso total de la molécula. Estos carbohidratos se encuentran en la región Fc de los anticuerpos, específicamente en el dominio  $C_H2$  (Yoo *et al.*, 2002).

Al igual que otras proteínas, los anticuerpos presentan grupos funcionales como carboxilo, amino, hidroxilo, sulfhidrilo, alquilo y arilo (Maruani *et al.*, 2015). Sin embargo, a través de ingeniería genética han sido añadidos otros grupos funcionales a los anticuerpos, así como también han sido obtenidos derivados de estos, entre los que podemos mencionar los fragmentos de unión al antígeno (Fab), los anticuerpos de simple cadena de fragmento variable (ScFv) y los dominios simples de anticuerpos (sdAb), entre otros.

#### **1.4. Estrategias de inmovilización de un anticuerpo a una superficie**

El método más simple de inmovilización de un anticuerpo a una superficie sólida como el poliestireno o el oro, es mediante adsorción física, la cual ocurre debido a interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals e interacciones  $\pi$ - $\pi$  y electrostáticas (Jung, Jeong and Chung, 2008). La adsorción pasiva de los anticuerpos es el método más empleado para el desarrollo de inmunoensayos clínicos y de investigación, así como para la preparación de partículas de oro con fines farmacológicos o diagnósticos (Jazayeri *et al.*, 2016). La inmovilización pasiva generalmente da como resultados que los anticuerpos queden orientados al azar, pierdan su conformación nativa y en algunos casos su actividad. Además, los anticuerpos pueden experimentar desplazamiento sobre las superficies debido a los sucesivos pasos de lavados requeridos de los diferentes ensayos (Butler, 2000; Kausaite-Minkstimiene *et al.*, 2010).

La orientación correcta del anticuerpo en una superficie, lo que asegura su completa funcionalidad, ocurre cuando la fracción constante de ambas cadenas pesadas interacciona con la superficie de modo que los sitios de reconocimiento del antígeno quedan libres para la actividad de detección (*end on*), mientras que la actividad de anticuerpo es parcial cuando uno de los sitios de unión queda enmascarado y el otro queda libre (*side on*). Las otras orientaciones posibles de los anticuerpos hacen que estos pierdan completamente su actividad, ya que ambos sitios de unión al antígeno quedan interaccionando con la superficie (*head-on* y *lying-on*) (Fig. 6) (Welch, Scoble, *et al.*, 2017).



**Figura 6.** Dimensiones de un anticuerpo y posibles orientaciones en una superficie tras una inmovilización pasiva por adhesión. *End on*: la fracción constante de ambas cadenas están sobre la superficie; *head on*: ambos sitios de unión al antígeno están sobre la superficie; *side on*: un sitio de unión al antígeno y una fracción constante están sobre la superficie; *lying on*: tanto las fracciones constantes como las variables están sobre la superficie. Los anticuerpos de tipo IgG son glicoproteínas globulares en forma de Y de alto peso molecular (150 kDa) y dimensiones aproximadas de 14 x 10 x 4 nm. *Imagen tomada de Crivianu-Gaita and Thompson, 2015.*

La eficiencia de unión al antígeno de un anticuerpo que ha sido inmovilizado mediante adsorción física a una superficie es muy baja, de forma que, aunque un anticuerpo posee dos sitios de unión al antígeno, la relación de unión no supera el valor de 0,1 en situaciones prácticas. Esta relación tan baja se debe al impedimento estérico en la superficie y a la inadecuada orientación de los anticuerpos sobre ella (Xu, Lu and Williams, 2006). Por ello se han estudiado diferentes condiciones para la optimización de la adsorción física de los anticuerpos como son el pH, la concentración de sales y el tiempo de incubación, observándose que a pesar que aumenta la densidad del anticuerpo en las superficies a pH cercanos al punto isoeléctrico de este, la orientación resultante que predomina mantiene los sitios de unión sobre la superficie en forma *lying on* (Zhao *et al.*, 2012).

Las estrategias de inmovilización de un anticuerpo a una superficie pueden condicionar la orientación específica o al azar del mismo. La orientación depende de la capacidad de organización del anticuerpo, la cual puede ser dirigida a través de grupos reactivos sobre la superficie, sobre el anticuerpo o sobre ambos. La orientación adecuada de un anticuerpo no es un objetivo fácil de lograr dado que los grupos reactivos de este no son únicos en la molécula. Además, en el proceso de inmovilización de los anticuerpos es necesario evitar cambios en su estructura para mantener su actividad y especificidad de unión al antígeno. Por este motivo las estrategias de unión a las superficies deben contemplar condiciones medias, como pH neutro y baja concentraciones de sales, y ser compatibles con los diferentes materiales de las superficies de ensayo.

Con el objetivo de disminuir los efectos adversos de la inmovilización pasiva de los anticuerpos, se han trazado diferentes estrategias para que mantengan su capacidad de unión al antígeno y su especificidad, además de aumentar su densidad sobre las superficies. Entre estas estrategias están las que solamente modifican la superficie permitiendo así una mayor densidad de los anticuerpos sobre ellas. En otros casos, la estrategia consiste en la modificación química, tanto del anticuerpo como de la superficie, que permita la formación de enlaces covalentes entre ambos. Por último, existen opciones en las que se utilizan reacciones de afinidad entre compuestos en la superficie y anticuerpos modificados ya sea de forma química o mediante ingeniería (Dixit, 2011; Shen, Rusling and Dixit, 2017; Welch, Scoble, *et al.*, 2017; Vashist and Luong, 2018a).

#### **1.4.1. Modificación de las superficies**

En el desarrollo de los inmunoensayos intervienen dos elementos fundamentales. En primer lugar, la reacción antígeno-anticuerpo y, en segundo lugar, la superficie de ensayo. Los inmunoensayos han sido desarrollados en diversas superficies tales como oro, vidrio, cobre, partículas magnéticas, silicona y las más comunes, las de polímeros tales como poliestireno y polivinilo, entre otros (Yang *et al.*, 2013; Damborska *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, los inmunoensayos son realizados en placas de poliestireno debido a que esta superficie es barata, estable y fácilmente reproducible con precisión. El poliestireno es una superficie hidrofóbica que permite la adsorción de una amplia variedad de proteínas, entre ellas los anticuerpos. Sin embargo, cuando las superficies son más hidrofílicas hay un incremento en la unión de los anticuerpos a esta, aumentando la densidad de los anticuerpos en la superficie y disminuyendo la cantidad de proteína desnaturalizada.

Con el objetivo de mejorar la inmovilización de los anticuerpos a las superficies, se desarrollaron diferentes métodos para la modificación específica de estas. Estos métodos pueden ser utilizados como único paso de mejora de la inmovilización, o más comúnmente, pueden ser utilizados en combinación con la modificación del anticuerpo para permitir su anclaje a la superficie de forma más eficiente. Entre los métodos más utilizados para la modificación de las superficies destacan los tratamientos con gas ionizado, la química en mojado, las monocapas de silano, la radiación ultravioleta, los polímeros impresos molecularmente, los sustratos tridimensionales y las monocapas auto ensambladas, entre otros (Goddard and Hotchkiss, 2007; Welch, Scoble, *et al.*, 2017).

#### **1.4.1.1. Tratamientos con gases ionizados**

Entre los tratamientos con gases ionizados podemos mencionar el plasma, la descarga corona y el tratamiento de llama. Estos métodos permiten la funcionalización de sustratos ya existentes, disminuyendo la hidrofobicidad de los mismos y reduciendo de esta manera la desnaturalización de las proteínas unidas (Awaja *et al.*, 2009). Estos métodos constituyen un punto de partida para tratamientos químicos posteriores que permitirían la unión covalente de proteínas.

El plasma es un estado de alta energía de la materia en el que un gas es parcialmente ionizado en partículas cargadas, electrones y moléculas neutras. El tratamiento superficial por plasma proporciona una modificación a escala nanométrica sin usar solventes o generar residuos químicos y con menos degradación del material que algunos tratamientos químicos. El tipo de funcionalización varía según el gas precursor del plasma (Ar, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) y los parámetros de proceso (presión, potencia, tiempo y flujo de gas). Este tratamiento se ha utilizado sobre muchos polímeros entre los que destacan el poliestireno, el polipropileno, el fluoruro de polivinilideno (PVDF) y el polietileno tereftalato (PET) (Thissen, 2016). Los gases reactivos empleados eliminan o modifican los grupos básicos de la superficie añadiendo grupos funcionales que influyen en las características hidrofílicas y la reactividad bioquímica (Bilek and McKenzie, 2010).

El método de descarga corona es un proceso simple, de bajo coste y continuo en el cual una corriente inducida de aire ionizado bombardea la superficie polimérica. Introduce superficialmente productos de oxidación, pero no es útil como técnica para introducir funcionalidades específicas para la bioconjugación. Por su parte, el método de tratamiento de llama, bombardea la superficie con aire ionizado generando un amplio espectro de productos oxidados y, al igual que la descarga corona, no activa la superficie específicamente. La diferencia es que en este método el oxígeno reactivo se genera quemando una mezcla de gases rica en este elemento (Fabbri and Messori, 2017).

#### **1.4.1.2. Monocapas auto ensambladas**

La formación de monocapas auto ensambladas (Self-assembled monolayers, SAM) constituye otro método de modificación química de la superficie que puede mejorar la adsorción de los anticuerpos o producir grupos funcionales sobre esta, los cuales a su vez pueden ser utilizados posteriormente para una inmovilización covalente de los anticuerpos. Debido a su disposición ordenada bien definida, al buen transporte de electrones, a sus propiedades eléctricas

controlables y a la disponibilidad de grupos funcionales, las SAMs han ganado una importancia significativa para la inmovilización de biomoléculas (Kamra *et al.*, 2016).

Las SAMs generalmente se forman con moléculas de cadenas hidrocarbonadas que contienen grupos funcionales activos en sus extremos. Uno de estos grupos permitiría la unión de la molécula a la superficie y el otro quedaría expuesto para la unión de las proteínas. Las propias cadenas hidrocarbonadas una vez que se unan a la superficie promueven el auto ensamblaje, y la unión entre las mismas permite la estabilización de las monocapas debido a interacciones hidrofóbicas entre las cadenas (Hasan and Pandey, 2015).

Las monocapas auto ensambladas han sido empleadas para cubrir superficies de varios materiales. Entre las opciones disponibles es posible el recubrimiento de superficies de óxido con silanos, de superficies de óxido de aluminio con ácidos grasos o de superficies metálicas con moléculas a base de azufre, como tioles o sulfuros (Welch, Scoble, *et al.*, 2017).

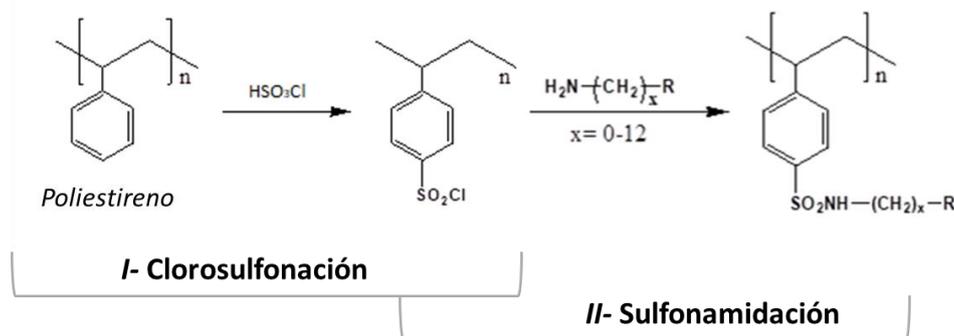
El ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) ha sido utilizado en varios estudios para la creación de monocapas auto ensambladas sobre superficies de oro, quedándose el grupo COOH expuesto en la superficie. Posteriormente, los anticuerpos se unen a estas superficies vía carbodiimida/N-hidroxisuccinimida quedando de esta manera unidos covalentemente a través de un enlace tipo amida (Ahmad and Moore, 2012; Lebec *et al.*, 2013).

#### **1.4.1.3. Química en mojado**

Un método clásico de uso actual incluye los medios químicos húmedos, donde se permite que tengan lugar reacciones químicas entre un compuesto disuelto en una solución orgánica y la superficie del polímero, generándose grupos funcionales reactivos en la superficie (Karaman *et al.*, 2016). La aminólisis y la hidrólisis alcalina o ácida representan casos típicos. Este procedimiento aporta la ventaja de que el tratamiento es penetrante pudiendo activar materiales porosos tridimensionales, mientras que el plasma y otras técnicas de modificación superficial con fuentes de energía presentan ciertas limitaciones. Además, esta tecnología proporciona superficies controladas y estables en cuanto a cantidad de grupos funcionales y tipología requerida, manteniendo la transparencia en el caso de las placas de ELISA (Del Prado *et al.*, 2012).

Dentro de los posibles tratamientos químicos en mojado para la modificación superficial del poliestireno podemos citar la clorosulfonación, que produce de manera muy selectiva grupos clorosulfonilo en la superficie que son químicamente estables en condiciones ambientales (temperatura, humedad y aireación) normales y que permiten la posterior reacción con aminos

alifáticas (sulfonamidación) en condiciones muy suaves (bajas temperaturas y en medio acuoso) y selectivas de manera cuantitativa (Fig. 7) (Del Prado *et al.*, 2012).



**Figura 7.** Representación gráfica de la modificación del poliestireno. El poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo, reacciona con alcanos di sustituidos que contengan un grupo amino alifático primario, para preparar derivados de poliestireno activados a través de enlaces sulfonamidas. **R** es un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende un amino ( $NH_2$ ) o un carboxílico ( $COOH$ ), **X** es la cadena carbonada, que puede tener entre 0 y 12 carbonos.

Del Prado *et al.*, (2012) han descrito la preparación de superficies de poliestireno transparentes activadas con grupos clorosulfonilos y posteriormente aminadas con etilendiamina. Esta superficie fue probada exitosamente en un ensayo tipo ELISA de detección de IL6 humana, donde el reactivo utilizado para el enlace entre el anticuerpo y la superficie fue el glutaraldehído, obteniéndose resultados satisfactorios en comparación con el ELISA realizado sobre una superficie estándar.

Recientemente, ha sido publicado el tratamiento de 10 placas distintas mediante un método de química en mojado empleando el complejo de cromo  $[Cr(OH)_6]^{3-}$  tamponado con etilendiamina para mejorar la inmovilización de anticuerpos y el rendimiento del ELISA (Welch, Lebot, *et al.*, 2017). Mediante análisis de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) y usando como modelo un anticuerpo anti EGFR, estos autores demostraron la unión del doble de anticuerpo en las placas tratadas al compararlas con las placas sin tratar, aumentando la señal del ELISA tres veces, lo que indica una mejor orientación del anticuerpo. Posteriormente Welch *et al.*, (2016), optimizaron el proceso variando la sal metálica y las proporciones de la sal del tampón. El complejo optimizado (hexahidrato de perclorato de cromo 1: 1 etilendiamina) fue utilizado para mejorar los límites de detección de un ELISA de cuantificación del factor de necrosis tumoral alfa bovino ( $TNF\alpha$ ), demostrando una mejora en un orden de magnitud con respecto a las placas no tratadas.

#### **1.4.2. Inmovilización covalente de los anticuerpos**

La unión covalente de los anticuerpos de captura a la superficie asegura una robusta inmovilización de los mismos, mejorando de esta manera su densidad y evitando su pérdida durante los pasos consecutivos del ensayo. La importancia de inmovilizar los anticuerpos a las superficies de los ensayos para lograr una mayor sensibilidad de los mismos ha sido demostrada en varias plataformas diagnósticas (Das *et al.*, 2010; Dixit *et al.*, 2010).

En el proceso de inmovilización covalente de un anticuerpo a una superficie ocurre una reacción química entre los grupos reactivos de la superficie y los grupos reactivos libres de los anticuerpos. Han sido empleadas distintas modificaciones del poliestireno que permiten el enlace covalente de distintas moléculas a la superficie del plástico. Las estrategias de inmovilización covalente de los anticuerpos a las superficies son caracterizadas atendiendo a la reacción química implicada en el proceso. Entre estas pueden distinguirse aquellas que involucran los grupos amino libres del anticuerpo o los grupos carboxilo, las que involucran los grupos sulfhidrilos, las reacciones usando las glicosilaciones propias del anticuerpo, las reacciones a través del sitio de unión a nucleótidos de los anticuerpos y más recientemente, las reacciones realizadas a través de química clic (Goddard and Hotchkiss, 2007)

En la Tabla 4 se muestran algunos de los grupos reactivos químicos (cross-linking) utilizados, así como el grupo funcional diana del anticuerpo implicado en la inmovilización (Vashist and Luong, 2018a).

**Tabla 4. Reactivos usados en la inmovilización de los anticuerpos a las superficies relacionado con el grupo funcional blanco.**

REACTIVIDAD	GRUPO FUNCIONAL DIANA EN EL ANTICUERPO	GRUPO QUÍMICO REACTIVO
Reacción amina	-NH <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NHS ester</li> <li>• Imidoéster</li> <li>• Epóxido</li> <li>• Isotiocianato</li> <li>• Aldehído</li> </ul>
Reacción carboxilo – amina	-COOH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carbodiimida (EDC)</li> </ul>
Reacción sulfhidrilo	-SH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maleimida</li> <li>• Piridildisulfida</li> <li>• Tiosulfonato</li> <li>• Haloacetilo (bromo o yodo)</li> </ul>
Reacción aldehído (Ej. azúcares oxidados)	-CHO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrazida</li> <li>• Alcoxiamina</li> </ul>
Reacción hidroxilo (no acuoso)	-OH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isocianato</li> </ul>
Reacción azida	-N <sub>3</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfina</li> </ul>

Los entrecruzantes o grupos químicos reactivos son especies químicas que contienen grupos altamente reactivos en uno o ambos extremos y, por tanto, son capaces de crear enlaces entre grupos funcionales dados. Estos entrecruzantes facilitan la reacción de los grupos funcionales deseados de un anticuerpo mediante la creación de intermediarios altamente reactivos que posteriormente pueden unirse a los grupos funcionales de la superficie. La elección del enlazador depende estrictamente de la reactividad química de los grupos funcionales seleccionados en el anticuerpo y la superficie deseada. Estos entrecruzantes pueden clasificarse en homo y hetero bifuncionales. Los entrecruzantes homo bifuncionales tienen los mismos grupos químicamente reactivos en ambos extremos y reaccionan con las mismas entidades en las moléculas diana, mientras que los entrecruzantes hetero bifuncionales tienen dos centros químicamente reactivos diferentes en cada extremo (Dixit, 2011).

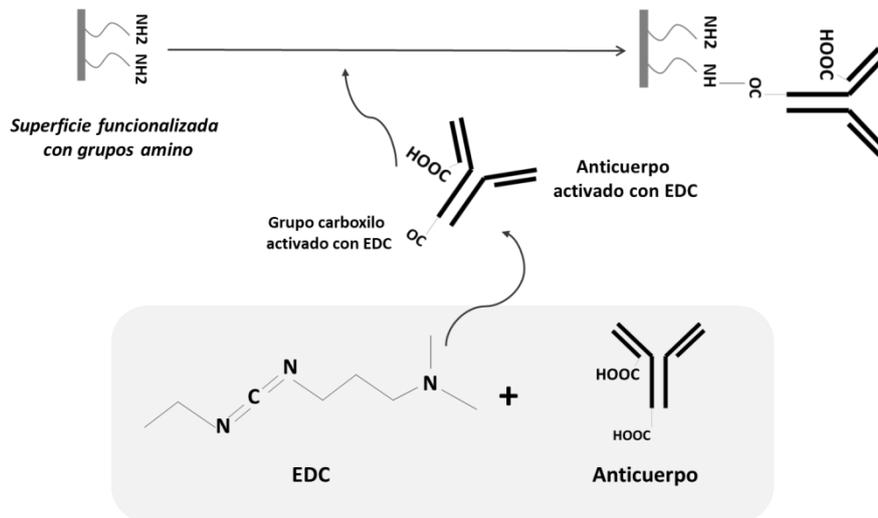
Existe una gran variedad de entrecruzantes comercialmente disponibles en diferentes combinaciones. Entre los homo-bifuncionales podemos citar la amina -amina (glutaraldehído) y el sulfhidrilo-sulfhidrilo, mientras que la amina-sulfhidrilo y la amina-carboxilo (carbodiimida) se encuentran entre los hetero-bifuncionales. Además, están disponibles otros entrecruzantes bifuncionales específicos tales como sulfhidrilo - hidroxilo, amina-carbohidrato y sulfhidril – carbohidrato (Dixit, 2011).

#### 1.4.2.1. Uniones a la superficie utilizando los grupos $\text{NH}_2$ y $\text{COOH}$ de los anticuerpos

Los grupos amino y carboxilo pueden encontrarse de forma aleatoria en cualquier sitio de la estructura de un anticuerpo y generalmente se encuentran expuestos en la superficie de la molécula debido a su naturaleza polar. Los grupos amino vienen dados por el aminoácido lisina, que posee una amina primaria, mientras que los grupos carboxilo los ofrecen el aspartato y el glutamato. Debido a la prevalencia de estos grupos a través de toda la molécula del anticuerpo, estos son los más utilizados para la inmovilización covalente de los anticuerpos a diferentes superficies. Sin embargo, esta misma característica hace que los anticuerpos inmovilizados tengan la probabilidad de no adoptar la orientación correcta y en algunas ocasiones perder su funcionalidad. No obstante, permiten una mayor densidad del anticuerpo en las superficies, así como una inmovilización permanente gracias a los enlaces covalentes que se forman.

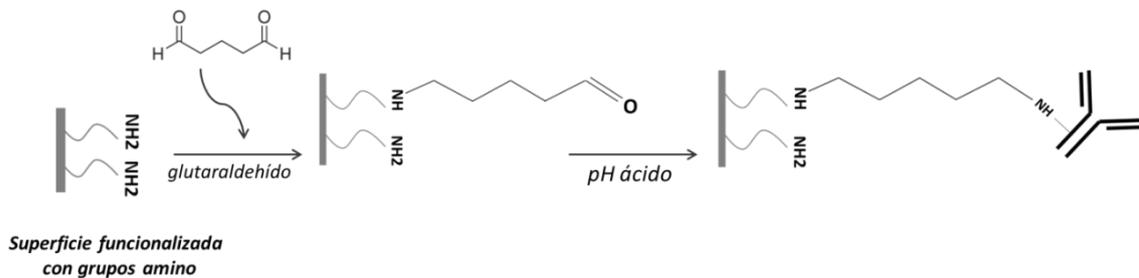
Muchos de los enlaces covalentes formados entre los anticuerpos y la superficie, se basan en la generación de grupos amino, carboxilo y epoxi sobre la superficie mediante diferentes métodos. Posteriormente, el anticuerpo se une a estos grupos a través de reacciones químicas usando compuestos hetero u homo bifuncionales a través de sus grupos  $\text{NH}_2$  y  $\text{COOH}$ . Las reacciones químicas más ampliamente utilizadas que involucran estos grupos funcionales del anticuerpo utilizan como enlazador homo bifuncional el glutaraldehído ( $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ) y como enlazador hetero bifuncional la carbodiimida ( $\text{NH}_2\text{-COOH}$ ).

La unión hetero bifuncional usando 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida hidrocloreuro (EDC) puede ser utilizada para superficies que tienen expuestos grupos aminos libres formándose un enlace covalente de tipo amida con los grupos carboxilo del anticuerpo (Goddard and Hotchkiss, 2007; Dixit *et al.*, 2011) o viceversa (Fig. 8). En estas reacciones ha sido generalizado el uso de la carbodiimida en combinación con N-hidroxisuccinimida (NHS) ya que esta favorece el proceso de bioconjugación debido a que estabiliza el intermediario que se forma en la reacción y se une eficazmente a los grupos amino.



**Figura 8.** Representación esquemática de la unión covalente de un anticuerpo a una superficie aminada usando como enlazador EDC. El grupo carboxilo del anticuerpo reacciona con la carbodiimida del EDC generando un intermediario derivado de la urea, un éster activo, que reacciona a su vez con los grupos amino de la superficie. *Imagen adaptada de Dixit (2011).*

Por su parte, el glutaraldehído ha sido utilizado como un enlazador homo bifuncional pues permite la unión del anticuerpo a la superficie a través de los grupos amino del anticuerpo y los de la superficie. Este método ha sido exitosamente utilizado para la inmovilización de diferentes anticuerpos y el uso de estas superficies en ensayos tipo ELISA (Gunda *et al.*, 2014) (Fig. 9).

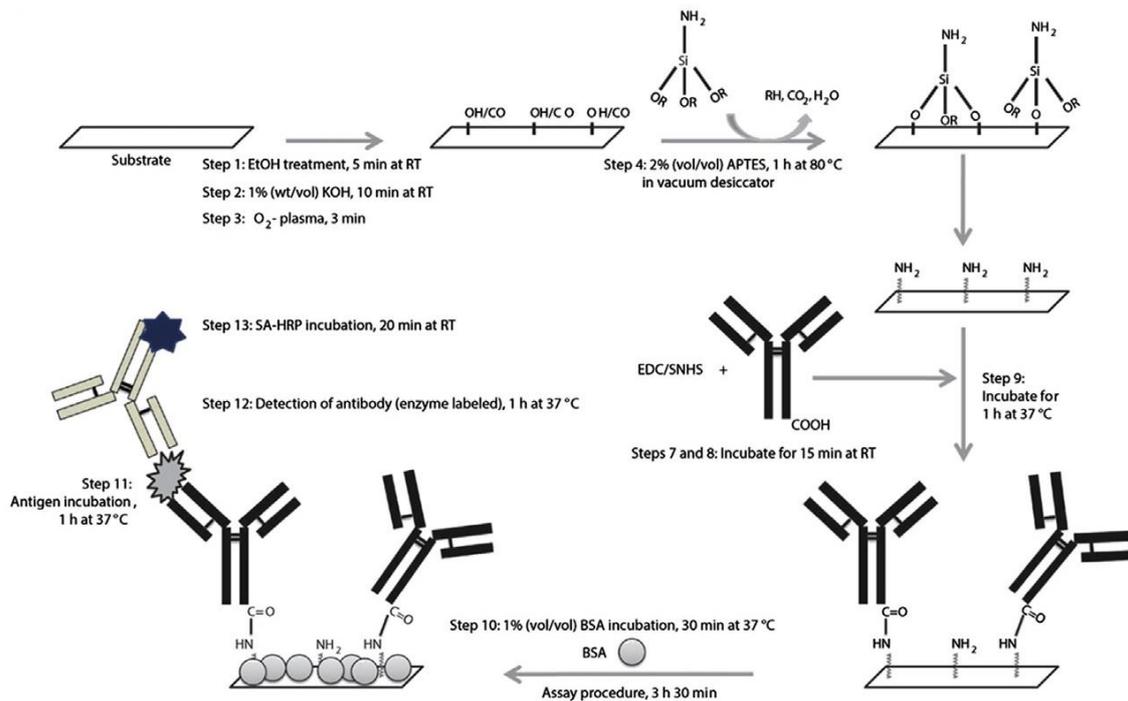


**Figura 9.** Representación esquemática de la unión covalente de un anticuerpo usando glutaraldehído como enlazador entre los grupos amino del anticuerpo y los de la superficie *Imagen adaptada de Dixit (2011).*

Las superficies activadas con 3-aminopropiltrióxido (APTES), las cuales tienen expuestos grupos amino libres en la superficie, han sido ampliamente utilizadas para la inmovilización covalente de los anticuerpos a las superficies. Este procedimiento implica la generación de grupos hidroxilo en la superficie de las placas a través de un tratamiento con KOH seguido de plasma de oxígeno. Estos grupos hidroxilo se unen a su vez con los grupos etoxi del APTES. lo que da como resultado una superficie activada con APTES que posee grupos amino libres

expuestos. Posteriormente, sobre estas superficies pueden ser utilizado el glutaraldehído o la carbodiimida (Dixit *et al.*, 2011; Gunda *et al.*, 2014).

Dixit *et al.* (2011), funcionalizaron una superficie con APTES y luego utilizaron la carbodiimida/ N-hidroxisuccinimida para la unión covalente del anticuerpo dejando este anclado a la superficie mediante una unión covalente a través de un enlace de tipo amida (Fig. 10). Este procedimiento aumentó la sensibilidad del ensayo ELISA tomado como modelo, la detección de la fetuína A humana, un biomarcador del carcinoma hepatocelular y de la aterosclerosis, unas 16 veces en comparación con la sensibilidad del kit comercial para esta proteína.



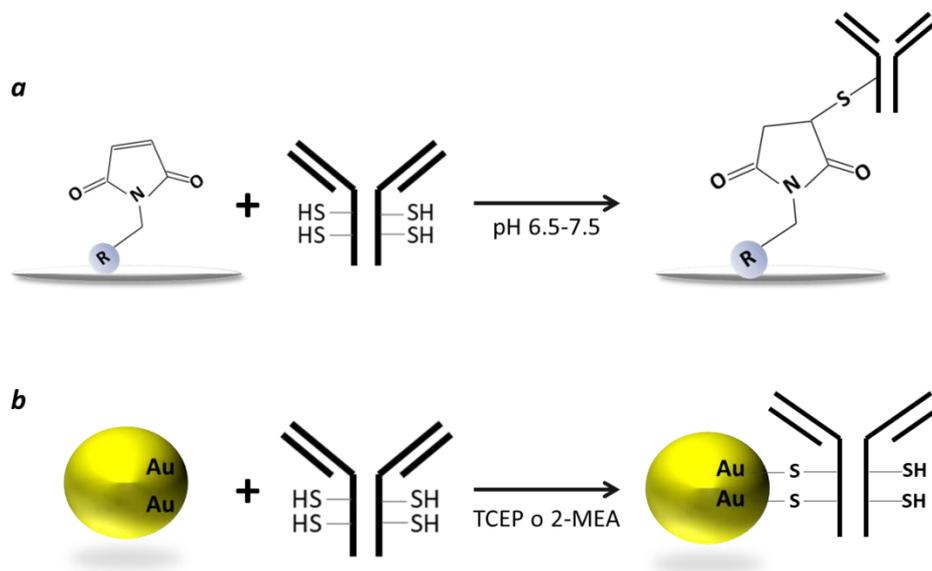
**Figura 10.** Inmovilización química de un anticuerpo a través de una unión covalente. La superficie de una placa de ELISA es tratada con KOH para posteriormente unir APTES y dejar expuestos grupos amino libres en la superficie. El anticuerpo tratado con 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) hidrocloreuro de carbodiimida (EDC) y sulfo N-hidroxisuccinimida (SHNS) se añade a la superficie formándose un enlace amida entre el grupo carboxilo de los anticuerpos con los grupos amino de la superficie. Finalmente se lleva a cabo un ELISA sándwich sobre las placas activadas (Dixit *et al.*, 2011).

Los soportes sólidos con grupos epóxido en la superficie también son utilizados ampliamente para la inmovilización de anticuerpos. Un epóxido es un éter cíclico que contiene un átomo de oxígeno en el anillo y su estructura deformada lo hace altamente reactivo en comparación con otras moléculas de éter. Este grupo es muy reactivo frente a las aminas secundarias de los aminoácidos, en particular la histidina, y los sulfhidrilos de un anticuerpo. La fuerte reactividad de un epóxido hacia los grupos amina permite la inmovilización de un anticuerpo a través de regiones ricas en lisina o secuencias repetidas de histidina (HIS). Esta inmovilización no exige la

presencia de un entrecruzante y permite utilizar anticuerpos completos o fragmentos de este (Ehlers *et al.*, 2007).

#### 1.4.2.2. Uniones covalentes a través de los grupos SH creando enlaces tipo tiol

Los anticuerpos poseen grupos sulfhidrilos en forma de puentes disulfuro que permiten su estabilidad estructural (Liu and May, 2012). La reducción de dichos puentes genera grupos sulfhidrilo libres que pueden reaccionar con compuestos como las maleimidas (Billah *et al.*, 2010), disulfuros de piridilo (Iwasaki, Omichi and Iwata, 2008) o epóxidos, los cuales a su vez pueden estar expuestos en la superficie del ensayo. Para la reducción química de estos grupos han sido usados generalmente agentes reductores como son el tris (2- carboxietilo) fosfina (TCEP) o el 2- mercaptoetilamina (2-MEA) (Trilling, Beekwilder and Zuilhof, 2013). De igual manera, la fotorreducción mediante excitación con luz ultravioleta de  $\lambda = 260$  nm es otra vía que ha sido empleada para la reducción de los puentes disulfuro de los anticuerpos (Funari *et al.*, 2016). También ha sido descrita la incorporación de grupos tiol a los anticuerpos través de los grupos amina usando el 2-iminotiolano, evitando de esta manera la pérdida de actividad del anticuerpo (Gauvreau *et al.*, 2004) (Fig. 11).



**Figura 11.** Representación esquemática de la unión covalente de los anticuerpos a diferentes superficies a través de los grupos sulfhidrilo. a) Inmovilización de un anticuerpo a una superficie de poliestireno activada con maleimida a través de la formación de un enlace tioéter. b) Unión de un anticuerpo con los enlaces disulfuro reducidos, usando TCEP o 2-MEA, a una superficie de oro.

La reducción de los puentes disulfuro que suele ir dirigida a la región bisagra, puede hacer una reducción no deseada de los demás puentes disulfuro del anticuerpo que conforman la estructura terciaria de este, creando fragmentos de anticuerpos que no son capaces de reconocer al antígeno o provocando un efecto de impedimento estérico en la zona de

reconocimiento (Karyakin *et al.*, 2000). Sin embargo, cabe destacar que algunos de estos fragmentos pueden mantener su actividad en la superficie del sensor (Sharma and Mutharasan, 2013).

Para controlar mejor este proceso se han construido fragmentos de anticuerpos añadiéndoles grupos sulfhidrilo de forma específica mediante ingeniería genética (Hortigüela *et al.*, 2015). De este modo, estos autores fusionaron un péptido conteniendo el aminoácido cisteína a un anticuerpo en el extremo distal de su unión al antígeno y usaron soportes con maleimida, permitiendo así la unión covalente del anticuerpo a la superficie, además de su correcta orientación (Fig. 11a) (Hortigüela and Wall, 2013).

La reducción de los puentes disulfuro ha sido ampliamente utilizada debido a la fuerte interacción que se establece entre el oro y los grupos tiol libres del anticuerpo, por lo que ha sido una estrategia de inmovilización útil para sustratos de oro y ampliamente utilizada también en la obtención de nanopartículas (Fig. 11b) (Jazayeri *et al.*, 2016).

#### **1.4.2.3. Uniones covalentes a través de los grupos carbohidratos**

Los grupos carbohidratos presentes en la región Fc, específicamente en el dominio C<sub>H</sub>2, de los anticuerpos han sido utilizados como una vía para la inmovilización orientada de estos a las superficies (Adak *et al.*, 2014). El uso de peryodato de sodio sobre el grupo hidroxilo de los carbohidratos genera grupos aldehídos que pueden reaccionar con una superficie aminada o con hidracinas teniendo como resultado la unión de los anticuerpos de forma orientada en la superficie (Duval, Van Beek and Zuilhof, 2015). Sin embargo, este método tiene la desventaja de que aminoácidos como la metionina, el triptófano y la histidina presentes en los anticuerpos, pueden ser oxidados durante el tratamiento con peryodato afectando la sitio-especificidad del método y posiblemente el reconocimiento del antígeno. Además, los grupos aldehídos formados en las glicosilaciones pueden reaccionar con los aminos libres y los grupos tiol del anticuerpo, resultando en interacciones entre anticuerpos que provocan la agregación y pérdida de actividad de estos (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2009).

Se han publicado numerosos trabajos sobre el uso del método de inmovilización con ácido borónico. Esta reacción implica la modificación de los grupos dioles de los N-glicanos de los anticuerpos mediante la reacción de estos con ácidos borónicos adheridos a las superficies. Estos últimos reaccionan con 1,2 dioles para formar ésteres de boronato (Lim and Ahmed, 2015). Entre las ventajas de este método es destacable el hecho de dejar los sitios de unión disponibles para la unión del antígeno (inmovilización orientada o aleatoria). Además, el método consta de un solo paso sin modificación previa de los anticuerpos y es relativamente

económico. Varios estudios comparativos han sugerido que la sensibilidad de detección de antígeno más alta se ha logrado cuando los anticuerpos han sido inmovilizados con ácidos borónicos (Duval, Van Beek and Zuilhof, 2015).

A pesar de sus ventajas, este método no ha sido ampliamente extendido. Probablemente esto esté asociado a los diversos requerimientos de la técnica que pueden provocar que no aumente la sensibilidad del ensayo. Entre estos se encuentra la preparación de las superficies con ácido borónico, que requiere de varios pasos químicos, la búsqueda de un anticuerpo con N-glicanos adecuados, así como las condiciones de unión del anticuerpo a la superficie que permitan como resultado una inmovilización efectiva y orientada del anticuerpo, asegurándose de que este no sea expulsado de la superficie por la competencia de dioles o las condiciones de regeneración (Duval, Van Beek and Zuilhof, 2015).

#### **1.4.2.4. Uniones de los anticuerpos a través del sitio de unión a nucleótidos**

El sitio de unión a nucleótidos es una región conservada del dominio variable de todos los isotipos de los anticuerpos, y ha sido utilizado para la inmovilización covalente y orientada de estos a las superficies de ensayo. Esta región es rica en aminoácidos aromáticos específicos y tiene afinidad con el ácido indol-3-butírico, con una  $K_d$  en el rango 1-8  $\mu\text{M}$ , dependiendo del isotipo del anticuerpo. Varios estudios han demostrado que la exposición a la luz ultravioleta ( $\lambda=254$  nm) permite la unión entre el anticuerpo y el ácido indol-3-butírico, el cual es fijado previamente a la superficie. Esta inmovilización del anticuerpo no afecta el sitio de unión al antígeno y resulta en una correcta orientación de este en la superficie, observándose por consiguiente un aumento de la sensibilidad de 8 veces comparado con la adsorción física (Alves, Kiziltepe and Bilgicer, 2012).

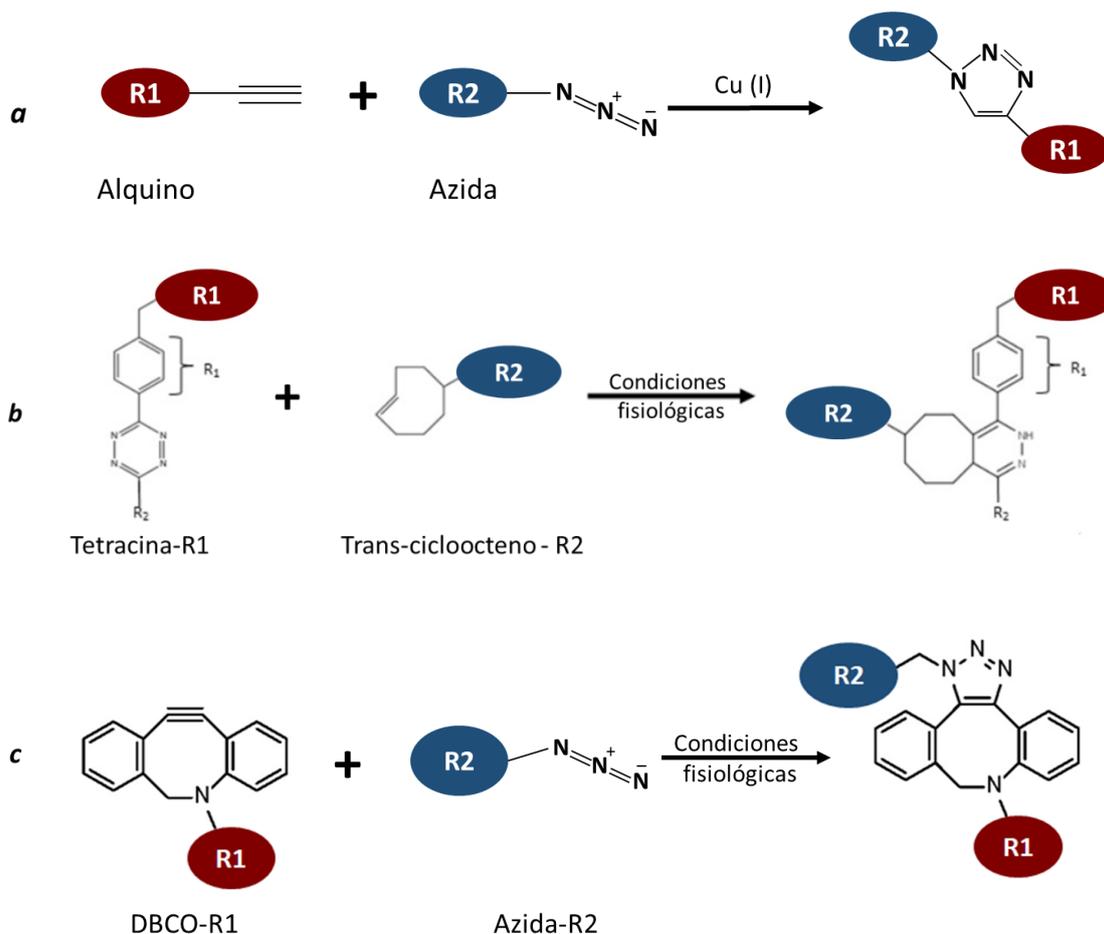
#### **1.4.2.5. Uniones de los anticuerpos utilizando química clic**

El término de reacción química clic (Click Chemistry, CC) introducido por Sharpless y colaboradores (Kolb, Finn and Sharpless, 2001) define una nueva metodología sintética que permite la preparación de una diversidad de estructuras complejas mediante la unión de moléculas sencillas a través de un número selecto de reacciones muy eficientes. Una reacción es considerada de tipo clic si reúne ciertos requisitos como son: i) simplicidad experimental; ii) tolerancia frente a una amplia variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción; iii) selectividad y especificidad regional; iv) formación del producto con elevado rendimiento; v) alta economía atómica; vi) insensibilidad al agua o al oxígeno; y vii) aislamiento sencillo del producto final evitando purificaciones cromatográficas.

Si bien existe un número considerable de reacciones químicas que reúnen todos o varios de estos requisitos, se han destacado especialmente cuatro tipos de transformaciones químicas que encajan a la perfección bajo el concepto de reacciones clic : 1) reacciones de cicloadición, especialmente las 1,3-dipolares y las hetero Diels-Alder; 2) reacciones de sustitución nucleofílica con apertura de anillos tensionados tales como epóxidos, aziridinas, sulfatos, iones aziridinio e iones episulfonio; 3) reacciones de condensación de compuestos carbonílicos, como la formación de éteres de oxima, hidrazonas y heterociclos aromáticos; y 4) reacciones de adición a enlaces múltiples C-C, como por ejemplo: epoxidación, dihidroxilación, aziridinación, y adiciones de haluros nitrosilo y sulfonilo.

En 2003, Wang *et al.*, informaron que la reacción de cicloadición azida-alquino [3 + 2] catalizada por cobre (I) (CuAAC), podía emplearse como una nueva clase de reacción clic para las conjugaciones biológicas de forma rápida y confiable (Wang *et al.*, 2003) (Fig. 12a). Debido a que los grupos azida y alquino no reaccionan con los residuos de proteínas u otras biomoléculas, esta reacción provocó un gran impacto y ha sido utilizada ampliamente como una metodología de unión rápida y específica de moléculas de interés (Li and Zhang, 2016). Usando la reacción entre un grupo alquino y un grupo azida, Finetti *et al.* (2016) inmovilizaron un anticuerpo que se unía a través de un grupo azida a la superficie de una partícula de oro activada con grupos alquino, catalizando dicha reacción con cobre. Usando esta reacción ha sido inmovilizado sobre electrodos un anticuerpo anti *E. coli* (Svalova *et al.*, 2020).

Dado que los metales exógenos utilizados para catalizar estas reacciones podrían causar efectos citotóxicos de leves a graves en aplicaciones biomédicas, ha sido recomendado el uso de reacciones químicas sin catalizador metálico (Dai *et al.*, 2015). Estas nuevas reacciones sin catalizadores metálicos han sido denominadas “bioortogonales” y constituyen una subclase de reacción cuyos componentes son inertes en medios biológicos (Jewett and Bertozzi, 2010). Entre las reacciones bioortogonales más utilizadas podemos citar la reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrones IEDDA (del inglés, *Inverse Electron-Demand Diels–Alder*) (Fig. 12b) y la reacción de cicloadición entre una azida y un ciclooctino conocida como reacción SPAAC azida-alquino (del inglés, *Strain-promoted Alkyne-Azide Cycloaddition*; Jewett and Bertozzi, 2010) (Fig. 12c).



**Figura 12.** Reacciones de conjugación de tipo química clic. a) Reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC); b) reacción inversa de demanda de electrones Diels-Alder entre la tetracina y un trans-alqueno; c) Reacción de cicloadición entre el dibenzociclooctino (DBCO) y un azida no dependiente de cobre.

Las reacciones bioortogonales han sido utilizadas en varios campos de investigación como la bioconjugación (Chio and Bane, 2020), la búsqueda de nuevos fármacos (Jiang *et al.*, 2019; El Azab *et al.*, 2021), la radioquímica, el trabajo con polímeros (Arslan and Tasdelen, 2019) y la biomedicina (Mushtaq, Yun and Jeon, 2019). Con este tipo de reacciones, la química clic, ha dado lugar a un cambio de paradigma, que muestra que las reacciones químicas artificiales pueden ocurrir tanto en la superficie como en el interior celular.

La química clic *in vitro* permite marcar de forma específica proteínas dianas celulares y realizar estudio de fármacos en células vivas. Además, los lípidos y proteínas de la membrana celular podrían marcarse selectivamente con química de clic *in vitro* y las células podrían adherirse entre sí. Asimismo, la química clic *in vivo* permite la obtención de imágenes moleculares y la administración de fármacos de forma eficiente y eficaz para el diagnóstico y la terapia. Por su parte, la química clic *ex vivo* se puede utilizar para desarrollar herramientas moleculares para

comprender el desarrollo de tejidos, el diagnóstico de enfermedades y el seguimiento terapéutico (Kim and Koo, 2019).

La reacción de cicloadición bioortogonal basada en la tetracina ha sido usada para el radiomarcaje de moléculas de anticuerpos (Rossin et al. 2010; Devaraj et al., 2008). En esta reacción, la tetracina reacciona con un trans-cicloocteno (TCO) formando un enlace dihidropiridacina sin la presencia de un catalizador, con una cinética de reacción ultra rápida ( $> 800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). García *et al.* (2018), acoplaron un anticuerpo con TCO para posteriormente hacer un radiomarcaje con Tetracina-Tecnecio<sup>99m</sup> y usar estos anticuerpos radiomarcados en estudios de imágenes *in vivo* en ratones.

En la inmovilización de anticuerpos a diferentes superficies han sido utilizadas las reacciones bioortogonales, como la reacción de Diels-Alder. Sin embargo, los grupos funcionales son introducidos en los anticuerpos a través de los grupos amino de las lisinas o a través de los grupos tiol de las cisteínas, lo que hace que la inmovilización no sea orientada (Trilling, Beekwilder and Zuilhof, 2013). Por otra parte, diferentes variantes de ciclooctinos han sido usadas para la funcionalización y/o bioconjugación. Por ejemplo, Witte *et al.* (2012), prepararon V<sub>HH</sub> de anti-GFP con grupos azida o ciclooctino en el carbono terminal y utilizaron su pareja de reacción para su anclaje a la superficie.

#### **1.4.3. Inmovilización de los anticuerpos a las superficies por afinidad o inmovilización sitio-específica**

La inmovilización por afinidad ocurre cuando un anticuerpo puede ser capturado específicamente a través de una región deseada. Estas estrategias incluyen el uso de biomoléculas afines como son la biotina y la estreptavidina, la afinidad de la proteína A, G y L por el Fc de los anticuerpos, la afinidad de dominios de las proteínas por sus sustratos, etc. Esta inmovilización tiene la ventaja de que puede introducir un alto grado de orientación del anticuerpo, por lo que la región de reconocimiento del antígeno estaría siempre correctamente posicionada.

La afinidad consiste en una fuerte interacción entre dos moléculas estabilizada por múltiples enlaces. Si un tag tiene una fuerte afinidad hacia otra molécula y se une a esta con una especificidad significativamente alta, se podría definir como un tag de afinidad. Los tags han sido ampliamente utilizados para la inmovilización de anticuerpos (Arnau *et al.*, 2006) ya que pueden ser introducidos en las moléculas de estos ya sea química o genéticamente (Arnau *et al.*, 2006; Nogi *et al.*, 2008). Se han desarrollado numerosos péptidos que pueden funcionar como tags y que tienen alta afinidad por diversos materiales. Los tags comerciales más

ampliamente utilizados son la biotina, el tándem de 6-10 histidinas, y la secuencia del péptido FLAG (Cho *et al.*, 2007; Jouybari *et al.*, 2018).

#### **1.4.3.1. Inmovilización de los anticuerpos a través de la unión avidina-biotina**

La biotina es una vitamina soluble conocida como vitamina B7, que participa en la gluconeogénesis. La alta afinidad de la biotina por la avidina ( $K_d \approx 10^{-15}$  M) y la prácticamente irreversible unión entre ambas (Holmberg *et al.*, 2005), la convierte en uno de los tags más utilizados en diversos ensayos biológicos. Los anticuerpos pueden ser biotinilados de forma química fácilmente (usando N-hidroxisuccinimida biotina) y pueden unirse posteriormente a la avidina o estreptavidina presente en la superficie de microtitulación. Este proceso de biotinilación es al azar, y se unirá a los grupos aminos expuestos del anticuerpo que se encuentran en toda su estructura. No obstante, otro grupo de investigadores (ver Cho *et al.*, 2007) han biotinilado los anticuerpos dirigiendo esta reacción, vía maleimida, a los grupos SH de los puentes disulfuro. Estos autores obtuvieron una mejora de dos veces de la inmovilización con respecto a la utilizada usando anticuerpos unidos a biotina vía grupos amino.

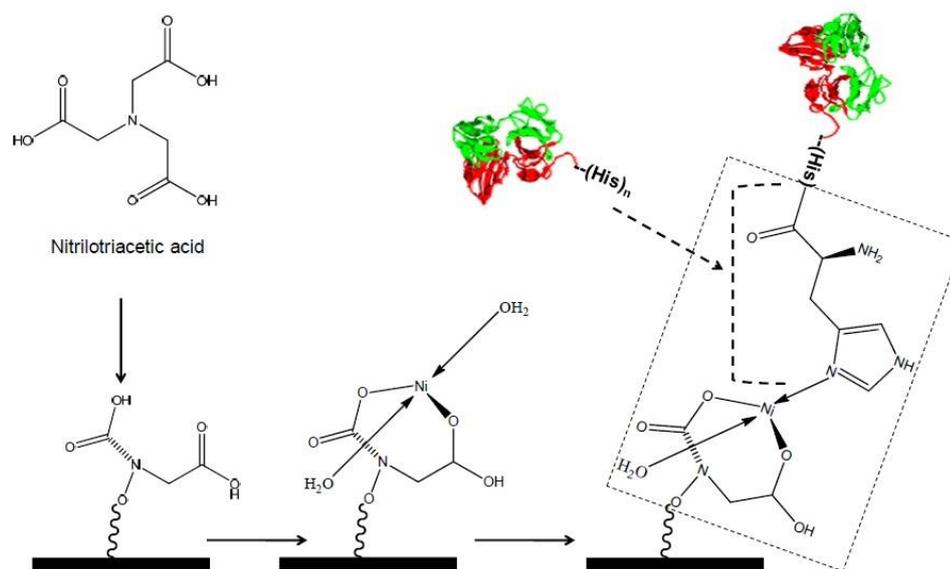
Sin embargo, debido a la multivalencia de la avidina (es capaz de unirse a 4 moléculas de biotina), cuando se utiliza para inmovilizar anticuerpos, se obtiene una alta densidad de los mismos en la superficie lo que puede provocar un alto grado de impedimento estérico (Kolenko *et al.*, 2009). Se han obtenido moléculas de estreptavidina a las que se les ha disminuido genéticamente su afinidad por la biotina con el objetivo de disminuir el estrés estérico entre anticuerpos y mejorar la inmovilización de estos (Jouybari *et al.*, 2018).

#### **1.4.3.2. Inmovilización de anticuerpos a través de péptidos de unión específica a materiales**

Recientemente, se han desarrollados péptidos que se unen de forma específica a determinados sustratos (como proteínas y metales) que son introducidos químicamente o mediante ingeniería genética en los anticuerpos o proteínas y pueden mejorar la orientación de estos en las superficies de ensayo. Estos péptidos son específicos para una amplia gama de materiales y ha sido posible su desarrollo gracias a su búsqueda mediante librerías de fagos (Pande, Szewczyk and Grover, 2010). Entre los péptidos de unión a materiales podemos citar los específicos del poliestireno [PS-tag, (Tang *et al.*, 2013)] y poliestireno hidrófilo (Phi-PS) [PS19-1 y PS19-6 (Kumada *et al.*, 2010)], los del silicio [Si-tag (Ikeda *et al.*, 2009)], los de portaobjetos de vidrio o resina de sílice [R9 (Fuchs and Raines, 2009)], los de poli (metacrilato de metilo) (PMMA) [c02, PM-OMP259 PMMA-tag (Kumada *et al.*, 2012)], los de policarbonato

[PCOMP6 (Kumada *et al.*, 2012)], los de poli-L-láctido [c22 (Matsuno *et al.*, 2008)], los de oro [GBP (De Juan-Franco *et al.*, 2013)], y el mejor conocido: el péptido de unión a níquel, el tag de histidinas (Hochuli *et al.*, 1988).

La fusión de un tándem de 6-10 histidinas en el extremo amino o carboxilo terminal de los anticuerpos, permite la inmovilización orientada de estos en superficies que contengan  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  debido a la afinidad de los grupos de más de 6 histidinas con estos iones ( $K_d = 10^7 \text{ M}^{-1}$ ). El ácido nitrilotriacético (NTA) forma complejos hexagonales con iones metálicos divalentes, dejando dos sitios de unión disponibles para la quelación con un residuo de histidina (Fig. 13). En un estudio comparativo de inmovilización de anticuerpos sobre monocapas con maleimida o monocapas de NTA, fue utilizado un anticuerpo recombinante (fragmento variable anti lisozima) que tenía fusionado una cisteína en su extremo amino terminal y 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal. A través de técnicas como la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), la resonancia de plasmón de superficie (SPR) y la espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo (ToF-SIMS) se demostró una unión del analito 10 veces superior en superficies de NTA comparadas con las de maleimida (Baio *et al.*, 2011). Sin embargo, debido a que la afinidad de unión del tag His6 no es lo suficientemente alta, los anticuerpos inmovilizados podrían sufrir una disociación no deseada, por lo que la estabilidad de estas superficies no es la idónea.



**Figura 13.** Inmovilización de una proteína mediada por histidina sobre superficies modificadas con NTA. Las superficies tratadas con NTA son queladas con metales divalentes como el níquel. Posteriormente las histidinas del tag reaccionan con el níquel hidratado a través del nitrógeno del anillo del imidazol quedándose la proteína fijada a la superficie (Dixit, 2011).

Otro péptido muy estudiado es el FLAG, con secuencia DYKDDDDK, que puede incorporarse genéticamente en proteínas. Dichas proteínas con FLAG pueden capturarse adicionalmente mediante un soporte que lleve anticuerpos anti-FLAG. Dicha inmovilización de proteínas a través de FLAG se basa en la interacción antígeno-anticuerpo en lugar de la quelación, por lo que se puede esperar una afinidad más fuerte y una mayor especificidad (Shen, Rusling and Dixit, 2017).

#### **1.4.3.3. Inmovilización de los anticuerpos a superficies recubiertas con Proteína A, Proteína G o Proteína L**

La obtención de soportes con anticuerpos orientados adecuadamente es posible cuando se utiliza la proteína A, la proteína G o la proteína L. Todas estas proteínas son procedentes de bacterias: la proteína A de *Staphylococcus aureus*, la proteína G de *Streptococcus sp. C40* y la proteína L de cepas de *Peptostreptococcus magnus*. Las proteínas A y G contienen múltiples dominios de unión a la fracción constante (Fc) de los anticuerpos de tipo IgG, presentando la proteína A 5 sitios de unión mientras que la proteína G contiene 2 (Iijima *et al.*, 2013). La unión de estas proteínas a los anticuerpos es diferente y depende de las subclases de inmunoglobulinas y las especies de origen de estas. La proteína G es capaz de unirse a un rango más amplio de inmunoglobulinas, aunque también tiene sitios de unión a otras proteínas como la albúmina, por lo que han sido generadas genéticamente moléculas de proteína G que tienen truncados estos dominios. Además, se han producido proteínas de fusión recombinantes A/G que son capaces de unirse a un rango mayor de inmunoglobulinas (Seo, Lee and Poulter, 2013). Por su parte, la proteína L puede unirse a las inmunoglobulinas a través de la cadena ligera kappa (Gao *et al.*, 2006).

Todas estas proteínas han sido utilizadas de forma eficiente en biosensores, así como en procesos de purificación de anticuerpos. En inmunoensayos se ha comprobado que permiten un aumento significativo de la sensibilidad de los mismos comparados con la inmovilización al azar de los anticuerpos, lo cual puede ser adjudicado a la correcta orientación de estos en las superficies (Kausaite-Minkstiniene *et al.*, 2010; Seo, Lee and Poulter, 2013).

El dominio de unión al Fc de los anticuerpos IgG de la proteína A se denomina dominio Z o dominio ZZ y ha sido utilizado una variante pequeña obtenida de forma sintética para su unión con el Fc (Nilsson *et al.*, 1987). Miyao *et al.* (2015) construyeron superficies sólidas con uno o dos dominios Z para la inmovilización de anticuerpos y encontraron que los dominios Z en tándem (es decir, dominios ZZ) capturaban el anticuerpo de manera más eficiente que el dominio Z único.

Existen placas de ELISA comerciales recubiertas con proteína G que permiten el aumento de la sensibilidad de la técnica a través de la orientación de los anticuerpos de captura. Estas superficies permiten, además, la utilización de anticuerpos que no han sido purificados. Sin embargo, estas placas son caras y su fabricación requiere mucho tiempo debido al complejo proceso de purificación y fijación de la proteína G. Recientemente se han producido placas en las que son fijadas células que expresan de forma estable el dominio de unión al Fc de la proteína G (G-C2), ya sea una sola unidad o en grupos de 8. La evaluación de estas placas mediante ELISA cuantitativo, comparándolas con las superficies estándar y las placas comerciales de proteína G, ha demostrado que presentan una sensibilidad significativamente mayor que la de las placas tradicionales basadas en poliestireno y que las comerciales basadas en proteína G, lo que potencialmente las convierte en una nueva generación de placas altamente sensibles para varios formatos de ELISA (Chen *et al.*, 2018).

#### **1.4.3.4. Inmovilización de los anticuerpos a través de la unión entre sustratos y enzimas**

Los anticuerpos pueden ser modificados genéticamente o de forma química para ser unidos al dominio activo de una enzima que esté involucrada en la catálisis de alguna reacción enzimática. Estos conjugados podrían ser posteriormente capturados sobre las superficies preparadas con el sustrato de las enzimas o con un análogo. En este caso, el dominio de la enzima que se une al sustrato queda unido a la superficie donde este se encuentra, debido a la formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas, junto con la formación de enlaces covalentes.

La pareja enzima-inhibidor, cutinasa y sus inhibidores de fosfonato, ha sido ampliamente utilizada con este propósito. La cutinasa es una serina esterasa que puede unir covalentemente su residuo de serina en el sitio activo con ligandos de fosfonato mediante una reacción de esterificación. Esta enzima es relativamente pequeña (22 kDa) con su sitio activo lejos de los extremos amino y carboxilo, lo que ofrece cierta flexibilidad para diseñar su fusión a anticuerpos o proteínas de interés. Kwon *et al.* (2004) fusionaron fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv y VHH) a la cutinasa y usaron soportes con fosfonatos para capturar las proteínas de fusión. Los anticuerpos inmovilizados usando esta vía, exhibieron una alta afinidad y especificidad por sus antígenos diana demostrado por estudios de fluorescencia y resonancia de plasmones superficiales SPR (*SPR, Surface Plasmon Resonance*).

Otro ejemplo de esta estrategia es el uso de la enzima O6-alquilguanina transferasa humana (hAGT), la cual se une a superficies activadas con bencilguanina. Esta enzima desplaza la guanina de la molécula de bencilguanina y forma enlaces covalentes con el grupo benzilo de la

misma. Los anticuerpos fusionados a esta enzima pueden ser capturados de forma covalente sobre este tipo de superficie (Engin *et al.*, 2010). Esta tecnología es comercializada por *New England Biolabs* como SNAP-tag®.

El dominio de unión a quitina (CBD), que forma parte de la enzima quitinasa y cataliza la hidrólisis del polímero quitina, puede ser incorporado genéticamente a anticuerpos recombinantes, aunque también puede ser unido de forma química. Diversos anticuerpos han sido desarrollados fusionados a CBD (Lindner *et al.*, 2002)(Reulen *et al.*, 2009) con el objetivo de ser inmovilizados en distintas superficies para ser más adelante utilizados en inmunoensayos. Los anticuerpos unidos a CBD pueden interactuar con la quitina a través de puentes de hidrógeno formados entre el hidrógeno del ácido aspártico D142 de CBD y el oxígeno de la amida de la quitina, produciéndose también otras interacciones hidrofóbicas como, por ejemplo, entre la tirosina Y214 del CBD y el grupo N-acetilglucosamina de la quitina. Todas estas interacciones podrían jugar un papel crucial en la inmovilización del anticuerpo (Dixit, 2011).

Recientemente las uniones mediadas por la sortasa han sido ampliamente utilizadas para el marcaje de proteínas y anticuerpos de forma dirigida. La sortasa es una transpeptidasa que reconoce el penta péptido LPXTG (donde X es un aminoácido cualquiera) uniéndose el S de la cisteína C184 de la sortasa a la treonina del péptido, formando de esta manera un intermediario estable: el LPXT-tioacilo-sortasa. Usando esta estrategia, diferentes drogas altamente anti tumorales, anticuerpos y proteínas de interés han sido marcados para posteriormente ser utilizados en estudios de imágenes *in vivo*, liberación de drogas en el organismo y detección de la unión antígeno-anticuerpo (Beerli *et al.*, 2015; Ismail and Lim, 2016).

## **1.5. Detección de ácidos nucleicos a través de reacciones inmunoenzimáticas**

### **1.5.1. Ensayos inmunoenzimáticos para la cuantificación de productos de PCR**

El método más simple para la detección de un producto de PCR es la electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, desde el punto de vista diagnóstico, debido a su bajo límite de detección, este método solo es útil para determinar si existe o no el producto de PCR. No obstante, se han desarrollado diversos métodos y equipos de detección, entre ellos la PCR cuantitativa en tiempo real y la droplet PCR.

A fines de la década de 1980 hubo un repentino auge de interés en el estudio de la inmunodetección del ADN y fueron publicados varios métodos, entre ellos la inmunodetección de ADN utilizando sondas de ARN biotinilado (Coutlée *et al.*, 1989). A partir de entonces, se

publicaron numerosos estudios sobre inmunodetección de ADN mediante técnicas de ensayo ligado a enzimas, que posteriormente condujeron a la introducción del ensayo de detección de una PCR mediante ELISA (PCR-ELISA). Este método combina PCR y ELISA en una sola técnica analítica y su aplicación es muy similar a un ELISA, excepto que este método permite la detección de ácidos nucleicos en lugar de proteínas (Di Pinto *et al.*, 2012).

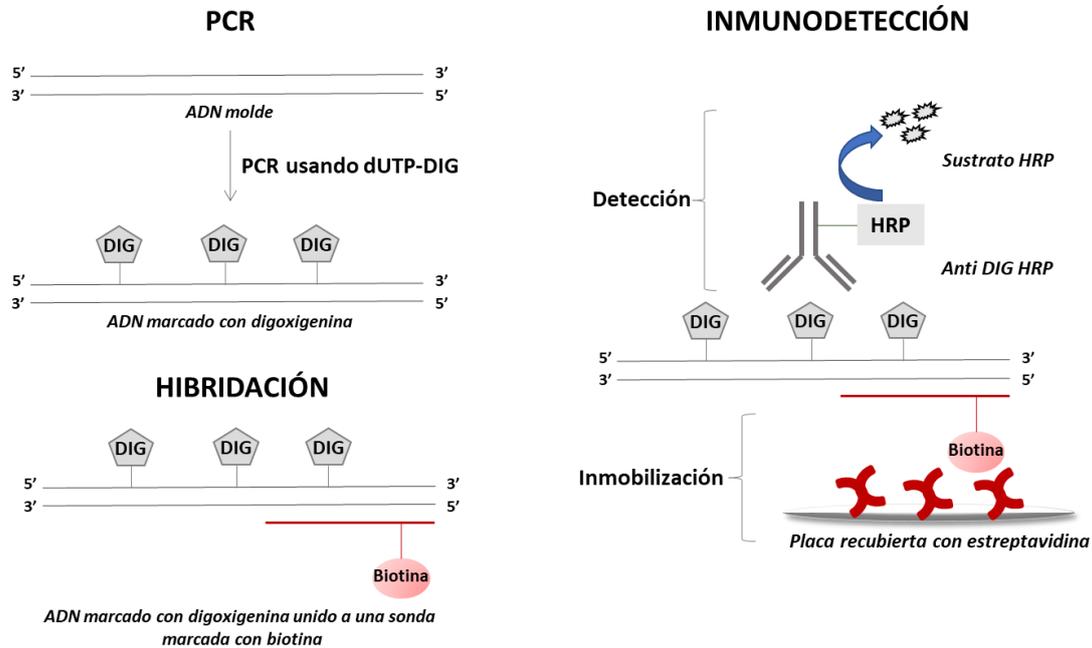
Los ensayos tipo ELISA han sido utilizados eficientemente para la cuantificación de productos de PCR debido a que exhiben una alta especificidad y sensibilidad, permiten un amplio rango dinámico, no son radioactivos y pueden ser automatizados (Kochanowski *et al.*, 2003). Las amplificaciones de PCR pueden ser provenientes de la amplificación de un ADN diana o de la amplificación de un ARN de interés tras su retrotranscripción. Estos ensayos pueden ser revelados mediante métodos colorimétricos, de fluorescencia o luminiscencia, siendo esta última la que permite un rango dinámico más amplio.

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre el uso de PCR-ELISA como método de detección y diagnóstico, los cuales han demostrado ser exitosos. Así, esta técnica ha sido utilizada en la clínica para la identificación de células cancerosas (Raji *et al.*, 2011), detección de la presencia de los distintos tipos de hepatitis A, B, C y E (Tahk *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2012), detección e identificación de especies de dermatofitos (Beifuss *et al.*, 2011), detección de infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunodeprimidos (Hadrich *et al.*, 2010), detección de poliovirus, enterovirus y norovirus (Park *et al.*, 2009), detección de leishmaniosis visceral en niños (Medeiros *et al.*, 2017) y la determinación de antígenos de grupos sanguíneos para la enfermedad hemolítica en recién nacidos y pacientes politransfundidos (St-Louis, 2009).

Además, el uso de PCR-ELISA como sistema de alerta temprana ha sido extendido para la detección de síntomas latentes de enfermedades o incluso estudios de expresión génica a través de biomarcadores. Algunos de estos estudios incluyen el desarrollo de PCR-ELISA como método de reemplazo para la detección y validación de estudios de expresión génica así como la detección de mutaciones puntuales en diferentes enfermedades como, por ejemplo, la talasemia (Gill *et al.*, 2008; Palermo *et al.*, 2012)

Existen diferentes formatos de PCR-ELISA dependiendo de la forma en que capturan y cuantifican los productos de PCR. El método más utilizado es el que incluye cebadores o dTNPS marcados con biotina, que son utilizados para la amplificación en la PCR. Posteriormente se lleva a cabo una reacción de hibridación con estos productos de PCR y sondas marcadas (FITC, digoxigenina). El producto de esta reacción es capturado en una placa de ELISA previamente recubierta con avidina/ estreptavidina. El ELISA se revela con un anticuerpo anti digoxigenina-

peroxidasa o anti FITC- peroxidasa, según corresponda (Medeiros *et al.*, 2017). En otros casos, la sonda está marcada con biotina y la PCR es realizada con dNTPs marcados con digoxigenina (Fig. 14) (Seo *et al.*, 2012).



**Figura 14.** Esquema del ensayo de detección de un producto de PCR mediante PCR-ELISA. La PCR inicial se desarrolla usando dUTPS marcados con digoxigenina. La amplificación obtenida se une mediante hibridación a una sonda complementaria y específica que, a su vez, está marcada con biotina. Posteriormente, la inmunodetección se hace en placas de ELISA previamente recubiertas con estreptavidina, y la detección se lleva a cabo con el anticuerpo anti digoxigenina HRP.

Atendiendo a las ventajas del método PCR-ELISA y a sus aplicaciones, tanto en la clínica como en otros sectores, actualmente se están realizando estudios para la mejora de la técnica. Uno de los intentos recientes consiste en desarrollar la capacidad de multiplexación de modo que sea posible la detección de varias secuencias específicas simultáneamente y sin ninguna reactividad cruzada. Este método disminuiría el coste y el tiempo de realización de la técnica con respecto al análisis de un único analito. El desarrollo clave de este procedimiento es diseñar sondas que sean altamente específicas para cada una de los genes de interés sin reacciones cruzadas, como se ha comentado (Santos *et al.*, 2008; Schützle *et al.*, 2008; Avlami *et al.*, 2010; Tahk *et al.*, 2011).

Por otro lado, Kobets *et al.* (2010) desarrollaron un método de PCR-ELISA mejorado que eliminaba la necesidad del paso de hibridación del producto de PCR con sondas marcadas. Centrándose en la detección y cuantificación de la *Leishmania*, estos investigadores utilizaron cebadores marcados con digoxigenina y biotina para generar productos de PCR marcados. A continuación, estos productos se unieron a una placa recubierta con estreptavidina y

posteriormente fueron detectados usando un ELISA sándwich con el anticuerpo anti digoxigenina. Este método no solo eliminó el paso de hibridación, en el cual era necesaria la desnaturalización del producto de PCR antes de la hibridación y el diseño de una sonda específica, sino que también eliminó una serie de pasos incluidos todos los procedimientos de lavado entre cada uno de ellos. En general, este diseño redujo el coste de los reactivos, así como el tiempo de incubación y lavado.

### **1.5.2. Ensayos inmunoenzimáticos para la detección de micro RNA**

Los micro RNA (miRNA) son RNAs no codificantes conservados evolutivamente, de aproximadamente 18-24 nucleótidos de longitud, que desempeñan un papel importante en el control de la expresión génica humana mediante la regulación o silenciamiento génico postranscripcional (Bartel, 2004). Diversos estudios han demostrado que los cambios en la expresión de miRNA están implicados en una amplia variedad de enfermedades y trastornos humanos como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, neurodegenerativas, hepáticas e inflamatorias (Wang, Chen and Sen, 2016; Correia *et al.*, 2017). Los miRNA no sólo circulan en la sangre periférica humana en una forma notablemente estable (Chen *et al.*, 2008), sino que también están ampliamente presentes en otros tejidos y líquidos corporales como la orina, la saliva, la leche y el líquido cefalorraquídeo (Weber *et al.*, 2010). Estas características indican que los miRNA son biomarcadores potenciales que pueden ser utilizados con fines de diagnóstico. Además, los miRNA están involucrados en el origen y el desarrollo de diversas enfermedades y son específicos de la patología, por lo que la expresión de un miRNA alterado ha sido empleada para la detección y el diagnóstico temprano, la clasificación, el pronóstico y el diagnóstico predictivo de enfermedades.

Inicialmente la desregulación de los miRNA fue relacionada con tumores sólidos y neoplasias hematológicas, y más recientemente varios estudios indican que los miRNA están implicados en la tumorigénesis humana de forma general. Así, se ha visto que un subconjunto de miRNA puede actuar como oncogenes o supresores de tumores. Por ejemplo, los grupos de miRNA-17-92 están regulados positivamente en linfomas de células B difusos y en cáncer de pulmón y de estómago (Fang *et al.*, 2017). La sobreexpresión de miRNA-155 también se ha detectado en neoplasias malignas de células B como son la leucemia de Burkitt, los linfomas de células B y la leucemia linfocítica crónica (Faraoni *et al.*, 2009). Por otro lado, la regulación a la baja de distintos miRNA también puede contribuir a la transformación maligna al permitir la re-expresión de oncogenes que contribuyen a fenotipos agresivos. Un ejemplo de ello es la familia del miRNA-29, incluido los miRNA-29 a, b y c, los cuales se encuentran regulados a la

baja en el cáncer de pulmón (Liu *et al.*, 2018) y en la leucemia linfocítica crónica (Santanam *et al.*, 2010).

El mayor problema para la detección de miRNA en las muestras se debe a su pequeño tamaño (aproximadamente 22 nucleótidos), a las pequeñas diferencias entre sus secuencias y a la baja concentración en los fluidos del organismo (Dellett and Simpson, 2016). No obstante, actualmente se utilizan varias técnicas para su detección como son la secuenciación de ARN, los microarrays y la RT-PCR (Hunt *et al.*, 2015).

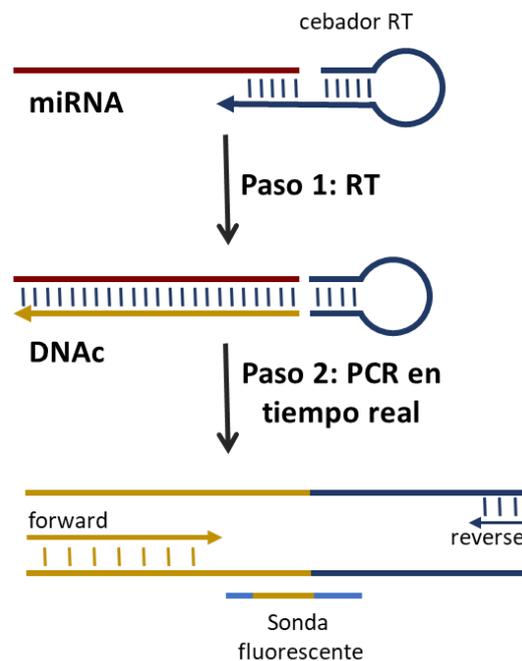
La secuenciación de ARN se realiza mediante secuenciación masiva (NGS, del inglés *Next generation sequencing*). Esta técnica permite descubrir nuevas moléculas de miRNA y es también el principio más sensible para la identificación y cuantificación de miRNA. Sin embargo, requiere mucho tiempo para el procesamiento, mucho volumen de muestra, un software muy sofisticado para su análisis, una instrumentación y reactivos caros, lo que en conjunto la convierte en una técnica de difícil aplicación (Dard-Dascot *et al.*, 2018).

El microarray es una técnica multiplex utilizada para la detección de miRNA. Está basada en la hibridación del miRNA diana con una sonda específica, y la cuantificación ocurre a través de la fluorescencia aportada por la sonda (Wang and Xi, 2013). En principio, los microarrays pueden proporcionar información muy precisa sobre la concentración absoluta de miRNA, pero en la práctica hay un gran sesgo de cuantificación debido a correcciones de fondo poco fiables y a la normalización, por lo que generalmente se considera una cuantificación relativa. La sensibilidad de los microarrays es menor que la de la secuenciación y la medición también está limitada por la sensibilidad del lector de fluorescencia (Wang and Xi, 2013; Hunt *et al.*, 2015).

Debido a la instrumentación necesaria y a la sofisticación de las técnicas NGS y microarray, estas no son consideradas adecuadas para su uso rutinario. En principio, su importancia radica en su potencial para la detección de nuevos miRNA y en la búsqueda de expresión diferencial de determinados miRNA relacionados con condiciones patológicas (Krepelkova *et al.*, 2019). La técnica con mayor potencial para fines diagnósticos es la RT-qPCR, para la que han sido establecidas diversas adaptaciones técnicas teniendo en cuenta el tamaño de las moléculas de miRNA (Zöllner, Hahn and Maghnouj, 2014).

La técnica RT-qPCR consiste en una retrotranscripción enzimática del miRNA maduro en una secuencia de ADN complementaria, seguido de la amplificación de esta secuencia mediante cebadores apropiados. El paso del proceso más propenso a errores es la reacción RT, por lo que han sido desarrollados dos métodos para evitarlos. El primer método establecido para la RT de un miRNA utiliza cebadores que forman lazos (*stem-loop*) específicos para producir

ADNc a partir del miRNA específico. El cebador se hibrida con la región 3' del miRNA, mientras que al mismo tiempo se prolonga desde el extremo 3' de la molécula al extremo 5' formando una molécula de ADNc que incluye el lazo del cebador. Después de la RT, el ADNc resultante es amplificado por qPCR usando un cebador directo específico para la secuencia de miRNA y un cebador inverso específico para el cebador del lazo (Fig. 15) (Schmittgen *et al.*, 2008; Zöllner, Hahn and Maghnoij, 2014). El segundo método extiende el miRNA en su extremo 3' terminal con una cola de poli (A) utilizando la enzima poli (A) polimerasa y posteriormente el ARN poliadenilado resultante se transcribe de forma inversa utilizando un cebador oligo (dT) universal. Por lo tanto, todos los miRNA dentro de la muestra de ARN son transcritos. Posteriormente, la amplificación del ADNc se lleva a cabo utilizando cebadores específicos (Zöllner, Hahn and Maghnoij, 2014; Kappel and Keller, 2017).



**Figura 15.** Representación esquemática de la técnica RT-qPCR para un miRNA mediante el uso de un cebador en forma de lazo (*stem-loop*). La estructura y el diseño del cebador de la RT en forma de lazo específico se muestra cuando se une al miRNA diana y posteriormente se extiende durante la reacción de RT (paso 1). En el paso 2, el lazo se abre durante la PCR. En este caso se representa el uso de una sonda fluorescente marcada que permitirá la cuantificación del miRNA.

## **HIPÓTESIS**

Nuestra hipótesis de estudio se basa en que la sensibilidad de un ELISA depende del anticuerpo de captura y de su inmovilización, si la superficie es modificada para que aumente la densidad del anticuerpo o para que este quede orientado de forma correcta, podría aumentar la sensibilidad del ELISA significativamente.



## OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto se basa en el desarrollo de una metodología para la obtención de un ELISA más sensible y multiplex que permita reducir el impacto de la baja afinidad de un anticuerpo por su analito específico sobre la sensibilidad del método inmunoenzimático y, además, sea capaz de detectar simultáneamente analitos de distinta naturaleza.

### Los objetivos específicos del estudio son:

- 1- Desarrollo de un método que permita aumentar la densidad de los anticuerpos inmovilizados en una superficie de poliestireno de forma que esto favorezca el aumento de la sensibilidad de un ELISA.
- 2- Crear un sistema que permita la correcta orientación de los anticuerpos de captura en la superficie de un ensayo de ELISA de manera que mejore la sensibilidad de detección.
- 3- Detección de ácidos nucleicos mediante un ensayo inmunoenzimático.
- 4- Cuantificación mediante un ensayo multiplex de dos analitos de diferente naturaleza: una proteína y un ácido nucleico.



## **II. AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA ELISA MEDIANTE QUÍMICA CLIC**

## CAPÍTULO 2

### 2.1. INTRODUCCIÓN

La sensibilidad de un ELISA depende de parámetros como la interacción entre el antígeno y el anticuerpo, la temperatura, el pH y la eficacia de la unión del anticuerpo a la superficie de ensayo. Entre estos factores, la inmovilización del anticuerpo en la placa de poliestireno juega un papel crucial en la mejora del límite de detección (Welch, Scoble, *et al.*, 2017). Ha sido demostrado, a través de varias plataformas diagnósticas, que una mayor densidad de anticuerpos en la superficie mejora la sensibilidad de la detección, por lo cual han sido desarrolladas diferentes estrategias para inmovilizar adecuadamente las proteínas a las superficies (Das *et al.*, 2010; Dixit *et al.*, 2010). Una proteína o un anticuerpo tienen la capacidad de inmovilizarse en la placa de poliestireno simplemente por adsorción química, física o interacción electrostática. Sin embargo, esta inmovilización pasiva generalmente da como resultado que los anticuerpos queden orientados al azar, pierdan su conformación nativa y en algunos casos su actividad. Además, los anticuerpos pueden experimentar desplazamiento sobre las superficies debido a los sucesivos pasos de lavados requeridos del ELISA (Butler, 2000; Kausaite-Minkstiene *et al.*, 2010).

La unión covalente de los anticuerpos de captura a la superficie asegura una robusta inmovilización de los mismos, mejorando de esta manera su densidad y evitando su pérdida durante los pasos consecutivos del ensayo. Muchos de los enlaces covalentes formados entre los anticuerpos y la superficie, se basan en la generación de grupos amino, carboxilo y epoxi sobre la superficie mediante diferentes métodos. Posteriormente, el anticuerpo se une a estos grupos mediante reacciones químicas usando compuestos hetero u homo bifuncionales a través de sus grupos  $\text{NH}_2$  y  $\text{COOH}$  (Dixit, 2011).

Aunque existen placas comerciales de ELISA que poseen grupos  $\text{NH}_2$  en la superficie (*ThermoFisher* (CovaLink), *Biomat*, etc), actualmente muchos laboratorios desarrollan sus propias superficies aminadas con las cuales obtienen mejores resultados. De este modo, Dixit *et al.*, (2011) prepararon placas de ELISA con grupos amino en superficie usando para ello APTES y diversos investigadores siguen esta misma metodología con algunas variaciones (Wang *et al.* 2019). Mediante una metodología muy distinta, Del Prado *et al.* (2012) prepararon superficies de poliestireno aminadas mediante clorosulfonación-sulfonamidación y estas fueron evaluadas mediante ELISA.

Inicialmente, antes del diseño de la estrategia a seguir para lograr el aumento de la sensibilidad de un ELISA, en este capítulo mostraremos que la sensibilidad de esta técnica depende de la afinidad del anticuerpo de captura por su antígeno, para lo cual compararemos dos anticuerpos anti citoquinas, anti IL8h y anti IL6h, con el anticuerpo anti c-myc. Para hacer posible esta comparativa se clonarán y se producirá de forma recombinante la proteína c-myc-GST-IL8h en *Escherichia coli* y la proteína c-myc-IL6h en células de mamíferos.

Para lograr el objetivo principal de aumento de la sensibilidad de un ELISA, se utilizarán las ventajas que ofrecen las reacciones de tipo química clic de ser rápidas, específicas y altamente eficientes. De este modo, la reacción tetracina TCO, será utilizada para fijar el anticuerpo de captura de forma covalente a la superficie de ensayo. Para ello, se prepararán superficies en las cuales esté expuesto el grupo tetracina y los anticuerpos de captura serán modificados con TCO. Para la preparación de las superficies se seguirán tres vías:

- 1) Se partirá de superficies aminadas mediante un proceso de clorosulfonación-sulfonamidación, las cuales serán tratadas posteriormente con NHS-tetracina
- 2) Se partirá de superficies aminadas comerciales las cuales, después de aumentar el número de grupos amino en superficie, serán tratadas con NHS-tetracina
- 3) Se obtendrá la proteína BSA unida a varios grupos tetracina que posteriormente será utilizada para recubrir las superficies de ELISA a una alta concentración

La evaluación del aumento de sensibilidad de las diferentes superficies preparadas será realizada a través del ELISA tipo sándwich para la detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h y la proteína recombinante c-myc-IL6h. En ambos casos se utilizará como anticuerpo de captura el anticuerpo anti c-myc, que estará marcado con TCO, y como anticuerpo de revelado el anticuerpo anti IL8h- biotina y el anti IL6h-biotina, respectivamente. Además de la detección de estas proteínas recombinantes como modelo de ELISA, se detectará el aumento de sensibilidad, a través de un ELISA sándwich de detección de la proteína CEA, biomarcador descrito para el cáncer colorrectal, usando para ello una pareja de anticuerpos comerciales. De igual modo, el anticuerpo de captura será modificado con TCO.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Obtención de proteínas recombinantes utilizadas en los ELISAs modelos para la validación de las superficies

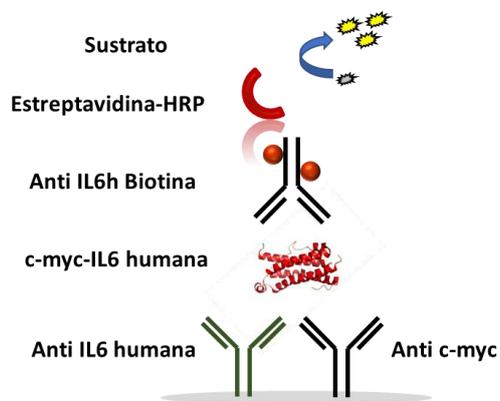
#### 2.2.1.1. Clonación y expresión de la proteína recombinante c-myc-IL6h en células de mamíferos. Cuantificación y detección mediante ELISA

Atendiendo a la referencia para la secuencia de IL6 humana (IL6h) (Gb: NM\_000600.5), se clonó la región codificante de la proteína desde el nucleótido 64 al 702. La fusión de c-myc a la citoquina IL6h por el extremo amino de la proteína fue diseñada sobre el vector de expresión pCDNA<sub>3.1</sub> quedando el gen de interés bajo el control del promotor de citomegalovirus (P<sub>CMV</sub>). La secuencia de aminoácidos de c-myc utilizada fue EQKLISEEDL. La clonación en el vector pCDNA<sub>3.1</sub> fue realizada con las enzimas de restricción *Xho*I/ *Not*I a partir del sintético de la fusión entre ambos genes (*IDT*). La clonación fue comprobada por digestión del inserto y posteriormente mediante secuenciación (*Stabvida*). El vector obtenido fue denominado pCDNA<sub>3.1</sub>-c-myc-IL6h.

Para la expresión de la proteína de fusión se empleó la línea celular de hámster CHO-K1 (*ATCC*, *CCL61*) que fue transfectada con el plásmido pCDNA<sub>3.1</sub>-c-myc-IL6h. Las células fueron cultivadas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, en medio de cultivo Hams'F12 + 10% Suero Fetal Bovino (FBS) + 100 UI/ml penicilina + 100 µg/ml estreptomina. El sobrenadante del cultivo de las células adheridas fue recogido a las 72 h y analizado mediante ELISA.

La proteína c-myc-IL6h fue detectada mediante dos tipos de ELISA, un ELISA comercial de detección de IL6 humana (*Immunttools GmbH*, 31330069) y un ELISA de detección de la fusión de c-myc con IL6h (Fig. 16). Para el ELISA de detección de IL6h, se recubrieron placas estándar de ELISA (*ThermoFisher*, 442404) con el anticuerpo anti IL6 humana de recubrimiento (*Immunttools GmbH*, 31670069) diluido en una solución tampón de NaHCO<sub>3</sub> a pH 9 e incubado durante 16 h a 4 °C. Los pocillos fueron lavados 5 veces con 0,3ml de PBS-Tween-20 0,05% y seguidamente fueron bloqueados con una solución de PBS-BSA 1%. Tras una incubación de 30 minutos a 37 °C se añadieron diferentes diluciones del sobrenadante de células CHO-K1 expresando la proteína c-myc-IL6h. La concentración de la proteína en el sobrenadante fue cuantificada utilizando una curva realizada con el patrón IL6 humano proporcionado por el kit comercial. Después de 1 h de incubación a 37 °C, los pocillos fueron lavados y el anticuerpo anti IL6 humana-biotina fue añadido siguiendo las indicaciones del fabricante. Pasada 1 h de incubación a 37 °C la placa fue lavada, tras lo cual fue añadida la estreptavidina-HRP (*ThermoFisher*, 21130), que fue incubada a temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 minutos. Tras 5 lavados, se añadió el sustrato de la peroxidasa (TMB; 3,3',5,5'-

tetrametilbenzidina) y la reacción fue detenida con una solución 1M de HCl. La lectura del ELISA se realizó a 450nm usando el equipo de lectura FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).



**Figura 16.** Esquema del ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-IL6h. Se representa la detección de la proteína de fusión c-myc-IL6h mediante un ELISA sándwich con el anticuerpo anti IL6h de captura o con el anticuerpo anti c-myc. En ambos casos el anticuerpo de revelado es el anticuerpo anti IL6h-biotina.

De forma similar, se comprobó la presencia en la proteína de fusión c-myc-IL6h del fragmento del proto oncogen c-myc (Fig. 16). Para ello, las placas fueron recubiertas con el anticuerpo anti c-myc 9E10 a 4 µg/ml en solución tampón de NaHCO<sub>3</sub> a pH 9 y este fue incubado durante 16 h a 4º C. El resto del ELISA se realizó de forma idéntica a la descrita para la detección de IL6h.

Ambos ELISAs fueron comparados en cuanto a límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1.1.1.

#### 2.2.1.1.1. Análisis de los resultados obtenidos en ensayos tipo ELISA

Los resultados obtenidos de los ELISA fueron analizados mediante una curva de regresión logística de 4 parámetros (4PL) usando el programa Graph-Pad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), obteniéndose de la curva la EC50, el valor de R<sup>2</sup> y la pendiente de Hill.

La EC50 indica la concentración a la cual es obtenida la mitad de la señal del ensayo o la concentración media efectiva. Por su parte, el valor de R<sup>2</sup> es una medida estadística que indica cuanto se ajustan los valores reales de las señales obtenidas a la curva de regresión trazada. Finalmente, la pendiente de Hill es la pendiente o inclinación correspondiente a la curva. La ecuación de la curva 4PL es la siguiente:

$$y = \text{Valor}_{\text{mínimo}} + (\text{Valor}_{\text{máximo}} - \text{Valor}_{\text{mínimo}}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC50} - X) * \text{Pendiente de Hill}})$$

Para el cálculo del límite de detección (LOD), que se corresponde con la mínima concentración del analito que puede ser detectada mediante el ELISA, se tuvo en cuenta la media de la

absorbancia obtenida de al menos 3 controles negativos del ELISA más 3 veces la desviación estándar de los mismos. En el caso del límite de cuantificación (LOQ), que representa la cantidad mínima del analito que puede ser cuantificada, la desviación estándar fue multiplicada por 10. El valor de absorbancia obtenido en cada caso, fue analizado mediante la curva 4PL obtenida de los datos de la curva, obteniéndose los valores de concentración correspondientes al LOD y al LOQ.

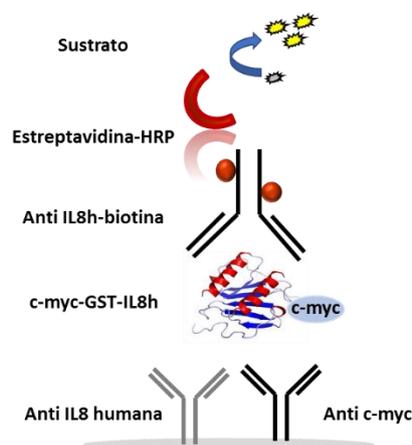
### **2.2.1.2. Clonación y expresión de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h en *Escherichia coli*. Purificación en columna de afinidad y detección mediante ELISA**

El fragmento sintético His6-c-myc- GST-IL8h (*IDT*) fue clonado en el vector de expresión pET-43a (*Novagen*) usando las enzimas de restricción *NdeI* y *Sall* en fase con el TAG de histidinas del vector. La proteína quimérica resultante estuvo constituida por 6 restos de histidina, el fragmento terminal del proto oncogen c-myc (EQKLISEEDL), la proteína glutatión-S-transferasa y la citoquina humana interleuquina-8 (IL8h) (Gb NM\_00584.4). La secuencia del plásmido resultante fue confirmada mediante digestiones de comprobación y secuenciación (*Stabvida*).

Para la expresión de la proteína, las células de *E. coli* BL21 (DE3) (*fhuA2 [lon] ompT [dcm] hsdS (rB-mB-) gal λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin*) transformadas con el vector de expresión pET43a-HIS6-c-myc-GST-IL8h fueron incubadas a 37 °C en 0,5L de medio Luria Bertani (LB: 1% triptona, 0,5% extracto levadura, 1% NaCl) conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. Cuando la densidad óptica a 600nm (DO<sub>600nm</sub>) alcanzó un valor de 0,8, fue añadido isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM, manteniendo el cultivo durante 4 h a 37 °C. Las células fueron separadas por centrifugación, lavadas con PBS conteniendo 1 mM EDTA y lisadas con el sonicador Bandelin Sonoplus con un 70% de potencia en el mismo tampón. La fracción soluble fue clarificada mediante centrifugación (14.000 g, 30 minutos, 4 °C) y filtración usando un filtro de 0,22 µm. La proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad usando una columna de níquel (*HisTrap HP, GE Healthcare 17-5247-01*) en el AKTA Prime Plus siguiendo las instrucciones del fabricante. Las fracciones fueron cuantificadas mediante un ensayo de Bradford (*Bio-Rad*) usando una curva de BSA como estándar y analizadas mediante electroforesis para determinar el grado de pureza.

Para la detección de la proteína His6-c-myc-GST-IL8h se aplicaron dos modalidades de ELISA tipo sándwich: uno formado por dos anticuerpos anti IL8 humana de *Mabtech* y otro, para detectar la fusión de c-myc a la proteína IL8h, en el que se utilizó el anticuerpo anti c-myc combinado con el anticuerpo anti IL8 humano (Fig. 17). Ambos ELISAs fueron realizados en placas estándar (*ThermoFisher, 442404*) recubiertas con el anticuerpo anti IL8 humana, clon MT8H6, o con el

anticuerpo anti c-myc, clon 9E10, diluidos ambos a 2 µg/ml en una solución tampón de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> a pH 9,6 e incubados durante 16 h a 4 °C. Posteriormente, ambas placas fueron lavadas 5 veces con 0,2 ml de la solución de lavado compuesta por PBS-Tween-20 0.05% y bloqueadas con PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37 °C. Fueron añadidas 100 µl de las diluciones seriadas de la proteína His6-c-myc-GST-IL8h con un rango de concentraciones entre 0,4 a 200 ng/ml en las placas recubiertas con anti c-myc y en el rango de 4 a 1000 pg/ml en las placas recubiertas con anti IL8h. Ambos ELISAs fueron revelados usando el anticuerpo anti IL8-biotina, clon MT8F19, a 1 µg/ml. Luego de 5 lavados fueron añadidos 100 ng/ml de estreptavidina-HRP e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente se añadió el sustrato de la peroxidasa TMB y la reacción se detuvo usando HCl 1M. La lectura de los ELISA fue realizada a 450nm usando el equipo de lectura FLUOstar OPTIMA.



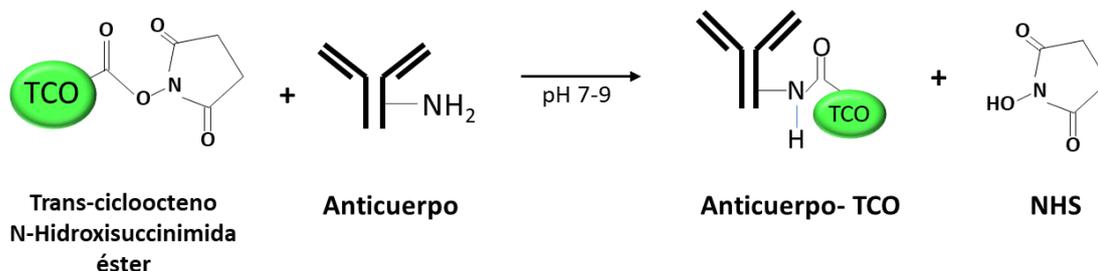
**Figura 17.** Esquema del ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h obtenida del cultivo en *E. coli*. Se representa la detección de la proteína de fusión c-myc-GST-IL8h mediante un ELISA sándwich con el anticuerpo anti IL8h de captura o con el anticuerpo anti c-myc. En ambos casos el anticuerpo de revelado es el anticuerpo anti IL8h-biotina.

## 2.2.2. Modificación de anticuerpos y BSA para la incorporación de grupos funcionales implicados en reacciones de tipo química clic

### 2.2.2.1. Incorporación del grupo funcional trans-cicloocteno en los anticuerpos anti c-myc y anti CEA a través de la reacción N-hidoxisuccinimida con los grupos amino libres del anticuerpo

Con el objetivo de incluir un grupo trans-cicloocteno (TCO) en moléculas de anticuerpos, trabajamos con dos anticuerpos de captura: un anti c-myc purificado en Canvax Biotech a partir del cultivo del hibridoma 9E10 y otro contra el antígeno carcinoembrionario (CEA) del hibridoma 3C1 (*Hyttest 4CA30*). Para la incorporación del grupo TCO se utilizó el reactivo trans-cicloocteno NHS éster (*UV-Tracer Trans-Cyclooctene NHS ester, Click Chemistry Tools, A1031*) en tampón

fosfato (0,15M NaCl, 0,1M NaPO<sub>4</sub> pH 7,5) con distintas relaciones molares: 15, 10 y 5 moles del reactivo por molécula de anticuerpo anti c-myc (Fig. 18). En el caso del anticuerpo anti CEA, el grupo TCO fue incorporado en una relación molar de 5 moles del reactivo: 1 mol de anticuerpo. La reacción fue incubada 1 h a temperatura ambiente y posteriormente dializada contra PBS pH 7,4 en una columna de diálisis de MWCO 7 kDa (Zeba, ThermoFisher, 89882).



**Figura 18.** Representación de la reacción química para la incorporación de un grupo trans-cicloocteno en la molécula del anticuerpo.

La concentración molar del anticuerpo fue cuantificada mediante absorbancia a 280nm, corrigiendo el efecto del trazador del compuesto mediante la ecuación:

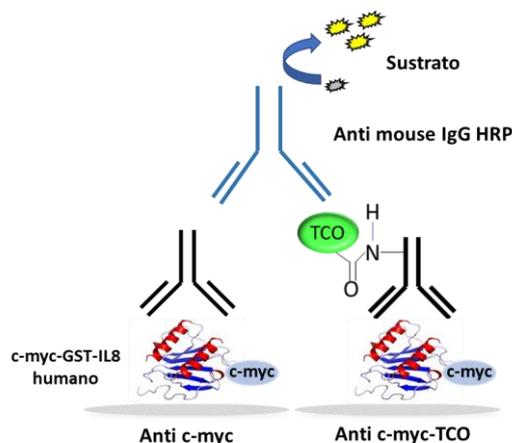
$$\text{Absorbancia}_{280\text{nm}} \text{ corregida} = \text{Absorbancia}_{280\text{nm}} - (\text{Absorbancia}_{350\text{nm}} \times 0,4475)$$

y teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar de un anticuerpo es  $\epsilon_{280\text{nm}} = 204.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Por su parte, la concentración molar de TCO se cuantificó a 350 nm y fue calculada teniendo en cuenta que el  $\epsilon_{350\text{nm}} = 19.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Finalmente se calculó la relación molar entre ambas moléculas.

#### 2.2.2.1.1. Detección de la actividad del anticuerpo modificado anti c-myc-TCO mediante ELISA

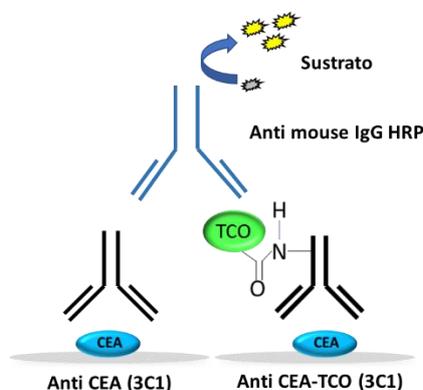
Las placas MaxiSorp fueron recubiertas con la proteína His6-c-myc-GST-IL8h diluida a 5 µg/ml en NaHCO<sub>3</sub> pH 9, e incubada 16 h a 4 °C. Tras bloquear los pocillos con PBS-BSA 1%, fue añadido el anticuerpo anti c-myc (9E10) en un rango de concentraciones de 0,39 a 50 ng/ml y el anticuerpo anti c-myc unido a TCO con diferentes diluciones. El revelado se realizó con el anticuerpo anti mouse HRP (Sigma-Aldrich A2554). En la Fig. 19 se muestra un esquema del ELISA realizado.



**Figura 19.** Esquema del ELISA de detección de actividad del anticuerpo anti c-myc-TCO. Cuantificación del anticuerpo tomando como patrón el anticuerpo sin modificar.

#### 2.2.2.1.2. Detección de la actividad del anticuerpo modificado anti CEA-TCO mediante ELISA

Las placas MaxiSorp (*ThermoFisher 442404*) fueron recubiertas con el antígeno carcinoembrionario (CEA) (*Hyttest, 8CEA88*) diluido a 5 µg/ml en NaHCO<sub>3</sub> pH 9, e incubado 16 h a 4 °C. Luego de bloquear los pocillos con PBS-BSA 1%, fue añadido el anticuerpo anti CEA (3C1) en un rango de concentraciones de entre 15,62 y 500 ng/ml y el anticuerpo anti CEA (3C1) unido a TCO con diferentes diluciones. El revelado se realizó con el anticuerpo anti mouse HRP (*Sigma-Aldrich, A2554*) como se muestra en la Fig. 20.

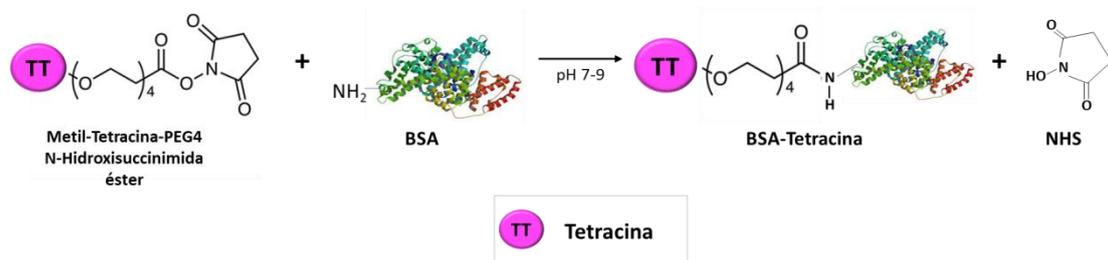


**Figura 20.** Esquema del ELISA de detección de actividad del anticuerpo anti CEA-TCO. Cuantificación del anticuerpo tomando como patrón el anticuerpo sin modificar.

#### 2.2.2.2. Incorporación del grupo funcional tetracina en la albúmina de suero bovino

La proteína BSA fue modificada con el objetivo de incorporar varios grupos tetracina en la molécula (Fig. 21). En la modificación se utilizó el reactivo Methyl Tetrazine–PEG4–NHS-ester (*Click Chemistry Tools, 1069*) a una concentración molar 30 veces superior a la de la proteína, para lo cual fueron utilizados 5 mg totales de BSA, correspondientes con  $7,7 \times 10^{-8}$  moles y

$231 \times 10^{-8}$  moles del reactivo. La reacción se llevó a cabo en tampón 50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 150 mM NaCl pH = 7 e incubada durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente la reacción se detuvo añadiendo una solución 1M Tris HCl pH 8 para una concentración final de 100 mM en tampón 50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 150 mM NaCl pH = 7. La mezcla de reacción fue dializada contra 0,5L de PBS para eliminar el exceso del reactivo usando una membrana de diálisis de MWCO de 12 kDa. La proteína fue cuantificada mediante Bradford usando una curva patrón de BSA, mientras que la tetracina fue cuantificada mediante absorbancia a 520 nm. Finalmente se calculó el número de grupos tetracina por molécula de BSA usando la relación molar entre ambas moléculas.



**Figura 21.** Representación de la incorporación de un grupo tetracina en la proteína BSA a través de la reacción de los grupos amino libres de ésta con N-hidroxisuccinimida formando un enlace tipo amida.

### 2.2.3. Preparación de superficies con alta densidad del grupo funcional tetracina

#### 2.2.3.1. Exposición del grupo tetracina en superficies de poliestireno previamente aminadas mediante química en mojado

Se utilizaron placas preparadas mediante la técnica de química en mojado, que incluye un proceso de clorosulfonación seguido de una sulfonamidación (Proyecto 2012/000069, TECNALIA Research & Innovation). La determinación de los grupos amino en superficie fue realizada a través de un método colorimétrico usando el reactivo Orange II (Reinecke, Navarro and Briz Iceta, 2010). Según la cuantificación aportada, los pocillos de las placas poseen una media de grupos amino de 1,5 - 3 nmoles/cm<sup>2</sup>. Debido a que los pocillos son generalmente recubiertos con un volumen de 100  $\mu\text{l}$ , fue considerado un volumen de 150  $\mu\text{l}$  para calcular la superficie a tratar con tetracina. De modo que se considera como la superficie de recubrimiento al área del círculo del fondo del pocillo más el área del rectángulo que rodea al círculo, la cual forma el cilindro del pocillo:

$$\text{Superficie de recubrimiento} = \text{Área del círculo} + \text{Área del rectángulo}$$

$$\text{Área del círculo} = \pi r^2 = 3,14 \times (0,35 \text{ cm})^2 = 0,384 \text{ cm}^2$$

$$\text{Área del rectángulo} = \text{Largo del círculo} \times \text{altura del líquido} = (2 \pi r) \times h$$

Conociendo que el volumen considerado es de 150  $\mu\text{L}$ , tenemos que

$$\text{Volumen del cilindro} = \pi r^2 h,$$

despejando la altura,

$$h = V / \pi r^2 = (0,15 \text{ cm}^3) / (3,14) \times (0,35 \text{ cm})^2 = 0,4 \text{ cm}$$

y sustituyendo en la ecuación del área del rectángulo,

$$\text{Área del rectángulo} = (2 \times 3,14 \times 0,35 \text{ cm}) \times 0,4 \text{ cm} = 0,879 \text{ cm}^2$$

Por tanto,

$$\begin{aligned} \text{Superficie de recubrimiento} &= \text{Área del círculo} + \text{Área del rectángulo} \\ &= 0,384 \text{ cm}^2 + 0,879 \text{ cm}^2 = 1,263 \text{ cm}^2 \end{aligned}$$

Si en 1  $\text{cm}^2$  teníamos 3 nmol de grupos amino, en 1,263  $\text{cm}^2$  tendremos 3,8 nmol de grupos amino.

Para el tratamiento con tetracina fue usado un exceso molar de 5 tetracina por grupos amino, siendo por tanto necesarios 18,95 nmol del reactivo, que se corresponden con 12  $\mu\text{g}$  tetracina/pocillo teniendo en cuenta la masa molecular del reactivo de tetracina utilizado.

La tetracina se diluyó a 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en buffer 0,1M  $\text{NaPO}_4$ , 0,15M  $\text{NaCl}$  pH 7,5, añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla por pocillo. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación suave y posteriormente fueron lavadas 3 veces con 0,3 ml de PBS pH 7,4.

Las superficies fueron evaluadas mediante el ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h que se describe en el apartado 2.2.4.4.

### **2.2.3.2. Exposición del grupo tetracina en superficies de poliestireno aminadas usando poli-lisina-tirosina**

Se utilizaron placas aminadas de CovaLink (*ThermoFisher*, 62409-285) que, según cuantificación de grupos amino, presentaban una media de 0,25 nmoles  $\text{NH}_2/\text{cm}^2$  (datos no mostrados). Los pocillos fueron tratados con una solución de glutaraldehído al 1% (v:v) (*Merck*, 8206030) y fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado con 0,2 ml de agua se añadió una solución de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de poli-lisina-tirosina (4 lisina: 1 tirosina) en PBS pH 7,4 (*Sigma-Aldrich*, P4659). Los pocillos se incubaron durante 16 h a temperatura ambiente con agitación constante suave y posteriormente lavadas 3 veces con PBS. Las placas fueron tratadas con el reactivo Methyl Tetrazine-PEG4-NHS-éster al igual que las placas aminadas mediante química en mojado.

Las superficies fueron evaluadas mediante el ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h como se describe en el apartado 2.2.4.4.

### **2.2.3.3. Exposición del grupo tetracina en superficies estándar de ELISA mediante la proteína BSA-Tetracina**

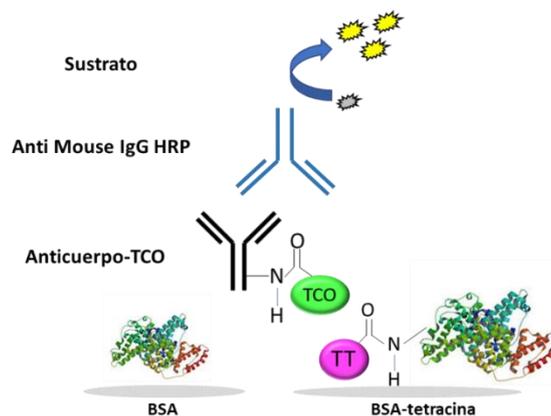
La superficie de una placa estándar de ELISA fue recubierta con 20, 50 y 100 µg/ml de la proteína BSA-Tetracina (1 BSA: 25 Tetracina) diluida en tampón 0,1M NaHCO<sub>3</sub> a pH 9 e incubadas durante 16 horas a 4 °C. Tras 3 lavados con PBS-Tween-20 0,05%, las placas fueron tratadas con un reactivo de bloqueo y almacenamiento para antígenos (*Sigma-Aldrich, C9483*) y almacenadas a 4 °C hasta su utilización.

Las superficies fueron evaluadas mediante el ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h descrito más adelante (apartado 2.2.4.4).

### **2.2.4. ELISAs desarrollados para la evaluación de las superficies activadas con tetracina**

#### **2.2.4.1. ELISA para la detección del anticuerpo anti CEA-TCO uniéndose a superficies tratadas con tetracina**

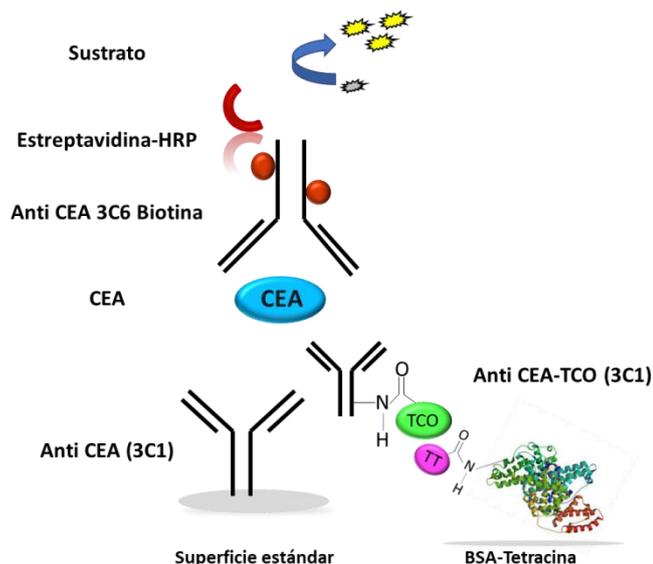
La reacción tetracina TCO sobre las superficies previamente recubiertas con BSA-tetracina a 20 µg/ml se comprobó usando el anticuerpo anti CEA-TCO (3C1) (Fig. 22). El anticuerpo fue utilizado en un rango de concentraciones de 0,78-1.000 ng/ml diluido en PBS pH 7,4 conteniendo BSA al 0,5%. Posteriormente, cada pocillo fue lavado 5 veces con 0,2 ml de PBS-Tween-20 0,05% (v:v) y bloqueados posteriormente durante 30 minutos a 37 °C con PBS-BSA 1%. El anticuerpo de revelado anti mouse HRP (*Sigma-Aldrich, A2554*) fue añadido e incubado 1 h a temperatura ambiente protegido de la luz. Tras 5 lavados se añadieron 100 µl del sustrato TMB por pocillo. La reacción fue detenida con 1M de HCl y la medida se efectuó a 450 nm usando el equipo de lectura FLUOstar OPTIMA (*BMG Labtech*).



**Figura 22.** Esquema del ELISA para la detección de la reacción de tipo química clic entre un anticuerpo marcado con TCO y una superficie recubierta con BSA- tetracina. Como control de las superficies preparadas con BSA-tetracina, se utilizaron superficies recubiertas con BSA.

#### 2.2.4.2. ELISA comparativo de detección de la proteína CEA en superficies estándar y en superficies tratadas con tetracina

En paralelo a lo anteriormente descrito, se realizaron los ELISAs de detección de CEA en placas estándar (*ThermoFisher, 442404*) y en placas tratadas con BSA-tetracina como se resume en la Fig. 23. En ambos casos, el anticuerpo anti CEA (3C1) fue utilizado a 5 µg/ml diluido en un tampón 0,1M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6. Las placas tratadas fueron recubiertas con el anticuerpo marcado anti CEA (3C1)-TCO, mientras que las placas estándar, lo fueron con el anticuerpo anti CEA (3C1) sin modificar. Tras 1 h de incubación, ambas placas continuaron con el mismo procedimiento. Estas fueron lavadas 5 veces con 0,2 ml por pocillo de PBS-Tween 20 0,05% y posteriormente fueron bloqueadas con una solución de PBS-BSA 1%. La proteína CEA diluida en una solución de PBS pH 7,4 conteniendo 0,5% de BSA, fue añadida en el rango de concentraciones de 0-200 ng/ml e incubada a temperatura ambiente durante 1 h. El anticuerpo biotilado anti CEA (3C6) a 0,5 µg/ml fue añadido como anticuerpo de detección luego de los lavados e incubado durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, la estreptavidina-HRP (*ThermoFisher, 21130*) fue añadida a 100 ng/ml e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Tras 5 lavados, se añadió el sustrato TMB a razón de 100 µl por pocillo. La reacción fue detenida con 100 µl por pocillo de 1M de HCl. La absorbancia se determinó a 450 nm usando el lector de placas FLUOstar OPTIMA (*BMG Labtech*).

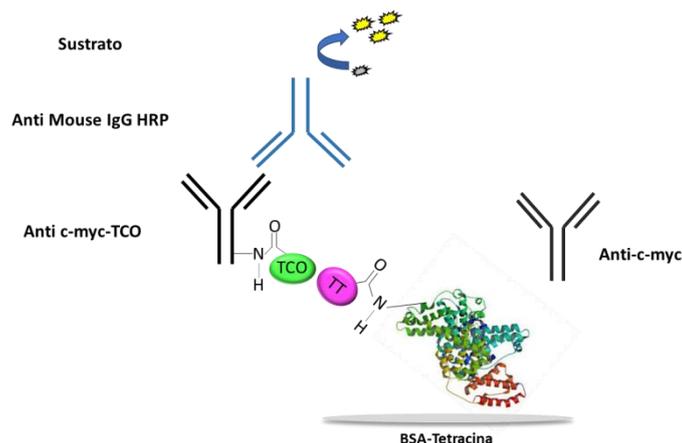


**Figura 23.** Esquema del ELISA desarrollado en superficies estándar recubriendo con el anticuerpo anti CEA (3C1) sin modificar o en superficies previamente recubiertas con BSA-tetracina y posteriormente añadido el anticuerpo anti CEA-TCO (3C1). Se representa la reacción entre la tetracina aportada por la proteína BSA y el TCO procedente del anticuerpo. Ambos ELISA se revelan con el anticuerpo anti CEA (3C6) biotina.

Para el cálculo del LOD y el LOQ fue utilizado el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1.1.1 utilizando para ello 10 pocillos de controles negativos de cada superficie. Los controles negativos fueron realizados usando, en vez de la proteína CEA, el tampón de dilución utilizado en este paso. Este ELISA fue realizado en paralelo 3 veces en días diferentes para determinar la variación intra ensayo y establecer el LOD y el LOQ.

#### 2.2.4.3. ELISA para la detección del anticuerpo anti c-myc-TCO uniéndose a superficies tratadas con tetracina

Para la detección de la unión específica entre el anticuerpo anti c-myc-TCO (4 grupos TCO) con las superficies de tetracina, se utilizaron superficies previamente recubiertas con 20 µg/ml de BSA-tetracina (Fig. 24). Luego del bloqueo, fue añadido el anticuerpo anti c-myc-TCO o el anticuerpo anti c-myc sin modificar en el rango de concentraciones desde 15,6 a 2.000 ng/ml. Tras 1 h de incubación a 37 °C, los pocillos fueron lavados 3 veces con el tampón de lavado PBS-Tween-20 0,05%. El anticuerpo unido fue detectado usando el anticuerpo de revelado anti mouse HRP (*Sigma-Aldrich*, A2554) que fue incubado durante 1 h a temperatura ambiente protegido de la luz. Tras 5 lavados se añadieron 100 µl por pocillo del sustrato TMB. La reacción fue detenida con 1M de HCl y la medida fue realizada a 450 nm usando el equipo de lectura FLUOstar OPTIMA (*BMG Labtech*).

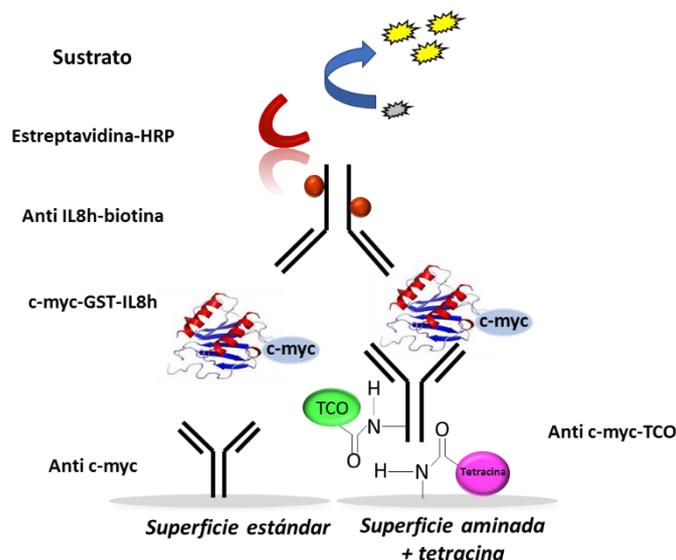


**Figura 24.** Esquema del ELISA para la detección de la reacción de tipo química clic entre el anticuerpo anti c-myc-TCO y una superficie recubierta con BSA- tetracina. Como control se utiliza el anticuerpo anti c-myc sin modificar.

El tiempo de incubación óptimo de unión entre ambos grupos funcionales fue determinado usando diferentes concentraciones del anticuerpo anti c-myc unido a TCO (100, 200, 500, 1.000, 2.000 y 5.000 ng/ml), y dos concentraciones del anticuerpo anti c-myc sin modificar (1.000 y 5.000 ng/ml) como controles negativos. Los tiempos ensayados fueron 30, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos.

#### 2.2.4.4. ELISA comparativo de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h en superficies estándar y tratadas con tetracina

Se realizó en paralelo el ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-GST- IL8h en superficies estándar de ELISA y en superficies tratadas con tetracina (Fig. 25). En ambos casos el anticuerpo anti c-myc fue utilizado en el recubrimiento a 2  $\mu\text{g/ml}$  en un tampón a 0,1M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  pH 9,6. El anticuerpo sin modificar fue utilizado en las placas estándar, mientras que en las tratadas con tetracina fue empleado el anticuerpo modificado anti c-myc-TCO. Posteriormente, las placas fueron bloqueadas con una solución de PBS pH 7,4 conteniendo BSA 1% durante 30 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ . La proteína c-myc-GST-IL8h fue añadida en un rango de concentraciones de 0,78-100 ng/ml e incubada a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. Para eliminar absorciones inespecíficas de la proteína se llevaron a cabo 5 lavados con 0,2ml de PBS-Tween-20 0,05%. El anticuerpo anti IL8-biotina (clon MT8F19) a 1  $\mu\text{g/ml}$  fue añadido e incubado durante 1 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Tras 5 lavados se añadió la estreptavidina-HRP (*ThermoFisher*, 21130) a 100 ng/ml e incubado a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 30 minutos. Como sustrato se utilizó TMB y la reacción fue detenida con una solución de HCl 1M. La absorbancia fue medida a 450 nm usando el lector de placas FLUOstar OPTIMA (*BMG Labtech*).



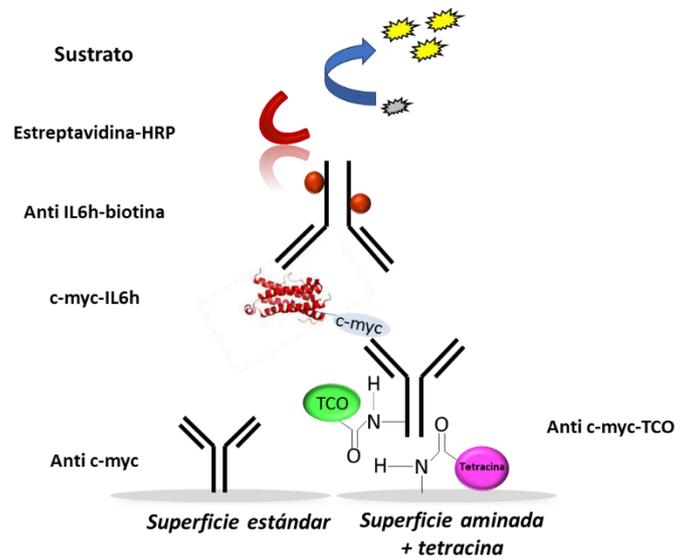
**Figura 25.** Esquema del ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h desarrollado en superficies estándar de ELISA o en superficies tratadas con tetracina. El anticuerpo utilizado en placas estándar no está modificado mientras que el anticuerpo utilizado en las placas tratadas con tetracina tiene incorporado el grupo funcional TCO. El resto del ELISA se desarrolla de la misma forma en ambos casos.

Para el cálculo del LOD y el LOQ fue utilizado el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1.1.1 usando para ello 10 pocillos de controles negativos de cada superficie. Estos controles fueron realizados usando el tampón de dilución en este paso el cual es PBS conteniendo 0,05% de BSA, en vez de la proteína recombinante. Este ELISA se repitió 3 veces en días diferentes en placas recubiertas con 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de BSA-tetracina para establecer el LOD y el LOQ atendiendo a la variación intra ensayo.

#### 2.2.4.5. ELISA comparativo de detección de la proteína c-myc-IL6h en superficies estándar y tratadas con tetracina

Los ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-IL6h en superficies estándar (*ThermoFisher, 442404*) y en superficies previamente aminadas mediante clorosulfonación-sulfonamidación y posteriormente tratadas con tetracina, se realizaron en paralelo. En ambos casos el anticuerpo anti c-myc fue utilizado en el recubrimiento a 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en un tampón a 0,1 M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  pH 9,6. En las placas estándar se utilizó el anticuerpo sin modificar mientras que las placas tratadas con tetracina fue utilizado el anticuerpo modificado anti c-myc-TCO (Fig. 26). Posteriormente, las placas fueron bloqueadas con una solución de PBS pH 7,4 conteniendo BSA 1% durante 30 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ . La proteína c-myc-IL6h fue añadida en un rango de concentraciones de 48-770 ng/ml e incubada a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. Fueron realizados 5 lavados con 0,2 ml de PBS-Tween 20 0,05% para eliminar absorciones inespecíficas de la proteína. El anticuerpo anti IL6h biotina (*Immunotools GmbH, 31330069*) diluido 1/100 fue añadido e

incubado durante 1 h a 37 °C. Luego de 5 lavados fue añadida la estreptavidina-HRP a 100 ng/ml e incubada protegida de la luz a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como sustrato fue utilizado el TMB y la reacción fue detenida con una solución de 1 M de HCl. La absorbancia fue medida a 450 nm usando el lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).



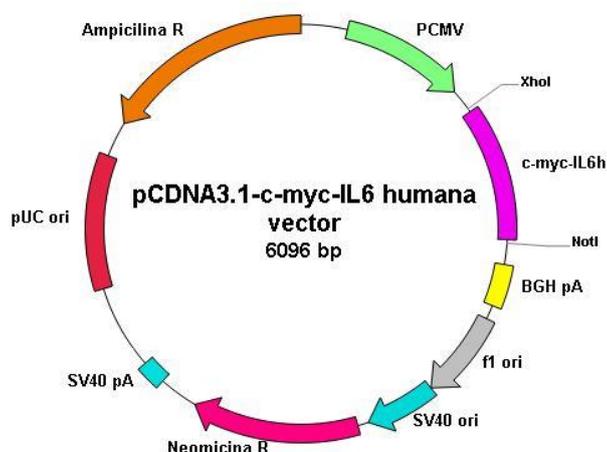
**Figura 26.** Esquema del ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-IL6h desarrollado en superficies estándar de ELISA o en superficies aminadas tratadas con tetracina. El anticuerpo utilizado en placas estándar no está modificado mientras que el anticuerpo utilizado en las placas tratadas con tetracina tiene incorporado el grupo funcional TCO. El resto del ELISA se desarrolla de la misma forma en ambos casos.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Obtención de proteínas recombinantes utilizadas en los ELISAs modelos para la validación de las superficies

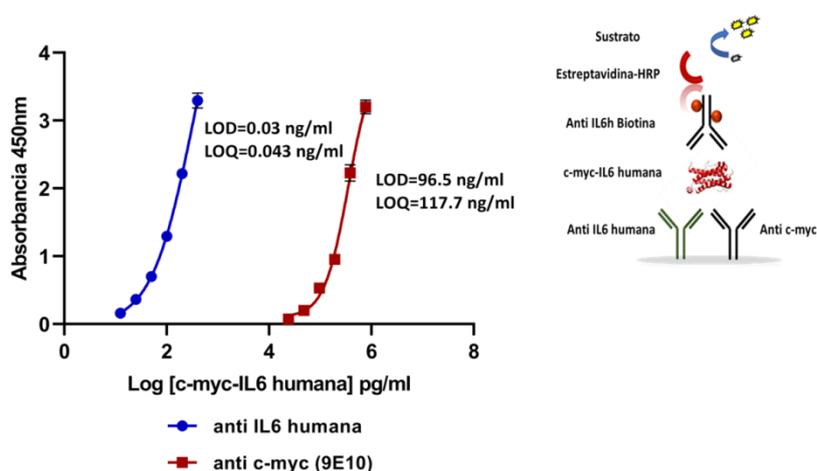
#### 2.3.1.1. Clonación y expresión de la proteína recombinante c-myc-IL6h en células de mamífero. Cuantificación y detección mediante ELISA

La clonación del inserto correspondiente a la proteína de fusión c-myc-IL6h fue comprobada mediante secuenciación del plásmido obtenido, el cual fue denominado pCDNA<sub>3.1</sub>-c-myc-IL6h (Fig. 27). Posteriormente, el plásmido fue utilizado para transfectar las células de la línea CHO-K1.



**Figura 27.** Esquema de la clonación de la proteína recombinante c-myc-IL6 humana en el vector de expresión de células de mamíferos pCDNA<sub>3.1</sub>.

La proteína recombinante c-myc-IL6h, expresada en el sobrenadante del cultivo de las células transfectadas e incubadas durante 72 h, fue cuantificada mediante un ELISA tipo sándwich de IL6 humana. Usando la citoquina IL6 humana proporcionada por el kit, fue realizada una curva de regresión lineal, obteniéndose que la concentración de la proteína recombinante en el sobrenadante del cultivo fue de  $770,3 \pm 6,5$  ng/ml (Fig. 28).

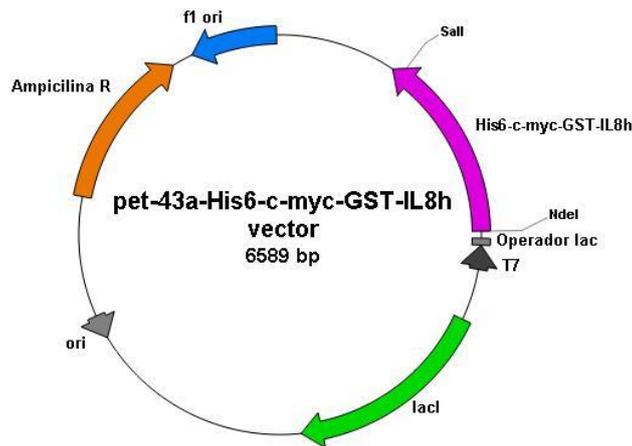


**Figura 28.** ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-IL6 humana. Curva sigmoide obtenida en el ELISA sándwich de detección de IL6h (azul) y curva del ELISA de detección de la fusión de c-myc con IL6h en la proteína recombinante (rojo). Se representan el LOD y el LOQ obtenidos para cada ELISA.

Mediante el ELISA tipo sándwich usando anti c-myc 9E10 como anticuerpo de captura y el anticuerpo anti IL6h biotinilado de detección, observamos que la proteína era reconocida por ambos anticuerpos, detectándose de esta manera la fusión de la proteína IL6 humana con el tag anti c-myc (Fig. 28). Como se observa en la figura la sensibilidad de ambos ELISAs es bastante diferente. En el caso del ELISA usando como anticuerpo de captura anti IL6 humano, el LOD y el LOQ están en el orden de pg/ml (30 y 43 pg/ml, respectivamente), mientras que cuando fue utilizado como anticuerpo de captura, el anticuerpo anti c-myc, observamos una disminución de la sensibilidad del ELISA en un orden de magnitud (hasta ng/ml), siendo el LOD y el LOQ, 96,5 y 117,7 ng/ml, respectivamente.

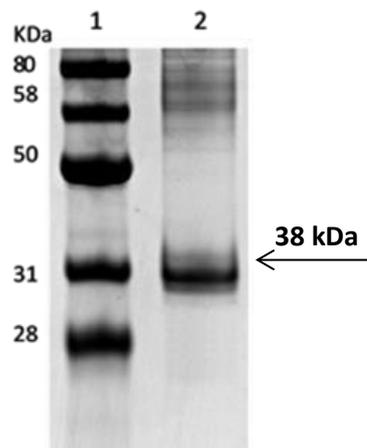
**2.3.1.2. Clonación y expresión de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h en *E. coli*. Purificación en columna de afinidad y detección mediante ELISA.**

El plásmido pET43a-c-myc-GST-IL8h fue secuenciado con el objetivo de detectar el inserto de interés correspondiente a la proteína de fusión clonada, el mapa del plásmido se representa en la Fig. 29.



**Figura 29.** Vector de expresión de la proteína recombinante His6- c-myc-GST-IL8h. La proteína IL8h está fusionada en su extremo carboxilo terminal a GST (*Glutation-S-transferasa*), el proto oncogen c-myc y un tándem de 6 histidinas.

Posteriormente, el plásmido obtenido fue usado para transformar las células de *E. coli* BL21 (DE3). A partir del cultivo de estas células se obtuvieron 10 mg/L de la proteína recombinante. La electroforesis en gel de acrilamida muestra una banda de aproximadamente 38 kDa, que se corresponde con la masa molecular esperada, observándose además un alto grado de pureza de la proteína (Fig. 30).

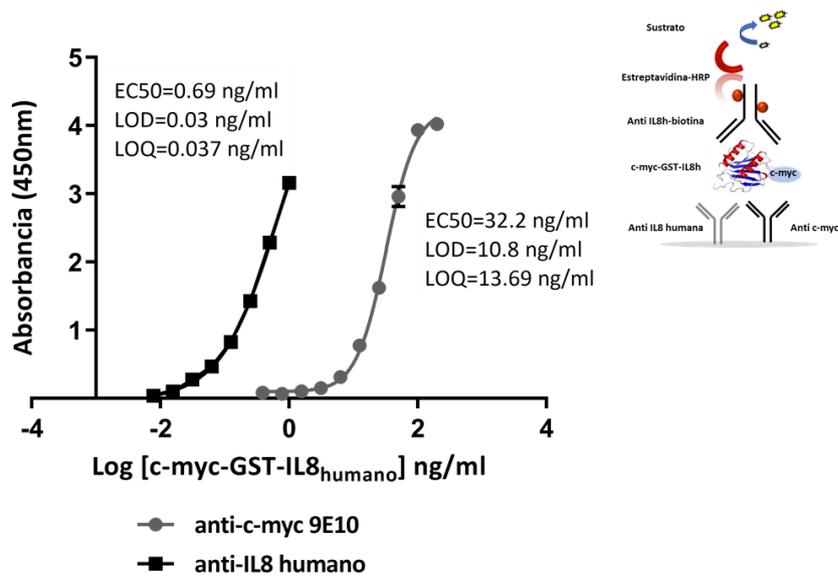


**Figura 30.** Análisis de la proteína recombinante His6-c-myc-GST-IL8h obtenida en las células BL21 (DE3) de *E. coli*. La imagen muestra un gel de acrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. Carriles: 1. Patrón de peso molecular (*Gene On*); 2. 1 µg His6-c-myc-GST-IL8h. La flecha indica la proteína purificada.

La proteína recombinante His6-c-myc-GST-IL8h fue detectada mediante el ELISA sándwich de IL8 humana, así como el ELISA donde además de IL8 humana se detecta el tag c-myc en la proteína quimérica. Como se observa, el rango de detección de la proteína varía considerablemente entre ambos ELISAs, lo que puede ser debido a la sensibilidad del ensayo dado que el anticuerpo anti c-myc tiene menos sensibilidad que el anti IL8 humano. Cuando en el ELISA fue utilizado el anticuerpo anti IL8 humano como anticuerpo de captura, el LOD y el LOQ fueron de 0,03 y 0,037

ng/ml, respectivamente. Sin embargo, cuando el anticuerpo de captura utilizado es el anti c-myc, el LOD es de 10,8 ng/ml y el LOQ es de 13,69 ng/ml (Fig. 31).

Estos resultados evidencian la importancia del anticuerpo de captura en los ELISAs tipo sándwich, ya que la diferencia de sensibilidad entre ambos ELISA donde solo cambia el anticuerpo de captura, es entre 360 y 370 veces. Este mismo perfil fue observado en el ELISA de detección de c-myc-IL6h. En ambos casos cuando es utilizado el anticuerpo anti citoquina, la sensibilidad es mucho mayor que cuando es utilizado el anticuerpo anti c-myc.



**Figura 31.** Análisis de la proteína recombinante His6-c-myc-GST-IL8h obtenida en *E. coli* mediante ELISA. Curva sigmoideal 4PL del ELISA desarrollado usando anti IL8 humano (negra) o anti c-myc (gris) como anticuerpos de captura. Las barras de error corresponden a tres triplicados para cada concentración de la proteína recombinante. Se indica la EC50, el LOD y el LOQ en cada caso.

### 2.3.2. Modificación de anticuerpos y BSA para la incorporación de grupos funcionales involucrados en reacciones de tipo química clic

#### 2.3.2.1. Incorporación del grupo funcional trans-cicloocteno en los anticuerpos anti c-myc y anti CEA a través de la reacción N-hidroxisuccinimida con los grupos amino libres del anticuerpo

Los anticuerpos utilizados en el recubrimiento de los ELISAs fueron modificados con el objetivo de incorporar el grupo reactivo TCO, el cual posteriormente debe unirse a los grupos tetracina que serán expuestos en las superficies de las placas de ensayo mediante una reacción bio-ortogonal. La incorporación de los grupos TCO se realizó mediante la reacción de N-hidroxisuccinimida éster con un grupo amino libre del anticuerpo formando un enlace tipo amida. Este grupo amino puede estar ubicado en cualquier región del anticuerpo, por lo que la modificación sería al azar y no estaría direccionada a ninguna región específica del anticuerpo.

Utilizando el anticuerpo anti c-myc (9E10) fueron ensayadas diferentes relaciones molares del reactivo con respecto al anticuerpo: 15:1, 10:1 y 5:1. Atendiendo a los resultados de la cuantificación de los distintos acoplamientos observamos que, a medida que aumenta la relación molar del reactivo con respecto al anticuerpo, aumenta la cantidad de grupos TCO incorporados en el mismo (Tabla 5).

**Tabla 5. Cuantificación del anticuerpo anti c-myc-TCO mediante absorbancia a 280 y a 350nm para determinar la relación molar final de grupos TCO por molécula de anticuerpo. Para la concentración molar del anticuerpo se tiene en cuenta la Absorbancia 280nm corregida, que es igual a la Absorbancia 280nm – (Absorbancia 350nm x 0,4475).**

Relación inicial TCO: Anticuerpo	Absorbancia 280nm	Absorbancia 350nm	Molaridad de TCO ( $\mu\text{M}$ )	Molaridad de anti c-myc ( $\mu\text{M}$ )	Relación final TCO: Anticuerpo	mg/ml del anticuerpo
5:1	1,266	0,438	22,46	5,27	4,26	0,76
10:1	1,317	0,764	39,18	4,80	8,16	0,70
15:1	1,507	1,013	51,95	5,19	10,01	0,75

$\epsilon_{280\text{nm}}$  del anticuerpo= 204.000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{350\text{nm}}$  = 19.500  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; MW anticuerpo= 150.000 g/mol

Posteriormente a la reacción del anticuerpo anti CEA (3C1) con el reactivo trans-cicloocteno NHS éster a una relación 5:1, pudo constatarse por cuantificación a absorbancia 280 nm y 350nm, que fueron incorporados 3,6 moléculas de TCO por molécula de anticuerpo.

Mediante un ELISA indirecto de reconocimiento del antígeno c-myc, se analizó si los anticuerpos modificados mantenían su actividad y no afectaban el reconocimiento del antígeno por la incorporación de los grupos TCO.

### 2.3.2.1.1. Detección de la actividad del anticuerpo c-myc-TCO mediante ELISA

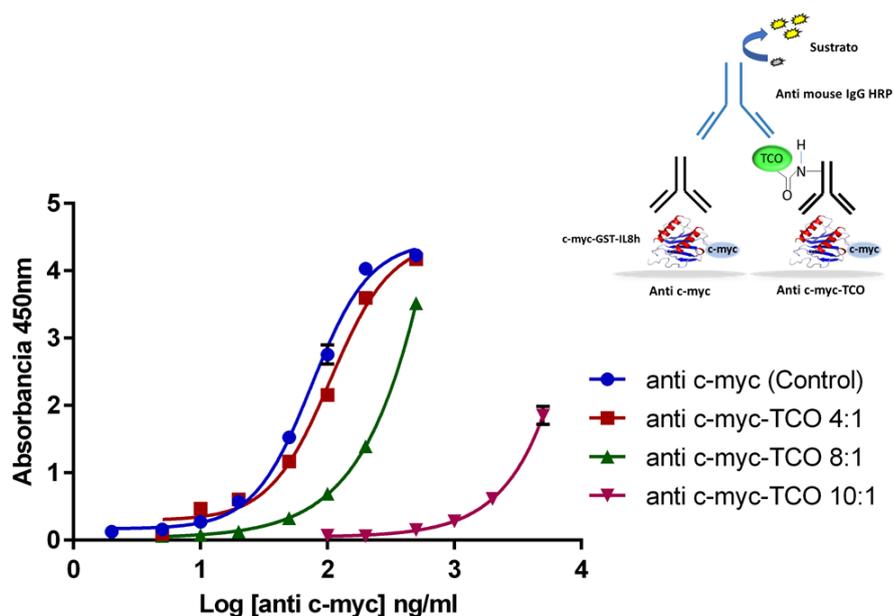
Los anticuerpos anti c-myc-TCO (relación final 4 TCO: 1 anti c-myc, 8 TCO: 1 anti c-myc y 10 TCO 1: anti c-myc) fueron cuantificados mediante ELISA utilizando como patrón el anticuerpo sin modificar. Se tomó como uno de los criterios de actividad del anticuerpo, la cuantificación de la concentración. En caso de que el anticuerpo mediante ELISA tuviese una concentración menor de la indicada por absorbancia a 280nm, esto indicaría que el anticuerpo habría perdido su actividad ya que, aun estando presente en la muestra, no estaría reconociendo a su antígeno. Para ello fue realizado el ELISA indirecto de detección del antígeno c-myc específico usando la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h y la absorbancia obtenida se interpoló en la curva patrón de anti c-myc (9E10) para cada uno de los anticuerpos a cuantificar. Como se observa en la Tabla 6, los anticuerpos con 8 y 10 grupos TCO por molécula (relación de acoplamiento 10:1 y 15:1, respectivamente) han perdido la actividad ya que sus concentraciones medidas por ELISA son más bajas que la cuantificación medida por absorbancia a 280nm. Por otro lado, el anticuerpo

con 4 TCO incorporados conservó la actividad, ya que su concentración medida por ELISA (0,698 mg/ml) se corresponde con la concentración determinada por absorbancia a 280nm (0,76 mg/ml).

**Tabla 6. Cuantificación de los anticuerpos anti c-myc, previamente modificados para la incorporación de grupos TCO en diferentes relaciones molares, mediante ELISA indirecto de reconocimiento de c-myc-GST-IL8h y usando como patrón el anticuerpo sin modificar.**

TCO: anti c-myc	Dilución en el ELISA	Absorbancia 450nm	Abs 450nm-Abs 450nm blanco	Log [Muestra] $\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$ muestra
4:1	70000	2,155	2,005	0,9993	698,84
8:1	35000	2,339	2,189	1,0447	387,93
10:1	35000	0,989	0,839	0,6005	139,51

Usando este mismo esquema de ELISA obtuvimos una curva comparativa con cada anticuerpo detectando que la actividad de los anticuerpos modificados con más de 4 grupos TCO había disminuido. En la Fig. 32 se observa la pérdida de actividad de los anticuerpos 8 TCO: 1 anti c-myc y 10 TCO 1: anti c-myc, mientras que el anticuerpo con 4 grupos TCO incorporados presenta una curva muy similar a la del patrón.

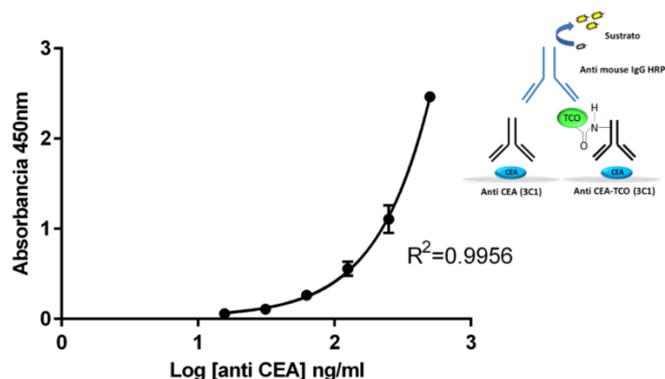


**Figura 32.** ELISA para la cuantificación y detección de la actividad del anticuerpo anti c-myc unido al grupo reactivo TCO usando como patrón el anticuerpo sin modificar. Curva sigmoideal 4PL comparativa del anticuerpo anti c-myc (9E10) sin modificar (*azul*) y los anticuerpos anti c-myc-TCO relación 4 TCO: 1 anticuerpo (*roja*), 8:1 (*verde*) y 10:1 (*magenta*) obtenida en el ELISA de detección del antígeno c-myc. Para cada concentración se representa la desviación estándar de 3 réplicas de cada una.

Atendiendo a estos resultados se seleccionó la relación molar 4:1 para la incorporación de TCO en el anticuerpo anti CEA (3C1).

### 2.3.2.1.2. Detección de la actividad del anticuerpo anti CEA-TCO mediante ELISA

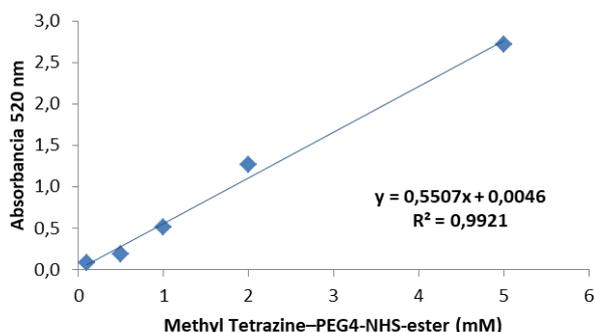
La detección de la actividad del anticuerpo anti CEA-TCO (3C1) se llevó a cabo mediante ELISA indirecto usando el antígeno CEA en el recubrimiento. Tomando como patrón el anticuerpo sin modificar, fue cuantificado el anticuerpo anti CEA-TCO (3C1) (Fig. 33). Atendiendo a los resultados de la cuantificación del anticuerpo a 280nm, que fue de 0,6 mg/ml, y la cuantificación según ELISA de 0,53 mg/ml, se comprobó que el anticuerpo con los grupos TCO incorporados no perdió su actividad de reconocimiento del antígeno.



**Figura 33.** Curva sigmoideal 4PL del patrón del anticuerpo anti CEA (3C1) sin modificar tomada para el cálculo de la concentración del anticuerpo anti CEA-TCO (3C1).

### 2.3.2.2. Incorporación del grupo funcional tetracina en la albúmina de suero bovino

La absorbancia a 520 nm de la proteína BSA- tetracina dializada de forma extensiva contra PBS pH 7,4, fue interpolada en la curva del reactivo Methyl Tetrazine-PEG4-NHS-éster (Fig. 34) obteniéndose de este modo la concentración molar de la tetracina presente en la proteína modificada. La concentración molar de la proteína fue medida mediante Bradford usando una curva de BSA y teniendo en cuenta la MW aproximada de BSA de 66.433 g/mol. De esta forma se calculó la concentración molar de la proteína. Finalmente, la relación entre ambas concentraciones molares indicó que había 25 grupos reactivos tetracina por molécula de BSA.



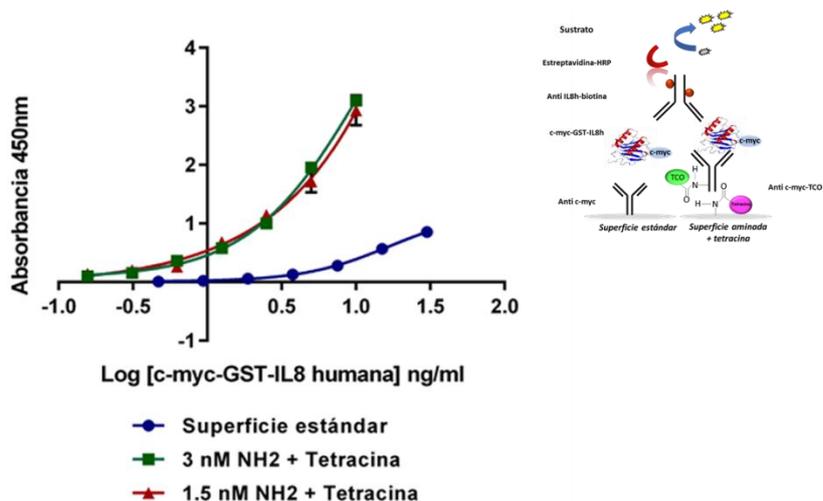
**Figura 34.** Curva de molaridad del reactivo Methyl Tetrazine-PEG4-NHS-éster contra absorbancia a 520nm.

### **2.3.3. Preparación de superficies con alta densidad del grupo funcional tetracina**

#### **2.3.3.1. Exposición del grupo tetracina en superficies de poliestireno previamente aminadas mediante química en mojado**

Las superficies de poliestireno fueron modificadas mediante una técnica de química en mojado, específicamente a través de la clorosulfonación. Esta técnica fue seleccionada ya que produce de manera selectiva grupos clorosulfonilo en la superficie, que son químicamente estables en condiciones ambientales de temperatura, humedad y aire normales, además de que permite la posterior reacción con aminas alifáticas (sulfonamidación) en condiciones muy suaves (bajas temperaturas y medio acuosos) y selectivas, de manera cuantitativa (véase Fig. 7). Aunque se han descrito diferentes metodologías de clorosulfonación, en este trabajo esta reacción fue realizada a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , realizándose posteriormente un aclarado con una solución de ácido sulfúrico y agua helada, lo que permitió la obtención de superficies transparentes con una modificación controlada (Del Prado *et al.*, 2012). De este modo, se prepararon superficies con 1,5 y 3 nmoles/cm<sup>2</sup> de grupos amino que fueron tratadas posteriormente con Methyl Tetrazine–PEG4-NHS-ester para la obtención de grupos tetracina en la superficie de las placas.

Con el objetivo de determinar la concentración idónea de grupos amino en superficie, se realizó el ELISA comparativo de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h en placas con superficie estándar y placas aminadas y posteriormente tratadas con tetracina. Posteriormente se realiza un ajuste logarítmico de 4 parámetros y se calcula el LOD y LOQ para cada tipo de superficie. Como se observa en la Figura 35, las curvas obtenidas para 1,5 y 3 nmoles/cm<sup>2</sup> de grupos amino son similares y ambas presentan diferencias muy significativas con respecto a la superficie estándar, indicando que la sensibilidad de la detección de la proteína ha aumentado. Las placas con superficies de 1,5 nmoles/cm<sup>2</sup> de amino tratadas con tetracina aumentan la sensibilidad 5 veces, mientras que las de 3 nmoles/cm<sup>2</sup> de grupos amino aumentan la sensibilidad aproximadamente 11 veces con respecto a la superficie estándar, como se aprecia en la Tabla 7.



**Figura 35.** Curva sigmoideal 4PL obtenida del ELISA realizado para la detección de c-myc-GST-IL8h, de forma paralela, en diferentes tipos de superficie; superficie estándar de ELISA (azul) y superficies aminadas con diferentes concentraciones de grupos NH<sub>2</sub> (3nM verde) y 1.5nM (roja) y posteriormente tratadas con tetracina. En las superficies tratadas con tetracina se utiliza el anticuerpo anti c-myc, que lleva incorporados grupos TCO, mientras que en la superficie estándar se utiliza el anticuerpo anti c-myc sin modificar. Para cada concentración de la proteína recombinante se representa la desviación estándar de 3 réplicas de cada una.

**Tabla 7. Comparación en la detección de c-myc-GST-IL8h desarrollada en una superficie estándar o en superficies aminadas con 1,5 y 3 nmoles/cm<sup>2</sup> de grupos amino.**

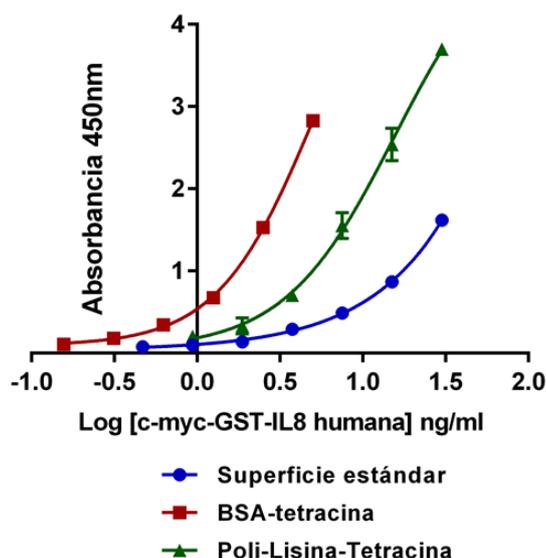
	Superficie estándar	3 nmoles/cm <sup>2</sup> NH <sub>2</sub> + Tetracina	1.5 nmoles/cm <sup>2</sup> NH <sub>2</sub> + Tetracina
LOD (ng/ml)	9,90	0,81	1,97
LOQ (ng/ml)	12,83	1,22	2,74
R <sup>2</sup>	0,9997	0,9987	0,9948

### 2.3.3.2. Exposición del grupo tetracina en superficies de poliestireno aminadas usando poli-lisina-tirosina

Como alternativa a las placas preparadas mediante química en mojado, se prepararon superficies conteniendo un alto porcentaje de grupos amino en superficie partiendo de placas disponibles comercialmente (Covalink), que previamente presentaban una densidad baja de estos grupos por cm<sup>2</sup>. Las placas fueron tratadas con glutaraldehído, molécula de naturaleza bifuncional que posee dos grupos aldehídos en su estructura separados por una cadena carbonada. Uno de los grupos aldehído podría formar un enlace con el grupo amino de la superficie mientras que el otro podría formar otro enlace con los grupos amino de la lisina del compuesto poli-lisina-tirosina, creando de esta manera un cruzamiento entre la superficie de la placa y la molécula poli-lisina-tirosina. Este último compuesto multiplicaría los grupos aminos libres en superficie, ya que presenta 4 lisinas en cada molécula. Estos grupos quedarían

expuestos en la superficie a una distancia mayor que los grupos amino originales y podrían reaccionar con el reactivo NHS-tetracina.

Estas superficies preparadas con tetracina a partir del uso del compuesto poli-lisina-tirosina, fueron comparadas con las superficies estándar y con superficies preparadas con BSA-tetracina mediante el ELISA de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h. Se realizó un ajuste sigmoidal 4PL con cada curva realizada en paralelo y se observaron las diferencias en la detección entre cada superficie. Como se aprecia en la Fig. 36, la superficie estándar muestra señales de absorbancia más bajas para la misma concentración de la proteína recombinante que las dos superficies preparadas con tetracina. Sin embargo, las señales con las placas recubiertas previamente con BSA tetracina presentaron mejores resultados. Usando estas curvas y 10 controles negativos en cada superficie, se calcularon el LOD y el LOQ y se comprobó que las placas preparadas con BSA-tetracina muestran una sensibilidad 8 veces mayor que las placas estándar, mientras que las placas aminadas con glutaraldehído-poli-lisina-tirosina y posteriormente tratadas con tetracina fueron 2,5 veces más sensibles (Tabla 8). De todo ello se puede deducir que las placas BSA-tetracina son 3 veces más efectivas que las de poli-lisina-tetracina y el proceso de obtención es, además, mucho más simple.



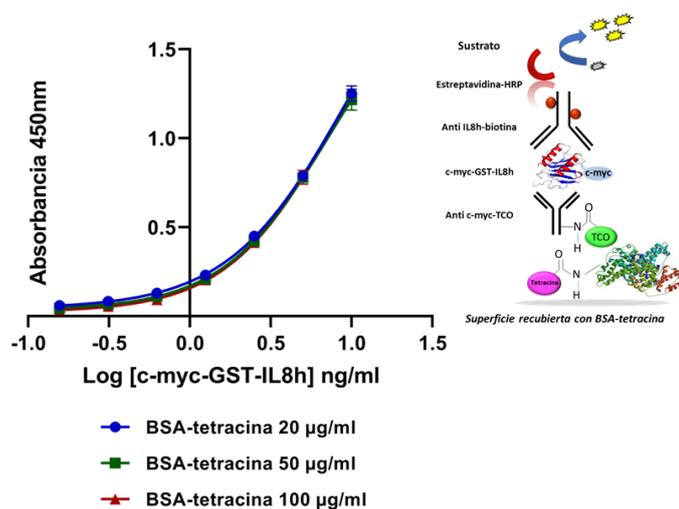
**Figura 36.** Curva sigmoidal 4PL obtenida del ELISA realizado para la detección de c-myc-GST-IL8h, de forma paralela, en una superficie estándar de ELISA (*azul*), una superficie tamizada con poli-lisina y posteriormente tratada con tetracina (*verde*) y una superficie recubierta con BSA-tetracina (*roja*). En las superficies tratadas con tetracina se utiliza el anticuerpo anti c-myc-TCO, mientras que en la superficie estándar se utiliza el anticuerpo anti c-myc sin modificar. Para cada concentración de la proteína recombinante se representa la desviación estándar de 3 réplicas.

**Tabla 8.** Curva sigmoideal 4PL comparativa del ELISA de detección de c-myc-GST-IL8h desarrollado sobre tres superficies de forma paralela: superficie estándar, superficie previamente recubierta con 20 µg/ml de BSA-tetracina y superficie aminada mediante glutaraldehído-poli-lisina-tirosina y posteriormente tratada con tetracina.

	Superficie estándar	BSA-Tetracina	Poli-lisina-tetracina
LOD (ng/ml)	10,47	1,29	3,99
LOQ (ng/ml)	12,14	1,42	4,89
R <sup>2</sup>	0,9983	0,9998	0,9991

### 2.3.3.3. Exposición del grupo tetracina en superficies estándar de ELISA usando la proteína BSA-Tetracina

La proteína BSA-tetracina se utilizó en el recubrimiento de superficies de ELISA estándar a concentraciones altas (20, 50 y 100 µg/ml) para permitir la exposición del grupo tetracina en las superficies. Se determinó mediante el ELISA de detección de c-myc-GST-IL8h la concentración óptima de la proteína con la cual la sensibilidad del ELISA aumenta. Como se observa en la Fig. 37, la concentración de la proteína BSA-tetracina en el rango de 20 a 100 µg/ml no tiene un efecto sobre la sensibilidad del ELISA. Si consideramos como hipótesis nula que no hay diferencias significativas entre los LOD y LOQ calculados, usando el concepto estadístico de los cuadrados medios obtenemos para el LOD y el LOQ unos valores de 0,015 y 0,006 respectivamente, indicando que no hay diferencias significativas en la detección de la proteína con una probabilidad del 95% (Tabla 9).



**Figura 37.** Curva sigmoideal 4PL del ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h desarrollado en superficies recubiertas previamente con la proteína BSA-tetracina a diferentes concentraciones y usando como anticuerpo de captura anti c-myc-TCO.

**Tabla 9. Comparación en la detección de c-myc-GST-IL8h desarrollada en una superficie estándar o recubierta previamente con la proteína modificada BSA-Tetracina a diferentes concentraciones.**

BSA-Tetracina	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
20 µg/ml	1,17	1,60
50 µg/ml	1,34	1,68
100 µg/ml	1,41	1,53
<b>p</b>	0,015	0,006

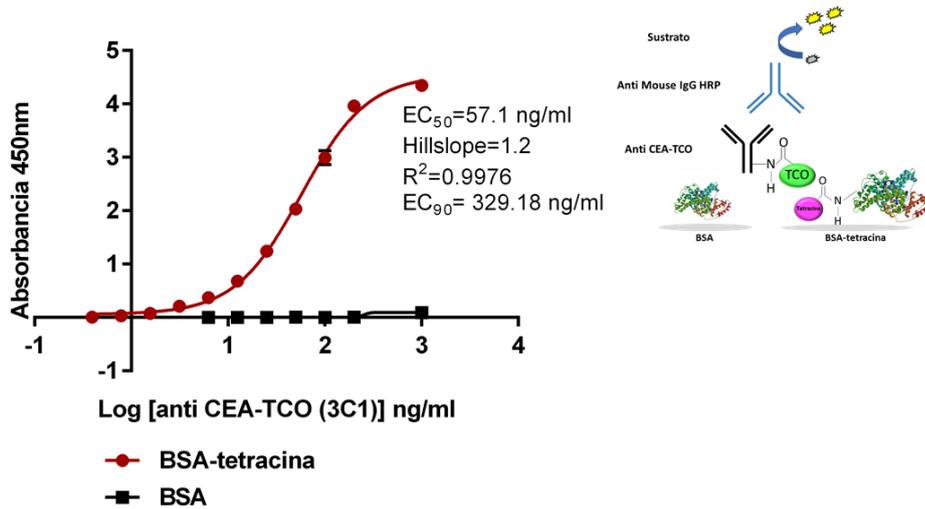
*LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación; p: variación atendiendo al concepto de cuadrados medios*

### 2.3.4. ELISAs desarrollados para la evaluación de las superficies activadas con tetracina

#### 2.3.4.1. ELISA para la detección del anticuerpo anti CEA-TCO uniéndose a superficies tratadas con tetracina

La reacción química esperada en la superficie de la placa de ELISA sería una reacción de cicloadición entre la tetracina y el TCO formándose un enlace covalente estable. Esta reacción es muy rápida a temperatura ambiente y no requiere catalizadores (Cu (I)) para la formación del producto. De esta manera se crea un enlace covalente que permite la unión del anticuerpo que lleva el grupo TCO y la tetracina que se encuentra en la superficie de la placa, lo que evita la pérdida del anticuerpo de captura en los sucesivos pasos de lavados que conllevan los ensayos tipo ELISA, además de aumentar la densidad de anticuerpo en la superficie.

Para comprobar que la reacción entre la tetracina y el TCO estaba ocurriendo, se utilizó el anticuerpo de revelado anti mouse para detectar al anticuerpo anti CEA-TCO (3C1) unido a la superficie previamente recubierta con BSA-tetracina. Como se observa en la Fig. 38, a medida que aumenta la concentración del anticuerpo unido a TCO aumenta la señal de absorbancia en las superficies con tetracina, mientras que en la superficie que fue recubierta solamente con BSA no se detectó señal. Esto demostraría que el anticuerpo se está uniendo mediante la reacción de cicloadición entre la tetracina y el TCO a la superficie de la placa, creándose un enlace covalente entre ambos.

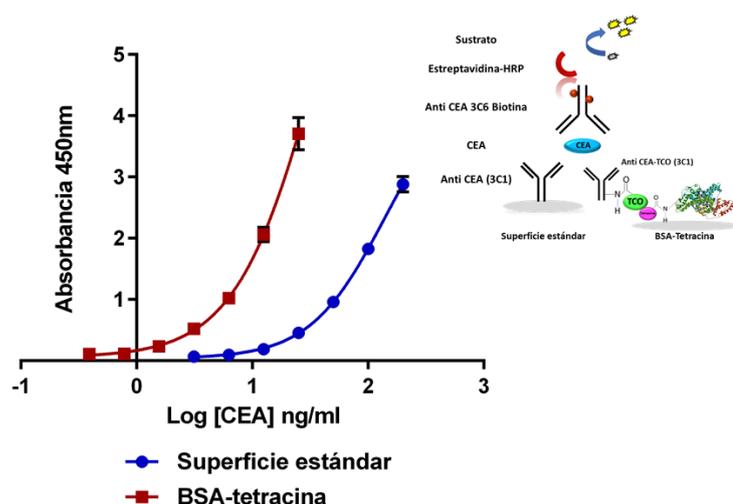


**Figura 38.** Ensayo de detección de la unión entre los grupos tetracina expuestos en la superficie de la placa y los grupos TCO aportados por el anticuerpo. Curva sigmoideal 4PL comparativa entre el ELISA realizado en placas previamente recubiertas con BSA-tetracina o con BSA.

La concentración óptima a utilizar del anticuerpo modificado anti CEA-TCO (3C1) sería aquella en la que la señal de absorbancia sea saturante, de modo que este paso no se convierta en limitante en el ELISA de cuantificación de la proteína CEA. En la Fig. 38 se observa que a partir de 1.000 ng/ml de anticuerpo se llega a la saturación de la señal.

#### 2.3.4.2. ELISA comparativo de detección de la proteína CEA en superficies estándar y tratadas con tetracina

El ELISA de detección de la proteína CEA fue desarrollado en superficies estándar o en superficies previamente recubiertas con BSA-tetracina. En la Fig. 39 se muestra la curva sigmoideal obtenida para ambos ELISAs desarrollados de forma paralela. En las placas en las que se utiliza la reacción tetracina-TCO, se observan mayores señales para las mismas concentraciones de la proteína CEA si se compara con las placas donde el anticuerpo de captura se une solamente por adsorción a la superficie, de modo que la curva para la superficie a ensayar se desplaza hacia la izquierda con respecto a la curva de la superficie control.



**Figura 39.** Curva sigmoideal 4PL comparativa del ELISA de detección de CEA desarrollado en superficies estándar recubriendo con el anticuerpo anti CEA (3C1) sin modificar (*azul*) o en superficies previamente recubiertas con BSA-tetracina y posteriormente añadido el anticuerpo anti CEA-TCO (3C1) (*roja*).

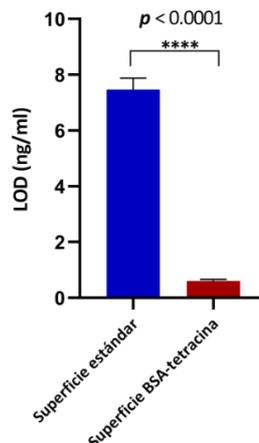
El mismo ELISA fue desarrollado 3 veces en paralelo para determinar la sensibilidad del ensayo teniendo en cuenta la variación inter ensayo. En la tabla 10 se muestran los valores del LOD obtenidos para cada tipo de superficie en las tres repeticiones, observándose que hay un aumento de sensibilidad aproximado de 12 veces cuando se involucra la reacción tipo química clic entre la tetracina aportada por el recubrimiento de la placa y el trans-cicloocteno aportado por el anticuerpo anti c-myc-TCO con respecto a una superficie estándar.

**Tabla 10.** Tabla comparativa de los resultados obtenidos del ELISA de detección de CEA desarrollado en paralelo en superficies previamente recubiertas con BSA-tetracina y usando posteriormente el anticuerpo anti CEA-TCO, comparado con el ELISA desarrollado en superficies estándar con el anticuerpo anti CEA.

	Superficie estándar	Superficie BSA-tetracina	Relación de sensibilidad
1-LOD	7,095	0,574	12,36
2-LOD	7,903	0,671	11,78
3-LOD	7,420	0,571	12,99
Media	7,473	0,605	12,38
SD inter ensayo	0,407	0,057	0,605
CV% inter ensayo	5,44	9,40	4,89

*LOD: Límite de detección, SD inter ensayo: Desviación estándar inter-ensayo, % CV inter ensayo: Porcentaje del coeficiente de variación inter-ensayo*

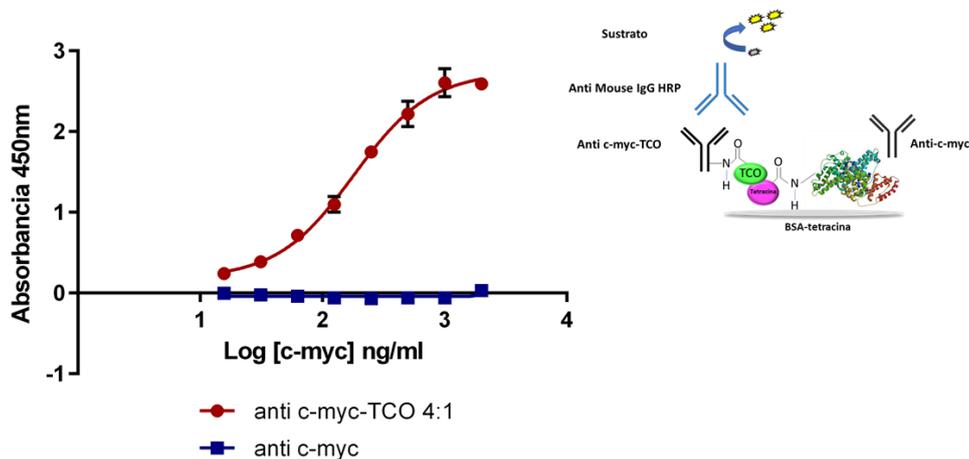
Posteriormente fueron analizados ambos grupos mediante un test t de Student, no emparejado, obteniéndose una diferencia significativa amplia ( $p < 0,001$ ) entre ambos tipos de superficies (Fig. 40).



**Figura 40.** Resultados obtenidos del ELISA de detección de CEA. Gráfico de barras del LOD (ng/ml) obtenido en cada superficie mostrando las diferencias significativas ( $p > 0,0001$ ) entre ambos grupos.

### 2.3.4.3. ELISA para la detección del anticuerpo anti c-myc-TCO uniéndose a superficies tratadas con tetracina

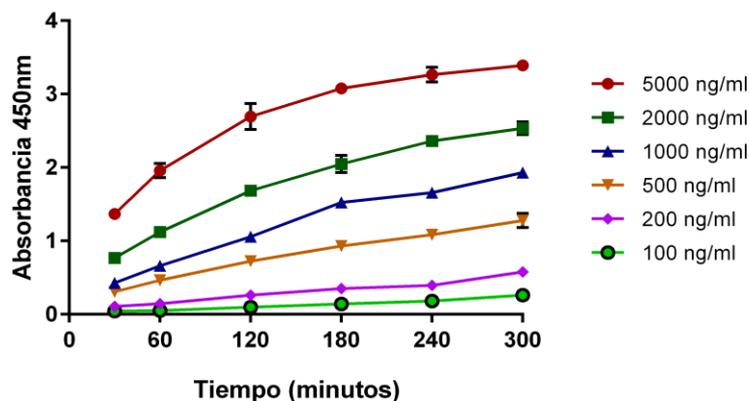
En el ELISA de detección de la unión del anticuerpo anti c-myc (9E10)-TCO a la tetracina de la superficie aportada por la proteína BSA-tetracina, se detecta que este se une de forma específica a la superficie, ya que si se compara con el anticuerpo anti c-myc sin modificar no se observa señal (Fig. 41). A medida que aumenta la concentración del anticuerpo, aumenta de forma exponencial la señal de absorbancia en el ELISA siendo la EC50 de 180 ng/ml, observándose una saturación a los 2.000 ng/ml del anticuerpo.



**Figura 41.** ELISA para la detección de la unión entre anti c-myc-TCO y la tetracina expuesta en la superficie de una placa. Curva sigmoideal 4PL de concentración del anticuerpo contra señal de absorbancia.

Para determinar el tiempo óptimo de la reacción entre la tetracina y el grupo TCO, se realizó el mismo ELISA, incubando la reacción entre el anticuerpo unido a TCO y la superficie recubierta con BSA-tetracina, previo bloqueo con PBS-BSA 1%, a diferentes tiempos y usando diferentes

concentraciones del anticuerpo anti c-myc-TCO. En la Fig. 42 se observa que a partir de 2 horas de incubación (120 minutos), aparece una meseta en la curva de cada concentración del anticuerpo, indicando que incubaciones más prolongadas no inducen aumento de señalización del ELISA de forma significativa. Además, se puede observar que a concentraciones muy bajas del anticuerpo no se obtienen señales muy altas, lo que indica que en el ELISA de detección específico de un analito utilizando el sistema de reacción tetracina- TCO, no se deben usar concentraciones del anticuerpo inferiores a 1.000 ng/ml.



**Figura 42.** Optimización del tiempo de incubación de la reacción en la superficie de la placa entre el grupo reactivo tetracina y el grupo TCO aportado por el anticuerpo. Para cada concentración del anticuerpo (100, 200, 500, 1.000, 2.000, 5.000 ng/ml) fueron utilizadas 4 réplicas en cada tiempo de reacción. El gráfico muestra la desviación estándar entre las mediciones de cada concentración del anticuerpo. Se utilizaron como controles negativos el anticuerpo anti c-myc sin modificar en la placa recubierta con BSA-tetracina y en la placa recubierta con BSA, el anticuerpo anti c-myc-TCO a 5.000 ng/ml (no se representan porque ambos controles presentan la misma señalización que el blanco del ELISA).

#### 2.3.4.4. ELISA comparativo de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h en superficies estándar y en superficies tratadas con tetracina

Se obtuvieron dos tipos de superficies tratadas con tetracina:

- Recubiertas previamente con 20 µg/ml de la proteína BSA- tetracina
- Amidadas previamente mediante clorosulfonación-sulfonamidación y posteriormente tratadas con NHS-tetracina.

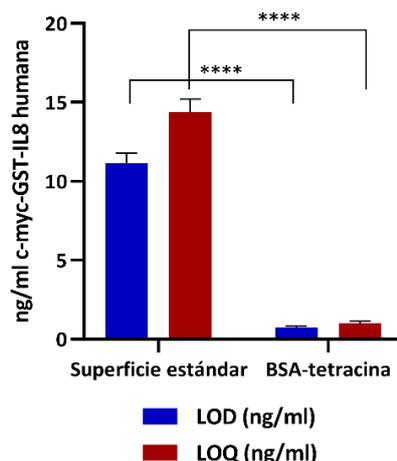
En ambas superficies se esperaba una reacción entre el grupo tetracina de la superficie y el grupo TCO aportado por el anticuerpo anti c-myc-TCO. Estas superficies fueron evaluadas para determinar si aumentaba la sensibilidad atendiendo al LOD y el LOQ obtenido tras desarrollar los ELISA en paralelo, en tres ensayos realizados en días diferentes, con una superficie estándar donde fue utilizado el anticuerpo anti c-myc sin modificar. El ELISA desarrollado fue el de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8 humano.

Con los resultados obtenidos, fue calculado el LOD y el LOQ en cada uno de los ensayos, siendo para las superficies estándar de  $11,17 \pm 0,62$  ng/ml y  $14,4 \pm 0,82$  ng/ml respectivamente, mientras que para las superficies recubiertas con BSA-tetracina fue de  $0,77 \pm 0,05$  ng/ml y  $1,01 \pm 0,14$  ng/ml. Atendiendo a la sensibilidad del ensayo para cada superficie, se observó un aumento de sensibilidad aproximado de 14 veces asociado a la disminución del LOD y del LOQ (Tabla 11).

**Tabla 11. Tabla comparativa de los resultados obtenidos del LOD y el LOQ del ELISA de detección de c-myc-GST-IL8 humano. Los ELISA se desarrollaron en paralelo en superficies previamente recubiertas con BSA-tetracina y usando posteriormente el anticuerpo anti c-myc-TCO, comparado con el ELISA desarrollado en superficies estándar con el anticuerpo anti c-myc.**

		Superficie estándar	Superficie BSA-tetracina	Relación de sensibilidad
<b>1</b>	LOD (ng/ml)	11,52	0,70	16,36
	LOQ (ng/ml)	14,63	0,91	16,13
<b>2</b>	LOD (ng/ml)	10,45	0,79	13,17
	LOQ (ng/ml)	13,49	1,16	11,59
<b>3</b>	LOD (ng/ml)	11,52	0,80	14,39
	LOQ (ng/ml)	15,07	0,95	15,79
<b>Límite de detección (LOD)</b>	Media	11,17	0,77	<b>14,64</b>
	SD inter ensayo	0,62	0,05	
	CV% inter ensayo	5,54	7,01	
<b>Límite de cuantificación (LOQ)</b>	Media	14,40	1,01	<b>14,50</b>
	SD inter ensayo	0,82	0,14	
	CV% inter ensayo	5,66	13,56	

Ambas superficies fueron comparadas mediante un test t de *Student*, obteniéndose diferencias muy significativas entre ambos grupos (Fig. 43).



**Figura 43.** Comparación entre el LOD y el LOQ (ng/ml) obtenidos en el ELISA de detección de c-myc-GST-IL8h.

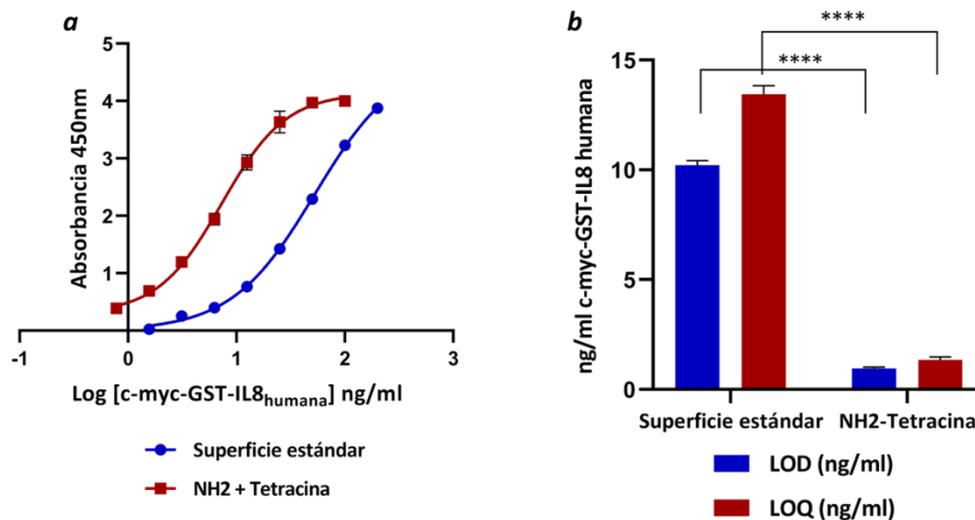
**Tabla 12.** Tabla comparativa mostrando el LOD y el LOQ calculados a partir de los resultados obtenidos del ELISA de detección de c-myc-GST-IL8h, que se desarrollaron en paralelo en superficies previamente aminadas y posteriormente tratadas con tetracina usando el anticuerpo anti c-myc-TCO comparado con el ELISA desarrollado en superficies estándar con el anticuerpo anti c-myc.

		Superficie estándar	Superficie NH <sub>2</sub> -tetracina	Relación de sensibilidad
<b>1</b>	LOD (ng/ml)	10,32	0,92	11,22
	LOQ (ng/ml)	13,08	1,37	9,55
<b>2</b>	LOD (ng/ml)	10,35	0,92	11,25
	LOQ (ng/ml)	13,86	1,19	11,65
<b>3</b>	LOD (ng/ml)	9,98	1,03	9,69
	LOQ (ng/ml)	13,39	1,46	9,17
<b>Límite de detección (LOD)</b>	Media	10,22	0,96	<b>10,72</b>
	SD inter-ensayo	0,21	0,06	
	CV% inter-ensayo	2,01	6,64	
<b>Límite de cuantificación (LOQ)</b>	Media	13,44	1,34	<b>10,12</b>
	SD inter-ensayo	0,39	0,14	
	CV% inter-ensayo	2,99	10,26	

Las superficies previamente aminadas mediante clorosulfonación y luego tratadas con tetracina, fueron evaluadas usando el ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h. El LOD y el LOQ fueron calculados en cada uno de los ensayos, siendo para las superficies estándar de  $10,22 \pm 0,21$  ng/ml y  $13,4 \pm 0,39$  ng/ml, respectivamente mientras que para las superficies donde ocurre la reacción tetracina-TCO fueron de  $0,96 \pm 0,06$  ng/ml y  $1,34 \pm 0,14$  ng/ml.

Atendiendo a la sensibilidad del ensayo para cada superficie observamos un aumento de sensibilidad aproximado de 10 veces asociado a la disminución del LOD y del LOQ (Tabla 12).

En la curva sigmoideal 4PL obtenida en uno de los ensayos realizados, se observa un desplazamiento de la curva hacia la izquierda debido a un aumento de la señalización cuando está involucrada la reacción tetracina-TCO en la superficie (Fig. 44a). En la Fig. 44b se observan diferencias significativas obtenidas entre ambos grupos tanto para el valor del LOD como del LOQ luego de un análisis mediante un test t de Student.



**Figura 44.** Análisis de los resultados del ELISA de detección de c-myc-GST-IL8h desarrollado en paralelo en superficies previamente aminadas y posteriormente tratadas con tetracina usando el anticuerpo anti c-myc-TCO en comparación con el desarrollado en superficies estándar con el anticuerpo anti c-myc. **a.** Curva sigmoideal 4PL obtenida en el ELISA usando para cada concentración 3 réplicas. Se representa la desviación estándar para cada concentración. **b.** Gráfico de barras del LOD y el LOQ (ng/ml) obtenido en cada superficie tras tres repeticiones del ensayo, mostrando las diferencias significativas entre ambos grupos ( $p < 0,0001$ ).

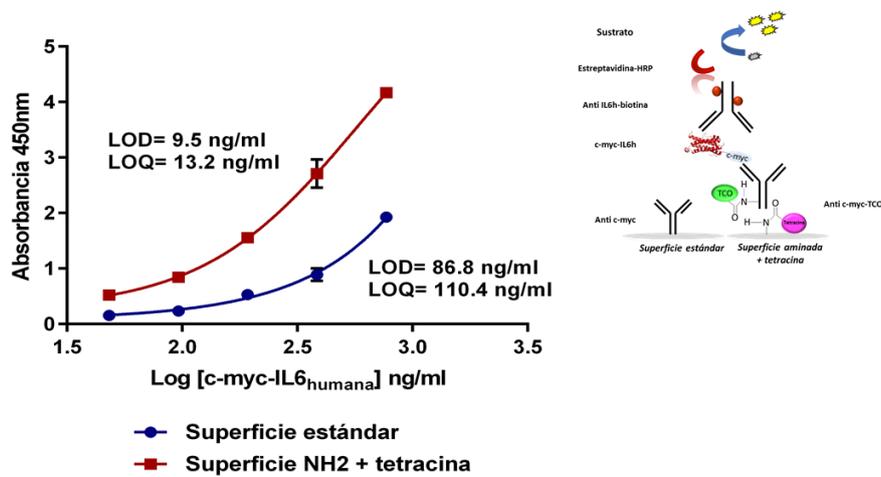
### 2.3.4.5. ELISA comparativo de detección de la proteína recombinante c-myc-IL6h en superficies estándar y en superficies tratadas con tetracina

Las superficies aminadas mediante química en mojado y posteriormente tratadas con tetracina fueron evaluadas para determinar si mejoran la sensibilidad del ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-IL6h. Estas superficies también fueron evaluadas con el ELISA de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h, como fue descrito anteriormente. Para ello se realizaron paralelamente ambos ELISAs empleando tanto la superficie estándar, como una superficie modificada por tratamiento con tetracina como soporte del inmunoensayo.

En las superficies estándar fue usado el anticuerpo anti c-myc, mientras que en las superficies tratadas con tetracina lo fue el anticuerpo anti c-myc-TCO, ello con el objetivo de obtener una mayor estabilidad y sensibilidad a causa del enlace covalente formado entre la tetracina y el

TCO. Como se observa, el límite de detección mejora 9 veces en las placas tratadas con tetracina con respecto a las MaxiSorp, siendo los valores del LOD y LOQ 9,51 ng/ml y 86,8 ng/ml, respectivamente. El límite de cuantificación obtenido para las superficies de tetracina fue de 13,2 ng/ml, mientras que para la estándar fue de 110,4 ng/ml mostrando una diferencia de sensibilidad de 8,4 veces (Fig. 45).

Estos resultados son consistentes y concuerdan con los obtenidos en la comparativa de estas superficies usando el ELISA de c-myc-GST-IL8h, donde se obtiene un aumento de la sensibilidad media entre ambas superficies similar (10x).



**Figura 45.** ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-IL6h realizado paralelamente en superficies estándar MaxiSorp y en superficie aminada y posteriormente tratada con tetracina. Curva sigmoideal 4PL mostrando el LOD y el LOQ obtenido en cada caso.

## 2.4. DISCUSIÓN

Existen diferencias significativas en la sensibilidad de detección de una proteína en dependencia del anticuerpo de captura utilizado en el ELISA. Este hecho ha sido constatado en este trabajo tanto en la comparación entre el anticuerpo anti IL8h y anti c-myc en la detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h, como en la comparación entre el anticuerpo anti IL6h y anti c-myc para detectar la proteína c-myc-IL6h. En la detección de la proteína c-myc-GST-IL8h usando anti IL8h como anticuerpo de captura se obtuvo como LOD 0,03 ng/ml mientras que cuando se utilizó anti c-myc la diferencia fue de 360 veces con un LOD = 10,8 ng/ml. En la detección de la molécula c-myc-IL6h usando el anticuerpo anti IL6h como anticuerpo de captura, el LOD fue de 0,03 ng/ml, mientras que cuando se utilizó anti c-myc fue de 96,5 ng/ml. Estos resultados son debidos probablemente a que la sensibilidad del ensayo queda comprometida al utilizar como anticuerpo de captura anti c-myc el cual es un anticuerpo de baja afinidad comparado con los anticuerpos anti IL8h o anti IL6h. Por tanto, el empleo en el recubrimiento de anticuerpos de baja afinidad genera ELISAs con una menor sensibilidad para la detección de analitos.

Cuando se utiliza un anticuerpo para la detección o cuantificación de su antígeno, la sensibilidad del ensayo depende en gran medida de la constante de disociación (Kd) del anticuerpo con su antígeno: si la interacción antígeno anticuerpo es débil, el valor de la Kd es alto; mientras que, si la afinidad es alta, el valor de la Kd es bajo. De acuerdo con la literatura, la constante de disociación anticuerpo-antígeno oscila en un amplio rango de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  M<sup>-1</sup> (Heinrich *et al.*, 2010). La constante de disociación de los anticuerpos anti citoquinas se encuentra aproximadamente en el rango picomolar, mientras que el anticuerpo monoclonal anti cmyc (clon 9E10) tiene baja afinidad por su antígeno en al menos cinco órdenes de magnitud con una Kd =  $5,3 \pm 0,3 \times 10^{-7}$  M (Evan *et al.*, 1985; Hilpert *et al.*, 2001).

En un estudio sobre la predicción del LOD en la técnica ELISA, fue estimada la cantidad de antígeno que puede unirse al anticuerpo de captura y posteriormente detectada en un ensayo colorimétrico donde el sustrato es TMB (Zhang *et al.*, 2013). Estos autores tuvieron en cuenta el área de recubrimiento de una placa de ELISA, el radio hidrodinámico de una molécula de IgG y finalmente el modelo de adsorción de Langmuir (Langmuir, 1918). El modelo de Langmuir ha sido ampliamente usado para cuantificar la cantidad de moléculas adsorbidas a un sustrato sólido en función de la concentración de la molécula en solución. El modelo de Langmuir plantea la ecuación:

$$\theta = \theta_{\text{máx}} \times \frac{K \times C}{1 + K \times C}$$

dónde:  $\theta$ : número de sitios ocupados por el antígeno

$\theta_{\text{máx}}$ = número máximo de sitios de unión en la superficie del sustrato

K: constante de unión antígeno- anticuerpo

C: concentración de la solución muestra.

Atendiendo a esto, se evidencia que el número de sitios que serán ocupados por el antígeno dependen directamente de la constante de afinidad antígeno-anticuerpo. Si la constante de unión aumentara en dos órdenes de magnitud, el límite de detección disminuiría proporcionalmente (Zhang *et al.*, 2013).

Diversas estrategias han sido utilizadas para la creación de grupos  $\text{NH}_2$  en la superficie de las placas de poliestireno, para posteriormente unir el anticuerpo a estas a través de enlaces covalentes. Con este fin han sido utilizados enlazadores como el glutaraldehído, que enlaza dos grupos amino, y la carbodiimida, que enlaza un grupo amino con un carboxilo (Goddard and Hotchkiss, 2007; Dixit *et al.*, 2011). En este último caso, generalmente se combina el uso de la carbodiimida con la N-hidroxisuccinimida (NHS) ya que esta estabiliza el intermediario que se forma en la reacción y se une eficazmente a los grupos amino.

Las superficies activadas con 3-(aminopropil)-trióxosilano (APTES), las cuales tienen expuestos grupos amino libres, han sido ampliamente utilizadas para la inmovilización covalente de los anticuerpos a estas (Dixit *et al.*, 2011; Gunda *et al.*, 2014). Dixit *et al.* (2011) activaron una superficie con APTES y luego utilizaron la combinación carbodiimida/ NHS para la unión del anticuerpo a la superficie mediante una unión covalente a través de un enlace de tipo amida (véase Fig. 10). Este procedimiento aumentó la sensibilidad del ensayo ELISA para la detección de la fetuína A humana, unas 16 veces en comparación con la sensibilidad del kit comercial.

Por otro lado, Wang *et al.* (2019), utilizaron superficies activadas con APTES para la inmovilización de un antígeno de pequeño tamaño, el antígeno p24 del VIH. Debido a la dificultad que supone el trabajo con moléculas pequeñas, estos investigadores utilizaron como enlazador el glutaraldehído que, como se ha mencionado, presenta dos grupos aldehídos, cada uno en un extremo de la molécula. Por un extremo aldehídico, el reactivo se une a la superficie de la placa y por el otro, a grupos  $\text{NH}_2$  libres del antígeno. Con esta metodología, el límite de detección con respecto a la superficie estándar mejoró 30 veces.

En ambos casos la superficie aminada utilizada ha sido lograda a través de APTES. Sin embargo, Del Prado *et al.* (2012) obtuvieron superficies de poliestireno con una alta densidad de grupos amino mediante un proceso de clorosulfonación seguido por una sulfonamidación. Esta superficie fue probada exitosamente en un ensayo tipo ELISA de detección de IL6 humana, donde el reactivo utilizado para el enlace entre el anticuerpo y la superficie fue el

glutaraldehído, obteniéndose resultados satisfactorios en comparación con el ELISA realizado sobre una superficie estándar.

En nuestro caso hemos trabajado con superficies aminadas mediante clorosulfonación-sulfonamidación, las cuales tenían una alta densidad de grupos amino en superficie. Nuestra experiencia con superficies preparadas con APTES no fueron reproducibles y no aumentó el límite de detección del ELISA de referencia (resultados no mostrados).

Sin embargo, en nuestro sistema no utilizamos como enlazadores ni glutaraldehído ni carbodiimida para la unión del anticuerpo a la superficie, debido a que nuestro objetivo era que el anticuerpo no fuese modificado en el momento del ELISA, como ocurre cuando se utilizan estos dos reactivos. La unión previa del glutaraldehído o la carbodiimida con el anticuerpo no es posible, ya que podrían formarse uniones entre las moléculas de anticuerpo provocando la precipitación y la pérdida de actividad del mismo. La preparación previa del anticuerpo con el grupo reactivo de interés nos permite controlar si este ha sufrido desnaturalización, lo cual no puede ser evaluado en el momento del ensayo al usar glutaraldehído o carbodiimida. La evaluación de la actividad del anticuerpo modificado nos permite además disminuir la variabilidad inter ensayo aumentando de esta forma la reproducibilidad del mismo. De esta forma, el anticuerpo modificado puede ser almacenado hasta su utilización, de modo que estaría disponible cada vez que se fuera a repetir el ensayo, incluso sería posible su comercialización una vez modificado.

Atendiendo a esto, en nuestro trabajo hemos diseñado un sistema basado en una reacción de tipo química clic, donde por un lado tendríamos placas de ELISA con grupos tetracina en superficie mientras que, por otro, tendríamos los anticuerpos unidos a TCO, de forma que cuando estos dos interactúan, se crearía un enlace covalente entre ambos mediante una reacción de alta eficiencia y especificidad.

Durante las últimas décadas, han sido desarrolladas varias reacciones bioortogonales, incluidas la cicloadición [3 + 2] azida-alquino, la cicloadición 1,3-dipolar fotoclic y las reacciones de Diels-Alder por demanda inversa de electrones (IEDDA), las cuales han sido utilizadas para modificaciones de proteínas (Sletten and Bertozzi, 2009; Kang et al., 2017). Entre estas, destaca la reacción IEDDA de la tetracina con el trans-cicloocteno, que presenta la cinética de reacción más rápida (constante de velocidad de hasta  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), es altamente específica, no necesita catalizador y posee buena biocompatibilidad (Oliveira et al, 2017). Esta reacción ha sido aplicada para la preparación de conjugados de anticuerpos, principalmente mediante modificaciones usando la química del éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) para su uso posterior en imágenes de

células, funcionalización de nanopartículas, y terapia dirigida de anticuerpos (Rahim *et al.*, 2013; Oliveira, Guo and Bernardes, 2017). Es por ello que en nuestro trabajo seleccionamos esta reacción como base para un sistema que aumentara la sensibilidad de los ELISA.

Los anticuerpos de captura utilizados, el anticuerpo anti c-myc clon 9E10 y el anticuerpo anti CEA clon 3C1, fueron unidos al grupo TCO por los grupos amino libres del anticuerpo a través de N-hidroxisuccinimida. Se observó que a medida que aumentaba la cantidad del reactivo de modificación para la incorporación del grupo TCO, aumentaba el número de grupos TCO por anticuerpo, sin embargo, este perdía su actividad. La mejor condición fue cuando fue utilizada una relación en la reacción de modificación de 5 moles de reactivo: 1 mol de anticuerpo, obteniéndose finalmente 4 moléculas de TCO por anticuerpo. La modificación previa del anticuerpo permite un mayor control del anticuerpo modificado y la disponibilidad de este para repetidos ensayos.

Las superficies de las placas de ELISA fueron preparadas con tetracina usando para ello el reactivo NHS-tetracina el cual se une a los grupos amino de la superficie. Empleamos dos superficies aminadas, una superficie comercial Covalink la cual fue tratada con glutaraldehído y posteriormente con poli-lisina para aumentar el número de grupos amino en superficie, y una superficie aminada preparada mediante clorosulfonación- sulfonamidación.

La preparación de superficies aminadas mediante química en mojado, en este caso una clorosulfonación seguida de una sulfonamidación, tiene varias ventajas en comparación con los procedimientos descritos de preparación de sustratos a base de poliestireno (Reinecke *et al.*, 2010). En esta, inicialmente se crean grupos clorosulfonilos en las superficies mediante clorosulfonación y, posteriormente, se añade un compuesto bifuncional en el que uno de los grupos funcionales es una amina alifática primaria que sirve de anclaje a la superficie mediante un enlace covalente de una sulfonamida. El segundo grupo funcional queda disponible en la superficie modificada, en nuestro caso un grupo amino ya que se utiliza la etilendiamina. Este método permite obtener superficies homogéneas con un número controlable de grupos funcionales que es de entre uno y dos órdenes de magnitud mayor que el que se consigue convencionalmente por tratamientos con plasma o ultravioleta. Las superficies obtenidas tienen una calidad óptica excelente con un alto grado de transparencia y además se produce, selectivamente y reproduciblemente solo el grupo funcional preseleccionado (Reinecke *et al.*, 2010).

Por otro lado, con el objetivo de exponer los grupos tetracina en superficie, fueron recubiertas placas MaxiSorp con la proteína BSA conteniendo 20 moléculas de tetracina por cada molécula

de proteína. En la Tabla 13 se resume el LOD y el LOQ obtenidos en el ELISA de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h en las tres superficies preparadas en las cuales estaba expuesta la tetracina utilizando como anticuerpo de recubrimiento anti c-myc-TCO, así como los resultados obtenidos con la superficie estándar, donde fue utilizado el anticuerpo anti c-myc sin modificar (los datos representan el cómputo de todas las veces que se utilizó este control).

Observamos que en todas las superficies preparadas con tetracina hay una mejora en la sensibilidad del ELISA con respecto a la superficie estándar, siendo la superficie recubierta con BSA-tetracina donde se obtuvieron los mejores resultados mientras que, la superficie que parte de la placa Covalink generó los peores resultados. No obstante, la sensibilidad del ELISA tuvo un aumento de un orden de magnitud, 13,7 y 11 veces, tanto en las superficies preparadas con BSA-tetracina como en las superficies tratadas con tetracina luego de una aminación mediante la técnica de química en mojado. En estas últimas fue corroborada la técnica mediante el aumento de la sensibilidad del ELISA de detección de IL6-cmyc, donde el LOD mejoro 9 veces.

El proceso de preparación de las placas con BSA-tetracina es menos laborioso que las placas preparadas con tetracina luego de una aminación mediante química en mojado. Además, la proteína BSA-tetracina puede ser almacenada o incluso las superficies pueden estar previamente recubiertas con la proteína, de forma que, al igual que el anticuerpo marcado con TCO, la superficie estaría disponible cada vez que se fuera a utilizar y podría además ser comercializada.

Tabla 13. Resumen del LOD y LOQ obtenido en el ELISA de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h en las diferentes superficies preparadas, comparadas con la superficie estándar		
Superficies	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
MaxiSorp (Superficie estándar)	10,51	13,30
MaxiSorp + BSA-tetracina	0,77	1,01
Clorosulfonación/Sulfonamidación - Tetracina	0,96	1,34
Covalink/Glutaralaldehído/Poli-Lys-Tetracina	3,99	4,89

Por otro lado, las superficies preparadas con BSA-tetracina mostraron un aumento de la sensibilidad para la detección de CEA, donde el LOD fue mejorado 12 veces con respecto al ELISA desarrollado de la forma convencional. Estos resultados demuestran que el sistema utilizando la reacción tetracina –TCO en la superficie de las placas de ELISA para el anclaje del anticuerpo, mejora la sensibilidad del ensayo de forma significativa y podría convertirse en un método rutinario en los laboratorios de investigación debido a su escasa complejidad.

**III. DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS  
MEDIANTE TÉCNICAS  
INMUNOENZIMÁTICAS**

## CAPÍTULO 3

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos nucleicos han sido detectados mediante técnicas inmunoenzimáticas tras hibridación por complementariedad con la molécula diana, o posterior a una amplificación por PCR. Atendiendo a esta última, surgió la llamada técnica PCR-ELISA, donde los productos de PCR provenientes de la amplificación de un ADN o un ARN retrotranscrito, son detectados mediante un ensayo tipo ELISA y su detección está ligada a métodos colorimétricos, de fluorescencia o luminiscencia, siendo esta última la que permite un rango dinámico más amplio. Los ensayos tipo ELISA han sido utilizados eficientemente para la cuantificación de productos de PCR debido a que exhiben una alta especificidad y sensibilidad, permiten un amplio rango dinámico, no son radioactivos y pueden ser automatizados (Kochanowski *et al.*, 2003).

La detección de ácidos nucleicos mediante hibridación se ha utilizado para la detección de oligos de pequeño tamaño, como los miRNA. Lorenson *et al.* (2019) desarrollaron un método para la detección de oligos al que denominaron “Ensayo de Hibridación de Oligonucleótidos Ligados a Enzimas” (ELOHA). Este es un ensayo de competencia entre el oligo de detección, el cual está marcado con la enzima de revelado (HRP), y el oligo diana. Ambos oligos son capturados mediante hibridación con un oligo complementario de captura que se encuentra unido covalentemente a la superficie de ensayo. Otro método de hibridación que no requiere PCR previa y que está ligado a un ensayo inmunoenzimático, es el desarrollado por Kappel *et al.*, (2015), que detecta el híbrido formado entre un ADN/ARN a través de un anticuerpo específico.

Numerosos estudios confirman que los miRNA participan en la carcinogénesis humana y alteran la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores alterando, además, funciones celulares como la respuesta al estrés y la apoptosis (Hayes *et al.*, 2014). El crecimiento tumoral y la metástasis en varios tipos de cáncer pueden estar mediados por la regulación disfuncional de determinados miRNA (Srivastava and Srivastava, 2012). De este modo ha sido demostrado que la desregulación de la familia del miRNA-29, que incluye a miRNA-29a, b y c, está relacionado con el cáncer de pulmón (Yanaihara *et al.*, 2006), y de colon (Zhi *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Por otro lado, un metaanálisis de las diferentes investigaciones clínicas del miRNA-205, revelaron que este constituye un biomarcador de diagnóstico, pronóstico y recurrencia del cáncer de pulmón (Li *et al.*, 2017).

El objetivo de este capítulo es el estudio de la técnica que permite la detección simultánea de dos moléculas de distinta naturaleza involucradas en el diagnóstico del cáncer, un ácido nucleico y una proteína, mediante un ensayo inmunoenzimático. Inicialmente se desarrollará un método para la detección del miRNA mediante ELISA y posteriormente, será combinado con la detección de una proteína en un mismo pocillo. Para la detección del miRNA mediante un inmunoensayo se seguirán dos estrategias:

- 1) Detección del miRNA mediante un ensayo tipo sándwich. El miRNA es reconocido de forma específica por hibridación a través de dos oligos, uno fijado a la placa y el otro marcado con un hapteno para su posterior reconocimiento con un anticuerpo anti hapteno.
- 2) ELISA del producto de una PCR del miRNA realizada con dos cebadores marcados (uno con FITC y el otro con biotina). Debido al pequeño tamaño de los miRNA, la RT-PCR se realizará mediante el uso de un cebador tipo *stem-loop*, que permite el incremento del tamaño del miRNA y su detección específica.

Una vez establecido el método de detección del miRNA, se desarrollará un ELISA de dos spots en un mismo pocillo, uno para la detección de una proteína y el otro para la detección del miRNA. Además, se establecerán las bases para la detección de varios miRNA en un mismo ensayo.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

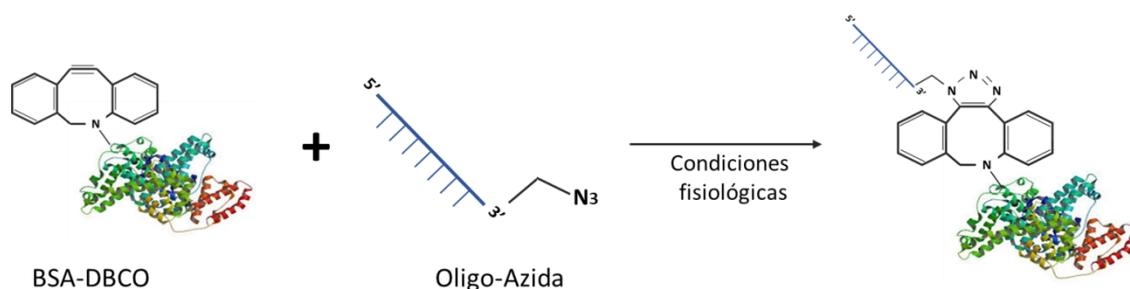
### 3.2.1. Unión de BSA con oligos a través de una reacción de tipo química clic

#### 3.2.1.1. Incorporación del grupo reactivo DBCO en la proteína albúmina de suero bovino

La proteína albúmina de suero bovino (BSA) fue modificada con el objetivo de incorporar varios grupos dibenzo-ciclooctino (DBCO) en la molécula. En la modificación fueron utilizados 5 mg totales de BSA, lo que se corresponde con  $7,7 \times 10^{-8}$  moles. El reactivo de acoplamiento, Dibenzylcyclooctyne-NHS ester (*Click Chemistry Tools, A134*), fue añadido con una relación molar de 30 veces, requiriéndose  $231 \times 10^{-8}$  moles de este. La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato de sodio 50 mM conteniendo 150 mM NaCl, a pH 7, e incubada durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción se detuvo añadiendo una solución de Tris-HCl 1 M, pH 8 para una concentración final de 100 mM. Para eliminar el exceso del reactivo, la mezcla de reacción se dializó contra 0,5 L de PBS usando una membrana de diálisis de MWCO de 12 kDa. La proteína fue cuantificada mediante Bradford usando una curva patrón de BSA, mientras que el grupo DBCO fue cuantificado mediante absorbancia a 350 nm. Finalmente se calculó el número de grupos DBCO por molécula de BSA usando la relación molar entre ambas moléculas.

#### 3.2.1.2. Unión de diferentes oligos con la proteína BSA-DBCO

La proteína BSA-DBCO (1:20) fue utilizada para obtener moléculas de BSA unidas a diferentes oligos, que fueron sintetizados con una molécula de azida en su extremo 3' (Fig. 46). Los oligos utilizados fueron pmir-205-5fw (3' Azido-GGAAGTAAGG 5') y pmir-29b-1fw (3' Azido-ATCGTGGTAAA 5'). En la reacción de acoplamiento, se utilizó 1 mg de BSA-DBCO para cada oligo en una relación molar de 2 moles de oligo por cada molécula de BSA-DBCO. Por tanto, fueron necesarios  $3 \times 10^{-8}$  moles de cada oligo. La mezcla fue incubada durante 4 h a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente cada mezcla fue dializada contra PBS pH 7,4 en Amicon de 10 kDa de MWCO para eliminar las moléculas no unidas a BSA.



**Figura 46.** Reacción entre un grupo dibenzo-ciclooctino con un grupo azida en condiciones fisiológicas. En nuestras reacciones el grupo DBCO está unido a la proteína BSA, mientras que el grupo azida está unido en el extremo 3' terminal a los diferentes oligos.

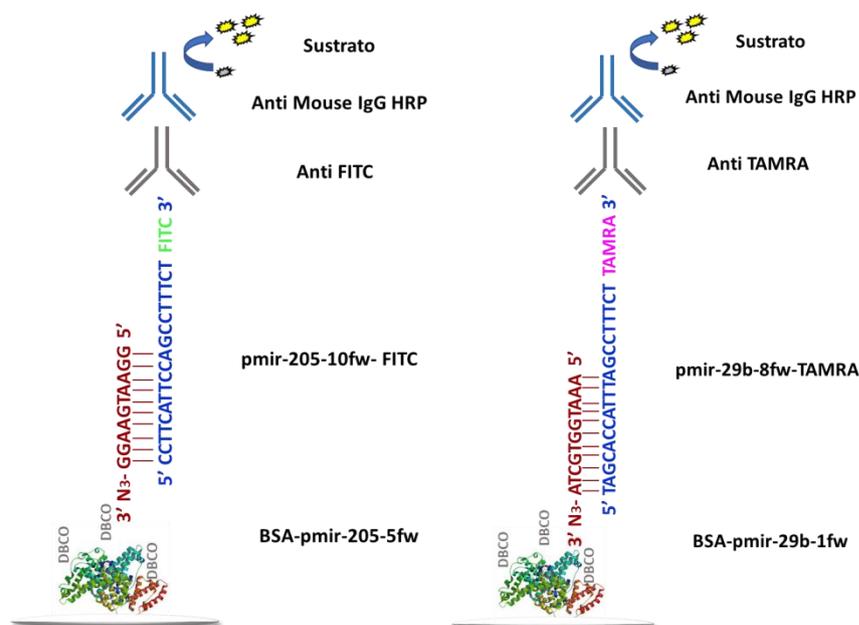
El proceso de acoplamiento fue seguido a través de la cuantificación de las moléculas mediante espectrofotometría a 260 nm y 280 nm. Para detectar el cambio de tamaño de las moléculas acopladas fue realizada una electroforesis en acrilamida al 10% que fue teñida con azul de Coomassie.

### 3.2.2. Detección de un oligo mediante la técnica ELISA

#### 3.2.2.1. Prueba de concepto de la detección a través de una reacción inmunoenzimática de la hibridación *in situ* de dos oligos complementarios

Esta prueba de concepto se efectuó con dos parejas diferentes de oligos, la pmir-205-5fw con pmir-205-10fw-FITC y la pareja pmir-29b-1fw con pmir-29b-8fw-TAMRA a través de ensayos inmunoenzimáticos.

Para la detección de la unión de pmir-205-5fw con pmir205-10fw-FITC, se realizó un spot de 0,2  $\mu$ L a una concentración de 20  $\mu$ g/ml en la superficie de una placa negra de fondo óptico (*Greiner Bio-One, 655097*) con la proteína BSA-pmir-205-5fw, diluida en tampón 0,1M de NaHCO<sub>3</sub> pH 9, e incubada durante 1 h a temperatura ambiente (Fig. 47). Posteriormente, la placa fue lavada usando PBS-Tween-20 0,05% y la superficie fue bloqueada durante 30 minutos usando PBS-BSA 1%. Posteriormente se añadió el oligo marcado con FITC-pmir-205-10fw-FITC (5' TAGCACCATTTAGCCTTTCT-FITC 3') en el rango de concentraciones de 0,5 a 10.000 attomoles/ $\mu$ l diluido en PBS más 100 mM LiCl y la reacción fue incubada durante 1 h a 37 °C. Tras 3 lavados consecutivos, fue añadido el anticuerpo anti FITC clon 4-4-20 a 0,5  $\mu$ g/ml e incubado 1 h a 37 °C. El revelado se llevó a cabo usando el anticuerpo anti mouse HRP (*Sigma-Aldrich, A2554*), incubado durante 1 h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Tras 5 lavados se añadieron 50  $\mu$ l por pocillo del sustrato de quimioluminiscencia de la peroxidasa (*ThermoFisher, 37075*). La lectura fue realizada usando el equipo Q-View (*Quansys Biosciences*).



**Figura 47.** Representación esquemática de la unión mediante complementariedad entre dos oligos en un ensayo tipo ELISA. El oligo de captura está unido a BSA, que se une a la superficie mediante adsorción pasiva. **Izquierda:** Unión entre los oligos pmir-205-5fw y pmir-205-10fw-FITC y detección con el anticuerpo anti FITC. **Derecha:** Unión entre los oligos pmir-29b-1fw y pmir-29b-8fw-TAMRA y detección con el anticuerpo anti TAMRA.

La detección de la unión de pmir-29b-1fw con pmir-29b-8fw se efectuó de manera similar a la anterior, usando las especificaciones para esta pareja (Fig. 47). El recubrimiento fue realizado con un spot de 0,2  $\mu$ L a 20  $\mu$ g/ml de la proteína BSA-pmir-29b-1fw. El oligo muestra pmir-29b-8fw (5' TAGCACCATTAGCCTTTCT-TAMRA 3') fue añadido en el rango de concentraciones de 0,5 a 10.000 attomoles/ $\mu$ l. Posteriormente se utilizó el anticuerpo anti TAMRA clon 5G5 (*Abcam*, *ab171120*) a 250 ng/ml. Los pasos restantes fueron idénticos al ensayo anterior.

### 3.2.2.2. Optimización del tampón utilizado en el paso de hibridación de los oligos por complementariedad

Para determinar el tampón óptimo de unión por complementariedad de ambos oligos, se utilizó el ensayo de unión entre pmir-205-5fw con pmir-205-10fw-FITC (Fig. 47). Fueron ensayados tres tampones diferentes en los que la concentración del oligo pmir-205-10fw fue de 200 attomol/ $\mu$ l: a) PBS; b) PBS + 50 mM LiCl y c) PBS + 100 mM LiCl.

El resto de los pasos del ensayo se realizaron tal y como ha sido descrito previamente. El ensayo fue analizado usando un test de ANOVA.

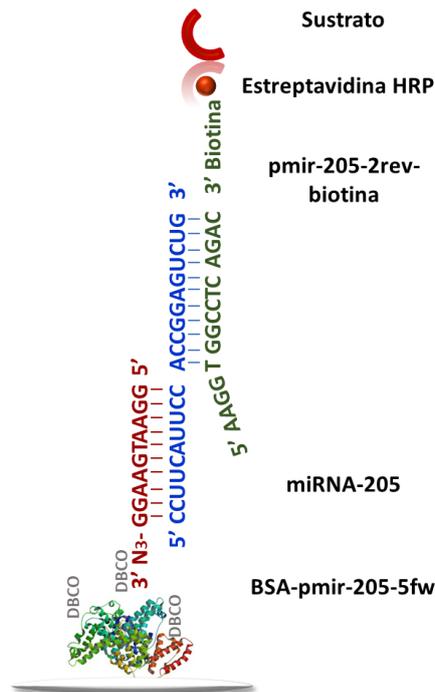
### **3.2.2.3. Ensayo 2 PLEX de detección de la hibridación entre dos oligos. Bases para el multiplexado**

Se llevó a cabo una prueba de multiplexado usando las mismas parejas de oligos que las descritas en el apartado 3.2.2.1. En el recubrimiento se efectuó, en el mismo pocillo, un spot de 0,2  $\mu$ l de BSA-pmir-205-5fw y un spot de BSA-pmir-29b-1fw, ambos a una concentración de 20  $\mu$ g/ml (Fig. 47). El ensayo fue realizado según lo descrito en el apartado 3.2.2.1, mezclando en cada paso los reactivos de cada una de las parejas y teniendo en cuenta la concentración final deseada en cada caso.

Paralelamente, fue realizado el ensayo de cada pareja de oligos por separado, en 1PLEX, para comparar la intensidad de píxeles obtenidas para 1PLEX y 2PLEX.

### **3.2.2.4. Detección del miRNA-205 a través de una técnica de hibridación *in situ* ligado a un ensayo inmunoenzimático**

La superficie de una placa negra de fondo óptico (*Greiner Bio-One, 655097*) fue recubierta con un spot de 0,2  $\mu$ l de la proteína BSA-pmir-205-5fw a 20  $\mu$ g/ml e incubada durante 1 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS-Tween-20 0,05%, los pocillos fueron bloqueados con una solución de PBS-BSA 1% e incubados durante 30 minutos a 37 °C. La muestra miRNA 205 fue añadida en el rango de concentraciones de 0,04 hasta 50 ng/ml diluida en PBS conteniendo 100 mM de LiCl e incubada durante 1 h a 37 °C. Después de 3 repeticiones de lavados, se añadió el oligo marcado con biotina pmir-205-2rev Biotina a 1 pmol/ $\mu$ L diluido en PBS-100 mM LiCl e incubado 1 h a 37 °C. De nuevo, tras 3 lavados con PBS-Tween-20 0,05% se procedió al revelado con estreptavidina-HRP (*ThermoFisher, 21310*). Posteriormente, los pocillos fueron lavados 5 veces y se añadieron 50  $\mu$ L del sustrato de quimioluminiscencia (*ThermoFisher, 37075*). La intensidad de la luz fue medida utilizando el equipo Q-View (*Quansys Biosciences*) (Fig. 48).



**Figura 48.** Representación esquemática de un ensayo tipo sándwich para la detección del miRNA pmir-205 haciendo uso de dos oligos complementarios, uno de captura y uno de detección marcado con biotina en su extremo amino terminal.

### 3.2.3. Detección de un miRNA a través de una PCR ligada a la técnica ELISA

#### 3.2.3.1. Amplificación del miRNA-29b mediante PCR con cebadores marcados

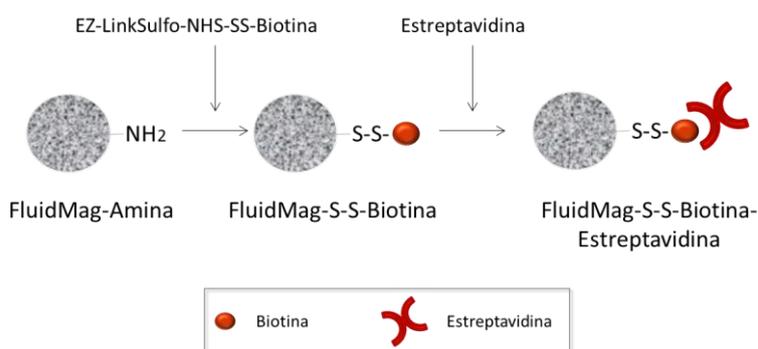
Para la retrotranscripción se utilizaron 12 fg del miRNA-29b, correspondientes a  $10^6$  moléculas (MW miRNA-29b = 7.292 g/mol), el pStem-loop-mir-29b (5' GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGGCCAACAACTG 3') y la retrotranscriptasa (*Revertaid H Minus reverse transcriptase*, ThermoFisher, EPO452) siguiendo el protocolo descrito para la enzima. Con el miRNA-29b retrotranscrito se efectuó una PCR a tiempo final usando los cebadores marcados pmir-29b-4fw-FITC (5' FITC-GGGTAGCACCATTGAAATC 3') y pmir-29b-5rev-Biotina (5' Biotina-GAATACCTCGGA CCCTGCACC 3'). El programa de PCR utilizado consta de un paso de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C; 25 ciclos que incluyen una desnaturalización de 30 segundos a 94 °C, un anillamiento a 50 °C de 30 segundos y una extensión de 3 segundos a 72 °C; y un paso de elongación final de 3 minutos a 72 °C. Considerando que la retrotranscripción tuviese un 100% de eficiencia, tendríamos  $10^6$  moléculas del miRNA-29b en 20 µL totales de la reacción. Usando diferentes cantidades de molde del miRNA-29b proveniente de la retrotranscripción, se confeccionó una curva que incluyó el rango de 976 a 62.500 moléculas, haciendo para ello diluciones seriadas dobles de la muestra de ADN complementario.

### 3.2.3.2. Eliminación del exceso del cebador marcado con hapteno usando partículas magnéticas de estreptavidina

#### 3.2.3.2.1. Preparación de las partículas magnéticas de estreptavidina

Se prepararon partículas de 200 nm con estreptavidina que tuviesen un enlace disulfuro entre la estreptavidina y la partícula magnética (Fig. 49). Para ello fueron utilizadas las partículas magnéticas FluidMag-Amine (*Chemice*ll) y el reactivo de biotilación EZ-LinkSulfo-NHS-SS-Biotin (*ThermoFisher*, 21328). En primer lugar, las partículas fueron lavadas y equilibradas con el tampón de acoplamiento 100 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl pH 7,2. y fueron realizados tres acoplamientos para 1 mg totales de partículas resuspendidas en 200 µl del tampón, variando la cantidad del reactivo de biotilación. Para fijar la cantidad del reactivo por reacción se tuvo en cuenta la cantidad de proteína (estreptavidina) con la que serían marcadas las partículas. Para 1 mg de partículas queríamos 250 µg de estreptavidina, lo que se corresponde con  $4.5 \times 10^{-9}$  mol de estreptavidina (MW estreptavidina= 55.000 g/mol). Se consideraron tres relaciones molares del reactivo con respecto a la estreptavidina: 1:1, 1:10 y 1:100. Teniendo en cuenta la MW del reactivo, fueron necesarios 2,7; 27 y 270 µg del reactivo para 1 mg de partículas en cada reacción. Las reacciones fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave.

Una vez lavadas las partículas 5 veces con 0,5 mL de tampón de acoplamiento, se comprobó la biotilación de las partículas usando 2 µg totales de partículas con 100 µl de 100 ng/ml de estreptavidina HRP. Tras el lavado extensivo de las partículas con el mismo tampón, fue añadido a la reacción el sustrato de la peroxidasa TMB. La reacción fue detenida con 100 µl por reacción de 1M de HCl. La absorbancia se determinó a 450nm usando el lector de placas FLUOstar OPTIMA (*BMG Labtech*).



**Figura 49.** Esquema de unión de las partículas FluidMag aminadas a la estreptavidina. Primeramente, las partículas fueron biotiladas a través de la N-hidroxisuccinimida, dejando este reactivo un enlace disulfuro entre la partícula y la biotina y, posteriormente, fue añadida la estreptavidina la cual se une a la biotina con una alta avidéz.

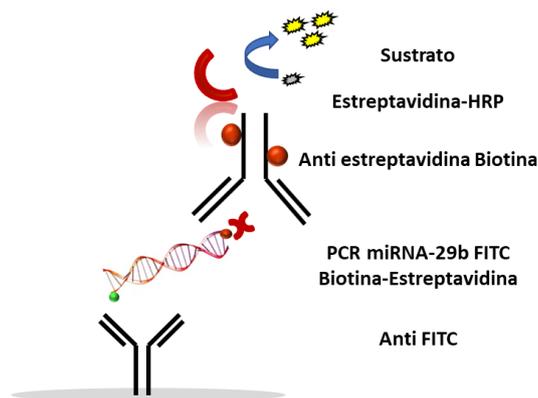
Para la unión de la estreptavidina se utilizó 1 mg de partículas marcadas con 270 µg del reactivo de biotilación, todo ello para acoplar 250 µg de estreptavidina (*GenScript, Z02043*). Tras incubar la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente y agitación, las partículas fueron lavadas 3 veces con el tampón de acoplamiento para eliminar el exceso de estreptavidina no unida.

#### **3.2.3.2.2. Eliminación del cebador marcado con el hapteno**

Señadieron 20 µg de partículas magnéticas FluidMag-S-S-Biotina-Estreptavidina por cada 20 µl de reacción de PCR del miRNA marcado con biotina y un hapteno (Apartado 3.2.3.1). El volumen fue ajustado a 150 µL usando el tampón de reacción 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,2. Tras incubar la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente, las partículas fueron lavadas con 200 µL del mismo buffer. La unión PCR-biotina-Estreptavidina fue separada de las partículas utilizando 100 µL del tampón de reacción conteniendo 30 mM de DTT e incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron diluidas 5 veces y cuantificadas mediante ELISA.

#### **4.2.3.3. ELISA de cuantificación del miRNA amplificado por PCR**

La superficie de una placa negra de fondo óptico (*Greiner Bio-One, 655097*) fue recubierta con un spot por pocillo de 0,2 µl a 20 µg/ml del anticuerpo anti FITC diluido en tampón 0,1M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6, e incubada durante 1 h a temperatura ambiente (Fig. 50). Después de tres lavados con PBS-Tween-20 0,05% los pocillos fueron bloqueados durante 30 minutos a 37 °C con PBS-BSA 1%. Las muestras de PCR marcada provenientes de la elución de las partículas FluidMag-S-S-Biotina-Estreptavidina (Apartado 4.2.3.2.2) fueron añadidas e incubadas durante 1 h a 37 °C. Luego de 3 lavados fue añadido el anticuerpo anti estreptavidina- biotina (*Abcam, ab7241*) a 100 ng/ml Pasada 1 h de incubación a 37 °C la placa fue lavada y se añadió la estreptavidina-HRP, que fue incubada a temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 minutos. Posteriormente, los pocillos son lavados 5 veces y se añadieron 50 µl del sustrato de quimioluminiscencia (*ThermoFisher, 37075*). La intensidad de la luz fue medida utilizando el equipo Q-View.



**Figura 50.** Esquema del ensayo PCR-ELISA para la de detección del miRNA-29b realizado mediante spots en placas de ELISA. El miRNA amplificado por PCR fue detectado usando un sándwich entre el anticuerpo anti FITC y el anticuerpo anti estreptavidina.

### 3.2.4. ELISA de 2 plex para detectar moléculas de distinta naturaleza en el mismo ensayo

#### 3.2.4.1. ELISA de detección de CEA y miRNA-29b

El ELISA de dos plex para la detección simultánea de CEA y miRNA-29b, fue realizado en pocillos de placas negras con fondo transparente, cada pocillo conteniendo un spot con el anticuerpo anti-CEA y otro spot con el anti-FITC. El ELISA de detección de la PCR del miRNA-29b fue realizado tal y como se describe en el Apartado 3.2.3.3. Para el ELISA de CEA el spot de 0,2  $\mu$ l se realizó con el anticuerpo anti CEA clon 3C1 a 20  $\mu$ g/ml diluido en tampón a 0,1M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  pH 9,6. Después de 1 h de incubación, las placas se lavaron 3 veces con 0,2 ml por pocillo de PBS-Tween-20 0,05% y bloqueadas posteriormente con una solución de PBS-BSA 1%. La proteína CEA diluida en una solución de PBS pH 7,4 conteniendo 0,5% de BSA, fue añadida en el rango de concentraciones de 3,12-200 ng/ml e incubada a 37  $^\circ\text{C}$  durante 1 h. El anticuerpo biotilado anti CEA clon 3C6 a 0,5  $\mu$ g/ml fue añadido como anticuerpo de detección después de los lavados e incubado durante 1 h a 37  $^\circ\text{C}$ . La estreptavidina-HRP (*ThermoFisher*, 21130) fue añadida a 100 ng/ml e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Los pocillos fueron lavados 5 veces y, posteriormente, se añadieron 50  $\mu$ L del sustrato de quimioluminiscencia (*ThermoFisher*, 37075).

La intensidad de píxeles de la luz, como medida de la concentración de las moléculas, fue determinada utilizando el equipo Q-View (*Quansys Biosciences*).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Unión de BSA con oligos a través de una reacción de tipo química clic

##### 3.3.1.1. Incorporación del grupo reactivo DBCO en la proteína BSA

La concentración de la proteína BSA-DBCO mediante Bradford y usando una curva de BSA, fue de 7 mg/ml lo que se corresponde con  $0,1 \times 10^{-3}$  M considerando que la MW de BSA es 66.433 g/mol. La absorbancia a 350 nm fue de 24,31 y teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar del reactivo es  $12.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , la concentración molar de este fue de  $2 \times 10^{-3}$  M. Por tanto, la relación molar entre ambas concentraciones indicó la existencia de 20 grupos reactivos DBCO por molécula de BSA. Esta proteína modificada fue utilizada para la unión de oligos que llevan el grupo reactivo azido.

##### 3.3.1.2. Unión de diferentes oligonucleótidos con la proteína BSA-DBCO

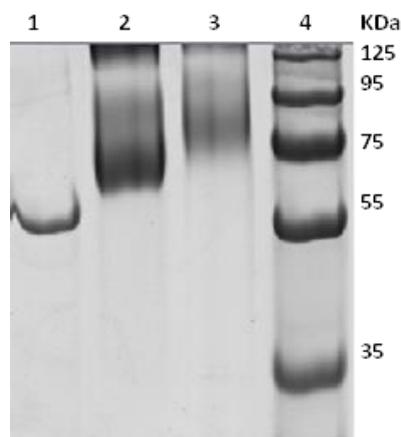
La unión de BSA-DBCO con los oligonucleótidos pmir-205-5fw y pmir-29b-1fw fue cuantificada en espectrofotómetro a longitudes de onda de 260 y 280 nm: a 260 nm fueron cuantificados los oligonucleótidos mientras que, a 280 nm, la proteína BSA. Sin embargo, al estar tan cerca ambas longitudes de ondas, hay una superposición del valor de absorbancia de ambas moléculas en ambas lecturas, por lo que es necesario tener en cuenta la relación entre las absorbancias para determinar qué tipo de molécula prevalece sobre la otra. En la Tabla 14 se muestran los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm obtenidos para cada muestra, así como la relación de absorbancia 260 nm/ 280 nm para cada caso. La relación 260 nm/280 nm para la proteína BSA-DBCO fue de 0,9 mientras que, en el caso de los oligos, este valor fue cercano a 2. Después del acoplamiento de BSA-DBCO con cada oligo, observamos que la relación aumenta con respecto a la de la proteína sin el oligo, por lo que se puede inferir que estos están unidos a la molécula de BSA.

**Tabla 14. Cuantificación de BSA-DBCO, de los oligos pmir-205-5fw y pmir-29b-1fw y BSA unido a cada uno de los oligos mediante absorbancia a 260nm y 280nm.**

MUESTRA	260 nm	280 nm	260 nm/ 280nm
<b>BSA-DBCO</b>	18,96	20,30	0,931
<b>pmir-205-5fw-Azido</b>	12,75	6,72	1,897
<b>pmir-29b-1fw-Azido</b>	10,95	5,76	1,901
<b>BSA-pmir-205-5fw-Azido</b>	12,24	9,79	1,250
<b>BSA-pmir-29b-1fw-Azido</b>	24,46	20,76	1,178

En la electroforesis es evidente el cambio de peso molecular de la proteína BSA según esté acoplada o no acoplada a los diferentes oligos (Fig. 51). En los acoplamientos BSA-oligos no se observa una banda única de la Proteína-Oligo, sino una mancha en un rango de pesos

moleculares más altos que la proteína BSA, lo que sugiere que la proteína está unida a los oligos pero no hay homogeneidad en el producto obtenido, presumiblemente debido a la existencia de diferentes grados de acoplamiento.



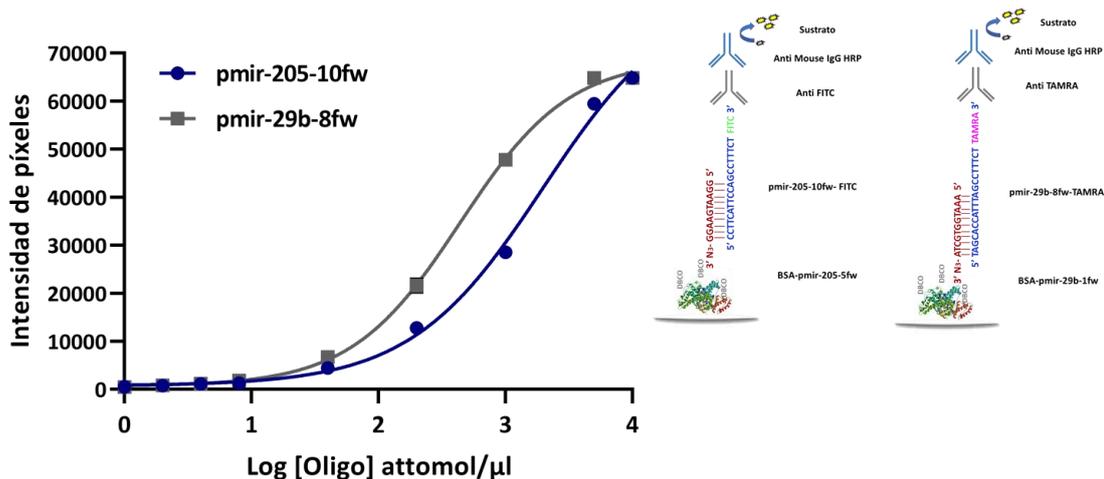
**Figura 51.** Análisis de la proteína BSA unida a diferentes oligos. Carril 1: 2  $\mu$ g BSA; Carril 2: 3  $\mu$ g BSA-pmir-205-5fw; Carril 3: 3  $\mu$ g BSA-pmir-29b-1fw; Carril 4: Patrón de peso molecular (*ThermoFisher*, 26619).

### 3.3.2. Detección de la hibridación entre dos oligos mediante la técnica ELISA

#### 3.3.2.1. Prueba de concepto para la detección de la hibridación entre dos oligos usando la técnica ELISA

La complementariedad entre dos oligos fue detectada a través de una reacción inmunoenzimática utilizando para ello oligonucleótidos marcados con haptenos. Los haptenos utilizados fueron isotiocianato de fluoresceína (FITC), que fue detectado con el anticuerpo anti FITC 4-4-20, y tetrametil-rodamina (TAMRA), que fue detectado con el anticuerpo anti TAMRA.

El ensayo de detección de la hibridación entre dos oligos *in situ* fue realizado con dos parejas de oligos diferentes: la pareja pmir-205-5fw y pmir-205-10fw-FITC, que tenían 10 nucleótidos complementarios y la pareja pmir-29b-1fw y pmir-29b-8fw-TAMRA, con 11 nucleótidos complementarios. En el caso de la primera pareja, la detección fue realizada usando el anticuerpo anti FITC mientras que la otra fue realizada con el anticuerpo anti TAMRA. Como se observa en la curva sigmoideal 4PL obtenida para ambos casos, la detección de la hibridación es posible a través de una reacción inmunoenzimática (Fig. 52), siendo la unión de los oligos pmir-29b-1fw y pmir-29b-8fw-TAMRA ligeramente más sensible que la de pmir-205-5fw y pmir-205-10fw-FITC.



**Figura 52.** Detección de la unión entre oligos a través de un ensayo inmunoenzimático. Curva sigmoideal 4PL de la unión entre el oligo pmir-205-5fw y el oligo pmir-205-10fw (azul) y entre el oligo pmir-29b-1fw y el oligo pmir-29b-8fw (gris). La detección fue realizada con el anticuerpo anti FITC y anti TAMRA, respectivamente. Todas las concentraciones del oligo detectado fueron realizadas por triplicado y muestran su desviación estándar en la curva.

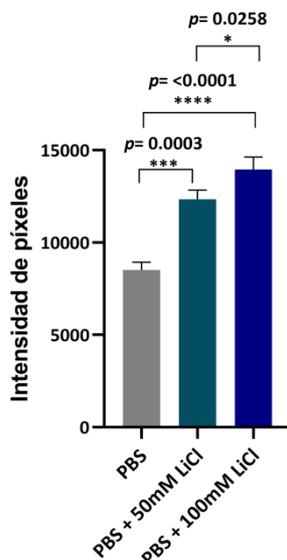
En la Tabla 15 quedan recogidos los valores de EC50 y R<sup>2</sup> obtenidos para cada curva sigmoideal y el resultado del cálculo del límite de detección para ambos casos. Como se observa, los valores de absorbancia se ajustan a una curva sigmoideal, ya que el R<sup>2</sup> en ambos casos está muy cercano a 1. Atendiendo a la EC50 y al LOD, se demuestra que la detección de pmir-29b-8fw es más sensible que la detección de pmir-205-10fw, aunque en ambos casos está en el orden de attomol/μl. La diferencia de sensibilidad puede ser atribuida a que el oligo pmir-29b-8fw compartía un nucleótido complementario más con su oligo de captura que el pmir-205-10fw.

Tabla 15. Análisis de los resultados obtenidos de la detección de oligos mediante ELISA.		
	pmir-205-10fw-FITC	pmir-29b-8fw-TAMRA
EC50	1.980,0	440,3
R <sup>2</sup>	0,9974	0,9994
LOD (attomol/μl)	2,72	1,04

### 3.3.2.2. Optimización del tampón utilizado en el paso de hibridación de los oligonucleótidos por complementariedad

Se comparó la complementación entre el oligo pmir-205-5fw y pmir-205-10fw con diferentes concentraciones de LiCl en PBS como tampón de dilución del oligo marcado. Como se observa en la Fig. 53, es necesaria la presencia del LiCl en el paso de complementación entre los oligos, ya que hay diferencias significativas entre la reacción realizada en PBS y en la que se incluye 100 mM LiCl ( $p < 0,0001$ ) o 50 mM LiCl ( $p = 0,0003$ ). En relación con la comparación entre las concentraciones 100 mM y 50 mM de LiCl, observamos que las diferencias entre ambos son menores ( $p = 0,0258$ ). El tampón PBS suplementado con 100 mM de LiCl, como tampón para el

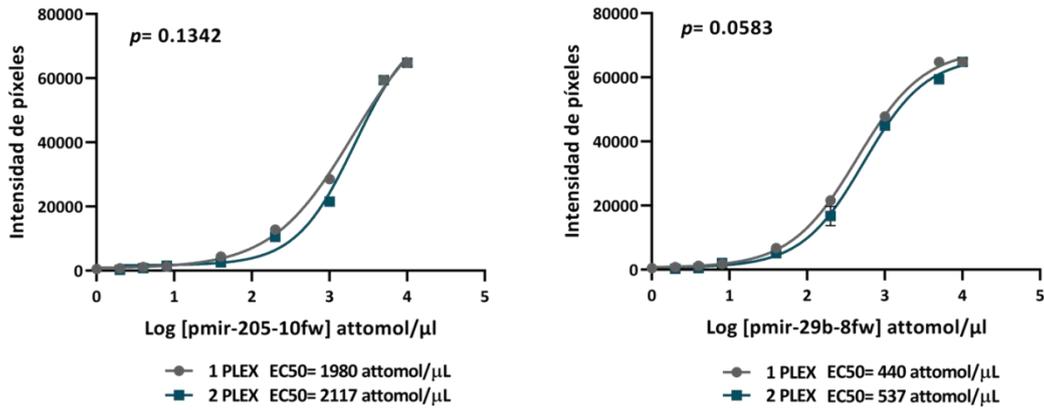
paso de unión por complementariedad de ambos oligos, fue seleccionado por permitir una mayor intensidad de los píxeles a leer.



**Figura 53.** Comparación de las señales obtenidas en el ensayo tipo ELISA basado en la complementariedad entre dos oligos usando diferentes concentraciones de LiCl. El oligo pmir-205-10fw-FITC fue utilizado a 200 attomol/  $\mu$ L. Cada muestra fue realizada por triplicado, representándose la desviación estándar de cada muestra.

### 3.3.2.3. Ensayo 2 PLEX de detección de la hibridación entre dos oligos. Bases para el multiplexado

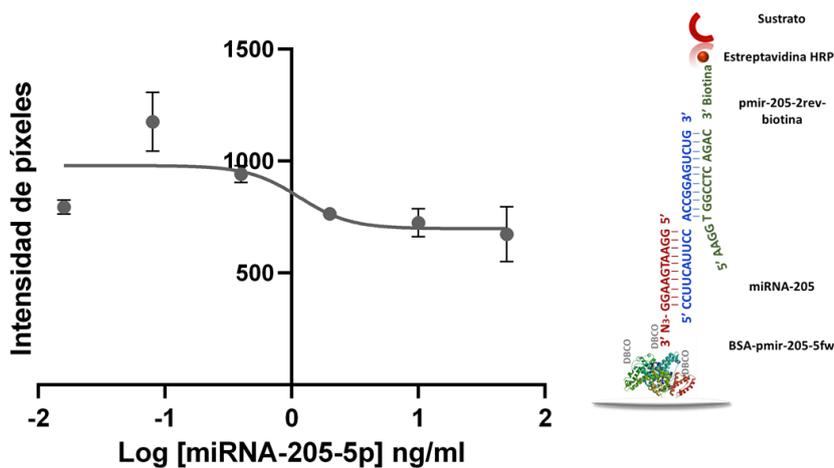
El ensayo realizado en 2 PLEX tenía como objetivo determinar posibles reacciones cruzadas entre ambos oligos que provocaran la disminución de la intensidad de píxeles comparada con la obtenida cuando la muestra se lleva a cabo en 1PLEX, además de detectar la posible reacción cruzada de los anticuerpos anti FITC y anti TAMRA utilizados en la reacción. Para ello, el ensayo realizado de forma paralela para cada una de las parejas en pocillos independientes (1PLEX) se comparó con el simultáneo de ambos oligos en el mismo pocillo, estando presentes ambos en la misma reacción (2 PLEX). Las curvas obtenidas del logaritmo de la concentración del oligo marcado contra la respuesta (intensidad de píxeles) para 1 PLEX y 2 PLEX se compararon utilizando un test t de student en parejas (Fig. 54). Como se observa, no hubo una diferencia significativa entre la curva realizada para 1 PLEX y la realizada en el pocillo 2 PLEX para cada una de las parejas de oligos. La EC50 de pmir-205-5fw y pmir-205-10fw en 1 y 2 PLEX fue de 1.980 y 2.117 attomol/ $\mu$ L, respectivamente, mientras que el valor de  $p$  fue de 0,1342. En el caso de pmir-29b-1fw y pmir-29b-8fw, la EC50 fue de 440 y 537 attomol/ $\mu$ L y el valor de  $p$  fue de 0,0583, demostrando que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos en el ensayo desarrollado en 1 PLEX y en 2PLEX.



**Figura 54.** Curva sigmoideal 4PL comparativa obtenida en un ensayo de detección de la hibridación entre dos oligos a través de una reacción inmunoenzimática realizada en un ensayo de 1 o 2 PLEX. **Izquierda:** Curva de detección de la hibridación de pmir-205-5fw y pmir-205-10fw. **Derecha:** Curva de detección de la hibridación entre pmir-29b-1fw y pmir-29b-8fw.

### 3.3.2.4. Detección del miRNA-205 a través de una técnica de hibridación *in situ* ligado a un ensayo inmunoenzimático

El ensayo para la detección de un miRNA en un spot en pocillos de placa de ELISA, fue utilizado para la detección del miRNA-205. Para ello se realizó la hibridación del miRNA por su extremo 5' con un oligo fijado en la superficie, y por el extremo 3' con un oligo marcado con biotina. Se ensayaron varios rangos de concentraciones (resultados no mostrados) y en ninguno de ellos se obtuvieron resultados positivos. En la Fig. 55 se muestra un rango de concentraciones bastante alto, del orden de ng/ml del miRNA-205 con el cual, a pesar del aumento de concentración, no se observa un incremento exponencial de la señalización.

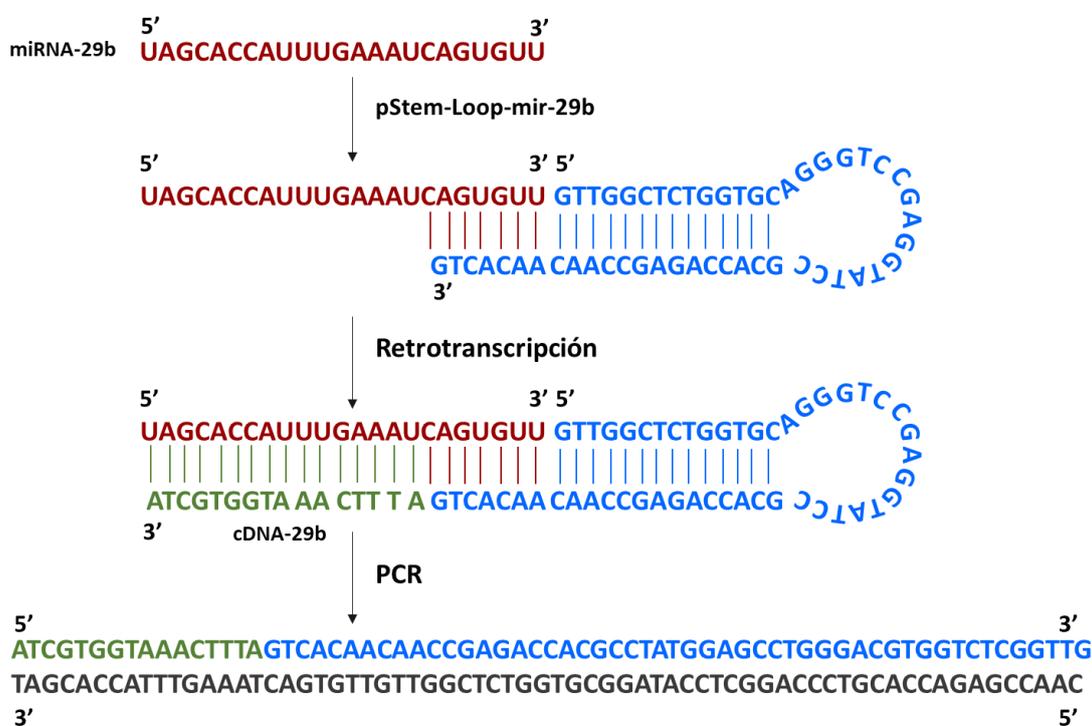


**Figura 55.** Ensayo de detección del miRNA-205 en spot realizado en placas de ELISA. Curva sigmoideal 4PL del logaritmo de la concentración del miRNA-205 contra la intensidad de píxeles.

### 3.3.3. Detección de miRNA a través de una PCR ligada a la técnica ELISA

#### 3.3.3.1. Amplificación del miRNA-29b mediante PCR con cebadores marcados

Los micro RNAs en general presentan una longitud de entre 18-25 nucleótidos, por lo que su amplificación mediante PCR es limitada. Ha sido descrito el empleo de un oligonucleótido *stem-loop* en la retrotranscripción como una mejora en la amplificación en cuanto a especificidad y eficiencia (Schmittgen *et al.*, 2008; Zöllner *et al.*, 2014). En nuestro trabajo se diseñó un *stem-loop* específico para el miRNA-29b que permitiera aumentar el tamaño del mismo en el paso de la retrotranscripción (Fig. 56). Se utilizó el stem-loop-mir-29b con una longitud de 51 bases, de las cuales 7 eran complementarias al miRNA-29b, y 14 bases complementarias sobre sí mismas formando un lazo.



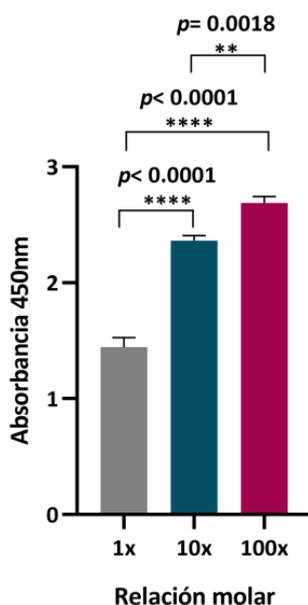
**Figura 56.** Representación de la secuencia de nucleótidos del miRNA-29b (rojo) unido al p-stemp-loop-mir-29b (azul). En el proceso de retrotranscripción se obtiene el cDNA del miRNA-29b (verde) y posteriormente se amplifica la secuencia mediante PCR.

#### 3.3.3.2. Eliminación del exceso de oligos usando partículas magnéticas de estreptavidina.

##### 3.3.3.2.1. Preparación de las partículas magnéticas de estreptavidina.

Las partículas FluidMag-amina fueron unidas a estreptavidina usando un reactivo de biotilación intermedio que permitiera la presencia de un enlace disulfuro entre la partícula y la estreptavidina. La presencia de este enlace fue introducida para permitir la separación de la estreptavidina de las partículas cuando fuese necesario (Fig. 49). La biotilación realizada con

diferentes relaciones molares del reactivo de biotilación con respecto a la estreptavidina, se determinó mediante un ensayo en solución usando 20 µg de las partículas de cada acoplamiento. El análisis mediante ANOVA de los diferentes acoplamientos muestra una diferencia muy significativa en el marcaje ( $p < 0,0001$ ) al emplear una relación molar de reactivo de biotilación: estreptavidina (1:1) con respecto a los acoplamientos con una relación molar 10: 1 y 100:1 (Fig. 57). La relación 1:1 fue descartada, ya que el marcaje es muy bajo. Las diferencias en el marcaje al usar mayor cantidad de estreptavidina son menores, aunque también significativas siendo la relación molar 1:100 la que ofreció los mejores resultados. Para el proceso de unión con la estreptavidina se emplearon partículas cuyo proceso de acoplamiento con la biotina tuvo un criterio de relación molar de 1:100.



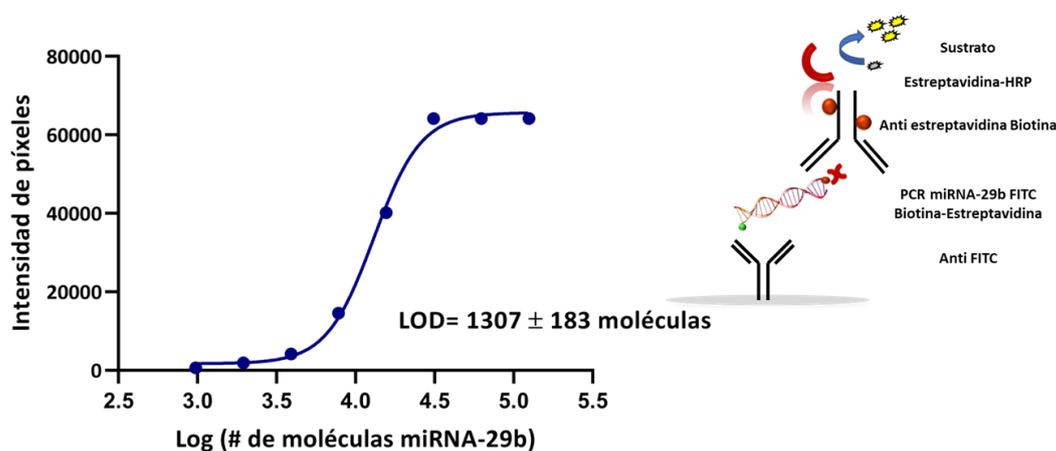
**Figura 57.** Gráfico de barras comparativo de la absorbancia obtenida a partir de la unión de 20 µg de partículas marcadas FluidMag-SS-biotina con estreptavidina peroxidasa. El gráfico muestra la comparación entre los diferentes acoplamientos de las partículas variando la relación molar entre el reactivo de biotilación y la estreptavidina.

### 3.3.3.3. ELISA de cuantificación del miRNA-29b amplificado por PCR.

El miRNA-29b fue amplificado mediante una PCR usando oligos marcados con FITC y biotina. Para eliminar el exceso de oligos, el producto de PCR fue purificado con partículas magnéticas previamente recubiertas con estreptavidina. Al añadir el producto de PCR, este quedó inicialmente unido a las partículas a través de la estreptavidina. Posteriormente, en el primer lavado de las partículas, se eliminó el exceso del cebador marcado con FITC el cual podría bloquear la señal del ELISA (datos no mostrados). Estas partículas, fueron tratadas con un

agente reductor para romper el enlace disulfuro entre la partícula y la biotina (Fig. 49), y de esta manera fue separado el complejo biotina-estreptavidina-PCR de la partícula magnética.

Terminado el proceso de aislamiento de la PCR, las moléculas amplificadas se quedan unidas a una molécula de estreptavidina, por lo que se diseñó un ELISA basado en la captura a través de FITC y la detección a través de la estreptavidina con un anticuerpo específico. Los resultados del ELISA mostraron una señal dosis-respuesta logarítmica, demostrando que la PCR iba marcada con FITC y que el proceso de aislamiento usando las partículas magnéticas de estreptavidina fue efectivo, ya que no hubo un bloqueo de la señal de luminiscencia del ELISA. Estos resultados, a su vez, mostraron que la PCR estaba unida a estreptavidina. El ensayo se repitió 5 veces obteniéndose un LOD de  $1.307 \pm 183$  moléculas, con un porcentaje del CV inter ensayo de 13,97% (Fig. 58).



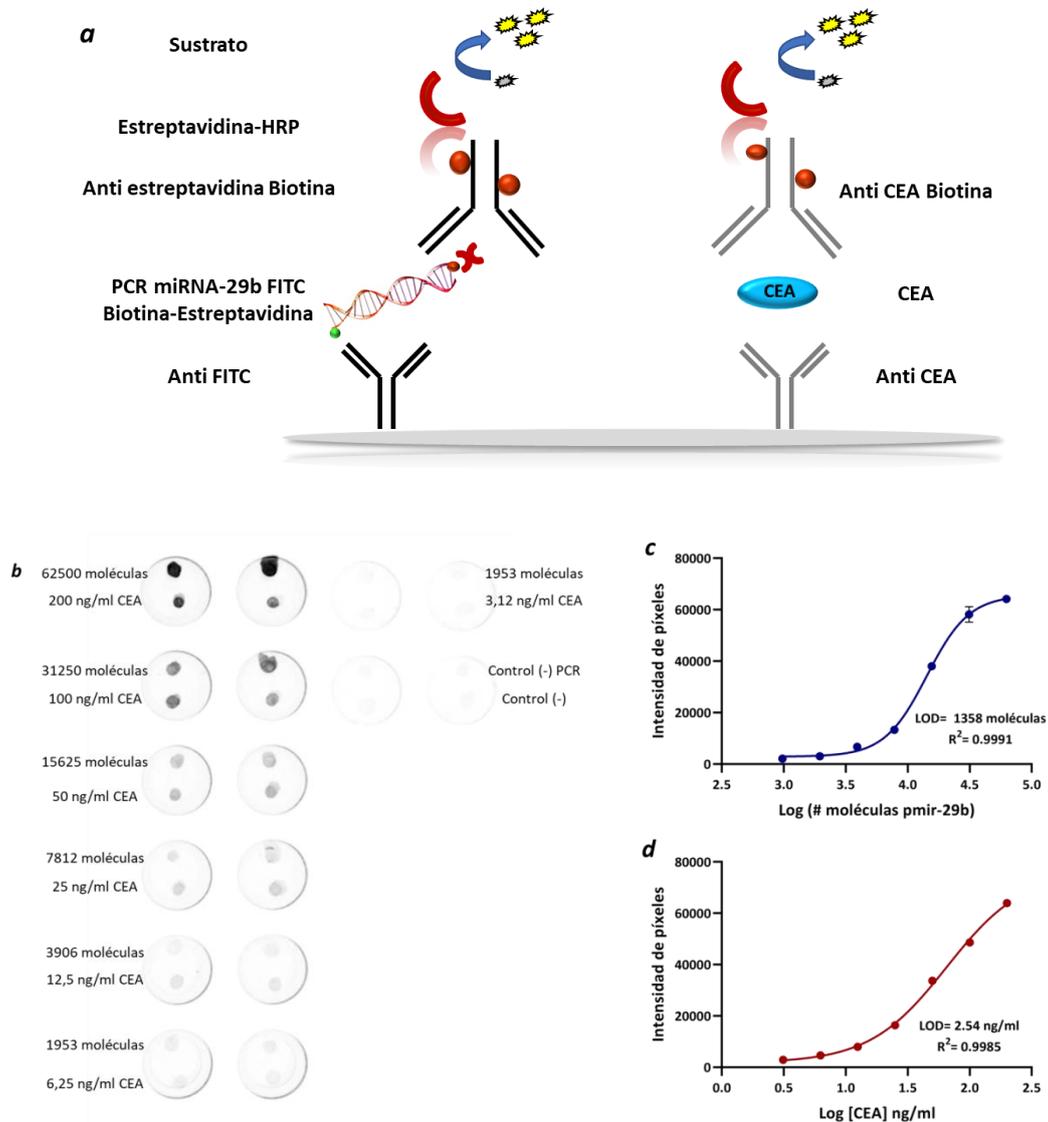
**Figura 58.** Curva sigmoideal 4PL del ELISA de detección de la PCR del miRNA-29b unida a FITC y estreptavidina. Se representa el LOD obtenido tras repetirse el ensayo 5 veces.

### 3.3.4. ELISA de 2 plex para detectar moléculas de distinta naturaleza en el mismo ensayo.

#### 3.3.4.1. ELISA de detección de CEA y miRNA-29b.

Como prototipo de la detección en un mismo ensayo de dos moléculas de diferente naturaleza, se desarrolló un ELISA 2 plex para la detección de miRNA-29b amplificado por PCR y de la proteína CEA. El ensayo fue implementado para la lectura de una señal quimioluminiscente de spots realizados en un pocillo de placa de ELISA. En la Fig. 59a se muestra el esquema que representa los pasos de ambos ELISAs realizados de forma simultánea en un mismo pocillo. La lectura de la señal se realiza mediante la medida de la intensidad de píxeles en cada spot a través de una foto tomada con el equipo Quansys (Fig. 59b). A medida que disminuye la concentración de CEA o el número de moléculas amplificadas del miRNA-29b, disminuye la intensidad de la luz. Los resultados obtenidos se analizaron mediante una curva sigmoideal 4PL

(Fig. 59c y 59d) y, posteriormente, se calculó el LOD para cada ELISA, siendo este de 1.358 moléculas en el caso del miRNA y de 2,54 ng/ml en el caso de la proteína CEA.



**Figura 59.** ELISA 2 plex para la detección de miRNA-29b y CEA en un mismo pocillo de placa de ELISA. **a.** Esquema de los pasos de ambos ELISAs realizados de forma simultánea. **b.** Foto invertida de los resultados del ensayo tomada por el equipo Quansys. Al lado de cada spot se muestra el número de moléculas estimado en el caso de miRNA-29b y la concentración final de CEA en el pocillo. **c.** Curva sigmoideal 4PL obtenida del número de moléculas estimado de pmir-29b contra la intensidad de píxeles obtenida en el ELISA. **d.** Curva sigmoideal 4PL obtenida de la concentración de CEA en ng/ml contra la intensidad de píxeles obtenida en el ELISA.

### 3.4. DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento en 1993, los miARN han mostrado un gran potencial diagnóstico al estar asociados con diversas enfermedades (Lee et al., 1993; Wang et al., 2016; Correia et al., 2017). Desde entonces, el número de publicaciones sobre el potencial diagnóstico de los miRNAs ha crecido casi exponencialmente, lo que ha impulsado al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico basadas en miRNA (Bonneau et al., 2019).

Muchos miRNA han sido reportados como biomarcadores de enfermedad para diferentes patologías, pero solo una pequeña fracción ha sido trasladada a su uso en la clínica (Bonneau et al., 2019). La variabilidad de los ensayos de PCR cuantitativa inter laboratorios y la consiguiente errónea interpretación de estos, han limitado el avance para el diagnóstico (Stejskal et al., 2019). La detección y cuantificación de los miRNAs continúa siendo un reto científico.

El primer ensayo basado en técnicas inmunoenzimáticas para detección de miRNAs fue desarrollado por Kappel et al. (2015). En este, el miRNA se hibrida con un DNA complementario biotinilado y el complejo de ambos es capturado por partículas recubiertas con estreptavidina. El revelado del ensayo se realiza usando un anticuerpo que reconoce de forma específica el híbrido DNA/miRNA (Kappel et al., 2015). La técnica fue comparada con la RT qPCR para la detección de los miRNA hsa-miR23a-3p y el hsa-miR-93-5p, obteniéndose menos variabilidad en los resultados mediante el ensayo inmunoenzimático que con RT-qPCR (Stejskal et al., 2019).

A diferencia de estos autores, en este trabajo hemos desarrollado una metodología basada en la hibridación por complementariedad para la detección de miRNAs que no implica el uso de anticuerpos contra híbridos DNA/miRNA, sino que la captura se basa en la complementariedad de nucleótidos con el analito, y la detección hace uso de anticuerpos contra haptenos. Como prueba de concepto se empleó la hibridación entre dos moléculas en una superficie sólida usando para ello como molécula diana, una secuencia de ADN de simple cadena marcada con un hapteno (FITC o TAMRA). Esta secuencia hibrida *in situ* con su secuencia complementaria, la cual ha sido fijada a la placa vía adsorción del complejo BSA-secuencia complementaria, preparada previamente mediante química clic. La detección de la hibridación entre las dos moléculas fue realizada a través de un anticuerpo específico anti hapteno. Como resultado se obtuvo un ensayo que permite cuantificar ácidos nucleicos de simple cadena con una sensibilidad en el orden de los attomoles/ $\mu$ l, que es la misma que la obtenida por Kappel et al., (2015).

El ensayo fue también evaluado en formato dos plex para la detección de dos analitos haciendo uso de dos canales de lectura. Los resultados obtenidos mostraron una alta especificidad, no observándose reacciones cruzadas entre ambas secuencias y la sensibilidad no se vio afectada.

Atendiendo a la EC50 y al LOD, se comprueba que la detección de pmir-29b-8fw es más sensible que la de pmir-205-10fw, aunque en ambos casos está en el orden de los attomol/ $\mu$ l. La diferencia de sensibilidad puede ser atribuida a las diferencias de afinidad entre los anticuerpos anti FITC y anti TAMRA o a que el oligo pmir-29b-8fw compartía un nucleótido complementario más con su oligo de captura que el pmir-205-10fw. No obstante, la constante de afinidad de anti FITC 4-4-20 es de las más altas descritas entre un anticuerpo y su antígeno ( $1.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) (Bates et al, 1985; Whitlow *et al.*, 1995) y el anticuerpo anti TAMRA clon 5G5 usado en este trabajo no tiene publicada una constante de afinidad. El desarrollo de un ensayo dos plex con dos canales de salida para cuantificar dos moléculas de ácido nucleico distintas es de gran interés y sería la base de la implementación de un sistema multiplex basado en hibridación en placa y ELISA.

Asimismo, el ensayo descrito podría ser adaptado, atendiendo a los valores de sensibilidad obtenidos, a un ensayo de competencia para la detección de ácidos nucleicos de simple cadena. En este ensayo la molécula diana sería complementaria a la secuencia de captura y competiría con una secuencia de simple cadena sintética marcada con un hapteno. El diseño de un ensayo basado en la competencia con una molécula marcada evitaría el marcaje del analito de interés, siendo la reducción de la señal proporcional al aumento de la concentración del analito.

El empleo de un sistema sándwich de hibridación no exigiría tampoco del marcaje por PCR del analito. Este incluiría dos pasos de hibridación *in situ*: una primera hibridación con el oligo de captura, y la segunda con el oligo de detección. En este trabajo fue evaluado un sistema sándwich de hibridación para la detección del miRNA-205, usando como oligo de captura el pmir-205-5fw y como oligo de detección el pmir-205-2rev-biotina. Los resultados obtenidos no permitieron la cuantificación de la molécula diana en el rango de los ng/ml. Esto pudo ser debido a las condiciones de hibridación, al tamaño de las secuencias y/o a impedimento estérico.

Rautio *et al.*, (2003) desarrollaron un sistema sándwich de hibridación utilizando partículas magnéticas en lugar de placas como soporte, logrando desarrollar un ensayo de cuantificación de RNA ribosomal con una sensibilidad en el orden de los fmoles, 1.000 veces inferior a la observada en el sistema no sándwich que hemos desarrollado y que implica un único paso de hibridación.

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones para la detección de moléculas de ácidos nucleicos diana con la técnica denominada PCR-ELISA, usando para ello el kit comercial PCR-ELISA-DIG (Roche Diagnostics Ltd) (Kurupati et al., 2005; Pumannova *et al.*, 2006). Este sistema amplifica la secuencia deseada con una mezcla de dNTPs que incluye dUTPs marcados con

digoxigenina. Tras la desnaturalización del producto de PCR se efectúa la hibridación de este con una sonda complementaria biotinilada. La superficie donde se desarrolla el ELISA, previamente recubierta con estreptavidina, captura la sonda biotinilada y la muestra es detectada a través de un anticuerpo anti digoxigenina (Kurupati et al., 2005). Dado que en este método no se emplean cebadores marcados para la captura, no es necesario un paso de purificación el producto de PCR para la eliminación de estos.

En el sistema PCR-ELISA desarrollado en este trabajo, los cebadores utilizados en la PCR están marcados, uno con biotina y el otro con FITC, y la captura de la muestra no es por hibridación sino mediante un anticuerpo que captura FITC. Por lo tanto, es necesario eliminar el cebador marcado con FITC ya que, de lo contrario, el exceso de este bloquearía el anticuerpo de captura y comprometería la sensibilidad del ELISA. Las partículas marcadas con estreptavidina obtenidas permitieron la separación eficiente de la diana amplificada marcada.

La sensibilidad del ELISA desarrollado permite la detección de  $10^3$  moléculas del miRNA-29b, para un LOD de 15,7 attogramos. El LOD fue menor que el descrito por Kurupati et al., (2005), que detectaron la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* de cultivos de sangre con una especificidad y sensibilidad del 100%, teniendo un LOD de 10 fg para una secuencia diana de 249 pares de bases (~3.700 moléculas). La diferencia de sensibilidad entre ambos ensayos puede ser debida a múltiples factores: el tamaño de la molécula diana, la eficiencia de la amplificación, la proteína de captura del producto de PCR o, el sustrato utilizado, entre otros. En nuestro caso la eficiencia de amplificación del miRNA-29b usando los cebadores indicados fue de un 95% (resultados no mostrados).

Dada la sensibilidad de nuestro ensayo, se considera que el método puede ser utilizado para la detección de cualquier miRNA de forma específica. Consideramos que este sistema pudiera hacerse multiplex para la detección de varios miRNAs de una misma muestra tan solo cambiando el cebador que lleva el hapteno, el cual es específico para el miRNA. El cebador biotinilado, en nuestro caso, puede ser común debido a que se une a la secuencia adicional del *stem-loop* que no es necesario variar entre diferentes miRNA y favorece la detección con estreptavidina-HRP.

En un estudio comparativo entre la detección de un ácido nucleico mediante PCR a tiempo real o mediante PCR-ELISA, para la detección de una secuencia de 159 pares de bases de citomegalovirus (CMV), los autores demostraron que ambos métodos tienen la misma especificidad y poseen la sensibilidad necesaria para detectar el ADN de CMV. Sin embargo, la

PCR cuantitativa tiene mayor reproducibilidad y un rango dinámico de detección del ADN más amplio (Pumannova *et al.*, 2006).

Las técnicas basadas en inmunonensayos para la detección de ácidos nucleicos constituyen un método alternativo a la PCR a tiempo real. Aunque la sensibilidad de la técnica es relativamente menor que la qPCR para cuantificar ácidos nucleicos, tiene como ventaja la capacidad de poder añadir la cuantificación de proteínas en el mismo ensayo. Además, la instrumentación requerida es mucho menos costosa que la necesaria para qPCR.

La proteína CEA fue la seleccionada para el diseño de un prototipo de ensayo inmunoenzimático de detección de dos moléculas de distinta naturaleza. En el capítulo 2 se incluyó un ELISA de detección de CEA en el que para el revelado se utilizó un sustrato colorimétrico, mientras que en los ensayos incluidos en este capítulo hemos usado un sustrato luminiscente. En ambos casos se utilizó la misma pareja de anticuerpos, y el ELISA se desarrolló en superficies de poliestireno estándar. Los resultados muestran una diferencia de sensibilidad entre ambos ELISA de 3 veces, siendo el LOD medio para el ensayo colorimétrico de 7,47 ng/ml y para el luminiscente de 2,54 ng/ml. Estas diferencias son debidas probablemente al sustrato.

Por otra parte, los resultados descritos concuerdan con los obtenidos en un estudio comparativo entre un ELISA colorimétrico y uno quimioluminiscente para la detección de IL23h, donde los autores encuentran una diferencia de 5 veces, siendo el ensayo luminiscente el de mayor sensibilidad (Samineni *et al.*, 2006). Otros autores coinciden en que la sensibilidad es mayor en ensayos luminiscentes comparados con ensayos colorimétricos al detectar interferón alfa-2b (Obenauer-Kutner *et al.*, 1997), IL-12, IL-4h e IL-4 de ratón (Lewkowich *et al.*, 2001) y factor de necrosis tumoral (Petrovas *et al.*, 1999). Sin embargo, en otro estudio realizado para la detección de IL8h y TNF $\alpha$  humano, los autores compararon el sustrato TMB con diferentes sustratos luminiscentes, incluido el de este trabajo, y no encontraron diferencias significativas en la sensibilidad de los ELISAs (Siddiqui and Remick, 2003).

Incluso al emplear revelado colorimétrico, cuando en lugar de utilizar superficies estándar fueron empleadas superficies tratadas con tetracina, los resultados mostraron un aumento de la sensibilidad de detección del antígeno CEA de 12 veces con respecto a las superficies estándar, con un LOD de 0,605 ng/ml. Aunque no fue evaluado, es presumible que el LOD disminuya si se combinaran las superficies tratadas con tetracina con la utilización del sustrato quimio luminiscente.

La detección de varias proteínas a partir de una misma muestra tiene numerosas ventajas entre las que cabe destacar la disminución del tiempo de ensayo y el coste, el poco volumen de

muestra utilizado y la amplia información obtenida sobre el proceso patológico (Adamcova and Šimko, 2018). Por dicha razón se han desarrollado numerosos sistemas de detección multiplex, los cuales detectan de forma simultánea varias proteínas relacionadas con una determinada patología de una misma muestra (por ejemplo, *Quansys*, *Luminex*, etc).

Actualmente se conoce que la detección de varios biomarcadores relacionados con determinados cánceres permite un pronóstico y diagnóstico en estadios más temprano de la enfermedad, lo que implica un mayor valor diagnóstico. Estos biomarcadores incluyen listados de moléculas de distinta naturaleza. Por ejemplo, en el diagnóstico del cáncer colorrectal se ha definido la proteína CEA como biomarcador, con una especificidad entre 70-95%, así como distintos miRNA como el miRNA-29 (85-93% de especificidad) y el miR139-3p (98% de especificidad) (Moody *et al.*, 2017).

En este trabajo hemos implementado un método multiplex de detección de la proteína CEA y el miRNA-29b, ambos relacionados con el cáncer colorrectal. Se emplearon superficies estándar y revelado quimiluminiscente para la detección simultánea de ambas moléculas, siendo el LOD de cada ensayo similar a los de los ensayos independientes de CEA y mir-29b.

En este ensayo podrían haber sido incluidos otros miRNA solo cambiando el marcaje del oligonucleótido. Para dicho marcaje, en este caso fue utilizado FITC, pero también podría haber sido utilizado TAMRA, NP, digoxigenina u otros TAGs contra los que existan anticuerpos. Además, se podrían incorporar otras proteínas relacionadas para la que se conozca una pareja de anticuerpos específicos de alta afinidad.



**IV. AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD DE LA  
TÉCNICA ELISA MEDIANTE UNA  
TECNOLOGÍA BASADA EN LA QUITINA Y  
EL DOMINIO DE UNIÓN A QUITINA**

## CAPÍTULO 4

### 4.1. INTRODUCCIÓN

Con objeto de mejorar la sensibilidad de la técnica de ELISA, se han desarrollado diversos métodos que se basan en la disminución de los efectos adversos de la inmovilización de los anticuerpos mediante adsorción pasiva a las superficies. Estos métodos, como ha sido descrito anteriormente, incluyen estrategias de modificación de las superficies de ensayo, modificación de los anticuerpos y la aplicación de ambas estrategias (Welch, Scoble, *et al.*, 2017).

La unión de los anticuerpos a la superficie de forma covalente o mediante enlaces que permitan una alta estabilidad, mejora la sensibilidad del ensayo ELISA dado que esta técnica involucra repetidos lavados que pueden desplazar las moléculas ya unidas. Además, la orientación adecuada de los anticuerpos en la superficie, es uno de los objetivos principales de la inmovilización ya que permite que éstos tengan expuestos sus sitios de unión al antígeno mejorando así su efectividad.

Las estrategias de inmovilización por afinidad, que son aquellas donde el anticuerpo es capturado específicamente por una región deseada, tienen la ventaja de que pueden introducir un alto grado de orientación del anticuerpo, por lo que la región de reconocimiento del antígeno estaría siempre correctamente posicionada. Entre estas estrategias se encuentran aquellas donde el anticuerpo está unido al dominio activo de una enzima, lo que posteriormente se combina con el uso de superficies preparadas con el sustrato de la enzima o con un análogo. En este caso, el dominio de la enzima que se une al sustrato queda unido a la superficie donde éste se encuentra, lo que se debe a la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.

Entre los ejemplos de enzimas utilizados para la inmovilización de proteínas o anticuerpos a diferentes soportes, podemos citar la cutinasa, la cual se une a soportes de fosfonato (Kwon *et al.*, 2004), la O6-alquilguanina transferasa, que se une a superficies activadas con bencilguanina (Engin *et al.*, 2010) y la quitinasa, de la que se utiliza solamente el dominio de unión a quitina, método que se combina con el uso de superficies de quitina (Lindner *et al.*, 2002; Reulen *et al.*, 2009).

La forma madura de la quitinasa A1 de *Bacillus circulans* WL-12 está compuesta por un dominio catalítico (CD) en el extremo amino terminal, dos dominios fibronectina tipo III (FnIII) y un dominio de unión a quitina (ChBD) (Wang *et al.*, 2018). En un estudio de unión a

diferentes sustratos de la quitinasa, se demostró que tanto la enzima madura como el dominio aislado ChBD, se unen específicamente a la quitina o a su forma regenerada (por ejemplo, quitosano acetilado) pero no a otros polisacáridos como la celulosa, el quitosano o el almidón. Al parecer, este dominio se une a una región de la quitina insoluble pero no a derivados solubles de esta, siendo una unión estable en un amplio rango de pH y de alta afinidad. Sin embargo, cuando se elimina ChBD de la quitinasa madura, ésta no es capaz de unirse a quitina (Hashimoto *et al.*, 2000).

La quitina, componente principal de las conchas de los crustáceos, es un homopolímero lineal insoluble de N-acetil-glucosamina unida mediante enlaces  $\beta$ -1,4. Este biopolímero y la celulosa, son los más abundantes en la naturaleza. El quitosano es un derivado de la quitina que se forma por desacetilación de esta con álcali, resultando en su solubilización. El quitosano está disponible comercialmente en una amplia variedad de pesos moleculares (por ejemplo, 10-1.000 kDa) y diferentes grados de desacetilación. La quitina se puede regenerar por acetilación del quitosano en una solución ácida usando un agente de acetilación como el anhídrido acético (Brooker *et al.*, 2012).

El objetivo de este capítulo es conseguir el aumento de la sensibilidad de los ELISA a través de la preparación de superficies de quitina y la utilización de anticuerpos de captura, obtenidos de forma recombinante o química, unidos a ChBD. Atendiendo a este objetivo general, se llevará a cabo la preparación de placas de poliestireno de formato de 96 pocillos recubiertas con quitina. Para ello, debido a que la quitina es altamente insoluble, se partirá de quitosano comercial y se realizará un proceso de acetilación *in situ*, suficiente para el reconocimiento específico de ChBD.

El anticuerpo de captura utilizado, anti c-myc 9E10, se fusionará a ChBD siguiendo dos vías diferentes: 1) mediante la obtención del anticuerpo recombinante por clonación del anticuerpo fusionado a CHBD en un vector de expresión de células de mamíferos, y 2) mediante reacciones de tipo química clic entre el anticuerpo acoplado a un grupo trans-cicloocteno y ChBD acoplada a tetracina. Para este último caso, el anticuerpo será obtenido del cultivo de hibridoma, mientras que ChBD será clonada en un vector de expresión de *E. coli* y posteriormente purificado tras su sobreexpresión en estas células.

La obtención del anticuerpo recombinante fusionado a ChBD asegura la ubicación de este en la molécula del anticuerpo, lo que permitirá su orientación en las superficies, mientras que en el anticuerpo unido a ChBD de forma química puede situarse en cualquier sitio de la molécula del anticuerpo. A pesar de que esta vía es menos específica, su desarrollo es esencial ya que en

muchos casos no es posible la clonación del anticuerpo debido a que no es conocida su secuencia y el proceso de clonación es altamente especializado. Por otra parte, una vez obtenido el anticuerpo deseado, los reactivos necesarios para la unión entre las dos moléculas están disponibles comercialmente.

El aumento de sensibilidad de los ELISA será evaluado a través de la determinación de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8 humana como modelo de cuantificación por ELISA.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Obtención de proteínas recombinantes

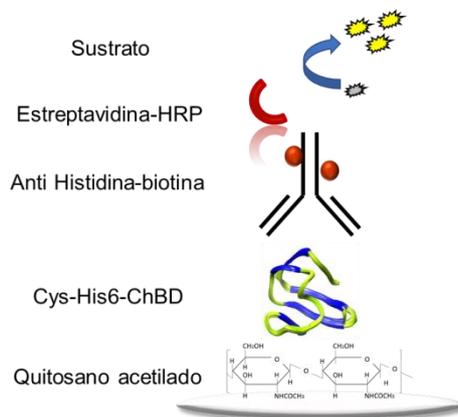
#### 4.2.1.1. Obtención de la proteína recombinante Cys-His6-ChBD

El fragmento sintético Cys-His6-ChBD, que consta de 6 histidinas y una cisteína en el extremo amino unidos a la secuencia del dominio de unión a quitina de la quitinasa A1 de *Bacillus circulans* WL-12 (TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKALQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ; (Terpe, 2003), fue clonado dentro del vector pET-43a (*Novagen*) con las enzimas de restricción *NdeI/SalI*. El vector obtenido, pET-43a-Cys-His6-ChBD, fue confirmado por digestión de comprobación usando enzimas de restricción y posteriormente mediante secuenciación (*STAB VIDA*).

La expresión y purificación de la proteína fue realizada según Hashimoto *et al.*, 2000. Las células BL21 (DE3) de *E. coli* una vez transformadas con el vector pET-43a-Cys-His6-ChBD, fueron incubadas a 37 °C en 0,5L de medio LB conteniendo 50 µg/ml ampicilina. Cuando fue alcanzada una densidad óptica a 600nm ( $DO_{600nm}$ ) de 0,6 el cultivo fue inducido añadiendo isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,5mM. La inducción fue incubada durante 16 h a 30 °C y agitación constante de 160 rpm. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 5.000 g durante 10 minutos y el pellet celular se resuspendió en una solución de Tris-HCl 100mM (pH 8) conteniendo 10mM de PMSF y 1mM de EDTA. Tras un paso de lavado las células fueron resuspendidas en la misma solución y sonicadas utilizando el sonicador Bandelin Sonoplus (*BANDELIN electronic GmbH & Co. KG*) con un 70% de potencia. La fracción soluble de la proteína fue clarificada mediante centrifugación (14.000 g, 30 minutos, 4 °C) y posteriormente precipitada con un 60% de saturación de sulfato de amonio a 4 °C durante 16 h y agitación magnética. El precipitado de la proteína fue disuelto en 5mM fosfato de sodio pH 6 conteniendo 10mM de Imidazol y, posteriormente, dializado usando membrana de diálisis de 10 kDa contra 1L del mismo tampón. Finalmente, la proteína Cys-His6-ChBD fue purificada mediante cromatografía con columna de Ni por afinidad (HisTrap HP, *GE Healthcare* 17-5247-01) siguiendo las instrucciones del fabricante en AKTA Prime Plus. La proteína fue cuantificada mediante Bradford usando una curva de BSA y analizada mediante electroforesis en gel de acrilamida al 14% para determinar el grado de pureza.

Para la detección de la actividad del dominio de unión a quitina, se llevó a cabo un ELISA en placas cuya superficie fue previamente recubierta con quitosano acetilado (Apartado 4.2.3). La proteína Cys-His6-ChBD purificada fue añadida a la placa en el rango de concentraciones de 15,62-1000 pg/ml e incubada 1 h a 37 °C. Una vez lavados los pocillos 3 veces con 0,2ml de

PBS-Tween-20 0,05%, se añadió 0,1ml del anticuerpo anti histidina-biotina (*GenScript*, A00613) a 50 ng/ml (Fig. 60). Luego de 3 lavados fueron añadidos 100 ng/ml de estreptavidina-HRP e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Finalmente se añadió el sustrato de la peroxidasa TMB y la reacción fue detenida usando HCl 1M. La lectura del ELISA fue realizada a 450nm usando el equipo de lectura FLUOstar OPTIMA.



**Figura 60.** Esquema del ELISA de detección de actividad de ChBD en placas de quitosano acetilado. El anticuerpo de detección es específico para el tag histidina que lleva la proteína Cys-His6-ChBD, por lo que como control negativo se utilizó la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h, que presenta una cola de 6 histidinas en el amino terminal.

#### 4.2.1.2. Obtención del anticuerpo anti c-myc-CHBD en células de mamífero

Para la obtención del anticuerpo anti-c-myc fue aislado el ARN del hibridoma 9E10 a partir de  $10^6$  células usando el reactivo PRImeZOL (*Canvax Biotech*, AN1100) y atendiendo al protocolo descrito por el fabricante. Posteriormente, fue realizada una retrotranscripción del ARN en ADNc y éste fue usado como molde para la amplificación de la secuencia del anticuerpo usando una polimerasa de alta fidelidad (*Canvax Biotech*, P0032).

La retrotranscripción del fragmento Vk-Ck del anticuerpo fue desarrollada usando el oligo pCK-2rev (5' TATGCGCCGCCTTTGTCTCTAACACTCATTCTG 3'). La amplificación por PCR fue realizada usando los oligos pVK-1fw (5'GGGGATATCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT 3') y pCK-2rev. Por otro lado, el ADNc del fragmento VH del anticuerpo se obtuvo utilizando el oligo pVH9E10-6rev (5'TTTAGATCTAATTTTCTTGCCACCTTGGTGC 3') en la retrotranscripción, mientras que la PCR se llevó a cabo usando los oligos pVH9E10-4fw (5'TTTAAGCTTCGCCACCATGAACTTCGGGCTCAG 3') y pVH9E10-6rev.

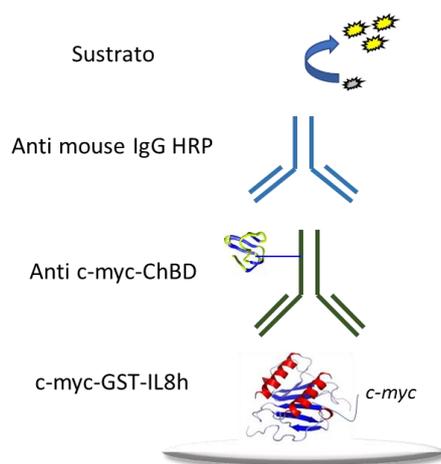
Los productos de la PCR obtenidos en ambos casos fueron clonados en el vector pSPARK® (*Canvax Biotech*, C0001) y secuenciados en el servicio de secuenciación de la empresa STABVIDA. Las secuencias funcionales obtenidas del fragmento Vk-Ck del anticuerpo fueron sub

clonadas en el vector de expresión pcDNA<sub>3,4</sub> usando las enzimas de restricción *EcoRV/ NotI*, mientras que para el fragmento VH fueron utilizadas las enzimas *HindIII/ BglII*. Finalmente, el fragmento VH del anticuerpo fue fusionado en fase al fragmento Fc de la IgG1 murina. Los vectores recombinantes fueron comprobados por digestión y secuenciación.

El dominio de unión a quitina (ChBD) de la quitinasa A1 de *Bacillus circulans* WL-12 fue amplificado con las enzimas de restricción 5' *NheI*/ 3' *NotI* flanqueantes a la secuencia. Fue realizada una ligación triple entre el fragmento de ChBD digerido *NheI/ NotI*, el fragmento de PCR correspondiente al VH amplificado con los oligos pVH9E10-4fw y pIgG1m-25rev (5'GATAGCTAGCTTACCAGGAGAGTGGGAGAG 3') y digerido con las enzimas *HindIII/ NheI* y el vector pcDNA<sub>3,4</sub> abierto con las enzimas *HindIII/ NotI*.

Los vectores obtenidos para la expresión de las cadenas VH y VK del anticuerpo anti c-myc-ChBD fueron co-transfectados en células CHO-S usando el kit de expresión "ExpiCHO Expression system kit" (*Thermo Scientific, A29133*). El anticuerpo fue expresado durante 10 días a 32 °C y 5% CO<sub>2</sub> con agitación constante atendiendo a las instrucciones del fabricante. Las células fueron separadas por centrifugación y el sobrenadante conteniendo el anticuerpo se cuantificó mediante ELISA sándwich de detección de IgG murina y purificado mediante afinidad con columna de proteína G (*HiTrap Protein G HP, GE Healthcare 29-0485-81*). El anticuerpo fue cuantificado por absorbancia a 280nm y el grado de pureza del anticuerpo se analizó mediante electroforesis.

La detección de la actividad del anticuerpo fue efectuada posteriormente mediante un ELISA indirecto (Fig. 61). Una placa estándar de ELISA, Maxisorp (*Thermo Scientific, 442404*), fue recubierta con 2 µg/ml de la proteína c-myc-GST-IL8 humana e incubada a 4 °C durante 16 h. La placa fue lavada 3 veces usando 0,2 ml por pocillo de PBS-Tween-20 0,05% y bloqueada con PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se añadió el anticuerpo anti c-myc obtenido del hibridoma 9E10 o el anticuerpo anti c-myc-ChBD, obtenido de forma recombinante a partir del cultivo de células CHO, ambos con diluciones seriadas en base dos, desde 100 a 0,078 ng/ml. Después de tres lavados, el ELISA fue revelado usando el anticuerpo anti mouse HRP (*Sigma-Aldrich, A2554*). Finalmente fue añadido el sustrato TMB y la reacción fue parada con 1M HCl. La absorbancia se determinó a 450 nm usando el lector de placas FLUOstar OPTIMA (*BMG Labtech*).



**Figura 61.** ELISA de detección de actividad del anticuerpo recombinante anti c-myc-ChBD. Para la curva patrón se utiliza el anticuerpo anti c-myc obtenido del hibridoma.

Para la detección de la actividad del dominio de unión a quitina del anticuerpo anti c-myc-ChBD, se utilizaron partículas magnéticas de quitina (*Chitin magnetic beads; BioLabs E8036S*), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo en tampón de unión (500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 0,05% Triton-X100 pH 8) fue incubado con 50  $\mu\text{l}$  de partículas durante 1 h a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Una vez lavados 3 veces con el mismo tampón, fue añadido 1  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo anti-mouse FITC y se incubó durante 30 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Las partículas fueron posteriormente analizadas mediante citometría de flujo (*Guava EasyCyte mini, Guava Technologies*).

#### 4.2.2. Unión del anticuerpo anti c-myc con el dominio de unión a quitina químicamente

##### 4.2.2.1. Modificación química del anticuerpo anti c-myc y de la proteína de unión a quitina

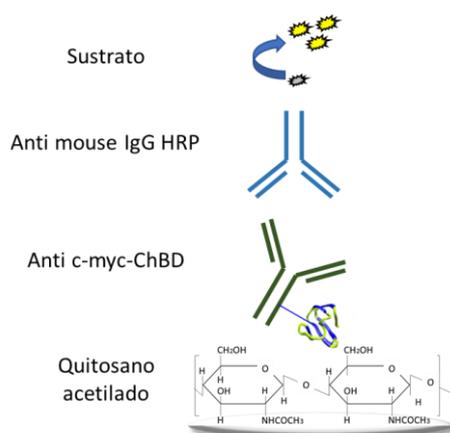
El grupo reactivo TCO se incorporó al anticuerpo anti c-myc según lo descrito en el apartado 2.2.2.1 y, posteriormente, se determinó su actividad. El grupo reactivo tetracina fue incorporado en la proteína Cys-His6-ChBD a través del grupo SH del aminoácido cisteína adicionado a la proteína. Primeramente, la proteína fue tratada con 1 mM de DTT durante 30 minutos a temperatura ambiente con el objetivo de reducir el grupo SH y más adelante dializada en un dispositivo de diálisis (*Amicon*) de masa molecular de corte de 10 kDa (*Millipore, UFC801024*) contra 100 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, EDTA 5 mM pH 7,5. La proteína fue cuantificada mediante Bradford usando una curva de BSA. Posteriormente, 1 mg de la proteína reducida (MW teórica= 12.216 daltons), que equivale a  $8,18 \times 10^{-8}$  mol, fue modificado usando un exceso molar del reactivo Tetrazine-PEG4-Maleimide (*Click Chemistry Tools, A139*) de 10. El reactivo fue incubado con la proteína durante 1 h a temperatura

ambiente y luego la mezcla fue dializada contra 1L de PBS pH 7,4 usando membrana de 12 kDa de corte. La proteína tetracina-Cys-His6-ChBD fue cuantificada por Bradford.

La proteína Cys-His6-ChBD-Tetracina fue mezclada con el anticuerpo anti c-myc-TCO (4 TCO: 1 anti c-myc), obtenido en el apartado 2.2.2.1., y fue incubada durante 4h a temperatura ambiente. Para ello, se tiene en cuenta una relación molar de 10 tetracina-Cys-His6-ChBD: 1 anti c-myc-TCO. Posteriormente la mezcla fue dializada en un dispositivo de diálisis (Amicon) de masa molecular de corte de 100 kDa (*Millipore, UFC610024*) con el objetivo de eliminar el exceso de proteína Cys-His6-ChBD-Tetracina contra PBS pH 7.4. El anticuerpo se purificó en AKTA usando columna de proteína G (*HiTrap Protein G HP, GE Healthcare 29-0485-81*), cuantificado por absorbancia a 280nm y analizado el grado de pureza del anticuerpo mediante electroforesis. La actividad del anticuerpo fue determinada usando el ELISA descrito en el apartado 4.2.1.2.

#### 4.2.2.2. Detección de la unión química entre ChBD y el anticuerpo anti c-myc

La unión química entre el anticuerpo anti c-myc y ChBD, a través de la reacción entre la tetracina y el TCO, fue detectada mediante un ELISA realizado en placas preparadas con quitosano acetilado. Para ello fue añadido el anticuerpo en el rango de concentraciones desde 3,12-100 ng/ml e incubado a 37 °C durante 2 h. El anticuerpo sin unirse a la proteína ChBD fue utilizado como control negativo. Luego de tres lavados con PBS-Tween-20 0,05% se añadió el anticuerpo de revelado anti mouse IgG HRP (Fig. 62).

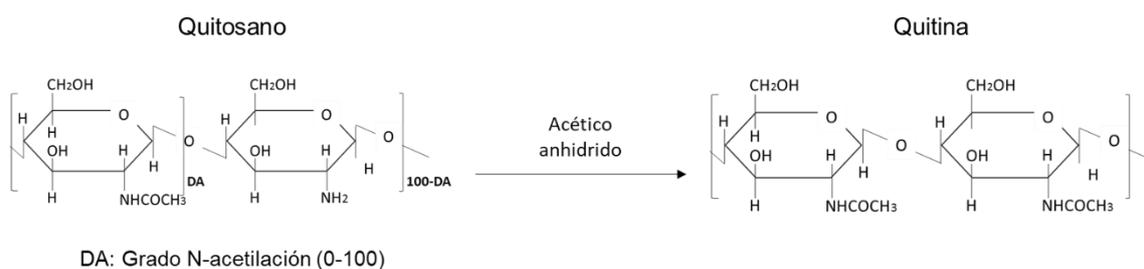


**Figura 62.** Esquema del ensayo de detección de actividad de la proteína recombinante ChBD unida de forma química al anticuerpo anti c-myc en placas preparadas de quitosano acetilado.

#### 4.2.3. Preparación de superficies de quitosano acetilado

Se utilizó el procedimiento descrito por Bernard *et al.* (2004) incluyendo pequeñas modificaciones. En nuestro caso, fueron utilizados dos tipos de quitosano con distintos grados

de desacetilación, 60% (Chitosan, *Sigma-Aldrich*, 740063) y 80% (*Chitosan Crab Shells*, *Sigma-Aldrich*, 48165), de cada uno de los cuales fueron disueltos 30 mg del quitosano deacetilado en 5 ml de 0,1M de cetato de sodio pH 3. Cada solución fue diluida 20 veces en acetato de sodio 0,1M, pH 5, y se añadieron 50  $\mu$ l por pocillo en placas de poliestireno de 96 pocillos. Posteriormente fueron añadidos 8  $\mu$ L de ácido acético anhidrido (*Sigma-Aldrich*, 320102) (Fig. 63). La placa fue incubada toda la noche en cámara de extracción de gases para permitir el secado de la misma. Finalmente, la placa fue lavada con PBS 10X pH 7,4 y bloqueada con 0,3 ml de PBS 10x pH 7,4 + 1  $\mu$ g/mL de BSA.



**Figura 63.** Representación de la reacción de acetilación del quitosano mediante una reacción *in situ* con ácido acético anhidrido.

Las placas preparadas con los distintos tipos de quitosano deacetilado fueron evaluadas para detectar el quitosano adherido a la superficie y ser comparadas entre sí usando un ensayo tipo ELISA. A ambas placas les fue añadido el anticuerpo anti c-myc-ChBD obtenido en células de mamíferos con diluciones seriadas en base dos, desde 50 a 0,039 ng/mL, y este fue incubado durante 2 h a 37 °C. Después de tres lavados con PBS-Tween-20 0,05% se llevó a cabo el revelado empleado el anticuerpo anti mouse HRP (Fig. 62).

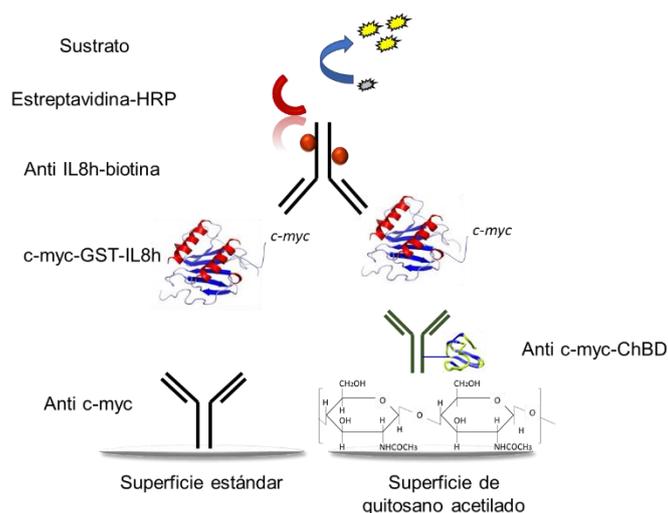
#### 4.2.4. ELISAs para la validación del aumento de sensibilidad de las superficies de quitosano acetilado con respecto a las superficies estándar

##### 4.2.4.1. Optimización de la unión de la proteína de unión a quitina a la superficie de quitosano acetilado

Para la optimización de la unión de ChBD a la superficie de quitosano acetilado, se determinó la concentración óptima del anticuerpo de recubrimiento anti c-myc-ChBD obtenido en células de mamíferos, así como el tiempo de incubación (1, 2, 4, 6 y 16 h) de la reacción ChBD-quitina, y el buffer de unión (PBS pH 7,4 o NaHCO<sub>3</sub> pH 9). Para ello, en una placa con superficie de quitina fue añadido el anticuerpo anti c-myc-ChBD con diluciones seriadas desde 1 a 0,312  $\mu$ g/ml e incubado durante 2 h a 37 °C. El anticuerpo anti c-myc 9E10 obtenido de hibridoma se utilizó como control de especificidad de la reacción. El ELISA fue revelado con anti mouse HRP (Fig. 62).

#### 4.2.4.2. Comparación del ELISA de detección de c-myc-GST-IL8h realizado en placas con superficies preparadas con quitosano acetilado o superficies estándar

El ELISA en placas MaxiSorp y en placas preparadas con quitosano acetilado fue llevado en paralelo (Fig. 64). Para ello, se recubrió con el anticuerpo anti c-myc en placas MaxiSorp y con anti c-myc ChBD en placas de quitosano acetilado. Posteriormente las placas fueron bloqueadas con una solución de PBS pH 7,4 conteniendo BSA 1% (peso: volumen) durante 30 minutos a 37 °C. La proteína c-myc-GST-IL8h fue añadida en un rango de concentraciones de 100-0,39 ng/ml e incubada a 37 °C durante 1 h. Fueron realizados 3 lavados con 0,2ml de PBS-Tween-20 0,05% para eliminar absorciones inespecíficas de la proteína. El anticuerpo anti IL8 biotina (clon MT8F19) fue añadido (1 µg/ml) e incubado durante 1 h a 37 °C. Tras 5 lavados se añadió la estreptavidina-HRP (*Thermo Scientific, 21130*) a 100 ng/ml e incubada a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 30 minutos. Fue utilizado como sustrato el TMB y la reacción fue detenida con una solución de 1M de HCl. Se determinó la absorbancia a 450nm usando el lector de placas FLUOstar OPTIMA.



**Figura 64.** Esquema del ELISA de detección de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h en superficie estándar y en superficie tratada con quitosano acetilado. El anticuerpo de captura utilizado en la superficie estándar es anti c-myc proveniente del hibridoma 9E10, mientras que en las superficies de quitosano, se utiliza el anticuerpo recombinante producido en células de mamíferos anti c-myc-ChBD (clon 9E10).

Usando estos ELISAs en paralelo se evaluó el anticuerpo anti c-myc-ChBD obtenido mediante clonación y expresión en células de mamíferos y el anticuerpo obtenido mediante unión química.

#### **4.2.4.3. Influencia del tipo de muestras sobre el ELISA**

Para determinar la influencia de la procedencia de la muestra, se añadió la proteína c-myc-GST-IL8h a dos concentraciones, 100 ng/ml y 10 ng/ml en suero humano, plasma humano o medio de cultivo de células superiores (Medio RPMI 1640). La concentración de las muestras fue determinada en el ELISA en placas de quitosano acetilado usando para ello la curva patrón de la proteína diluida en PBS-BSA 0,5%.

El porcentaje de recuperación fue calculado teniendo en cuenta que el 100% de recuperación o la concentración esperada era la obtenida cuando la muestra fue disuelta en PBS-BSA 0,5% y cuantificada mediante el ELISA. La ecuación utilizada fue:

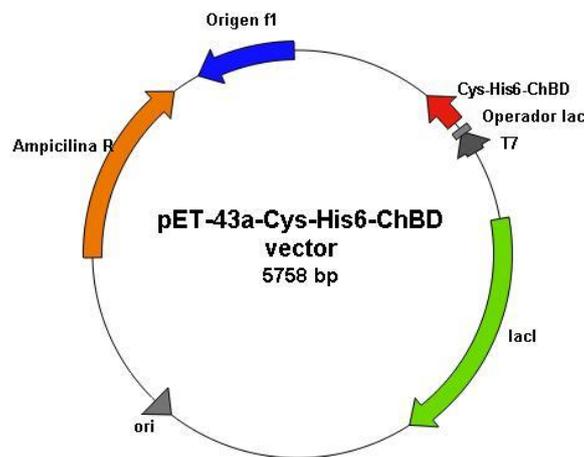
% de recuperación = (Concentración observada de la muestra con la proteína añadida - Media de la concentración de la muestra sin añadir la proteína) / Concentración de la proteína obtenida en PBS-BSA 0,5%

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Obtención de proteínas recombinantes

##### 4.3.1.1. Obtención de la proteína recombinante His6-Cys-ChBD

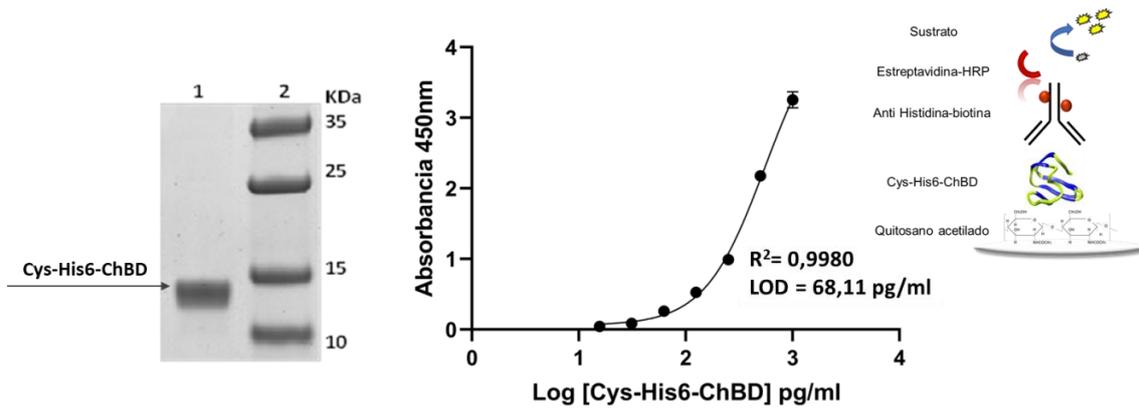
El dominio de unión a quitina de la quitinasa A1 de *Bacillus circulans* WL-12 (ChBD) fue clonado añadiendo un aminoácido cisteína en el extremo amino. Esta metodología se llevó a cabo con el objetivo de unir de forma dirigida el grupo reactivo tetracina a la proteína a través de una reacción de la maleimida con el grupo sulfhidrilo de la cisteína. La proteína recombinante Cys-His6-ChBD clonada en el vector de expresión pET-43a se representa en la Fig. 65. La secuencia de nucleótidos correspondientes al inserto fue comprobada mediante secuenciación siendo esta la esperada (*Stabvida*).



**Figura 65.** Vector de expresión pET-43a conteniendo la secuencia de la proteína recombinante ChBD conteniendo 6 histidinas y una cisteína en el carboxilo terminal.

El vector pET-43a-Cys-His6-ChBD resultante fue utilizado para la transformación de las células BL21 (DE3) y, posteriormente, fue purificada la proteína mediante afinidad en columna de níquel. A partir de la sobre expresión de estas células se obtuvieron 5 mg por litro de cultivo de la proteína recombinante. A continuación, fue analizado el grado de pureza de la proteína purificada mediante electroforesis en un gel de acrilamida, detectándose una única banda con un peso molecular aproximado al teórico de 13 kDa (Fig. 66 Izq.).

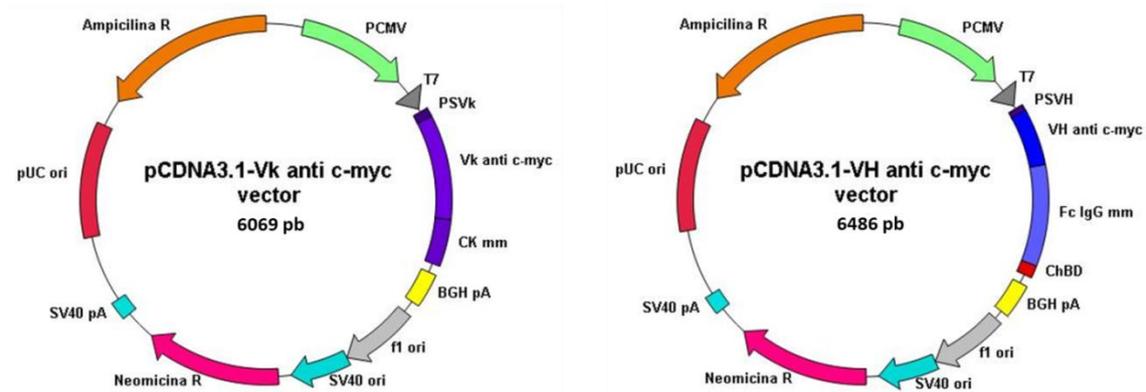
La actividad del dominio de unión a quitina fue detectada en placas de quitosano acetilado mediante un ELISA. Como se observa en la Fig. 66, el ensayo está en el orden de los pg/ml, siendo el LOD de 68,11 pg/ml, indicando la alta afinidad de ChBD por el quitosano acetilado.



**Figura 66.** Análisis de la proteína recombinante Cys-His6-ChBD purificada de cultivo de *E. coli*. **Izquierda:** Electroforesis en gel de acrilamida (14%) y tinción con azul de Coomassie. Carril 1: 5 µg de Cys-His6-ChBD; Carril 2: patrón de peso molecular (*Thermo Fisher Scientific*, 26619). **Derecha:** Curva sigmoideal 4PL de la detección de actividad de la proteína ChBD en placas de quitosano acetilado y detección con el anticuerpo anti histidina.

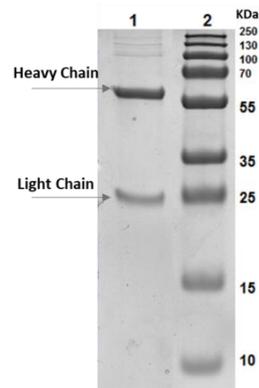
#### 4.3.1.2. Obtención del anticuerpo anti c-myc-ChBD en células ExpiCHO

Los fragmentos VH y Vk del anticuerpo anti c-myc (Clon 9E10) fueron clonados en el vector pCDNA<sub>3.1</sub> con promotor de citomegalovirus. La región constante de la cadena ligera, Ck murina, fue clonada en fase detrás del Vk. De la misma manera, detrás del fragmento variable de la cadena pesada (VH), fue clonada la fracción constante de la cadena pesada de una IgG1 murina y posteriormente se añadió el dominio de unión a quitina (ChBD) (Fig. 67). Las clonaciones fueron comprobadas por digestión con enzimas de restricción y secuenciadas posteriormente.



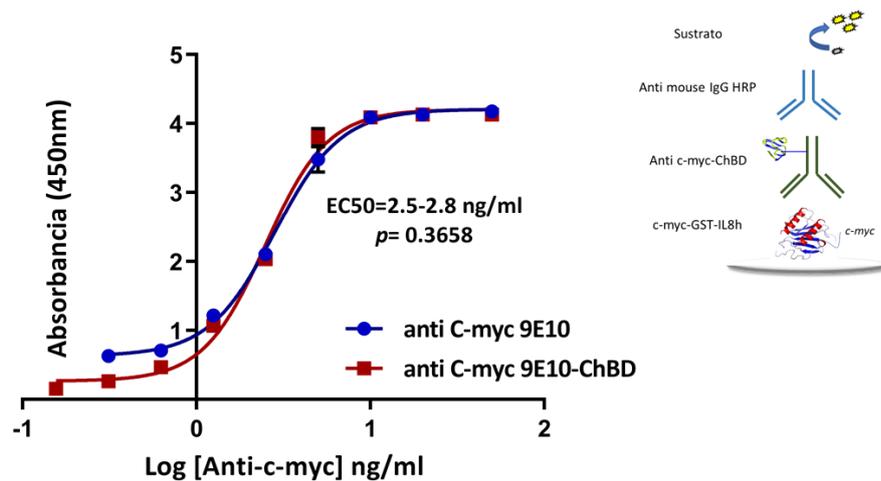
**Figura 67.** Esquema de los vectores para la expresión del anticuerpo recombinante anti c-myc-ChBD en células de mamíferos (cadenas ligera y pesada). PCMV: Promotor de citomegalovirus; PSVk: Péptido señal de la cadena ligera; Vk anti c-myc: Región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti c-myc; CK mm: Cadena constante kappa murina (mm: *Mus musculus*); PSVH: Péptido señal de la cadena pesada; VH anti c-myc: región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti c-myc; Fc IgG mm: Fracción constante de la cadena pesada murina; ChBD: Dominio de unión a la quitinasa A1 de *Bacillus circulans* WL-12.

El anticuerpo anti c-myc-ChBD fue obtenido a partir de la expresión en células ExpiCHO usando un protocolo estándar. Atendiendo al ELISA de cuantificación del sobrenadante de las células expresando el anticuerpo, se detectaron 40 µg por ml de cultivo del anticuerpo obteniéndose tras la purificación, 8 mg totales del anticuerpo a partir de 60 ml de cultivo. Según la electroforesis en gel de acrilamida, el anticuerpo presenta un alto grado de pureza (Fig. 68).



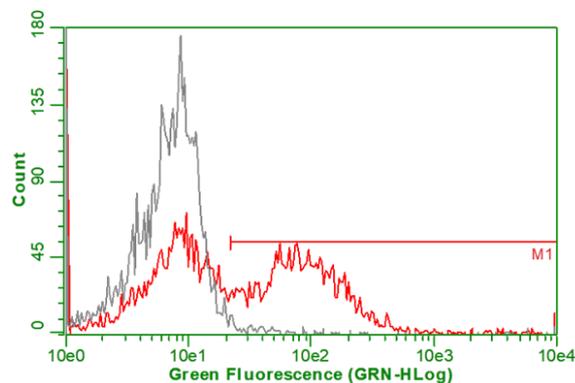
**Figura 68.** Análisis del anticuerpo anti c-myc-ChBD expresado en células de mamífero. Electroforesis en gel de acrilamida al 10% y tinción con azul de Coomassie. Carril 1: 2 µg de anti c-myc-ChBD en tampón de carga conteniendo β Mercaptoetanol; Carril 2: Patrón de peso molecular en kDa (*Thermo Fisher Scientific, 26619*).

Posteriormente, el anticuerpo purificado a partir de este sobrenadante fue analizado mediante ELISA para comparar su actividad con respecto al anticuerpo anti c-myc obtenido a partir del clon del hibridoma 9E10, y también para detectar actividad del dominio de unión a quitina mediante citometría sobre partículas de quitina. Como se observa, ambos anticuerpos poseen la misma actividad, lo que demuestra que la fusión al dominio ChBD no afecta la actividad de reconocimiento del anticuerpo por su antígeno. Asimismo, las curvas no presentan diferencias significativas entre sí, siendo el valor de  $p=0,3658$  (Fig. 69).



**Figura 69.** Curva sigmoideal 4PL resultante del análisis del ELISA de detección de la actividad específica del anticuerpo recombinante anti c-myc-ChBD obtenido en células de mamíferos comparado con el anticuerpo anti c-myc obtenido del hibridoma 9E10.

Atendiendo a la citometría de flujo sobre las partículas de quitina comerciales (Fig. 70), se observa que el dominio de unión a quitina de la quitinasa A1 de *Bacillus circulans* WL-12 fusionada al anticuerpo anti c-myc mediante clonación, es activo y capaz de reconocer de forma específica la quitina, detectándose un 50% de unión.



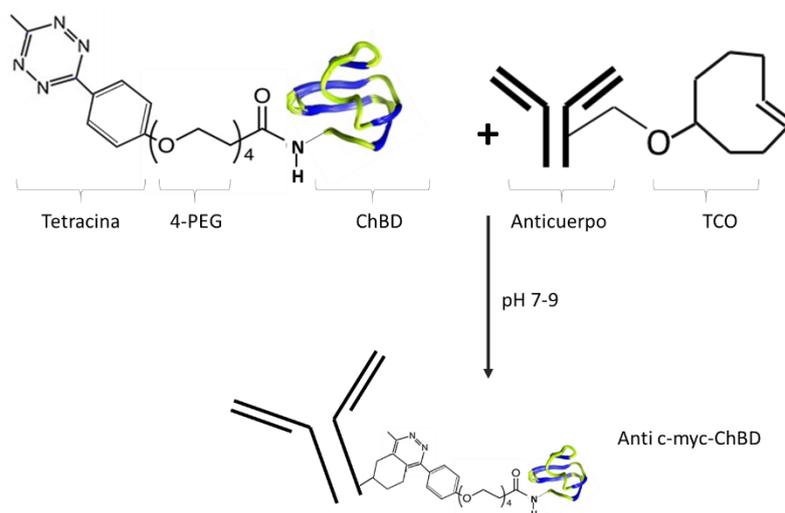
**Figura 70.** Citometría de partículas magnéticas recubiertas con quitina usando el anticuerpo anti c-myc-ChBD. Como control negativo de la citometría fue utilizado el anticuerpo anti c-myc, representado por la línea gris, mientras que el anticuerpo anti c-myc-ChBD está representado en rojo.

#### 4.3.2. Unión del anticuerpo anti c-myc con el dominio de unión a quitina químicamente

##### 4.3.2.1. Modificación química del anticuerpo anti c-myc y de la proteína de unión a quitina

Se incorporaron cuatro grupos trans-cicloocteno en el anticuerpo anti c-myc como fue descrito en el apartado 2.2.2.1. La actividad del anticuerpo con TCO (2.2.2.1.1) fue comparada con la del anticuerpo sin modificar, observándose que no hubo pérdida de la misma, ya que el anticuerpo continúa reconociendo su antígeno específico. Por otro lado, se incorporó un grupo

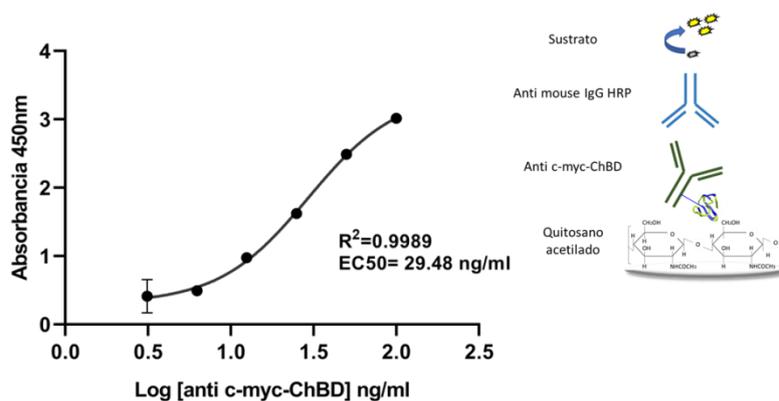
tetracina, a través de la reacción de la maleimida, con la cisteína incorporada en un extremo de la proteína Cys-His6-ChBD. Ambas proteínas, anti c-myc-TCO y tetracina-Cys-His6-ChBD. Tras ser dializadas, se mezclaron para permitir el acoplamiento entre las dos moléculas y, de esta manera, obtener un anticuerpo anti c-myc fusionado a ChBD de forma química sin necesidad de la obtención del anticuerpo de forma recombinante (Fig. 71).



**Figura 71.** Representación esquemática de la unión mediante química clic entre la tetracina y el TCO incorporados en ChBD y el anticuerpo anti c-myc respectivamente, en condiciones fisiológicas.

#### 4.3.2.2. Detección de la unión química entre ChBD y el anticuerpo anti c-myc

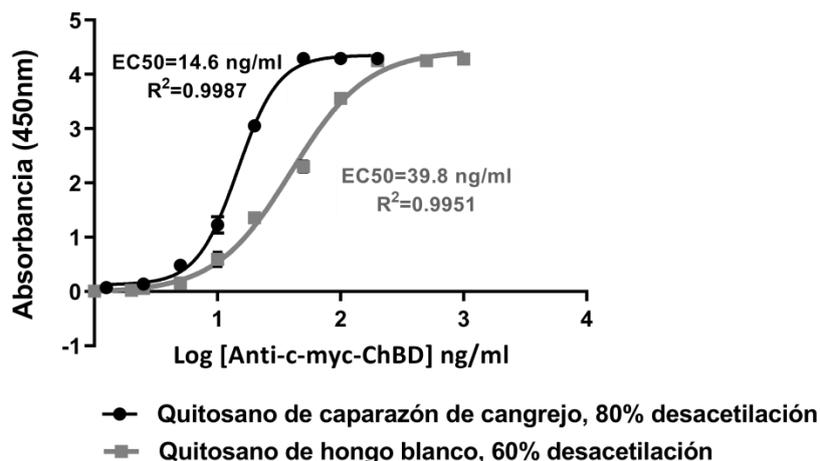
La unión química de ChBD al anticuerpo anti c-myc mediante una reacción de tipo química clic, fue comprobada a través de un ELISA realizado en placas de quitosano acetilado. En este ensayo se comprueba la unión entre ambas moléculas además de la actividad de la proteína Cys-His6-ChBD obtenida de forma recombinante en *E. coli*. Como control negativo del ELISA se utilizó el anticuerpo sin modificar, el cual no presentó reacción en el rango de concentraciones utilizado. Como se observa en la Fig. 72, a medida que aumenta la concentración del anticuerpo, aumenta la señalización del ELISA, indicando que la proteína ChBD es activa ya que se está uniendo de forma específica al quitosano acetilado de la superficie. Además, queda demostrada la unión entre ambas moléculas, ya que en el ensayo tipo sándwich se captura la proteína mediante la actividad de unión de ChBD a la superficie y la detección se hace de la región constante del anticuerpo, por lo que para que haya señalización tienen que ocurrir ambos eventos.



**Figura 72.** Curva sigmoideal 4PL del ensayo de detección de actividad del dominio de unión a quitina unido mediante química clic, realizado en placas de quitosano acetilado.

### 4.3.3. Preparación de superficies de quitosano acetilado

Se prepararon dos superficies distintas de quitina (quitosano acetilado) a partir de dos tipos de quitosano comercial que se diferenciaban en el grado de desacetilación, uno con un 60% y el otro con un 80%. Ambas superficies fueron tratadas mediante un proceso de acetilación *in situ*. Se esperaba que el porcentaje de desacetilación más bajo produjera mejores resultados, ya que ChBD se une específicamente a los derivados de la quitina insolubles. Sin embargo, las señales fueron mayores en las superficies preparadas a partir del quitosano con un 80% de desacetilación (Fig. 73). Estos resultados pueden ser debidos al hecho de que la solución previa preparada del quitosano con un 80% de desacetilación es mucho menos viscosa que la preparada a partir del quitosano con un 60% de desacetilación.



**Figura 73.** Análisis de las superficies de quitosano acetilado preparadas a partir de dos quitosanos con diferentes grados de desacetilación. Curva sigmoideal 4PL obtenida usando diferentes concentraciones del anticuerpo anti c-myc-ChBD recombinante sobre cada superficie. Se representa la EC50 obtenida en cada curva.

Además, una vez analizado el coeficiente de variación obtenido de los resultados de la absorbancia resultante de 10 controles negativos de cada superficie, se encontraron mejores resultados en las superficies preparadas con un 80% de desacetilación (Tabla 16), por lo que se seleccionó este tipo de superficie en ensayos posteriores.

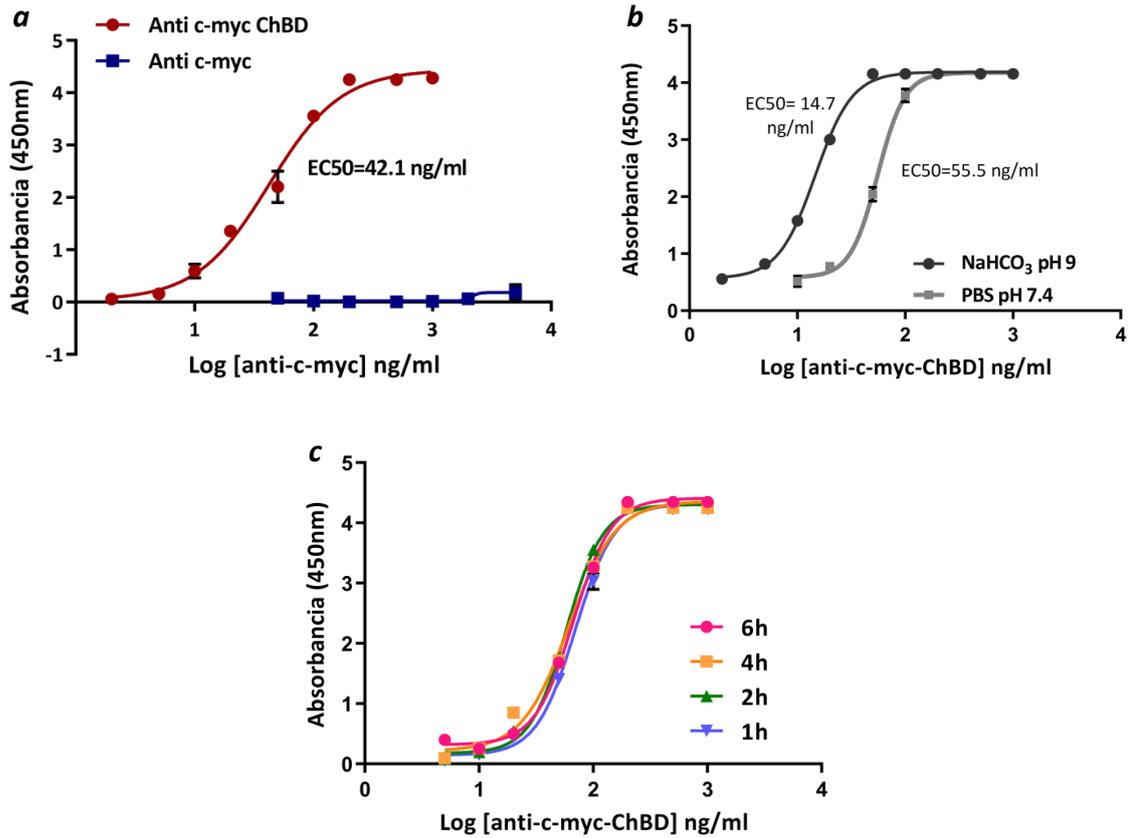
<b>Tabla 16. Análisis del control negativo sin anticuerpo (blanco) en el ELISA de detección de actividad de ChBD en la proteína de fusión anti c-myc-ChBD</b>		
	<b>Quitosano 60% de desacetilación</b>	<b>Quitosano 80% de desacetilación</b>
Media blanco	0,208	0,170
CV% del blanco	18,66	4,70

#### **4.3.4. ELISAs para la validación del aumento de sensibilidad de las superficies de quitosano acetilado con respecto a las superficies estándar**

##### **4.3.4.1. Optimización de la unión de la proteína de unión a quitina a la superficie de quitosano acetilado**

El ELISA de unión del anticuerpo recombinante anti c-myc-ChBD comparado con el anticuerpo proveniente del hibridoma 9E10 anti c-myc, se llevó a cabo en una superficie previamente preparada de quitosano acetilado (Fig. 74a). Como se observa, la unión a estas superficies es específica para el anticuerpo que lleva el dominio de unión a quitina (ChBD) y no se observa unión cuando se utiliza el anticuerpo anti c-myc. Este ELISA fue repetido 5 veces en días diferentes y se comprobó que, para un intervalo de confianza del 95%, la EC50 estaba en el rango entre 47,54 y 67,22 ng/ml. Debido a que este anticuerpo es el de captura del antígeno en un ELISA tipo sándwich, se consideró que la concentración del mismo debería de ser saturante por lo que fue calculada la EC95, que estuvo en el rango entre 155,41 y 219,75 ng/ml.

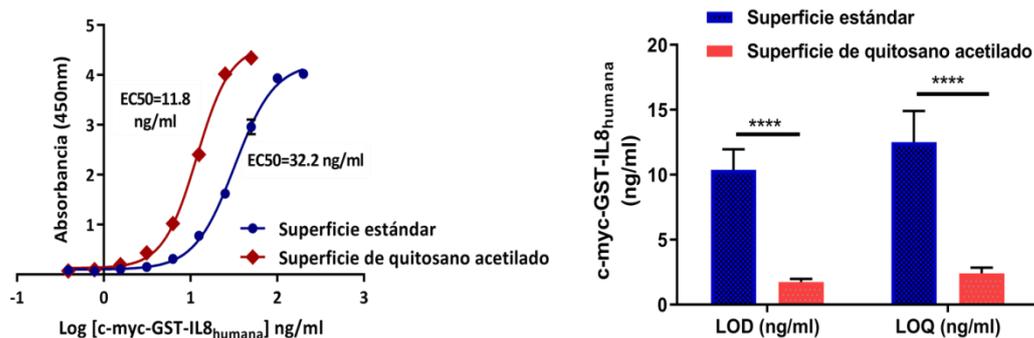
El tampón de reacción y el tiempo de incubación fueron variables medidas con el objetivo de optimizar las condiciones de unión entre el quitosano acetilado y el anticuerpo recombinante anti c-myc-ChBD. El tampón con mejores resultados fue el NaHCO<sub>3</sub>, dado que la EC50 fue de 14,7 ng/ml, mientras que la obtenida con PBS fue más alta, de 55,5 ng/ml (Fig. 74b). Los resultados del valor de *p* mediante el test t de Student para las comparaciones entre las distintas curvas obtenidas con respecto a los tiempos de incubación (1, 2, 4 y 6h), demuestran que no hubo diferencias significativas para un intervalo del 95% de confianza, por lo que fue seleccionada 1 h de incubación como el tiempo óptimo de unión (Fig 74c).



**Figura 74.** Análisis de las condiciones óptimas de unión de ChBD sobre las superficies de quitosano acetilado. **a.** Comparación de la unión del anticuerpo recombinante anti c-myc-ChBD y el anticuerpo anti c-myc sobre superficies de quitosano acetilado. **b.** Curvas de unión del anticuerpo recombinante anti c-myc-ChBD usando diferentes tampones. **c.** Curvas de unión de anti c-myc-ChBD a 37 °C a las superficies de quitosano acetilado usando diferentes tiempos de incubación. Todas las curvas muestran las barras de error de 3 réplicas para cada concentración del anticuerpo.

#### 4.3.4.2. Comparación del ELISA de detección de c-myc-GST-IL8h realizado en placas con superficies preparadas con quitosano acetilado o superficies estándar

El ELISA desarrollado en superficies recubiertas con quitosano acetilado y usando anti c-myc-ChBD recombinante como anticuerpo de captura, fue comparado con el ELISA desarrollado en superficies estándar con el anticuerpo anti c-myc proveniente de hibridoma, para la detección de la proteína c-myc-GST-IL8h (Fig. 64). La curva sigmoideal referente a la superficie de quitosano acetilado, se desplaza hacia la izquierda con respecto a la de la superficie estándar, indicando que concentraciones más bajas del analito pueden ser detectadas y cuantificadas (Fig. 75).



**Figura 75.** ELISA comparativo de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h en superficies estándar y superficies tratadas con quitosano acetilado. **Izquierda:** Curva sigmoideal 4PL del ELISA desarrollado sobre las dos superficies. El rango de concentración usado fue de 0,39-200 ng/ml. Los resultados corresponden a 3 réplicas de cada concentración. El control negativo incluía 10 réplicas. **Derecha:** Diagrama de barras del LOD y el LOQ obtenido de 5 repeticiones del ELISA en cada superficie.

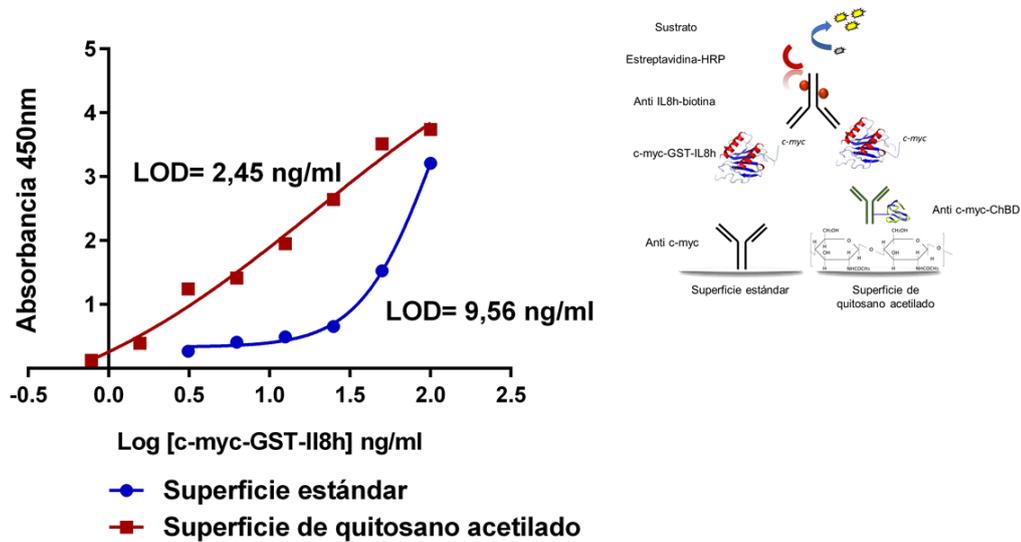
En las superficies estándar la cantidad mínima detectada de la proteína c-myc-GST-IL8h fue de 10,4 ng/mL, mientras que en las superficies de quitosano acetilado fue de 1,74 ng/ml, significando esto un incremento de 6 veces el límite de detección (Tabla 17). Además, las cantidades mínimas que pueden ser cuantificadas fueron 12,5 y 2,4 ng/ml respectivamente, lo que supone una mejora de 5,2 veces del límite de cuantificación. Por otra parte, el análisis estadístico de los resultados nos muestra diferencias tanto en el LOD como en el LOQ entre ambas placas ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 75).

**Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos del LOD y el LOQ del ELISA de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h en superficies estándar y superficies tratadas con quitosano acetilado.**

	Superficies estándar	Superficies de quitosano acetilado
<b>LOD (ng/mL)</b>	10,38 ± 1,58	1,74 ± 0,23
<b>LOQ (ng/mL)</b>	12,50 ± 1,41	2,40 ± 0,34
<b>CV% Intra-ensayo</b>	0,27- 6,05	0,17- 4,90
<b>CV% Inter-ensayo</b>	0,77- 8,35	1,37- 6,59

El anticuerpo anti c-myc-ChBD obtenido por la unión de ambas proteínas mediante reacción química, fue utilizado para determinar si, al igual que el anticuerpo obtenido de forma recombinante, aumentaba la sensibilidad del ELISA de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h. De la misma manera fue comparado el ELISA realizado en superficies estándar o en placas recubiertas con quitosano acetilado. En la Fig. 76 se observa que las señales son mayores en el ELISA realizado en superficies de quitosano acetilado en comparación con la estándar.

Atendiendo al LOD calculado, 9,56 ng/ml para la superficie estándar y 2,45 ng/ml para la superficie de quitosano, se demuestra que hay un aumento de sensibilidad de 4 veces.

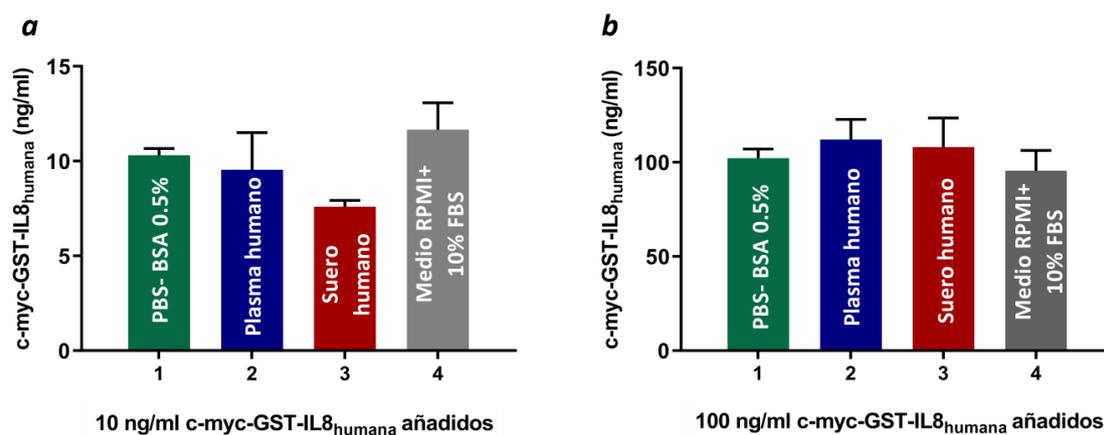


**Figura 76.** Curva sigmoideal 4PL obtenida del ELISA comparativo de detección de la proteína c-myc-GST-IL8h en superficies estándar y tratadas con quitosano acetilado.

#### 4.3.4.3. Influencia del tipo de muestras sobre el ELISA

Durante el desarrollo de un ELISA es necesario un ensayo de Proteína añadida/Recuperación (Spike/Recovery) para determinar si los valores de una muestra cuantificada mediante el ELISA son precisos y confiables y que no haya habido interferencias a casusa del medio natural de la muestra. En este ensayo, una cantidad conocida de la proteína recombinante c-myc-GST-IL8h es añadida a diferentes medios y cuantificada en las superficies preparadas con quitosano acetilado. Los resultados de la concentración medida mediante el ELISA no deberían de diferir significativamente del valor esperado de concentración. Si hubiese diferencias, estas podrían estar causadas por algún factor de la muestra que inhibe la detección de la proteína en este sistema.

La proteína fue añadida a muestras de plasma humano, de suero humano, de medio celular (RPMI suplementado con 10% de FBS) y de PBS-BSA 0,5% a una concentración final de 10 y 100 ng/ml. Posteriormente, la proteína fue cuantificada mediante ELISA usando una curva estándar. La concentración de la proteína preparada en PBS-BSA 0,5% fue considerada como el 100% de recuperación debido a que este es el tampón usado normalmente para desarrollar la curva estándar (Fig. 77 a y b). El rango de recuperación aceptado fue del 80-120% (*R&D Systems*).



**Figura 77.** Detección de la proteína c-myc-GST-IL8h en superficies tratadas con quitosano acetilado añadida a muestras biológicas humanas y medio de cultivo. **a.** Gráfico de barras de la concentración resultante de la proteína cuando fue añadida a una concentración final de 10 ng/ml. **b.** Gráfico de barras de la concentración resultante de la proteína cuando fue añadida a una concentración final de 100 ng/ml.

Como se observa en la Tabla 18 los porcentajes de recuperación se ajustan en todos los casos al rango de recuperación aceptado, excepto el porcentaje del 73% correspondiente a la concentración de 10 ng/ml de la proteína en suero humano. Estos resultados indican que las superficies preparadas con quitosano pueden ser utilizadas para la detección de proteínas en muestras de pacientes, así como en medios celulares con un alto porcentaje de suero fetal bovino.

**Tabla 18. Resultados de recuperación (en %) obtenido de cada muestra añadida en diferentes medios comparado con el control.**

Muestra	Concentración de proteína añadida (ng/ml)	Resultados cuantificación por ELISA (ng/ml)	% de recuperación
Plasma humano	10	9,54	92,54
	100	112,11	109,73
Suero humano	10	7,59	73,69
	100	108,00	105,70
Medio RPMI + 10% FBS	10	11,66	113,15
	100	95,53	93,50

#### **4.4. DISCUSIÓN**

La correcta orientación de los anticuerpos en las superficies donde se desarrollan los inmunoensayos reviste una gran importancia, ya que se ha demostrado que aumenta considerablemente la sensibilidad de detección. Por esta razón, se han realizado numerosas investigaciones de inmovilización orientada de anticuerpos a superficies basándose en la afinidad entre distintas moléculas (Welch *et al.*, 2017).

El quitosano es un compuesto de bajo coste ampliamente utilizado en diferentes aplicaciones entre las que se incluye la preparación de superficies (Wei, Cruz and Gorski, 2002). Para la regeneración de la quitina a partir de la acetilación del quitosano han sido realizados varios estudios. Bernard *et al.* (2004) prepararon superficies, a través de una acetilación *in situ* del quitosano, que permitieron detectar un análogo de la hormona glicoproteica heterodimérica humana fusionada con ChBD directamente de los medios de cultivo de células de mamíferos, detectando hasta una cantidad mínima de 100 picogramos totales de la proteína de fusión. Según estos investigadores, la detección de la proteína estuvo en el mismo rango que cuando se detectó la proteína usando placas de microtitulación recubiertas con anticuerpos de captura de alta afinidad (es decir,  $K_d > 5 \times 10^{-9} M$ ) y considerablemente mejor que cuando las placas de microtitulación habían sido recubiertas con anticuerpos de menor afinidad ( $K_d < 10^{-8} M$ ). En nuestro caso, usando las placas recubiertas con quitosano acetilado, fuimos capaces de detectar hasta 6,8 picogramos totales de la proteína Cys-His6-ChBD. La sensibilidad, en nuestro caso, fue 15 veces mayor. Sin embargo, este resultado puede ser debido a que nuestro dominio de unión a quitina no estaba fusionado a ninguna proteína, lo que puede mejorar su afinidad por la quitina, además de que el peso molecular es más bajo que la proteína de fusión que usaron estos investigadores. Asimismo, la preparación de las superficies optimizadas con un quitosano acetilado que tiene mejores rendimientos, el de caparazón de cangrejo, y el anticuerpo de revelado utilizado, que es de alta afinidad y está biotinilado, probablemente permitieron que el LOD fuese menor y que, por consiguiente, el ensayo fuera más sensible.

La unión entre ChBD y quitina es altamente estable en un amplio rango de pH. Incluso en dodecilsulfato de sodio, esta interacción solo se disocia parcialmente a pH bajo o en urea 8 M a 37 °C (Bernard *et al.*, 2004). Estos datos sugieren que la unión ChBD-quitina es útil y adecuada para el desarrollo de ELISAs en esas superficies preparadas.

En nuestro ensayo utilizamos superficies acetiladas no solo para detectar proteínas marcadas con ChBD, sino también para mejorar la detección de cualquier molécula mediante inmunoensayo. Los anticuerpos fusionados a ChBD nos permiten realizar cualquier tipo de

ELISA: sándwich, competitivo o directo. En contraste con esto, el método descrito por Bernard *et al.*, (2004) está restringido a analitos marcados con ChBD. Por otro lado, estos autores utilizaron lecturas radioactivas mediante el uso de anticuerpos monoclonales marcados radioactivamente, mientras que en este trabajo ha sido combinado el uso de las superficies de quitosano acetilado con ensayos enzimáticos colorimétricos.

Posteriormente, hemos mostrado que la unión del anticuerpo anti c-myc fusionado a ChBD, ya sea obtenido de forma recombinante o mediante química clic, se une de forma específica a superficies de quitosano acetilado. Cuando fue usado como tampón de reacción entre ChBD y su sustrato, uno de pH neutro o alcalino, se obtuvieron mejores resultados a pH más alto. Este resultado concuerda con los reportados por Hashimoto *et al.* (2000), que demostraron que ChBD de la quitinasa A1 muestra actividad de unión a la quitina en un amplio rango de pH, siendo la mejor condición a pH 9.

La inmovilización de los anticuerpos biotinilados a superficies recubiertas de estreptavidina como método de inmovilización de anticuerpos basado en la afinidad entre moléculas, no permite la orientación correcta de los anticuerpos debido a que el proceso de biotinilación es aleatorio donde generalmente la biotina se une al anticuerpo vía grupos NH<sub>2</sub> libres. La biotina puede unirse al grupo amino de cualquier lisina y también a un amino terminal: En consecuencia, es posible que el anticuerpo no esté correctamente orientado en la superficie. Sin embargo, la limitación más importante de este procedimiento es que generalmente se usan anticuerpos biotinilados como anticuerpos secundarios; es decir, anticuerpos que se usan para detectar el analito unido a un primer anticuerpo de recubrimiento. Cho *et al.* (2007) conjugaron anticuerpos a biotina vía reacción de la maleimida con los grupos disulfuro de la bisagra y detectó solo una mejora del doble en la detección del antígeno en relación con el sistema que usa la biotinilación aleatoria de anticuerpos.

Otra de las técnicas de inmovilización de anticuerpos sitio-específica, utiliza la afinidad de la región constante de los anticuerpos por la Proteína A (una proteína de membrana de *Streptococcus sp*) y la Proteína G (una proteína de membrana de *Staphylococcus aureus*) (Nilsson *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 2018). La inmovilización de anticuerpos utilizando microplacas recubiertas con proteína G es una técnica que, a pesar de haber sido comercializada, aún continúa en investigación para mejorar su sensibilidad. Chen *et al.* (2018) prepararon placas de ELISA recubiertas de células de mamífero que expresaban el dominio de unión al Fc de los anticuerpos de forma repetida en superficie, obteniendo un aumento de la sensibilidad hasta de 6,8 veces con respecto a las placas comerciales. Este método, a pesar de que permite una orientación adecuada de los anticuerpos y no es necesaria su modificación, tiene la desventaja

de que debe evitarse el uso de las IgG como anticuerpos secundarios, ya que cualquier proteína G libre reaccionará con dicha IgG secundaria. Este hecho es muy importante ya que la mayoría de los anticuerpos comerciales que se utilizan hoy en día en los ELISA son de isotipo IgG.

El ELISA realizado en nuestro sistema fue 6 veces más sensible que el realizado en superficies estándar cuando se utilizó como anticuerpo de captura un anticuerpo fusionado a ChBD de forma recombinante, y 4 veces más sensible cuando se utilizó el anticuerpo unido a ChBD químicamente. Estas diferencias pueden ser debidas a que el anticuerpo obtenido de forma recombinante tiene ChBD fusionado al Fc de la cadena pesada, mientras que el anticuerpo que se une químicamente a ChBD lo hace vía grupos  $\text{NH}_2$  libres del anticuerpo. Por tanto, el primer anticuerpo probablemente quedaría orientado en la superficie con sus sitios de unión al antígeno expuestos, mientras que, en el otro caso, el anticuerpo puede no estar orientado de forma correcta y la mejora de la sensibilidad sea debida solamente al aumento de la densidad del anticuerpo en la superficie y al no desplazamiento de este en los pasos de lavado. La literatura citada en este trabajo muestra que la unión a superficies de poliestireno de forma pasiva tiende a distorsionar algunos anticuerpos de captura lo suficiente como para perder su capacidad de detección de su antígeno (Butler, 2000). El método descrito aquí evita esa tendencia porque la unión a la superficie es por afinidad y no por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, por lo que la sensibilidad aumenta en cualquiera de los dos casos.

En este trabajo mostramos que un anticuerpo recombinante fusionado a ChBD por la región Fc sería un método excelente para lograr una orientación adecuada de anticuerpos en placas de ELISA, de forma similar a cuando estos son capturados con Proteína A o G. Este sistema, basado en la superficie de quitosano acetilado, tiene la ventaja adicional de que para la detección podrían usarse todos los isotipos de anticuerpos y/o cualquier anticuerpo biotinilado.

En resumen, los datos mostrados aquí sugieren que las superficies de quitosano acetilado mejoran la detección de biomarcadores incluso utilizando anticuerpos de baja afinidad. Este método tiene también la ventaja de que puede ser desarrollado para cualquier biomarcador y que, además, puede utilizar cualquier isotipo de anticuerpo en la detección. Por ello, este sistema podría utilizarse para cuantificar una muestra biológica que tenga una concentración por debajo del límite de detección del ELISA tradicional. Dado el aumento de la sensibilidad, la estabilidad en el tiempo y el bajo costo de su preparación, las superficies de quitosano acetilado pueden ser una excelente alternativa a las superficies estándar.

## **CONCLUSIONES**

1.- El uso de un sistema de inmovilización de anticuerpos, donde estos quedan fijados a la superficie a través de un enlace covalente entre la tetracina y el TCO, mejora significativamente la sensibilidad del ensayo ELISA.

2.- Las superficies previamente recubiertas con la proteína BSA marcada con 20 grupos tetracina por molécula, mejoraron la sensibilidad de los ELISA obteniéndose mejores resultados que con las superficies preparadas con tetracina, una vez aminadas por distintos métodos.

3.- El sistema basado en la afinidad entre la quitina y el ChBD, donde las superficies fueron preparadas con quitosano acetilado y el anticuerpo de captura se unió a ChBD, favoreció el aumento de la sensibilidad del ELISA probablemente debido a la correcta orientación de los anticuerpos en la superficie del ensayo.

4.- La detección inmunoenzimática de un miRNA amplificado por PCR usando un cebador de tipo stem-loop, produjo resultados que indicaban una alta especificidad y sensibilidad del ensayo atendiendo a su límite de detección.

5.- Es posible la detección de dos moléculas de distinta naturaleza, una proteína y un ácido nucleico, de forma simultánea en un único ensayo inmunoenzimático realizado sobre un soporte sólido.



## BIBLIOGRAFÍA

Adak, A. K. *et al.* (2014) 'Fabrication of antibody microarrays by light-induced covalent and oriented immobilization', *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(13), pp. 10452–10460. doi: 10.1021/am502011r.

Adamcova, M. and Šimko, F. (2018) 'Multiplex biomarker approach to cardiovascular diseases', *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), pp. 1068–1072. doi: 10.1038/aps.2018.29.

Ahmad, A. and Moore, E. (2012) 'Electrochemical immunosensor modified with self-assembled monolayer of 11-mercaptopundecanoic acid on gold electrodes for detection of benzo[a]pyrene in water', *Analyst*, 137(24), pp. 5839–5844. doi: 10.1039/c2an35236b.

Ahmed, S. *et al.* (2020) 'Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: a review', *Food and Agricultural Immunology*, 31(1), pp. 268–290. doi: 10.1080/09540105.2019.1707171.

Allinson, J. L. (2011) 'Automated immunoassay equipment platforms for analytical support of pharmaceutical and biopharmaceutical development.', *Bioanalysis*, 3(24), pp. 2803–2816. doi: 10.4155/bio.11.209.

Alves, N. J., Kiziltepe, T. and Bilgicer, B. (2012) 'Oriented surface immobilization of antibodies at the conserved nucleotide binding site for enhanced antigen detection', *Langmuir*, 28(25), pp. 9640–9648. doi: 10.1021/la301887s.

Arnau, J. *et al.* (2006) 'Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins', *Protein Expression and Purification*, 48(1), pp. 1–13. doi: 10.1016/j.pep.2005.12.002.

Arslan, M. and Tasdelen, M. A. (2019) 'Click Chemistry in Macromolecular Design: Complex Architectures from Functional Polymers', *Chemistry Africa*, 2(2), pp. 195–214. doi: 10.1007/s42250-018-0030-8.

Avlami, A. *et al.* (2010) 'Detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system', *Journal of Microbiological Methods*, 83(2), pp. 185–187. doi: 10.1016/j.mimet.2010.08.014.

Awaja, F. *et al.* (2009) 'Adhesion of polymers', *Progress in Polymer Science*, 34, pp. 948–968. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.007.

El Azab, I. H. *et al.* (2021) 'molecules New 1,2,3-Triazole-Containing Hybrids as Antitumor Candidates: Design, Click Reaction Synthesis, DFT Calculations, and Molecular Docking Study', *Molecules*, 26, p. 708. doi: 10.3390/molecules26030708.

Backen, A. C. *et al.* (2009) "'Fit-for-purpose" validation of SearchLight multiplex ELISAs of angiogenesis for clinical trial use', *Journal of Immunological Methods*, 342(1–2), pp. 106–114. doi:

10.1016/j.jim.2009.01.003.

Baio, J. E. *et al.* (2011) 'Probing orientation of immobilized humanized anti-lysozyme variable fragment by time-of-flight secondary-ion mass spectrometry', *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 97A(1), pp. 1–7. doi: 10.1002/jbm.a.33025.

Bartel, D. P. (2004) 'MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function', *Cell*, 116(2), pp. 281–297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.

Bastarache, J. A. *et al.* (2014) 'Validation of a multiplex electrochemiluminescent immunoassay platform in human and mouse samples', *Journal of Immunological Methods*, 408, pp. 13–23. doi: 10.1016/j.jim.2014.04.006.

Bates, R. M., Ballard, D. W. and Voss, E. W. (1985) 'Comparative properties of monoclonal antibodies comprising a high-affinity anti-fluorescyl idotype family', *Molecular Immunology*, 22(8), pp. 871–877. doi: 10.1016/0161-5890(85)90072-0.

Beaudet, L. *et al.* (2008) 'AlphaLisa immunoassays: the no-wash alternative to ELISAs for research and drug discovery', *Nature Methods*, 5, p. an8an9. Available at: <http://www.nature.com/naturemethods> (Accessed: 24 January 2021).

Beerli, R. R. *et al.* (2015) 'Sortase Enzyme-Mediated Generation of Site-Specifically Conjugated Antibody Drug Conjugates with High In Vitro and In Vivo Potency', *PLOS ONE*. Edited by C. E. Hagemeyer, 10(7), p. e0131177. doi: 10.1371/journal.pone.0131177.

Beifuss, B. *et al.* (2011) 'Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer', *Mycoses*, 54(2), pp. 137–145. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01771.x.

Bernard, M. P. *et al.* (2004) 'Tight attachment of chitin-binding-domain-tagged proteins to surfaces coated with acetylated chitosan', *Analytical Biochemistry*, 327(2), pp. 278–283. doi: 10.1016/j.ab.2003.12.029.

Bertolotti-Ciarlet, A. *et al.* (2009) 'Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to FcRn and Fcγ receptors', *Molecular Immunology*, 46(8–9), pp. 1878–1882. doi: 10.1016/j.molimm.2009.02.002.

Bilek, M. M. and McKenzie, D. R. (2010) 'Plasma modified surfaces for covalent immobilization of functional biomolecules in the absence of chemical linkers: Towards better biosensors and a new generation of medical implants', *Biophysical Reviews*, 2(2), pp. 55–65. doi: 10.1007/s12551-010-0028-1.

Billah, M. M. *et al.* (2010) 'Directed immobilization of reduced antibody fragments onto a novel SAM on gold for myoglobin impedance immunosensing', *Bioelectrochemistry*, 80(1), pp. 49–54. doi: 10.1016/j.bioelechem.2010.08.005.

Bonneau, E. *et al.* (2019) 'How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic

and therapeutic market', *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 30(2), pp. 114–127. Available at: /pmc/articles/PMC6599191/ (Accessed: 6 May 2021).

Brooker, A. D. M. *et al.* (2012) 'Acetylation of chitosan'. United States.

Broto, M. *et al.* (2017) 'A high throughput immunoassay for the therapeutic drug monitoring of tegafur', *Analyst*, 142(13), pp. 2404–2410. doi: 10.1039/c7an00418d.

van Brummelen, E. M. J. *et al.* (2017) 'BRAF Mutations as Predictive Biomarker for Response to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies', *The Oncologist*, 22(7), pp. 864–872. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0031.

Butler, J. E. (2000) 'Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays', *Methods*, 22(1), pp. 4–23. doi: 10.1006/meth.2000.1031.

Chen, X. *et al.* (2008) 'Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases', *Cell Research*, 18(10), pp. 997–1006. doi: 10.1038/cr.2008.282.

Chen, Y. J. *et al.* (2018) 'Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) through use of poly-protein G-expressing cell-based microplates', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-36192-8.

Chio, T. I. and Bane, S. L. (2020) 'Click Chemistry Conjugations', in *Methods in Molecular Biology*, pp. 83–97. doi: 10.1007/978-1-4939-9929-3\_6.

Cho, I. H. *et al.* (2007) 'Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces', *Analytical Biochemistry*, 365(1), pp. 14–23. doi: 10.1016/j.ab.2007.02.028.

Cinquanta, L., Fontana, D. E. and Bizzaro, N. (2017) 'Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?', *Autoimmunity Highlights*, 8(1). doi: 10.1007/s13317-017-0097-2.

Cook, D. B. *et al.* (2019) 'Multiplexing protein and gene level measurements on a single Luminex platform', *Methods*, 158, pp. 27–32. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.01.018.

Correia, C. N. *et al.* (2017) 'Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious disease', *Frontiers in Immunology*, p. 118. doi: 10.3389/fimmu.2017.00118.

Coutlée, F. *et al.* (1989) 'Immunodetection of DNA with biotinylated RNA probes: A study of reactivity of a monoclonal antibody to DNA-RNA hybrids', *Analytical Biochemistry*, 181(1), pp. 96–105. doi: 10.1016/0003-2697(89)90399-0.

Crivianu-Gaita, V. and Thompson, M. (2015) 'Immobilization of Fab' fragments onto substrate surfaces: A survey of methods and applications', *Biosensors and Bioelectronics*, 70, pp. 167–180. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.032.

- Dai, L. *et al.* (2015) 'Metal-Free Catalysts for Oxygen Reduction Reaction', *Chemical Reviews*, 115(11), pp. 4823–4892. doi: 10.1021/cr5003563.
- Damborska, D. *et al.* (2017) 'Nanomaterial-based biosensors for detection of prostate specific antigen', *Microchimica Acta*, 184(9), pp. 3049–3067. doi: 10.1007/s00604-017-2410-1.
- Dard-Dascot, C. *et al.* (2018) 'Systematic comparison of small RNA library preparation protocols for next-generation sequencing', *BMC Genomics*, 19(1). doi: 10.1186/s12864-018-4491-6.
- Das, R. D. *et al.* (2010) 'Optimization of covalent antibody immobilization on macroporous silicon solid supports', *Applied Surface Science*, 256(20), pp. 5867–5875. doi: 10.1016/j.apsusc.2010.03.066.
- Dave, V. P. *et al.* (2019) 'MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics', *Laboratory Investigation*, 99(4), pp. 452–469. doi: 10.1038/s41374-018-0143-3.
- Dellett, M. and Simpson, D. A. (2016) 'Considerations for optimization of microRNA PCR assays for molecular diagnosis', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 16(4), pp. 407–414. doi: 10.1586/14737159.2016.1152184.
- Devaraj, N. K., Weissleder, R. and Hilderbrand, S. A. (2008) 'Tetrazine-based cycloadditions: Application to pretargeted live cell imaging', *Bioconjugate Chemistry*, 19(12), pp. 2297–2299. doi: 10.1021/bc8004446.
- Diamos, A. G. *et al.* (2020) 'High Level Production of Monoclonal Antibodies Using an Optimized Plant Expression System', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, p. 472. doi: 10.3389/fbioe.2019.00472.
- Dinis-Oliveira, R. J. (2014) 'Heterogeneous and homogeneous immunoassays for drug analysis', *Bioanalysis*, 6(21), pp. 2877–2896. doi: 10.4155/bio.14.208.
- Dixit, C. K. *et al.* (2010) 'Development of a high sensitivity rapid sandwich ELISA procedure and its comparison with the conventional approach', *Analytical Chemistry*, 82(16), pp. 7049–7052. doi: 10.1021/ac101339q.
- Dixit, C. K. *et al.* (2011) 'Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays', *Nature Protocols*, 6(4), pp. 439–445. doi: 10.1038/nprot.2011.304.
- Dixit, C. K. (2011) *Surface Modification and Conjugation Strategies for Bioassay / Biomaterial Applications*.
- Dixit, C. K. and Twyman, R. M. (2019) 'Immunoassays | Clinical applications', in *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, pp. 8–14. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14430-0.
- Doroshov, D. B. *et al.* (2021) 'PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors', *Nature Reviews Clinical Oncology*, pp. 1–18. doi: 10.1038/s41571-021-00473-5.

- Duval, F., Van Beek, T. A. and Zuilhof, H. (2015) 'Key steps towards the oriented immobilization of antibodies using boronic acids', *Cite this: Analyst*, 140, p. 6467. doi: 10.1039/c5an00589b.
- Ehlers, J. E. *et al.* (2007) 'Theoretical study on mechanisms of the epoxy-amine curing reaction', *Macromolecules*, 40(12), pp. 4370–4377. doi: 10.1021/ma070423m.
- El-Khoury, V. *et al.* (2020) 'Identification of a blood-based protein biomarker panel for lung cancer detection', *Cancers*, 12(6), pp. 1–15. doi: 10.3390/cancers12061629.
- Engin, S. *et al.* (2010) 'Benzylguanine thiol self-assembled monolayers for the immobilization of snap-tag proteins on microcontact-printed surface structures', *Langmuir*, 26(9), pp. 6097–6101. doi: 10.1021/la904829y.
- Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) 'Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G', *Immunochemistry*, 8(9), pp. 871–874. doi: 10.1016/0019-2791(71)90454-X.
- Evan, G. I. *et al.* (1985) 'Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product.', *Molecular and Cellular Biology*, 5(12), pp. 3610–3616. doi: 10.1128/mcb.5.12.3610.
- Fabbri, P. and Messori, M. (2017) 'Surface Modification of Polymers: Chemical, Physical, and Biological Routes', in *Modification of Polymer Properties*. Elsevier Inc., pp. 109–130. doi: 10.1016/B978-0-323-44353-1.00005-1.
- Fang, L. L. *et al.* (2017) 'Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review)', *International Journal of Molecular Medicine*, 40(6), pp. 1624–1630. doi: 10.3892/ijmm.2017.3164.
- Faraoni, I. *et al.* (2009) 'miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792(6), pp. 497–505. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.02.013.
- Finetti, C. *et al.* (2016) 'Click Chemistry Immobilization of Antibodies on Polymer Coated Gold Nanoparticles', *Langmuir*, 32(29), pp. 7435–7441. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b01142.
- Frazer, J. and Capra, J. (1998) *Immunoglobulins: Structure and Function*, in *Fundamental*. N-Y. LWEW. Paul, W.
- Fuchs, S. M. and Raines, R. T. (2009) 'Polyarginine as a multifunctional fusion tag', *Protein Science*, 14(6), pp. 1538–1544. doi: 10.1110/ps.051393805.
- Funari, R. *et al.* (2016) 'Single Molecule Characterization of UV-Activated Antibodies on Gold by Atomic Force Microscopy', *Langmuir*, 32(32), pp. 8084–8091. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b02218.
- Gao, D. *et al.* (2006) 'Fabrication of antibody arrays using thermally responsive elastin fusion proteins', *Journal of the American Chemical Society*, 128(3), pp. 676–677. doi: 10.1021/ja056364e.
- Gao, Y. *et al.* (2018) 'A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays', *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 39(4), pp. 351–364. doi:

10.1080/15321819.2018.1515775.

García, M. F. *et al.* (2018) 'Synthesis of hydrophilic HYNIC-[1,2,4,5]tetrazine conjugates and their use in antibody pretargeting with <sup>99m</sup>Tc', *Organic and Biomolecular Chemistry*, 16(29), pp. 5275–5285. doi: 10.1039/c8ob01255e.

Gauvreau, V. *et al.* (2004) 'Engineering surfaces for bioconjugation: Developing strategies and quantifying the extent of the reactions', *Bioconjugate Chemistry*, 15(5), pp. 1146–1156. doi: 10.1021/bc049858u.

Ge, X. *et al.* (2014) 'Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 58, pp. 31–39. doi: 10.1016/j.trac.2014.03.008.

Gill, P. *et al.* (2008) 'Detection of four  $\beta$ -thalassemia point mutations in Iranians using a PCR-ELISA genotyping system', *Molecular and Cellular Probes*, 22(2), pp. 103–109. doi: 10.1016/j.mcp.2007.10.001.

Gion, M., Trevisiol, C. and Fabricio, A. S. C. (2020) 'State of the art and trends of circulating cancer biomarkers', *International Journal of Biological Markers*, 35(1\_suppl), pp. 12–15. doi: 10.1177/1724600819900512.

Goddard, J. M. and Hotchkiss, J. H. (2007) 'Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds', *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 32(7), pp. 698–725. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002.

Gunda, N. S. K. *et al.* (2014) 'Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker', *Applied Surface Science*, 305, pp. 522–530. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.03.130.

Hadrich, I. *et al.* (2010) 'Comparison of PCR-ELISA and Real-Time PCR for invasive aspergillosis diagnosis in patients with hematological malignancies', *Medical Mycology*, 49(5), pp. 1–6. doi: 10.3109/13693786.2010.540724.

Hasan, A. and Pandey, L. M. (2015) 'Review: Polymers, Surface-Modified Polymers, and Self Assembled Monolayers as Surface-Modifying Agents for Biomaterials', *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 54(13), pp. 1358–1378. doi: 10.1080/03602559.2015.1021488.

Hashimoto, M. *et al.* (2000) 'Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12', *Journal of Bacteriology*, 182(11), pp. 3045–3054. doi: 10.1128/JB.182.11.3045-3054.2000.

Hayes, J., Peruzzi, P. P. and Lawler, S. (2014) 'MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy', *Trends in Molecular Medicine*, 20(8), pp. 460–469. doi: 10.1016/j.molmed.2014.06.005.

Heinrich, L. *et al.* (2010) 'Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity', *Journal of Immunological Methods*, 352(1–2), pp. 13–22. doi: 10.1016/j.jim.2009.10.002.

Henry, N. L. and Hayes, D. F. (2012) 'Cancer biomarkers', *Molecular Oncology*, 6(2), pp. 140–146. doi: 10.1016/j.molonc.2012.01.010.

Hermanson, G. T. (2013) *Bioconjugate Techniques: Third Edition*, *Bioconjugate Techniques: Third Edition*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/C2009-0-64240-9.

Hilpert, K. *et al.* (2001) 'Anti-c-myc antibody 9E10: Epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose', *Protein Engineering*, 14(10), pp. 803–806. doi: 10.1093/protein/14.10.803.

Hochuli, E. *et al.* (1988) 'Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent', *Bio/Technology*, 6(11), pp. 1321–1325. doi: 10.1038/nbt1188-1321.

Holmberg, A. *et al.* (2005) 'The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures', *Electrophoresis*, 26(3), pp. 501–510. doi: 10.1002/elps.200410070.

Hortigüela, M. J. *et al.* (2015) 'Engineering recombinant antibodies for polymer biofunctionalization', *Polymers for Advanced Technologies*, 26(12), pp. 1394–1401. doi: 10.1002/pat.3619.

Hortigüela, M. J. and Wall, J. G. (2013) 'Improved detection of domoic acid using covalently immobilised antibody fragments', *Marine Drugs*, 11(3), pp. 881–895. doi: 10.3390/md11030881.

Hou, C. *et al.* (2016) 'Donor/acceptor nanoparticle pair-based singlet oxygen channeling homogenous chemiluminescence immunoassay for quantitative determination of bisphenol A', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(30), pp. 8795–8804. doi: 10.1007/s00216-016-9584-y.

Hunt, E. A. *et al.* (2015) 'MicroRNA Detection: Current Technology and Research Strategies', *Annual Review of Analytical Chemistry*, 8, pp. 217–237. doi: 10.1146/annurev-anchem-071114-040343.

Iijima, M. *et al.* (2013) 'Nanocapsule-based probe for evaluating the orientation of antibodies immobilized on a solid phase', *Analyst*, 138(12), pp. 3470–3477. doi: 10.1039/c3an00481c.

Ikeda, T. *et al.* (2009) 'Oriented immobilization of antibodies on a silicon wafer using Si-tagged protein A', *Analytical Biochemistry*, 385(1), pp. 132–137. doi: 10.1016/j.ab.2008.11.001.

*Immunoassay Market by Product & Service. Global Forecast to 2023 : MarketsandMarkets* (no date). Available at: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/immunoassay-market-436.html> (Accessed: 11 March 2021).

Ismail, N. F. and Lim, T. S. (2016) 'Site-specific scFv labelling with invertase via Sortase A mechanism as a platform for antibody-antigen detection using the personal glucose meter', *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep19338.

Iwasaki, Y., Omichi, Y. and Iwata, R. (2008) 'Site-specific dense immobilization of antibody fragments on polymer brushes supported by silicone nanofilaments', *Langmuir*, 24(16), pp. 8427–8430. doi: 10.1021/la801327a.

- Jason-Moller, L., Murphy, M. and Bruno, J. A. (2006) 'Overview of Biacore systems and their applications.', *Current protocols in protein science*, Chapter 19. doi: 10.1002/0471140864.ps1913s45.
- Jazayeri, M. H. *et al.* (2016) 'Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies', *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9, pp. 17–22. doi: 10.1016/j.sbsr.2016.04.002.
- Jewett, J. C. and Bertozzi, C. R. (2010) 'Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology', *Chemical Society Reviews*, 39(4), pp. 1272–1279. doi: 10.1039/b901970g.
- Ji, J. A. *et al.* (2009) 'Methionine, tryptophan, and histidine oxidation in a model protein, PTH: Mechanisms and stabilization', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(12), pp. 4485–4500. doi: 10.1002/jps.21746.
- Jiang, X. *et al.* (2019) 'Recent applications of click chemistry in drug discovery', *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(8), pp. 779–789. doi: 10.1080/17460441.2019.1614910.
- Jouybari, R. M. *et al.* (2018) 'Production of recombinant streptavidin and optimization of refolding conditions for recovery of biological activity', *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 6(2), pp. 178–185. Available at: [www.RBMB.net](http://www.RBMB.net) (Accessed: 20 February 2021).
- De Juan-Franco, E. *et al.* (2013) 'Site-directed antibody immobilization using a protein A-gold binding domain fusion protein for enhanced SPR immunosensing', *Analyst*, 138(7), pp. 2023–2031. doi: 10.1039/c3an36498d.
- Jung, Y., Jeong, J. Y. and Chung, B. H. (2008) 'Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports', *Analyst*, 133(6), pp. 697–701. doi: 10.1039/b800014j.
- Kamra, T. *et al.* (2016) 'Covalent immobilization of molecularly imprinted polymer nanoparticles on a gold surface using carbodiimide coupling for chemical sensing', *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, 461, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.jcis.2015.09.009.
- Kang, K., Park, J. and Kim, E. (2017) 'Tetrazine ligation for chemical proteomics', *Proteome Science*, 15(1). doi: 10.1186/s12953-017-0121-5.
- Kappel, A. *et al.* (2015) 'MicroRNA in vitro diagnostics using immunoassay analyzers', *Clinical Chemistry*, 61(4), pp. 600–607. doi: 10.1373/clinchem.2014.232165.
- Kappel, A. and Keller, A. (2017) 'MiRNA assays in the clinical laboratory: Workflow, detection technologies and automation aspects', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(5), pp. 636–647. doi: 10.1515/cclm-2016-0467.
- Karaman, M. *et al.* (2016) 'Chemical and Physical Modification of Surfaces', in *Surface Treatments for Biological, Chemical, and Physical Applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 23–66. doi: 10.1002/9783527698813.ch2.
- Karle, M. *et al.* (2016) 'Microfluidic solutions enabling continuous processing and monitoring of biological samples: A review', *Analytica Chimica Acta*, 929, pp. 1–22. doi: 10.1016/j.aca.2016.04.055.

- Karyakin, A. A. *et al.* (2000) 'Oriented immobilization of antibodies onto the gold surfaces via their native thiol groups', *Analytical Chemistry*, 72(16), pp. 3805–3811. doi: 10.1021/ac9907890.
- Kausaite-Minkstimiene, A. *et al.* (2010) 'Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor', *Analytical Chemistry*, 82(15), pp. 6401–6408. doi: 10.1021/ac100468k.
- Kim, E. and Koo, H. (2019) 'Biomedical applications of copper-free click chemistry:: In vitro, in vivo, and ex vivo', *Chemical Science*, 10(34), pp. 7835–7851. doi: 10.1039/c9sc03368h.
- Kobets, T. *et al.* (2010) 'Leishmania parasite detection and quantification using PCR-ELISA', *Nature Protocols*, 5(6), pp. 1074–1080. doi: 10.1038/nprot.2010.68.
- Kochanowski, B. *et al.* (2003) 'Quantifying Amplicons with ELISA', in *Quantitative PCR Protocols*. Humana Press, pp. 157–170. doi: 10.1385/0-89603-518-2:157.
- Kolb, H. C., Finn, M. G. and Sharpless, K. B. (2001) 'Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions', *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11), pp. 2004–2021. doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::aid-anie2004>3.3.co;2-x.
- Kolenko, P. *et al.* (2009) 'New insights into intra- and intermolecular interactions of immunoglobulins: Crystal structure of mouse IgG2b-Fc at 2.1-Å resolution', *Immunology*, 126(3), pp. 378–385. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02904.x.
- Krepelkova, I. *et al.* (2019) 'Evaluation of miRNA detection methods for the analytical characteristics necessary for clinical utilization', *BioTechniques*, 66(6), pp. 277–284. doi: 10.2144/btn-2019-0021.
- Kumada, Y. *et al.* (2010) 'Characterization of polystyrene-binding peptides (PS-tags) for site-specific immobilization of proteins', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(6), pp. 583–587. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.11.005.
- Kumada, Y. *et al.* (2012) 'Screening of PC and PMMA-binding peptides for site-specific immobilization of proteins', *Journal of Biotechnology*, 160(3–4), pp. 222–228. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.02.010.
- Kuramitz, H. (2009) 'Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(1), pp. 61–69. doi: 10.1007/s00216-009-2650-y.
- Kurupati, P., Kumarasinghe, G. and Laa Poh, C. (2005) 'Direct identification of *Pseudomonas aeruginosa* from blood culture bottles by PCR-enzyme linked immunosorbent assay using oprI gene specific primers', *Molecular and Cellular Probes*, 19(6), pp. 417–421. doi: 10.1016/j.mcp.2005.07.005.
- Kwon, Y. *et al.* (2004) 'Antibody arrays prepared by cutinase-mediated immobilization on self-assembled monolayers', *Analytical Chemistry*, 76(19), pp. 5713–5720. doi: 10.1021/ac049731y.
- Langmuir, I. (1918) 'The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum', *Journal of the American Chemical Society*, 40(9), pp. 1361–1403. doi: 10.1021/ja02242a004.

- Lebec, V. *et al.* (2013) 'Probing the orientation of  $\beta$ -lactoglobulin on gold surfaces modified by alkyl thiol self-assembled monolayers', *Journal of Physical Chemistry C*, 117(22), pp. 11569–11577. doi: 10.1021/jp311964g.
- Lee, A. N. and Kennedy, I. R. (2007) 'Immunoassays', in *Food Toxicants Analysis*. Elsevier, pp. 91–145. doi: 10.1016/B978-044452843-8/50006-7.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993) 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75(5), pp. 843–854. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- Lewkowich, I. P., Campbell, J. D. and HayGlass, K. T. (2001) 'Comparison of chemiluminescent assays and colorimetric ELISAs for quantification of murine IL-12, human IL-4 and murine IL-4: Chemiluminescent substrates provide markedly enhanced sensitivity', *Journal of Immunological Methods*, 247(1–2), pp. 111–118. doi: 10.1016/S0022-1759(00)00306-9.
- Li, J. H. *et al.* (2017) 'MiR-205 as a promising biomarker in the diagnosis and prognosis of lung cancer', *Oncotarget*, 8(54), pp. 91938–91949. doi: 10.18632/oncotarget.20262.
- Li, L. *et al.* (2016) 'The Diagnostic Efficacy and Biological Effects of microRNA-29b for Colon Cancer', *Technology in Cancer Research and Treatment*, 15(6), pp. 772–779. doi: 10.1177/1533034615604797.
- Li, L. and Zhang, Z. (2016) 'Development and applications of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) as a bioorthogonal reaction', *Molecules*, 21(10). doi: 10.3390/molecules21101393.
- Lim, S. A. and Ahmed, M. U. (2015) 'A carbon nanofiber-based label free immunosensor for high sensitive detection of recombinant bovine somatotropin', *Biosensors and Bioelectronics*, 70, pp. 48–53. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.022.
- Lindner, P. *et al.* (2002) 'Chitin binding domains for immobilizing antibody fragments in immunaffinity chromatography', *EUCHIS'02, 5th International Conference of the European Chitin Society*, VI(May 2014), pp. 261–262. Available at: <http://www.unizh.ch/~pluckth/publications/pdf/APpub0229.pdf>.
- Liu, H. and May, K. (2012) 'Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function', *mAbs*, 4(1), pp. 17–23. doi: 10.4161/mabs.4.1.18347.
- Liu, X. *et al.* (2018) 'MicroRNA-29a functions as a tumor suppressor and increases cisplatin sensitivity by targeting NRAS in lung cancer', *Technology in Cancer Research and Treatment*, 17. doi: 10.1177/1533033818758905.
- Lorenson, M. Y., Chen, K. H. E. and Walker, A. M. (2019) 'Enzyme-linked oligonucleotide hybridization assay for direct oligo measurement in blood', *Biology Methods and Protocols*, 4(1), pp. 1–8. doi: 10.1093/biomethods/bpy014.

Marrugo-Ramírez, J., Mir, M. and Samitier, J. (2018) 'Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). doi: 10.3390/ijms19102877.

Maruani, A. *et al.* (2015) 'A plug-and-play approach to antibody-based therapeutics via a chemoselective dual click strategy', *Nature Communications*, 6. doi: 10.1038/ncomms7645.

Matsuno, H. *et al.* (2008) 'Biological selection of peptides for poly(L-lactide) substrates', *Langmuir*, 24(13), pp. 6399–6403. doi: 10.1021/la800844z.

Medeiros, F. A. C. *et al.* (2017) 'Development and Validation of a PCR-ELISA for the Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Infection by Leishmania (Leishmania) infantum', *Journal of Tropical Medicine*, 2017. doi: 10.1155/2017/7364854.

Miyao, H. *et al.* (2015) 'Immobilization of immunoglobulin-G-binding domain of Protein A on a gold surface modified with biotin ligase', *Analytical Biochemistry*, 484, pp. 113–121. doi: 10.1016/j.ab.2015.05.010.

Mohammed, M. I. and Desmulliez, M. P. Y. (2011) 'Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: A review', *Lab on a Chip*, 11(4), pp. 569–595. doi: 10.1039/c0lc00204f.

Moody, L. *et al.* (2017) 'Methods and novel technology for microRNA quantification in colorectal cancer screening', *Clinical epigenetics*. *Clinical Epigenetics*, 9, p. 119. doi: 10.1186/s13148-017-0420-9.

Mushtaq, S., Yun, S. J. and Jeon, J. (2019) 'Recent advances in bioorthogonal click chemistry for efficient synthesis of radiotracers and radiopharmaceuticals', *Molecules*, 24(19). doi: 10.3390/molecules24193567.

Nilsson, B. *et al.* (1987) 'A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein a', *Protein Engineering, Design and Selection*. *Protein Eng*, 1(2), pp. 107–113. doi: 10.1093/protein/1.2.107.

Nogi, T. *et al.* (2008) 'Novel affinity tag system using structurally defined antibody-tag interaction: Application to single-step protein purification', *Protein Science*, 17(12), pp. 2120–2126. doi: 10.1110/ps.038299.108.

Obenauer-Kutner, L. J. *et al.* (1997) 'A highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay for interferon alfa-2b in human serum', *Journal of Immunological Methods*, 206(1–2), pp. 25–33. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00081-1.

Oliveira, B. L., Guo, Z. and Bernardes, G. J. L. (2017) 'Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology', *Chemical Society Reviews*, 46(16), pp. 4895–4950. doi: 10.1039/c7cs00184c.

Palermo, F. A. *et al.* (2012) 'PCR-ELISA detection of estrogen receptor  $\beta$  mRNA expression and plasma vitellogenin induction in juvenile sole (*Solea solea*) exposed to waterborne 4-nonylphenol', *Chemosphere*, 86(9), pp. 919–925. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.10.058.

- Pande, J., Szewczyk, M. M. and Grover, A. K. (2010) 'Phage display: Concept, innovations, applications and future', *Biotechnology Advances*, 28(6), pp. 849–858. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.004.
- Park, K. *et al.* (2009) 'Application of a Diagnostic Method Using Reverse Transcription-PCR ELISA for the Diagnosis of Enteroviral Infections', *Annals of Laboratory Medicine*, 29(6), pp. 594–600. doi: 10.3343/kjlm.2009.29.6.594.
- Perea, A. *et al.* (2019) 'Accelerating high-throughput screening with FirePlex<sup>®</sup>-HT: An automatable, multiplex immunoassay using FirePlex<sup>®</sup> Particle Technology'. Abcam.
- Petrovas, C., Daskas, S. M. and Lianidou, E. S. (1999) 'Determination of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in serum by a highly sensitive enzyme amplified lanthanide luminescence immunoassay', *Clinical Biochemistry*, 32(4), pp. 241–247. doi: 10.1016/S0009-9120(99)00004-1.
- Di Pinto, A. *et al.* (2012) 'Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay', *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), pp. 494–498. doi: 10.1111/j.1472-765X.2012.03231.x.
- Del Prado, A. *et al.* (2012) 'Transparent polystyrene substrates with controllable surface chlorosulfonation: Stable, versatile, and water-compatible precursors for functionalization', *Macromolecules*, 45(6), pp. 2648–2653. doi: 10.1021/ma300283d.
- Pumannova, M. *et al.* (2006) 'Comparison of quantitative competitive polymerase chain reaction - Enzyme-linked immunosorbent assay with LightCycler-based polymerase chain reaction for measuring cytomegalovirus DNA in patients after hematopoietic stem cell transplantation', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54(2), pp. 115–120. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.08.021.
- Rahim, M. K. *et al.* (2013) 'Bioorthogonal chemistries for nanomaterial conjugation and targeting', *Nanotechnology Reviews*, 2(2), pp. 215–227. doi: 10.1515/ntrev-2012-0083.
- Raji, N. *et al.* (2011) 'Detection of human papillomavirus 18 in cervical cancer samples using PCR-ELISA (DIAPOPS)', *Iranian Journal of Microbiology*, 3(4), pp. 177–182. Available at: /pmc/articles/PMC3330180/ (Accessed: 6 March 2021).
- Ranjan, R., Esimbekova, E. N. and Kratasyuk, V. A. (2017) 'Rapid biosensing tools for cancer biomarkers', *Biosensors and Bioelectronics*, 87, pp. 918–930. doi: 10.1016/j.bios.2016.09.061.
- Rautio, J. *et al.* (2003) 'Sandwich hybridisation assay for quantitative detection of yeast RNAs in crude cell lysates', *Microbial Cell Factories*, 2(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/1475-2859-2-4.
- Reinecke, H., Navarro, R. and Briz Iceta, N. (2010) 'Preparation of functionalized surfaces of polystyrene substrates'. España.
- Reulen, S. W. A. *et al.* (2009) 'Efficient, chemoselective synthesis of immunomicelles using single-domain antibodies with a C-terminal thioester.', *BMC biotechnology*, 9(1), p. 66. doi: 10.1186/1472-6750-9-66.
- Rossin, R. *et al.* (2010) 'In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice', *Angewandte*

- Chemie - International Edition*, 49(19), pp. 3375–3378. doi: 10.1002/anie.200906294.
- Salfeld, J. G. (2007) 'Isotype selection in antibody engineering', *Nature Biotechnology*, 25(12), pp. 1369–1372. doi: 10.1038/nbt1207-1369.
- Samineni, S. *et al.* (2006) 'Optimization, comparison, and application of colorimetric vs. chemiluminescence based indirect sandwich ELISA for measurement of human IL-23', *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27(2), pp. 183–193. doi: 10.1080/15321810600573051.
- Santanam, U. *et al.* (2010) 'Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), pp. 12210–12215. doi: 10.1073/pnas.1007186107.
- Santos, N. *et al.* (2008) 'Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes', *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), pp. 462–469. doi: 10.1128/JCM.01361-07.
- Schmittgen, T. D. *et al.* (2008) 'Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA', *Methods*, 44(1), pp. 31–38. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.09.006.
- Schützle, H. *et al.* (2008) 'Diagnostic performance of a rapid antigen test for RSV in comparison with a 19-valent multiplex RT-PCR ELISA in children with acute respiratory tract infections', *European Journal of Pediatrics*, 167(7), pp. 745–749. doi: 10.1007/s00431-007-0581-1.
- Seo, D. J. *et al.* (2012) 'Detecting Hepatitis E Virus with a Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Enzyme-Linked Immunosorbent Assay', *Food and Environmental Virology*, 4(1), pp. 14–20. doi: 10.1007/s12560-011-9073-6.
- Seo, J. S., Lee, S. and Poulter, C. D. (2013) 'Regioselective covalent immobilization of recombinant antibody-binding proteins A, G, and L for construction of antibody arrays', *Journal of the American Chemical Society*, 135(24), pp. 8973–8980. doi: 10.1021/ja402447g.
- Sharma, H. and Mutharasan, R. (2013) 'Half antibody fragments improve biosensor sensitivity without loss of selectivity', *Analytical Chemistry*, 85(4), pp. 2472–2477. doi: 10.1021/ac3035426.
- Shen, M., Rusling, J. F. and Dixit, C. K. (2017) 'Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnosics development', *Methods*, 116, pp. 95–111. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.11.010.
- Siddiqui, J. and Remick, D. G. (2003) 'Improved sensitivity of colorimetric compared to chemiluminescence ELISAs for cytokine assays', *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 24(3), pp. 273–283. doi: 10.1081/IAS-120022937.
- Sletten, E. M. and Bertozzi, C. R. (2009) 'Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality', *Angewandte Chemie - International Edition*, pp. 6974–6998. doi: 10.1002/anie.200900942.

- Srivastava, K. and Srivastava, A. (2012) 'Comprehensive Review of Genetic Association Studies and Meta-Analyses on miRNA Polymorphisms and Cancer Risk', *PLoS ONE*. Edited by L. J. de Windt, 7(11), p. e50966. doi: 10.1371/journal.pone.0050966.
- St-Louis, M. (2009) 'PCR-ELISA for high-throughput blood group genotyping', *Methods in Molecular Biology*, 496, pp. 3–13. doi: 10.1007/978-1-59745-553-4\_1.
- Stejskal, D. *et al.* (2019) 'Comparison of a new immunoassay and PCR-based method for quantification of microRNAs in whole blood. A pilot methodical study', *Biomedical Papers*, 163(1), pp. 39–44. doi: 10.5507/bp.2018.080.
- Studentsov, Y. Y. *et al.* (2002) 'Enhanced enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus', *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), pp. 1755–1760. doi: 10.1128/JCM.40.5.1755-1760.2002.
- Svalova, T. S. *et al.* (2020) 'A label-free impedimetric immunosensor based on covalent immobilization of anti-E. Coli antibody via a copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(21), pp. 5077–5087. doi: 10.1007/s00216-019-02381-1.
- Tahk, H. *et al.* (2011) 'Development of duplex RT-PCR-ELISA for the simultaneous detection of hepatitis A virus and hepatitis E virus', *Journal of Virological Methods*, 175(1), pp. 137–140. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.04.030.
- Tang, J. B. *et al.* (2013) 'Well-oriented ZZ-PS-tag with high Fc-binding onto polystyrene surface for controlled immobilization of capture antibodies', *Analytica Chimica Acta*, 776, pp. 74–78. doi: 10.1016/j.aca.2013.03.017.
- Terpe, K. (2003) 'MINIREVIEW Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems', *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, pp. 523–533. doi: 10.1007/s00253-002-1158-6.
- Thillaivinayagalingam, P. *et al.* (2010) 'Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors', *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(2), pp. 149–153. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.08.040.
- Thissen, H. (2016) 'Plasma-based surface modification for the control of biointerfacial interactions', in *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*. Elsevier Inc., pp. 129–144. doi: 10.1016/B978-1-78242-105-4.00005-5.
- Tighe, P. *et al.* (2013) 'Utility, reliability and reproducibility of immunoassay multiplex kits', *Methods*, 61(1), pp. 23–29. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.01.003.
- Tighe, P. J. *et al.* (2015) 'ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls', *Proteomics - Clinical Applications*, 9(3–4), pp. 406–422. doi: 10.1002/prca.201400130.
- Trilling, A. K., Beekwilder, J. and Zuilhof, H. (2013) 'Antibody orientation on biosensor surfaces: A

- minireview', *Analyst*, 138(6), pp. 1619–1627. doi: 10.1039/c2an36787d.
- Turner, A. P. F. (2013) 'Biosensors: Sense and sensibility', *Chemical Society Reviews*, 42(8), pp. 3184–3196. doi: 10.1039/c3cs35528d.
- Vashist, S. K. *et al.* (2012) 'Nanotechnology-Based Biosensors and Diagnostics: Technology Push versus Industrial/Healthcare Requirements', *BioNanoScience*, 2(3), pp. 115–126. doi: 10.1007/s12668-012-0047-4.
- Vashist, S. K. *et al.* (2014) 'Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics', *Chemical Reviews*, 114(21), pp. 11083–11130. doi: 10.1021/cr5000943.
- Vashist, S. K. and Luong, J. H. T. (2016) 'Trends in in vitro diagnostics and mobile healthcare', *Biotechnology Advances*, 34(3), pp. 137–138. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.03.007.
- Vashist, S. K. and Luong, J. H. T. (2018a) 'Antibody immobilization and surface functionalization chemistries for immunodiagnosics', in *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications*. Elsevier, pp. 19–46. doi: 10.1016/B978-0-12-811762-0.00002-5.
- Vashist, S. K. and Luong, J. H. T. (2018b) 'Immunoassays: An overview', in *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications*. Elsevier, pp. 1–18. doi: 10.1016/B978-0-12-811762-0.00001-3.
- Vashist, S. K. and Vashist, P. (2011) 'Recent advances in quartz crystal microbalance-based sensors', *Journal of Sensors*, 2011, pp. 1–13. doi: 10.1155/2011/571405.
- Vivot, A. *et al.* (2017) 'Evidence for Treatment-by-Biomarker interaction for FDA-approved Oncology Drugs with Required Pharmacogenomic Biomarker Testing', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-017-07358-7.
- Walter, F. M. *et al.* (2019) 'Evaluating diagnostic strategies for early detection of cancer: The CanTest framework', *BMC Cancer*, 19(1), p. 586. doi: 10.1186/s12885-019-5746-6.
- Wang, B. and Xi, Y. (2013) 'Challenges for MicroRNA Microarray Data Analysis', *Microarrays*, 2(2), pp. 34–50. doi: 10.3390/microarrays2020034.
- Wang, C., Lakshmipriya, T. and Gopinath, S. C. B. (2019) 'Amine-Aldehyde Chemical Conjugation on a Potassium Hydroxide-Treated Polystyrene ELISA Surface for Nanosensing an HIV-p24 Antigen', *Nanoscale Research Letters*. *Nanoscale Research Letters*, 14. doi: 10.1186/s11671-018-2848-z.
- Wang, D. *et al.* (2018) 'A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes', *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, pp. 863–868. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.122.
- Wang, J., Chen, J. and Sen, S. (2016) 'MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics', *Journal of Cellular Physiology*, pp. 25–30. doi: 10.1002/jcp.25056.

- Wang, Q. *et al.* (2003) 'Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition', *Journal of the American Chemical Society*, 125(11), pp. 3192–3193. doi: 10.1021/ja021381e.
- Weber, J. A. *et al.* (2010) 'The microRNA spectrum in 12 body fluids', *Clinical Chemistry*, 56(11), pp. 1733–1741. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.
- Wei, X., Cruz, J. and Gorski, W. (2002) 'Integration of enzymes and electrodes: Spectroscopic and electrochemical studies of chitosan - Enzyme films', *Analytical Chemistry*, 74(19), pp. 5039–5046. doi: 10.1021/ac020216e.
- Welch, N. G. *et al.* (2016) 'High-Throughput Production of Chromium(III) Complexes for Antibody Immobilization', *Analytical Chemistry*, 88(20), pp. 10102–10110. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02531.
- Welch, N. G., Scoble, J. A., *et al.* (2017) 'Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review)', *Biointerphases*, 12(2), p. 02D301. doi: 10.1116/1.4978435.
- Welch, N. G., Lebot, C. J., *et al.* (2017) 'Polypropylene microtitre plates modified with [Cr(OH)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> – for enhanced ELISA sensitivity', *Journal of Immunological Methods*, 446, pp. 70–73. doi: 10.1016/j.jim.2017.03.015.
- Whitlow, M. *et al.* (1995) '1.85 Å structure of anti-fluorescein 4-4-20 Fab', *Protein Engineering, Design and Selection*, 8(8), pp. 749–761. doi: 10.1093/protein/8.8.749.
- Wild, D. and Kodak, E. (2013) *The Immunoassay Handbook, The Immunoassay Handbook*. doi: 10.1016/C2010-0-66244-4.
- Witte, M. D. *et al.* (2012) 'Preparation of unnatural N-to-N and C-to-C protein fusions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(30), pp. 11993–11998. doi: 10.1073/pnas.1205427109.
- Workowski, K. A. and Bolan, G. A. (2015) 'Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015', *MMWR Recommendations and Reports*, 64(3), pp. 1–138. doi: 10.1097/00019048-200206000-00012.
- Xu, H., Lu, J. R. and Williams, D. E. (2006) 'Effect of surface packing density of interfacially adsorbed monoclonal antibody on the binding of hormonal antigen human chorionic gonadotrophin', *Journal of Physical Chemistry B*, 110(4), pp. 1907–1914. doi: 10.1021/jp0538161.
- Yalow, R. S. and Berson, S. A. (1960) 'Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.', *The Journal of clinical investigation*, 39(7), pp. 1157–1175. doi: 10.1172/JCI104130.
- Yanaihara, N. *et al.* (2006) 'Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis', *Cancer Cell*, 9(3), pp. 189–198. doi: 10.1016/j.ccr.2006.01.025.
- Yang, Z. *et al.* (2013) 'Characterization of three amino-functionalized surfaces and evaluation of antibody immobilization for the multiplex detection of tumor markers involved in colorectal cancer', *Langmuir*, 29(5), pp. 1498–1509. doi: 10.1021/la3041055.

Yoo, E. M. *et al.* (2002) 'Myeloma expression systems', *Journal of Immunological Methods*, 261(1–2), pp. 1–20. doi: 10.1016/s0022-1759(01)00559-2.

Zhang, R. Y. and Shen, W. D. (2012) 'Monoclonal antibody expression in mammalian cells', *Methods in Molecular Biology*, 907, pp. 341–358. doi: 10.1007/978-1-61779-974-7\_20.

Zhang, S. *et al.* (2013) 'Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general', *Analyst*, 139(2), pp. 439–445. doi: 10.1039/c3an01835k.

Zhao, X. *et al.* (2012) 'Interfacial recognition of human prostate-specific antigen by immobilized monoclonal antibody: Effects of solution conditions and surface chemistry', *Journal of the Royal Society Interface*, 9(75), pp. 2457–2467. doi: 10.1098/rsif.2012.0148.

Zhi, M. L. *et al.* (2015) 'Diagnostic performance of microRNA-29a for colorectal cancer: A meta-analysis', *Genetics and Molecular Research*, 14(4), pp. 18018–18025. doi: 10.4238/2015.December.22.28.

Zöllner, H., Hahn, S. A. and Maghnouj, A. (2014) 'Quantitative RT-PCR specific for precursor and mature miRNAs', *Methods in Molecular Biology*, 1095, pp. 121–134. doi: 10.1007/978-1-62703-703-7\_10.

## Article

# Covalent Immobilization of Antibodies through Tetrazine-TCO Reaction to Improve Sensitivity of ELISA Technique

Tania García-Maceira <sup>1,\*</sup>, Fé I. García-Maceira <sup>1</sup>, José A. González-Reyes <sup>2</sup> , Luis A. Torres-Sánchez <sup>1</sup>, Ana Belén Aragón-Gómez <sup>1</sup>, María Eugenia García-Rubiño <sup>3</sup> and Elier Paz-Rojas <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Canvax Biotech, Parque Científico y Tecnológico Rabanales 21, c/Astrónoma Cecilia Payne s/n, Edificio Orión, 14014 Córdoba, Spain; fi.garciamaceira@gmail.com (F.I.G.-M.); titoanafe@gmail.com (L.A.T.-S.); nelebana83@hotmail.com (A.B.A.-G.); pazrojaselier@gmail.com (E.P.-R.)

<sup>2</sup> Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), University of Córdoba, 14014 Córdoba, Spain; bc1gorej@uco.es

<sup>3</sup> Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain; rubino@ugr.es

\* Correspondence: tagama0802@gmail.com

**Abstract:** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is routinely used to detect biomolecules related to several diseases facilitating diagnosis and monitoring of these, as well as the possibility of decreasing their mortality rate. Several methods have been carried out to improve the ELISA sensitivity through antibodies immobilization on the microtiter plates. Here, we have developed a strategy of antibodies immobilization to improve the ELISA sensitivity increasing the antibody density surface through the tetrazine (Tz)-trans-cyclooctene (TCO) reaction. For this, we prepared surfaces with tetrazine groups while the captured antibody was conjugated with TCO. The tetrazine surfaces were prepared in two different ways: (1) from aminated plates and (2) from Tz-BSA-coated plates. The surfaces were evaluated using two sandwich ELISA models, one of them using the low-affinity antibody anti-c-myc as a capture antibody to detect the c-myc-GST-IL8h recombinant protein, and the other one to detect the carcinoembryonic human protein (CEA). The sensitivity increased in both surfaces treated with tetrazine in comparison with the standard unmodified surface. The c-myc-GST-IL8h detection was around 10-fold more sensible on both tetrazine surfaces, while CEA ELISA detection increased 12-fold on surfaces coated with Tz-BSA. In conclusion, we show that it is possible to improve the ELISA sensitivity using this immobilization system, where capture antibodies bond covalently to surfaces.

**Keywords:** ELISA; antibodies immobilization; tetrazine; TCO; CEA



**Citation:** García-Maceira, T.; García-Maceira, F.I.; González-Reyes, J.A.; Torres-Sánchez, L.A.; Aragón-Gómez, A.B.; García-Rubiño, M.E.; Paz-Rojas, E. Covalent Immobilization of Antibodies through Tetrazine-TCO Reaction to Improve Sensitivity of ELISA Technique. *Biosensors* **2021**, *11*, 524. <https://doi.org/10.3390/bios11120524>

Received: 28 November 2021

Accepted: 17 December 2021

Published: 20 December 2021

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



**Copyright:** © 2021 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/>).

## 1. Introduction

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is one of the most used techniques for the detection of molecules, generally proteins, in different fields such as food technology, clinical diagnosis, scientific research, and industry. The sensitivity of an ELISA depends on different factors such as the interaction antigen-antibody, the temperature, the pH, and the effectiveness of the antibody binding to the test surface. Microtiter commercial plates use hydrophobic polymers such as polystyrene. The increase in hydrophilicity can enhance antibody binding (density) and decreases the amount of denatured protein. Therefore, the immobilization of the antibody on the polystyrene surface plays a crucial role in improving the detection limit [1].

It has been shown that a higher density of antibodies on the surface increases the detection sensitivity of analytes in ELISA, and, accordingly, different strategies have been developed to adequately immobilize proteins to surfaces [2–4]. These strategies are based on the generation of amino, carboxyl, or epoxy groups on the surface by different methods and the subsequent covalent bond of the antibody to these groups through chemical reactions using NH<sub>2</sub>, SH, and COOH free groups of the antibodies [5].

With the aim of increasing the sensitivity of the ELISA, Dixit et al. [6] used a methodology based on the use of aminopropyltriethoxysilane (APTES) to generate  $\text{NH}_2$  groups on the assay surface [4,5]. Subsequently, other groups followed this method with some variations (see, for example, the work of [7]). Using this approach, a 50-fold increase in sensitivity has been achieved compared to standard surfaces [8]. The capture of the antibody to the surface is carried out using EDC (carbodiimide) and NHS (N-hydroxysuccinimide) chemistry on the aminated 96-well plate, forming an amide-type covalent bond [5,9].

Additionally, other methods have been applied to produce functional groups on the surface, such as plasma treatment [10], corona discharge [11], ultraviolet treatment, and wet chemistry techniques [12]. The wet chemical modification allows chemical reactions to take place between a compound dissolved in an organic solution and the surface of the polymer, generating reactive functional groups on the surface [13]. This procedure shows the advantage that the treatment is penetrating and provides controlled and stable surfaces in terms of the number of functional groups and required typology, maintaining transparency in the case of ELISA plates [14]. Using chlorosulfonation-sulfonamidation reactions, aminated surfaces have been prepared as well, controlling the density of  $\text{NH}_2$  groups on the surface, which were used for the development of ELISAs [14].

Among the “click chemistry reactions”, which are frequently used in biomedicine, there is the “Inverse Electron Demand Diels–Alder” (IEDDA) reaction between 1,2,4,5-tetrazines (Tz) and trans-cyclooctenes (TCO), forming a dihydropyridazine bond in the absence of a catalyst [15]. Today, this one is among the fastest known click reactions, with second-order rate constants of up to  $3.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [16]. The Tz-TCO reaction has been widely used in *in vivo* imaging studies, where the antibodies are labeled with TCO and later with tetrazine-technetium-99m [17,18], as well as for the immobilization of antibodies to surfaces [19].

In an attempt to increase the sensitivity of the ELISA technique, we used the click chemistry reaction between Tz-TCO, in which the capture antibody was modified with TCO, and the surface had exposed tetrazine groups. The addition of tetrazine to the plate was carried out in two different ways: (a) starting from aminated plates by wet chemistry and (b) coating the plate with the Tz-BSA protein by adsorption. To evaluate the sensitivity on both surfaces, we used a sandwich-type ELISA to detect the recombinant protein IL8h and the colorectal cancer biomarker CEA and compared the results obtained in the conventional ELISA with those achieved in the treated plates. The results show a significant increase in the sensitivity of the model ELISA for the detection of IL8h with respect to the conventional ELISA on both surfaces, as well as on the plates prepared with Tz-BSA in the case of the detection of CEA.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. TCO Functionalization of Anti-c-myc and Anti-CEA

For both anti-CEA 3C1 (Hytest 4CA30) and anti-c-myc 9E10, TCO functionalization of antibodies was performed with UV-Tracer Trans-Cyclooctene NHS ester (Click Chemistry Tools, A1031) in phosphate buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M  $\text{NaPO}_4$ , pH = 7.5). Different molar relations between trans-cyclooctene and the antibody anti-c-myc were used to provide different degrees of labeling per antibody. Thus, 5, 10, and 15 equivalents of TCO per 1 equivalent of mAb were added. The antibody anti-CEA 3C1 was modified with 5 equivalents of TCO per 1 equivalent of antibody. Reactions were performed for 60 min at room temperature (RT) with stirring. TCO-modified antibodies were purified on Zeba desalting columns (40 kDa MW cut-off, 0.5 mL) (Pierce Zeba™ desalting columns, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

The degree of labeling (DOL) was calculated based on the molar concentration relation between antibodies and reactive. Absorbance at 280 nm ( $A_{280}$ ) was used to determine the antibody concentration in the samples. Since UV tracer also absorbs at 280 nm, a correction factor was applied to adjust the  $A_{280}$  contributed by the tracer ( $A_{280} \text{ corrected} = A_{280} - A_{350\text{nm}} \times 0.4475$ ). Then we checked the absorbance of TCO-mod-

ified antibodies at 280 nm and 350 nm, where antibodies molar extinction coefficient at 280 nm ( $\epsilon$ ) is equal  $\epsilon_{280\text{nm}} = 204.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and UV tracer at 350 nm is equal at  $\epsilon_{350\text{nm}} = 19.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

The affinity of the anti-c-myc-TCO antibodies conjugated toward their targets was assessed by ELISA and compared with the non-modified antibody. A microplate coated with 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  c-myc-GST-human IL8 antigen was blocked with PBS containing 1% (*w/v*) BSA. Then, serially dilutions of the TCO-modified anti-c-myc antibodies were added and incubated at 37 °C for 1 h. Antibodies concentrations ranged from 0.39 to 50 ng/mL. Anti-mouse HRP (Sigma, A2554, Madrid, Spain) was used as a revealing antibody. Then ELISA colorimetric reaction employed TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), and it was stopped with 1 M HCl. The measure was performed at 450 nm. Similarly, the anti-CEA-TCO antibody affinity was measured by ELISA on a microplate coated with 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  carcinoembryonic antigen (CEA) (Hytect, 8CEA88). TCO-modified anti-CEA 3C1 and unmodified antibody affinity were compared at concentrations ranging from 15.62 to 500 ng/mL.

## 2.2. Tetrazine Functionalization of BSA

Tetrazine functionalization of BSA was realized with methyl tetrazine-PEG4-NHS-ester (Click Chemistry Tools, 1069) using 30 equivalents of tetrazine per 1 equivalent of BSA in phosphate buffer (50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 150 mM NaCl, pH = 7). The reaction was developed under stirring in the dark at RT for 2 h and stopped with 1 M Tris-HCl buffer pH = 8. The reaction was dialyzed with 1 L PBS pH 7.4 using a dialysis tubing membrane of 12 kDa molecular weight cut-off. Tz-BSA concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad) at 495 nm and using bovine serum albumin (BSA) as standard. DOL was calculated based on molar concentration relation between BSA and the reactive, considering that MW BSA = 66.433 g/mol and concentration of tetrazine was interpolated at the curve of reactive performed at  $A_{520}$ .

## 2.3. Preparation of Microtiter Plates with Tetrazine

Aminated coated plates were prepared using a wet chemical technique by TECNALIA Laboratories (Project 2012/000069, TECNALIA Research & Innovation). The densities of  $\text{NH}_2$  groups were 1.5 and 3 nmol/ $\text{cm}^2$ . Microtiter wells were treated with 5 equivalents of methyl tetrazine-PEG4-NHS-ester per  $\text{NH}_2$  group in 100  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer (50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 150 mM NaCl, pH = 7). Plates were stirred in the dark for 2 h at RT following by 3 washing steps with 0.3 mL of PBS pH = 7.4.

Standard microplates of polystyrene (MaxiSorp, Thermo 442404, Waltham, MA, USA) were coated with 20, 50, or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Tz-BSA in buffer 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  pH = 9 and incubated for 16 h at 4 °C. After 5 washing steps with 0.3 mL of PBS-Tween-20 0.05%, plates were treated with coating stabilizer and blocking buffer (Sigma-Aldrich, C9483) and stored at 4 °C.

## 2.4. ELISA to Evaluate Binding of TCO-Modified Antibodies to Tetrazine Surfaces

Standard microplates coated with 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Tz-BSA or aminated surface treated with tetrazine were added serially dilutions of the TCO-modified anti-c-myc antibody or the unmodified antibody and incubated at 37 °C for 1 h. Antibodies concentration ranged from 15.6 to 2000 ng/mL. After microplate washing, anti-mouse HRP and TMB were sequentially added. The enzyme reaction was stopped with 1 M HCl, and color development was measured at 450 nm on a microtiter reader.

## 2.5. ELISA Assays for the Detection of Bi-Specific Model c-myc-GST-IL8h Protein Using Treated Tetrazine Surfaces

The sandwich ELISA was used for the detection of human c-myc-GST-IL8h as well as to evaluate the tetrazine surfaces and to compare the limits of detection obtained in this surface with the results achieved from standard surfaces. We compared 1.5 nm/ $\text{cm}^2$

and 3 nm/cm<sup>2</sup> of NH<sub>2</sub> group in tetrazine surface prepared from wet chemical and the concentration of the coating with Tz-BSA, 20, 50, or 100 µg/mL on standard plates.

The ELISA was performed as described by García-Maceira et al. [20] with modifications. Briefly, standard plates coated with Tz-BSA or aminated plates Tz treated were added 2 µg/mL anti-c-myc-TCO in 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> pH = 9.6. Simultaneously standard plates were coated with unmodified anti-c-myc antibody and blocked with PBS pH = 7 containing 1% (*w/v*) BSA. The following ELISA steps were executed as described below. All plates were added to the model protein c-myc-GST-IL8h in serial dilutions from 0.78 to 100 ng/mL. ELISAs were then developed using an anti-human IL-8 biotin clone MT8F19 antibody at 1 µg/mL. After 1 h of incubation at 37 °C and 5 washing steps, streptavidin-HRP (Thermo Fisher, 21130, Waltham, MA, USA) diluted at 100 ng/mL was added. ELISA readout was as described previously.

#### *2.6. Comparative ELISA Assays for the Detection of Carcinoembryonic Human Protein Using Treated Tetrazine Surfaces*

The standard and Tz-BSA-coated surfaces were compared using the CEA sandwich ELISA. MaxiSorp plates were coated with 5 µg/mL unmodified anti-CEA 3C1 antibody in 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> pH = 9.6 and blocked with PBS pH = 7 containing 1% BSA. Simultaneously, anti-CEA-TCO was added to 20 µg/mL of Tz-BSA pre-coated plates. The next steps were the same for both ELISA. A range of concentrations of CEA protein (0–200 ng/mL) was added per duplicate in wells and incubated for 1 h at RT. After 3 washing steps, detection was achieved with 100 µL of 0.5 µg/mL of biotin anti-CEA 3C6. After 5 washing steps, 100 µL per well of streptavidin-HRP was diluted at 100 ng/mL, and TMB was sequentially added. The enzyme reaction was stopped with 1 M HCl, and color development was measured at 450 nm on a microplate reader.

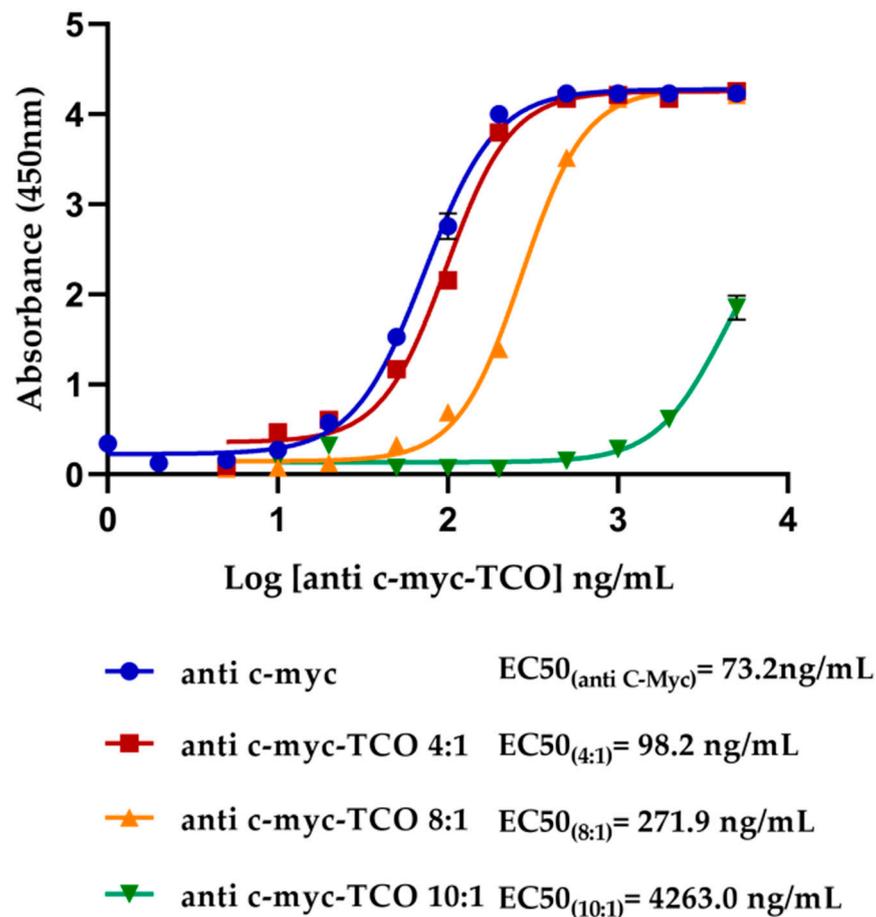
#### *2.7. Assay Performance Analysis*

The results of ELISAs were analyzed using the GraphPad Prism program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), and the four-parameter logistic standard curve showed the EC<sub>50</sub> and R<sup>2</sup> of each one. The detection limit was calculated using the absorbance arithmetic media of all repetitions of the blank plus 3 standard deviations. Similarly, was calculated the limit of quantification using 10 standard deviations as criteria. Finally, the LOD and LOQ concentrations were obtained by plotting the absorbance of each other on the standard curve.

### **3. Results**

Coating ELISA antibodies were modified to include TCO functional groups through their NH<sub>2</sub> groups. This modification was not directional, and TCO groups would be attached at any NH<sub>2</sub> sites of the molecule. Modifications of anti-c-myc 9E10 with 5, 10, and 15 equivalents of TCO per antibody molecule resulted in anti-c-myc-TCO conjugates with 4, 8, and 10 TCOs/antibody, respectively. On the other hand, anti-CEA 3C1 antibody modified with five equivalents of TCO resulted in anti-CEA-TCO conjugates with four TCOs/molecule.

The affinity of anti-c-myc-TCO-conjugated antibodies was compared with anti-c-myc unmodified through an indirect ELISA coated with c-myc-GST-IL8h protein and revealed with anti-mouse IgG-HRP. As observed in Figure 1, this modification did not disturb the affinity toward c-myc when the antibody contains four TCO groups per molecule as the curve was like that one obtained with the unmodified antibody, being EC<sub>50</sub> values also similar. In contrast, with 8 and 10 TCO groups per antibody, the specific antigen anti-c-myc detection activity was significantly reduced. Consequently, we selected the conjugation process with five equivalents.



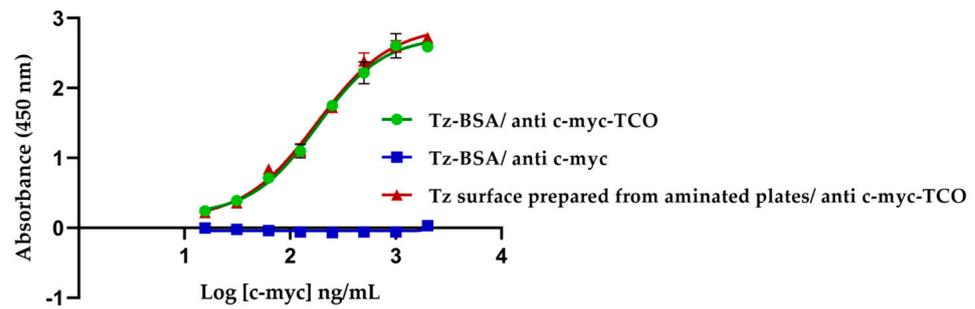
**Figure 1.** Comparative ELISA of anti-c-myc-TCO-conjugated antibodies and anti-c-myc unmodified to its antigen affinity c-myc. A 4PL sigmoidal curve to each anti-c-myc antibody is displayed. The EC50 represents the analyte concentration capable of generating half of the maximum signal obtained in the test in the linear range of the curve. The error bars correspond to three replicates of each antibody concentration.

Similarly, using an indirect ELISA, we confirmed that anti-CEA-TCO conserved the same activity that the unmodified antibody.

### 3.1. Evaluation of Tetrazine-Coated Microtiter Plates

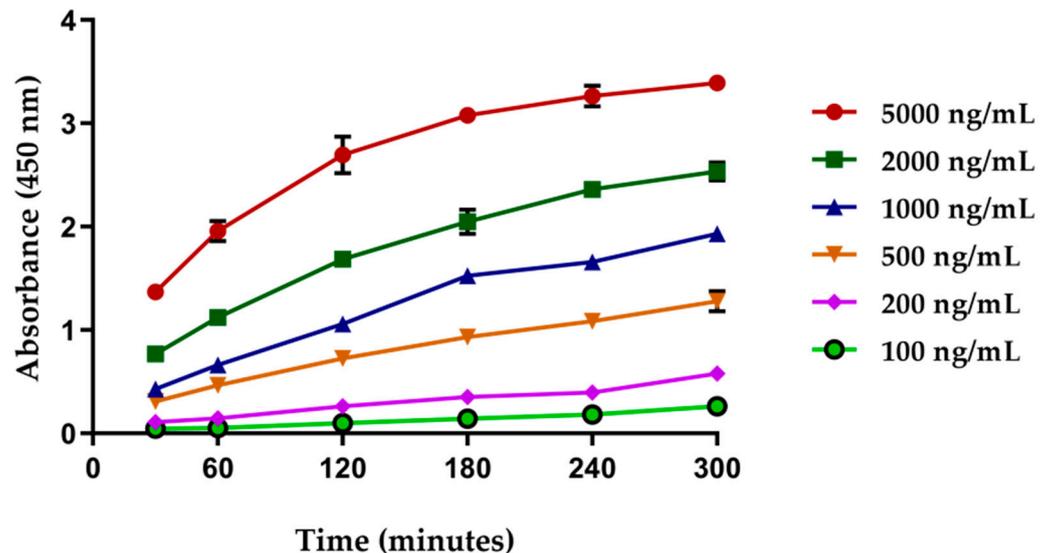
The Tz-BSA protein was assessed at 520 nm to quantify the number of tetrazine groups incorporated into a BSA molecule. The protein concentration was measured by Bradford using a standard curve of unmodified BSA. Considering an MW of BSA as  $66.433 \text{ gmol}^{-1}$ , we calculated the molar concentration of Tz-BSA, and the absorbance at 520 nm was interpolated at a linear regression curve of methyl tetrazine-PEG4-NHS-ester. Finally, we obtained a ratio of 25 tetrazines per molecule of BSA.

The evaluation of the binding to tetrazine-coated surfaces was performed with the anti-c-myc-TCO (1:4) antibody. As we show here, the anti-c-myc-TCO antibody bound specifically to the tetrazine surfaces, either pre-coated with Tz-BSA or aminated plates treated with tetrazine, and binding of the anti-c-myc antibody lacking TCO conjugation was not observed (Figure 2). There were no differences between both different tetrazine prepared surfaces.



**Figure 2.** Evaluation of tetrazine surfaces using anti-c-myc-TCO (4:1). The 4PL sigmoidal curves of antibodies concentration against absorbance at 450 nm. The negative control was performed on Tz-BSA-coated surface. The error bars correspond to three replicates of each concentration of antibody.

The incubation time of the click chemistry reaction between tetrazine surface and TCO from the anti-c-myc-TCO conjugated antibody was measured at 60, 120, 180, 240, and 300 min with concentrations of antibody of 100, 200, 500, 1000, 2000, and 5000 ng/mL. This reaction was performed on Tz-BSA pre-coated surface. As observed in Figure 3, the absorbance did not increase further after 2 h incubation, remaining unchanged independently of the antibody concentration. Nevertheless, there was a signal increase when antibody concentration was raised. The optimal results were obtained when using more than 1000 ng/mL (see Figure 3).



**Figure 3.** Incubation time optimization of the tetrazine-TCO reactions on the surface of microtiter plates prepared with tetrazine using the anti-c-myc-TCO (1:4) antibody. Four replicates were carried out for each antibody concentration and incubation time. Unmodified anti-c-myc antibody on Tz-BSA pre-coated wells. Anti-c-myc-TCO antibodies on pre-coated BSA wells were used as negative controls. In these cases, signals were too low to be represented in the graph.

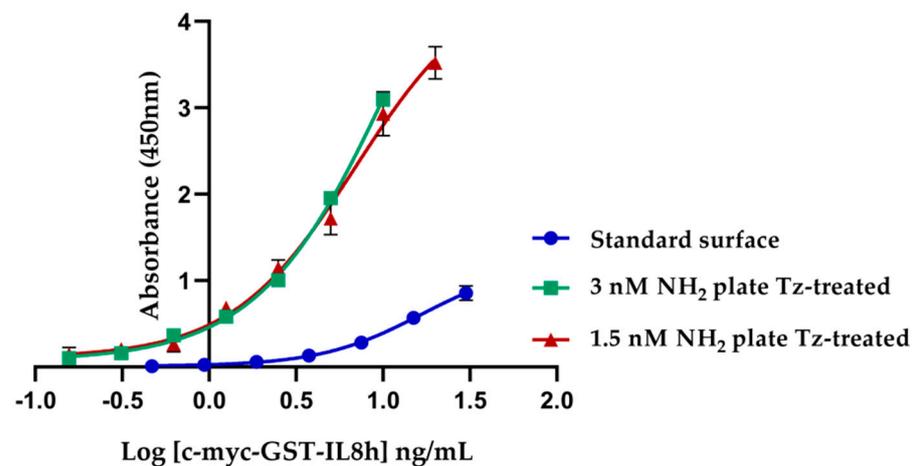
### 3.2. ELISA Assays for the Detection of c-myc-GST-IL8h Protein Using Treated Tetrazine Surfaces

The recombinant protein c-myc-GST-IL8h was cloned and expressed by Canvax Biotech S.L. García-Maceira et al. [20] confirmed that this protein can be detected by ELISA with different capture antibodies, as anti-human IL8 or anti-c-myc 9E10 antibody, using the same revealed biotin anti-IL8h antibody, so that it can be used as a chimeric protein and would be detected by the c-myc tag or IL8h protein [20]. Significant differences in the detection of the recombinant protein with different coating antibodies were also found [20], indicating that a low-affinity antibody reduces the assay sensitivity. Accord-

ingly, we designed a strategy to improve an ELISA developed with an antibody that can decrease this effect.

Tetrazine surfaces were prepared in two different ways. Polystyrene plates were treated by wet chemical to the prepared aminated surfaces, followed by a reaction with NHS-tetrazine reagent obtaining tetrazine surfaces. The aminated surfaces used contained 1.5 and 3 nmol/cm<sup>2</sup> of NH<sub>2</sub> groups per well. The second method consisted of Tz-BSA pre-coated standard surface.

The detection sandwich ELISA of c-myc-GST-IL8h was performed to determine the best concentration of NH<sub>2</sub> groups on surfaces prepared by the wet chemical technique. These surfaces were the starting point to prepare tetrazine surfaces. We compared 1.5 and 3 nmol/cm<sup>2</sup> of NH<sub>2</sub> groups per well using a standard plate as control (Figure 4). LOD and LOQ were calculated from 4PL fitted curves, and significant differences between the ELISA performed on tetrazine surface with respect to standard were found. Thus, the sensitivity on tetrazine surface prepared from aminated wells with 1.5 nmol/cm<sup>2</sup> was 5-fold higher than on standard surfaces, while tetrazine surfaces prepared from 3 nmol/cm<sup>2</sup> of NH<sub>2</sub> were 11-fold more sensitive than the standard control (Table 1). Although there were no visual differences between both tetrazine surface curves, LOD and LOQ values showed that the ELISA developed on tetrazine surface prepared from 3 nmol/cm<sup>2</sup> of NH<sub>2</sub> was more sensitive than the one developed on a surface prepared from 1.5 nmol/cm<sup>2</sup> of NH<sub>2</sub>. These differences can be attributed to the standard deviation in tetrazine surface prepared from 1.5 nmol/cm<sup>2</sup> of NH<sub>2</sub> since it was higher than the one prepared from 3 nmol/cm<sup>2</sup>.

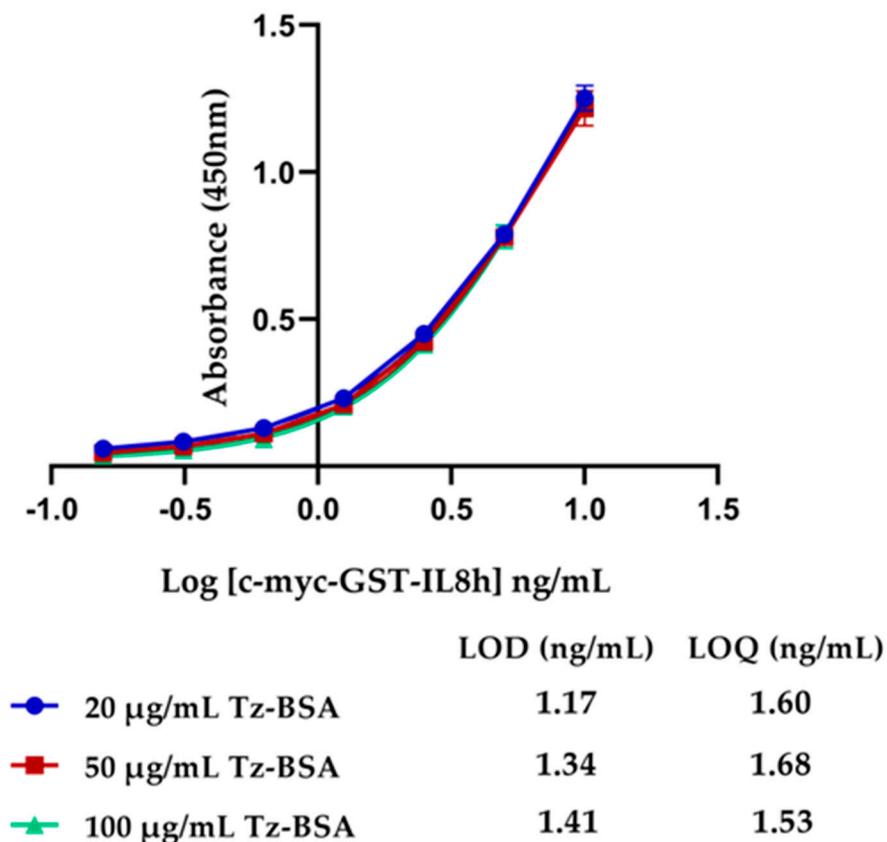


**Figure 4.** Comparative ELISA of c-myc-GST-IL8h detection in standard and tetrazine-coated surfaces. 4PL sigmoidal curves on two tetrazine surfaces prepared from aminated plates with different NH<sub>2</sub> groups density and standard surface were used as control. On the tetrazine surface, the capture antibody was anti-c-myc-TCO, while on the standard surface, we used an anti c-myc unmodified antibody. The results correspond to three replicates for each concentration. The negative control included 10 replicates.

**Table 1.** Comparison of LOD and LOQ values obtained for tetrazine surfaces prepared from aminated plates with different concentrations of amine groups per well, with respect to the standard plates.

	Standard Surface	Tz Surface Prepared from Aminated Plates with	
		3 nmoles NH <sub>2</sub> /cm <sup>2</sup>	1.5 nmoles NH <sub>2</sub> /cm <sup>2</sup>
LOD (ng/mL)	10.90	0.81	1.97
LOQ (ng/mL)	13.83	1.22	2.74
R <sup>2</sup>	0.9997	0.9987	0.9948

On the other hand, we coated standard ELISA (MaxiSorp) surfaces with different concentrations of Tz-BSA (25 tetrazine: 1BSA) protein (20, 50, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to develop the ELISA for c-myc-GST-IL8h detection. The capture antibody used was anti-c-myc-TCO (1:4), and the revealing antibody was anti-human IL8 biotin. As depicted in Figure 5, no differences in the ELISAs sensitivity were detected, as LOD and LOQ results were similar. Considering these results and using the statistical concept of medium square, we calculated  $p$ -value for LOD = 0.015 ng/mL and for LOQ = 0.006 ng/mL with a 95% probability. These results revealed that there were no significant differences between the three concentrations of Tz-BSA to coat and, therefore, we selected a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration of Tz-BSA for the next assays.

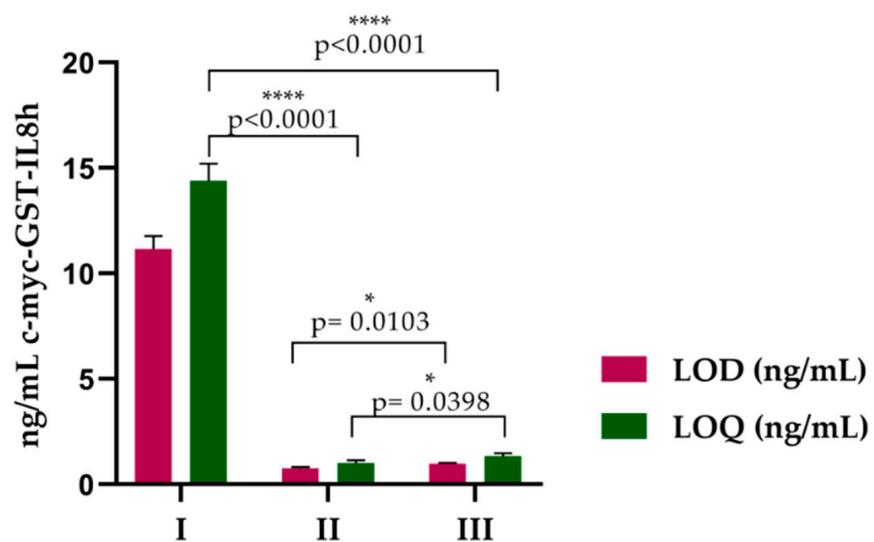


**Figure 5.** ELISA of c-myc-GST-IL8h detection in standard surfaces pre-coated with different concentrations of Tz-BSA. The 4PL sigmoidal curves to each coated Tz-BSA surface are represented.

The sandwich ELISA for c-myc-GST-IL8h detection was repeated three times to compare the LOD and LOQ in tetrazine and standard surfaces. In Table 2, we show the results of each assay as well as the standard deviation and coefficient of variation inter-assay. In the standard surface, the medium LOD was  $11.17 \pm 0.62$  ng/mL and the LOQ was  $14.4 \pm 0.82$  ng/mL, while in the tetrazine surface prepared from pre-aminated plates, these values were  $0.96 \pm 0.06$  ng/mL and  $1.34 \pm 0.14$  ng/mL, respectively. On another tetrazine surface prepared by coating the standard surface with Tz-BSA, LOD and LOQ values were  $0.77 \pm 0.05$  ng/mL and  $1.01 \pm 0.14$  ng/mL, respectively. Concerning the assays sensitivity, we found an improvement in both tetrazine surfaces with respect to the standard. Thus, in tetrazine surfaces prepared from pre-aminated plates, the assay was approximately 11-fold more sensitive, while in pre-coated Tz-BSA surfaces, it was 14-fold compared to the standard surface. The significant differences between groups shown in Figure 6 confirm that both tetrazine surfaces improve the detection sensitivity of ELISA of c-myc-GST-IL8h.

**Table 2.** LOD and LOQ values of ELISA detection of c-myc-GST-IL8h protein. The results of three different independent assays for each surface are shown.

Surfaces		LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Standard Surface	Replicate 1	11.52	14.63
	Replicate 2	10.45	13.49
	Replicate 3	11.52	15.07
	Arithmetic media	11.17	14.40
	Standard deviation	0.62	0.82
	%CV inter-assay	5.54	5.66
Tz-BSA-Coated Surface	Replicate 1	0.70	0.91
	Replicate 2	0.79	1.16
	Replicate 3	0.80	0.95
	Arithmetic media	0.77	1.01
	Standard deviation	0.05	0.14
	%CV inter-assay	7.01	13.56
Tetrazine Surface Prepared from Aminated Plates	Replicate 1	0.92	1.37
	Replicate 2	0.92	1.19
	Replicate 3	1.03	1.46
	Arithmetic media	0.96	1.34
	Standard deviation	0.06	0.14
	%CV inter-assay	6.64	10.26



**I** Standard surface/ anti c-myc

**II** Tz-BSA coated surface/ anti c-myc-TCO

**III** Tz surface prepared it from aminated plates/ anti c-myc-TCO

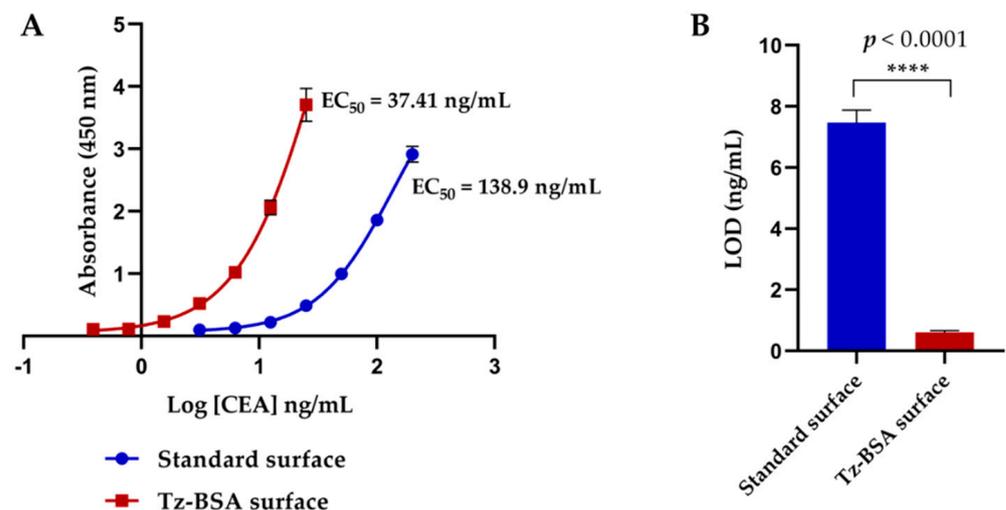
**Figure 6.** Bar graphs of sandwich ELISA for c-myc-GST-IL8h protein detection representing the arithmetic media of LOD and LOQ (ng/mL) calculated for Tz-BSA-coated surface, tetrazine surface prepared from pre-aminates plates, and standard surface.

Significant differences were found when comparing both tetrazine prepared surfaces (Figure 6). Since the preparation of Tz-BSA-coated surface is a simple process compared

with tetrazine surfaces prepared from aminated plates, we selected this surface in another ELISA comparative assay that includes an important antigen with clinical interest.

### 3.3. ELISA Assays for the Detection of CEA Using Tetrazine-Treated Surfaces

We developed another sandwich ELISA using Tz-BSA pre-coated surfaces to explore possible sensitivity improvement of ELISA through the tetrazine-TCO reaction compared with the standard surface, in which the antibody binds to the surface by passive adsorption. When comparing the signals observed in the Tz-BSA surface and those obtained in the standard one, we detected a higher signal in TZ-BSA with the same concentrations of CEA and with a clear displacement of the curve to the left compared with the standard curve (Figure 7A). This ELISA comparison was developed three times, and the LOD in the standard surface was  $7.47 \pm 0.41$  ng/mL, while in Tz-BSA-coated surface, it was  $0.60 \pm 0.06$  ng/mL. There was an increased sensitivity in CEA detection ELISA of 12.4-fold compared with the traditional technique. A Student t-test showed extremely significant differences between both surfaces ( $p < 0.0001$ ; see Figure 7B), which allows us to conclude that Tz-BSA-coated plates combined with modified-TCO capture antibody greatly improve the ELISA sensitivity.



**Figure 7.** ELISA for CEA protein detection developed on Tz-BSA-coated and standard surfaces. (A) 4PL sigmoidal curves. (B) Bar graphs representing mean values of LOD (in ng/mL) calculated for Tz-BSA-coated and standard surfaces showing significant differences between both conditions ( $p < 0.0001$ ).

## 4. Discussion

There are significant differences in protein detection sensitivity by ELISA depending on the capture antibody. This fact was reported by García-Maceira et al. [20], who developed an ELISA with different capture antibodies to detect a chimeric recombinant protein c-myc-GST-IL8h, showing differences in the dynamic range of concentrations and the sensitivity for the analyte detection [20].

Considering the model of Langmuir [21], the detection limit of an ELISA depends on the binding affinity of the capture antibody with the target protein. If antibody-antigen binding constant values increase two orders of magnitude, the detection limit values decrease proportionally [22]. In agreement with most of the reports, binding constant values may vary in a wide range: from  $10^{-5}$  to  $10^{-12}$  M<sup>-1</sup> [23]. Since there are many antibodies with low affinity, several strategies have been recently developed to minimize their effect on ELISA sensitivity.

Different crosslinkers have been employed to immobilize proteins covalently on aminated polystyrene surfaces, such as glutaraldehyde, with each extreme able to bind to an NH<sub>2</sub> group, or carbodiimide, which links an amino group with a carboxyl [8,24].

Surfaces activated with APTES, with  $\text{NH}_2$  free groups on the surface, have been used for the covalent immobilization of antibodies [5,7,24]. Dixit et al. [5] used a combination of the cross-linker carbodiimide/NHS to improve an ELISA of fetuin-A detection, improving the sensitivity 16-fold compared to commercial kits. On the other hand, Wang et al. [7] used glutaraldehyde as a crosslinking to immobilize HIV-p24 antigen on surfaces activated with APTES, improving by 30-fold the LOD compared with the standard surface in an ELISA of HIV-p24 detection [7].

In this work, we did not use crosslinkers such as glutaraldehyde or carbodiimide because when used in situ, they could form bonds between the antibody molecules causing its precipitation and loss of activity. The activity evaluation of the modified antibody before being used offers several advantages: (a) to decrease the inter-assay variability and thus increasing its reproducibility; (b) to store the modified antibody until used, being then available each time the ELISA is repeated, and (c) it could even be marketed once it had been modified. In this work, we prepared capture antibodies pre-modified with TCO and plates prepared with tetrazine on the surface, and both were pre-evaluated and stored before their use so that when they are mixed, a covalent bond is formed between tetrazine and TCO groups with high specificity and selectivity.

Several bioorthogonal reactions, including the azide-alkyne [3+2] cycloaddition, the photoinducible 1,3-dipolar cycloaddition, and the inverse electron demand Diels–Alder (IEDDA) reaction, have been developed and used for several applications, including protein modifications [25,26]. Among these, the IEDDA reaction stands out from other bioorthogonal reactions due to its unmatched kinetics (rate constant of up to  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) and its high specificity and biocompatibility [25]. Specifically, this reaction has been used to conjugate antibodies, which were later conjugated with tetrazine or TCO and then applied to cell imaging, nanoparticle functionalization, and targeted antibody therapy [27,28]. Attending to its characteristics and applications, we selected this reaction as the basis of system development to increase ELISA sensitivity.

The capture antibodies used in this work were modified with TCO through their free  $\text{NH}_2$  groups using NHS reagent. We observed that when the modification compound increased with respect to the antibodies, the TCO groups incorporated into the antibody molecules increased too. However, decreased antibodies activity was also detected, demonstrating the importance of the evaluation of the modified antibodies.

On the other hand, the microtiter ELISA plates were prepared with tetrazine in two different ways: from aminated plates after wet chemical treatment of chlorosulfonation-sulfonamidation and from MaxiSorp plates coated with the BSA protein modified with 20 tetrazines per protein molecule. Aminated surface prepared using wet chemical technique has some advantages compared with other methods described of polystyrene preparation surface with reactive groups [29]. Thus, in this method, polystyrene surface is activated with chlorosulfonyl groups, and then a bifunctional aliphatic amine compound is added, allowing an amine group linkage to the surface, while the second functional group remains available for further reactions. This method also allows to acquire a controllable number of amine groups on polystyrene surfaces and additionally provides a higher amount of amine groups than that obtained using commercial plasma, functionalized polystyrene substrates, or ultraviolet treatment [13].

Attending the results obtained for LOD and LOQ calculated for c-myc-GST-IL8h detection in the different surfaces (see Table 2), we found an improvement of the sensitivity in both tetrazine surfaces when an anti-c-myc-TCO was used as a capture antibody compared with the standard surface. Thus, ELISA sensitivity increased in one order of magnitude. In this sense, when using Tz-BSA surfaces, the LOD was 13.7-fold improved compared to the standard plates, while in tetrazine surfaces followed by wet chemical treatment, this improvement was 11-fold. On the other hand, the surfaces prepared with Tz-BSA showed increased sensitivity for the detection of CEA, an effect due to a 12-fold LOD improvement when compared with ELISAs developed by traditional techniques. These results demonstrate that the system using Tz-TCO reaction on the surface of ELISA plates

for antibody anchoring significantly improves the sensitivity of the assay and could become a routine method in research laboratories due to its reduced complexity.

The Tz-BSA-coated surface preparation is less laborious than the tetrazine prepared plates after wet chemical amination. In addition, the Tz-BSA protein can be stored, and the surfaces can even be previously coated with the protein by using a stabilizer reagent so that, like the TCO-labeled antibody, the surface would be readily available when needed, and eventually, it could also be marketed.

## 5. Conclusions

In this work, we describe a method based on Tz-TCO reaction to immobilize antibodies to microtiter surfaces that additionally may improve the ELISA assay sensitivity, using for this purpose the comparison of sandwiches ELISA with their corresponding traditional methods. The Tz-BSA-coated surface also provides a simple procedure to obtain surfaces with a high quantity of tetrazine that increases ELISA sensitivity.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.P.-R.; methodology, E.P.-R. and T.G.-M.; formal analysis, T.G.-M., F.I.G.-M. and L.A.T.-S.; investigation, T.G.-M., F.I.G.-M., J.A.G.-R., A.B.A.-G., M.E.G.-R. and L.A.T.-S.; data curation, T.G.-M.; writing original draft preparation, T.G.-M.; manuscript writing and editing, F.I.G.-M., M.E.G.-R. and J.A.G.-R.; project administration, E.P.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Compra Pública Precomercial, Reference 2012/000069, Ministerio de Economía y Competitividad, España. ONCOVER project: Volatile compound detection system for early cancer diagnosis.

**Acknowledgments:** Aminated plates from wet chemicals were supplied by Nerea Briz Iceta, Tecnalia, Mikeletegi Pasealekua, 2 Parque Tecnológico, E-20009 San Sebastián, Spain.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Welch, N.G.; Scoble, J.A.; Muir, B.W.; Pigram, P.J. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays. *Biointerphase* **2017**, *12*, 02D301. [\[CrossRef\]](#)
2. Shen, M.; Rusling, J.F.; Dixit, C.K. Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnostics development. *Methods* **2017**, *116*, 95–111. [\[CrossRef\]](#)
3. Das, R.D.; Maji, S.; Das, S.; RoyChaudhuri, C. Optimization of covalent antibody immobilization on macroporous silicon solid supports. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256*, 5867–5875. [\[CrossRef\]](#)
4. Dixit, C.K.; Vashist, S.K.; O’neill, F.T.; O’Reilly, B.; MacCraith, B.D.; O’Kennedy, R. Development of a high sensitivity rapid sandwich ELISA procedure and its comparison with the conventional approach. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7049–7052. [\[CrossRef\]](#)
5. Dixit, C.K.; Vashist, S.K.; MacCraith, B.D.; O’Kennedy, R. Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 439–445. [\[CrossRef\]](#)
6. Dixit, C.K. Surface Modification and Conjugation Strategies for Bioassay/Biomaterial Applications. Ph.D. Thesis, Dublin City University, Dublin, Ireland, 2011.
7. Wang, C.; LakshmiPriya, T.; Gopinath, S.C.B. Amine-aldehyde chemical conjugation on a potassium hydroxide-treated polystyrene ELISA surface for nanosensing an HIV-p24 antigen. *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, *14*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
8. Vashist, S.K.; Lam, E.; Hrapovic, S.; Male, K.B.; Luong, J.H.T. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 11083–11130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Goddard, J.M.; Hotchkiss, J.H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 698–725. [\[CrossRef\]](#)
10. Thissen, H. Plasma-based surface modification for the control of biointerfacial interactions. In *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*; Poole-Warren, L., Martens, P., Green, R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 129–144.
11. Fabbri, P.; Messori, M. Surface modification of polymers: Chemical, physical, and biological routes. In *Modification of Polymer Properties*; Jasso-Gastinel, C., Kenny, J.M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 109–130.
12. Nemani, S.K.; Annavarapu, R.K.; Mohammadian, B.; Raiyan, A.; Heil, J.; Haque, A.; Abdelaal, A.; Sojoudi, H. Surface Modification of Polymers: Methods and Applications. *Adv. Mater. Interfaces* **2018**, *5*, 1801247. [\[CrossRef\]](#)
13. Mustafa Karaman, M.; Gürsoy, M.; Kuş, M.; Özel, F.; Yenel, E.; Şahin, Ö.G.; Kivrak, H.D. Chemical and Physical Modification of Surfaces. In *Surface Treatments for Biological, Chemical, and Physical Applications*; Gürsoy, M., Karaman, M., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2016; pp. 23–66.

14. Del Prado, A.; Briz, N.; Navarro, R.; Pérez, M.; Gallardo, A.; Reinecke, H. Transparent polystyrene substrates with controllable surface chlorosulfonation: Stable, versatile, and water-compatible precursors for functionalization. *Macromolecules* **2012**, *45*, 2648–2653. [[CrossRef](#)]
15. Mushtaq, S.; Yun, S.J.; Jeon, J. Recent advances in bioorthogonal click chemistry for efficient synthesis of radiotracers and radiopharmaceuticals. *Molecules* **2019**, *24*, 3567. [[CrossRef](#)]
16. Darko, A.; Wallace, S.; Dmitrenko, O.; Machovina, M.M.; Mehl, R.A.; Chinb, J.W.; Fox, J.M. Conformationally strained trans-cyclooctene with improved stability and excellent reactivity in tetrazine ligation. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3770–3776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lopes van den Broek, S.; Shalgunov, V.; Sehlín, D.; Syvanen, S.; Herth, M. Development of Trans Cyclooctene Modified Antibodies for Pretargeted Imaging within the Central Nervous System. *J. Nucl. Med.* **2020**, *61*, 196.
18. García, M.F.; Gallazzi, F.; Junqueira, M.S.; Fernández, M.; Camacho, X.; da Silva Mororó, J.; Faria, D.; de Godoi Carneiro, C.; Couto, M.; Carrión, F.; et al. Synthesis of hydrophilic HYNIC-[1,2,4,5] tetrazine conjugates and their use in antibody pretargeting with <sup>99m</sup>Tc. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 5275–5285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Trilling, A.K.; Beekwilder, J.; Zuilhof, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: A minireview. *Analyst* **2013**, *138*, 1619–1627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. García-Maceira, T.; García-Maceira, F.I.; González-Reyes, J.A.; Paz-Rojas, E. Highly enhanced ELISA sensitivity using acetylated chitosan surfaces. *BMC Biotechnol.* **2020**, *20*, 1–12. [[CrossRef](#)]
21. Langmuir, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40*, 1361–1403. [[CrossRef](#)]
22. Zhang, S.; Garcia-D'Angeli, A.; Brennan, J.P.; Huo, Q. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *Analyst* **2013**, *139*, 439–445. [[CrossRef](#)]
23. Heinrich, L.; Tissot, N.; Hartmann, D.J.; Cohen, R. Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity. *J. Immunol. Methods* **2010**, *352*, 13–22. [[CrossRef](#)]
24. Gunda, N.S.K.; Singh, M.; Norman, L.; Kaur, K.; Mitra, S.K. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *305*, 522–530. [[CrossRef](#)]
25. Sletten, E.M.; Bertozzi, C.R. Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 6974–6998. [[CrossRef](#)]
26. Kang, K.; Park, J.; Kim, E. Tetrazine ligation for chemical proteomics. *Proteome Sci.* **2017**, *15*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Oliveira, B.L.; Guo, Z.; Bernardes, G.J.L. Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895–4950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rahim, M.K.; Kota, R.; Lee, S.; Haun, J.B. Bioorthogonal chemistries for nanomaterial conjugation and targeting. *Nanotechnol. Rev.* **2013**, *2*, 215–227. [[CrossRef](#)]
29. Reinecke, H.; Navarro, R.; Briz-Iceta, N. Preparation of Functionalized Surfaces of Polystyrene Substrates. WO 2010/061032 A1, 3 June 2010.

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access



# Highly enhanced ELISA sensitivity using acetylated chitosan surfaces

Tania García-Maceira<sup>1\*</sup>, Fé I. García-Maceira<sup>1</sup>, José A. González-Reyes<sup>2</sup> and Elier Paz-Rojas<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), is the most widely used and reliable clinical routine method for the detection of important protein markers in healthcare. Improving ELISAs is crucial for detecting biomolecules relates to health disorders and facilitating diagnosis at the early diseases stages. Several methods have been developed to improve the ELISA sensitivity through immobilization of antibodies on the microtiter plates. We have developed a highly sensitive ELISA strategy based on the preparation of acetylated chitosan surfaces in order to improve the antibodies orientation.

**Results:** Chitin surfaces were obtained by mixing small quantities of chitosan and acetic anhydride in each well of a microtiter plate. Anti-c-myc 9E10 low affinity antibody fused to ChBD was cloned and expressed in CHO cells obtaining the anti-c-myc-ChBD antibody. We found that anti c-myc-ChBD binds specifically to the chitin surfaces in comparison with anti-c-myc 9E10, which did not. Chitin surface was used to develop a sandwich ELISA to detect the chimeric human protein c-myc-GST-IL8 cloned and expressed in *Escherichia coli*. The ELISA assays developed on chitin surfaces were 6-fold more sensitive than those performed on standard surface with significant differences ( $p < 0,0001$ ).

**Conclusions:** As shown here, acetylated chitosan surfaces improve the antibody orientation on the substrate and constitute a suitable method to replace the standard surfaces given the stability over time and the low cost of its preparation.

**Keywords:** Chitosan surface, Chitin binding domain, Antibody orientation, ELISA

## Background

The ELISA is a powerful and widely used technique which has been used for decades to detect different molecules, especially protein analytes, in diagnostic and research context. This highly versatile technique allows the detection of biomolecules with high specificity and sensitivity, associating the readout with a subsequent enzymatic reaction producing colorimetric, fluorescence or luminescence signals [1, 2].

Disease biomarkers detection on clinical samples have great importance for diagnosis as well as for the

monitoring of disorders. However, the effectiveness of the detection is frequently limited by the sensitivity and quantification capacity of the assay. Due to its high specificity and sensitivity, ELISA technique is probably the most used technique for these purposes, although for many biomarkers this technique has shortcomings based on criteria like kinetic properties and/or antibody availability [3, 4]. To cope with this issue, several methods have been developed to increase the sensitivity of the ELISA technique. In this sense, several surfaces have been designed in order to improve antibodies orientation and density [4, 5], while other methods have been established to improve the detection process by amplifying the ELISA signals [6].

\* Correspondence: [t.garcia@canvaxbiotech.com](mailto:t.garcia@canvaxbiotech.com)

<sup>1</sup>Canvax 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). 2020 **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.

In a standard sandwich ELISA assay, the analyte detection is based on the use of two specific antibodies: a primary or capture antibody, which is adsorbed to a polystyrene surface with high protein binding capacity, and a secondary antibody which generally is biotinylated. The catalyzing enzyme can be horseradish peroxidase (HRP) which normally is linked to streptavidin. The high affinity streptavidin-biotin binding facilitates the signal amplification [7].

To improve analyte detection, several methods have been developed. Among them, the use of silver nanoparticles, streptavidin-coated microparticles, or the signal amplification with the tyramide system, can be mentioned [8–10].

The adsorption of capture antibodies to standard polystyrene surfaces takes place due to hydrophobic and electrostatic interactions [11]. In this process of immobilization, the antibodies can acquire a random orientation hindering the interaction with its antigen. In addition, in the contact surface some steric impediment can occur and even the antibodies can be denatured with the consequent loosening of ability to detect the antigen. Furthermore, during the development of an ELISA the antibody can be displaced by other proteins, for example, during surface washing steps [12, 13]. All these effects can result in lower sensitivity of a large number of ELISAs with the subsequent reduced reproducibility. In order to decrease these adverse effects on antibodies immobilization, and thereby improving the sensitivity of the ELISA technique, some procedures have been developed. These methods include, for example, surface modification to make them more hydrophilic or more suitable for the covalent binding of the antibodies, and the use of high-affinity intermediate molecules [14].

The production of monolayer surfaces is one of the methods that best permit the adsorption of antibodies. In addition, the monolayers facilitate the appearance of functional groups which subsequently allow the covalent binding of the antibodies to the surface. The monolayers are formed using hydrocarbon molecules containing functional groups at one or both ends and, additionally, can be auto assembled [15]. The monolayers formed from mercaptoundecanoic acid [16] are representative examples of these structures.

On the other hand, the covalent coupling of the antibody to the surface would enhance its immobilization thus improving its concentration and orientation. For this purpose,  $-NH_2$ ,  $-COOH$  and  $-SH$  groups of the antibodies have been used. However,  $-NH_2$  and  $-COOH$  groups are ubiquitous throughout the antibody structure and their use should hinder the correct antibody orientation [17]. Antibody immobilization through  $-SH_2$  groups could result in loss of functionality [18] since these

groups are exclusively located in the hinge region playing an essential role on the protein tertiary structure.

Other methods have used the affinity of Protein A and G for the Fc (fragment crystallizable region) region of the antibodies, and several surfaces have been developed that facilitate the adequate orientation of the antibodies and thereby improving the sensitivity of the ELISA [19].

Due to its multiple biomedical applications, chitin (poly N-acetyl glucosamine), one of the most abundant polysaccharides in nature, is broadly used in the pharmaceutical industry. The chitin binding domain (ChBD) of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase, specifically binds to the insoluble or regenerated form of chitin but not to other polysaccharides such as cellulose, chitosan or starch. This fact results in higher stability and affinity of this union in a wide pH range [20].

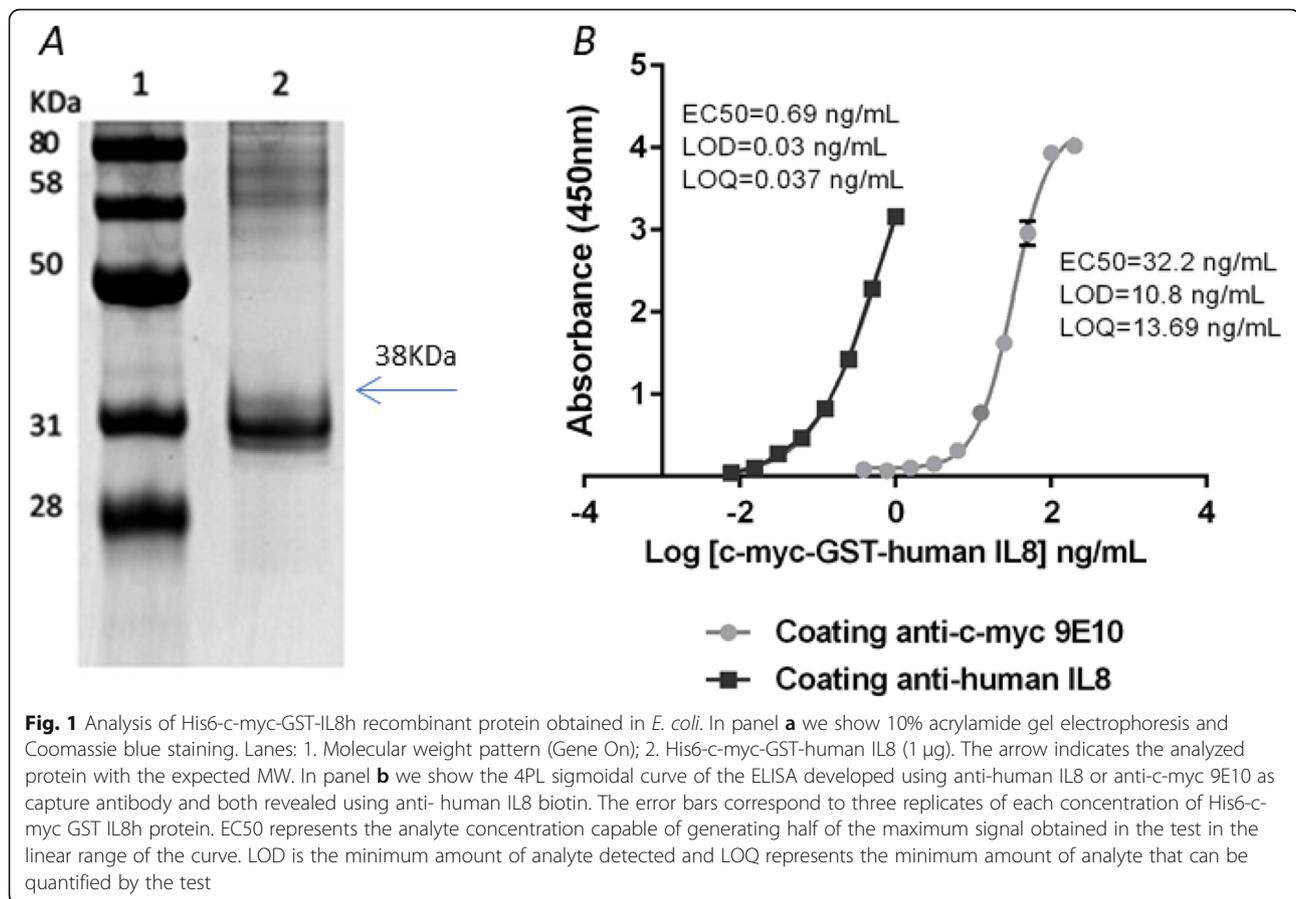
To improve the orientation and density of antibodies, and thus the sensitivity of the ELISA, we have used chitin-coated polystyrene surfaces. Chitin was regenerated by acetylation from different chitosan sources “in situ”. These surfaces prepared with acetylated chitosan were used in the determination of human IL-8 as a model of quantification by ELISA. The results show an improved detection limit with the consequent improvement of the ELISA sensitivity, possibly due to an increase immobilization and better orientation of antibodies fused to the chitin binding domain.

## Results

Firstly, we obtained a plasmid for the expression of c-myc-GST-IL8h fusion protein. After checking by sequencing, it was used to transform *E. coli* BL21 (DE3) strain. The *E. coli* BL21 (DE3) cultures yielded 10 mg/L of His6-c-myc-GST-IL8h recombinant protein. The electrophoresis gel showed a band of approximately 38 kDa, which correlated well with the expected molecular mass. Also, a high degree of purity of this protein was noticeable (Fig. 1a).

The recombinant protein His6-c-myc-GST-IL8h was detected in the sandwich ELISA using anti-human IL-8, as well as with an anti-c-myc-ChBD as capture antibody (see Fig. 1b). Both ELISAs were developed in parallel on standard unmodified surfaces. Figure 1b shows the differences observed in the dynamic range of concentrations. When using standard surfaces coated with the human anti-IL-8 antibody, ELISA LOD and LOQ were 0.03 and 0.037 ng/mL, respectively. However, when coating with the anti-c-myc antibody 9E10, these values were 10.8 and 13.69 ng/mL, respectively. Thus, when changing only the capture antibody, the difference between both ELISAs was between 360 and 370 times more sensitive.

Using a standard protocol, the anti-c-myc-ChBD antibody was expressed with the ExpiCHO system. This antibody had an expression of 40 µg/mL, and the affinity



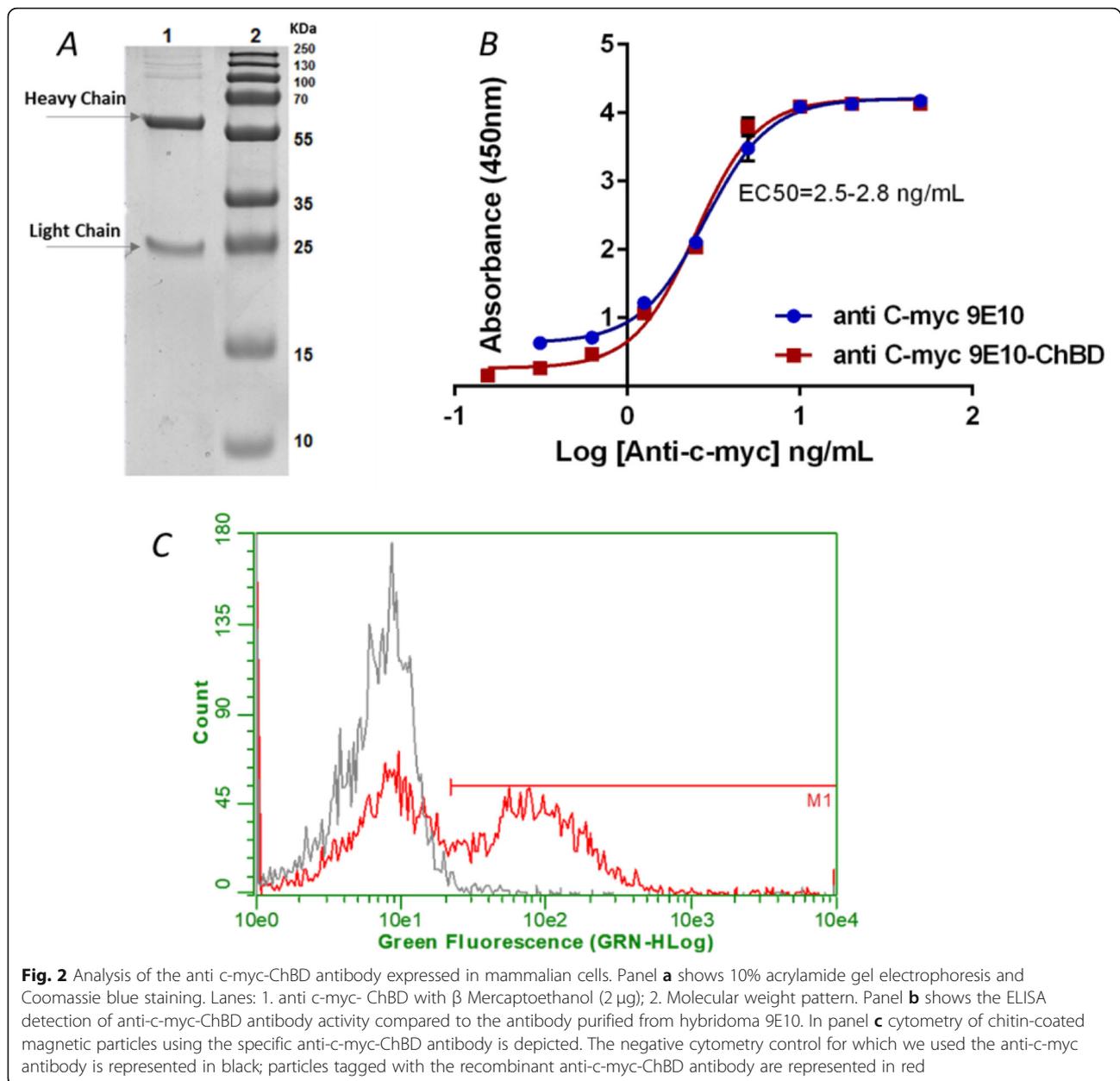
purification with Protein G column using the AKTA system, allowed the isolation of the pure antibody (Fig. 2a). It specifically recognized its antigen with the same sensitivity than the unmodified anti-c-myc 9E10 antibody, as confirmed by a direct ELISA (Fig. 2b). Flow cytometry on chitin particles showed that the chitin binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 fused to the anti-c-myc antibody, was active and capable of binding to chitin in a specific manner. Its union to 50% of the particles was detected (Fig. 2c).

Chitin plates with two types of commercial chitosan were prepared, one with 60% deacetylation and the other with 80%. Both plates were treated by an “in situ” acetylation process. It should be expected that lower percentage of deacetylation would produce better results. However, the signal was higher in those plates prepared from chitosan with 80% deacetylation (Fig. 3a). Besides, when the absorbance and the coefficient of variation of 10 negative control wells were analyzed, these parameters were much higher in acetylated chitosan prepared from a chitosan with 60% deacetylation (Mean blank = 0.208; %CV Blank = 18.66) than in the surfaces prepared from chitosan with 80% deacetylation (Mean blank = 0.170; %CV Blank =

4.70). This result is probably due to the fact that 80% deacetylated chitosan surfaces are less viscous than those prepared using solutions of chitosan with 60% of deacetylation. Therefore, the 80% deacetylated chitosan was selected for the preparation of chitin plates.

As we show here, the binding to surfaces coated with insoluble chitins specific and is recognized only by an antibody fused to the ChBD. Accordingly, the anti-c-myc-ChBD antibody bound specifically to the chitin surface, and no binding of the same antibody lacking the ChBD domain was detected (Fig. 3b). This ELISA was repeated 5 times on different days, and it was determined that in the 95% confidence interval, the EC50 ranged from 47.54 to 67.22 ng/mL. As this is the capture antibody, its concentration should be saturating in the sandwich ELISA, and then the EC95 is calculated to use a higher concentration. The EC95 range was 155.41 to 219.75 ng/mL.

To optimize the binding reaction conditions of ChBD protein with the chitin surface, we performed several tests to improve the experimental conditions (reaction buffer and incubation time of the ChBD-chitin binding). The test buffer selected was  $\text{NaHCO}_3$  since the EC50



**Fig. 2** Analysis of the anti c-myc-ChBD antibody expressed in mammalian cells. Panel **a** shows 10% acrylamide gel electrophoresis and Coomassie blue staining. Lanes: 1. anti c-myc-ChBD with  $\beta$  Mercaptoethanol (2  $\mu$ g); 2. Molecular weight pattern. Panel **b** shows the ELISA detection of anti-c-myc-ChBD antibody activity compared to the antibody purified from hybridoma 9E10. In panel **c** cytometry of chitin-coated magnetic particles using the specific anti-c-myc-ChBD antibody is depicted. The negative cytometry control for which we used the anti-c-myc antibody is represented in black; particles tagged with the recombinant anti-c-myc-ChBD antibody are represented in red

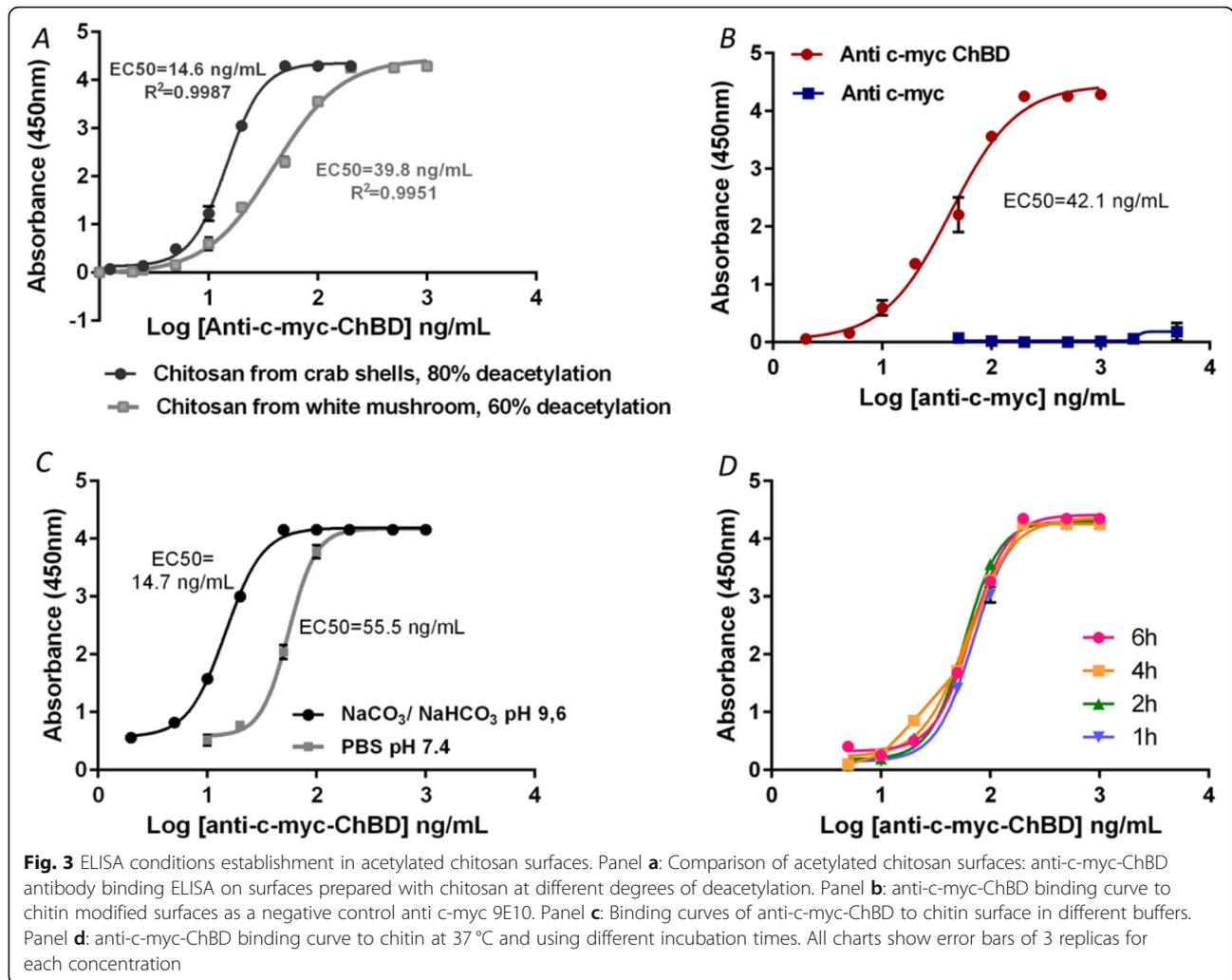
was 14.7 ng/mL, lower than that obtained with PBS, which was 55.5 ng/mL (Fig. 3c). After one-hour incubation, no signal variation was detected. Thus, one hour was selected as the incubation time for binding of anti-c-myc-ChBD antibody to the chitin surface (Fig. 3d).

ELISAs performed on chitosan plates using anti-c-myc-ChBD as capture antibody and ELISAs developed on standard plates using an anti-c-myc antibody were compared (see Fig. 4). The results show that the ELISA performed on chitin surface has a shift of the sigmoid curve to the left, indicating that lower concentrations of the analyte, were detected and quantified. In fact, on the modified surface we detected

analyte concentrations that cannot be measured using standard plates (Fig. 4a).

In the standard plates, the minimum detected amount of human His6-c-myc-GST-IL8h protein was 10.4 ng/mL, while in the chitin surfaces it was 1.74 ng/mL, with 6-fold increase of the detection limit (Table 1). Also, the lowest quantified amounts were 12.5 and 2.4 ng/mL respectively, a 5.2 fold improvement of the detection limit. The statistical analysis yielded significant differences in both the LOD and the LOQ between ELISAs ( $p < 0.0001$  in both cases; see also Fig. 4b).

LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantification; CV: Coefficient of variation.



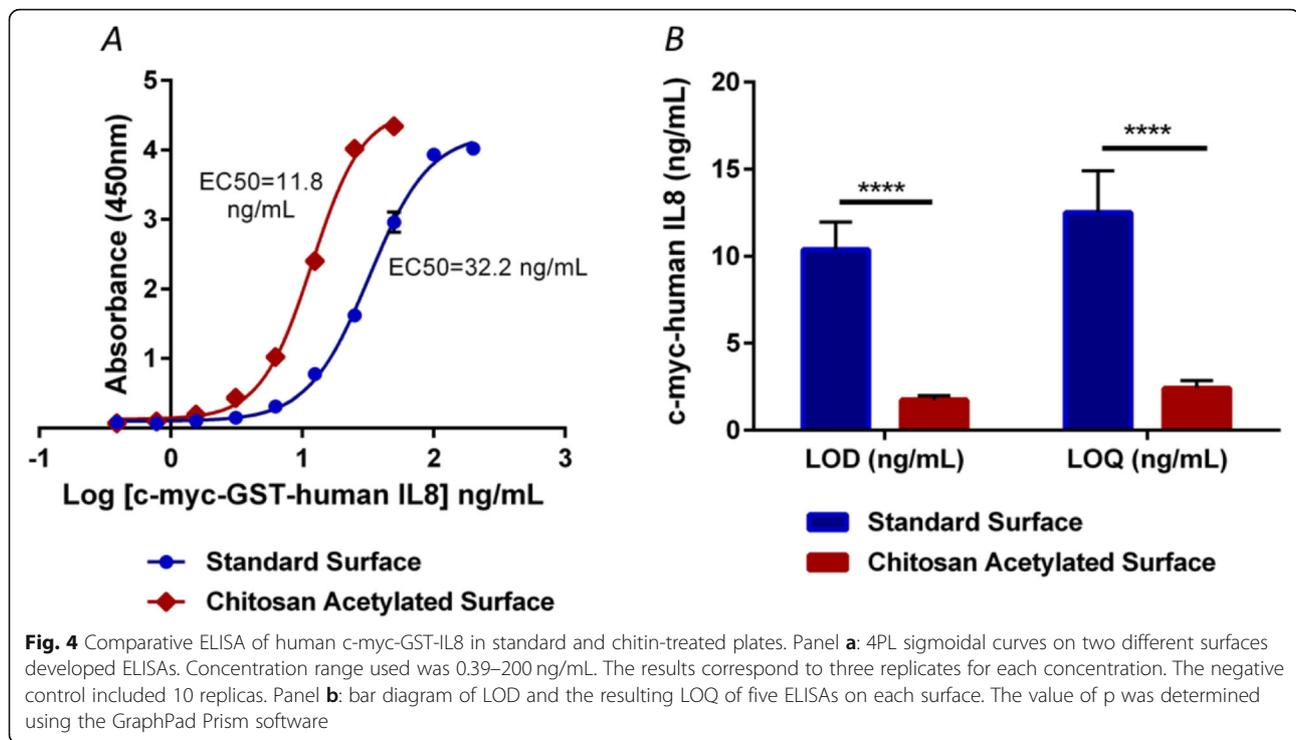
During ELISA assay development a Spike/Recovery assessment is commonly performed to determine whether the value obtained from a sample is accurate and reliable or if there is some factor in the natural sample matrix interfering with the measurement. In this assay, a known amount of recombinant protein, in this case His6-c-myc-GST-IL8h, is “spiked” into a sample and measured in the ELISA. The resulting concentration should not differ significantly from the expected value of the spiked concentration. If there are differences, some factor in the sample may be inhibiting the detection of the protein in this system.

His6-c-myc-GST-IL8h protein was added to human serum and plasma samples, to RPMI medium plus 10% FBS and to PBS: BSA 0.5% at 10 and 100 ng/mL final concentration. The protein was then measured on each sample and the concentrations were calculated using a standard curve. The protein concentrations in PBS: BSA 0.5% was taken as 100% of recovery because this buffer

is commonly used to elaborate standard curves (see Fig. 5 a-b). The recovery acceptance ranges were 80–120% (*R&D Systems*). As observed, excepting the 73% recovery, the other percentages fit with the expected values (Table 2). These results indicate that chitin-prepared plates can be used for the detection of proteins in samples from patients as well as from cell cultures.

### Discussion

ELISA developed with different capture antibody, in this work, anti human-IL8 or anti c-myc 9E10 antibody to detect recombinant protein His6-c-myc-GST-IL8h, show differences in the dynamic range of concentrations. These results were due probably to the sensitivity of the assay, since coating with the anti-c-myc antibody is less sensitive than coating with the anti-human IL8 antibody. This reveals that coating with low affinity antibodies, ELISA displays a lower sensitivity for analyte detection.



When an antibody is used for detection or quantification of its antigen, the assay sensitivity greatly depends on the dissociation constant ( $K_d$ ) of the antibody with its antigen: if the antigen-antibody interaction is weak,  $K_d$  value is high, while if the affinity is high,  $K_d$  value is low. In agreement with most of the reports, the antibody-antigen binding constant may vary in a wide range from  $10^{-5}$  to  $10^{-12} \text{ M}^{-1}$  [21]. The anti-cytokines binding constant is about picomolar range while anti c-myc antibody monoclonal (clone 9E10) has low affinity in at least two order of magnitude to its antigen,  $K_d = 5.3 \pm 0.3 \times 10^{-7} \text{ M}$  [22, 23]. If the binding constant increases by two orders of magnitude, the detection limit can reach 1 pg/mL [24].

Chitin is an insoluble linear  $\beta$ -1,4-linked homopolymer of N-acetyl-glucosamine. Its solubilization with alkali results in chitosan, which forms films whose amino groups, can be readily acetylated with acetic anhydride treatment [25]. This acetylation is necessary since ChBD only recognizes insoluble chitin but no other

polysaccharides such as chitosan, cellulose or starch [20]. Once chitosan is acetylated, ChBD specifically binds to it.

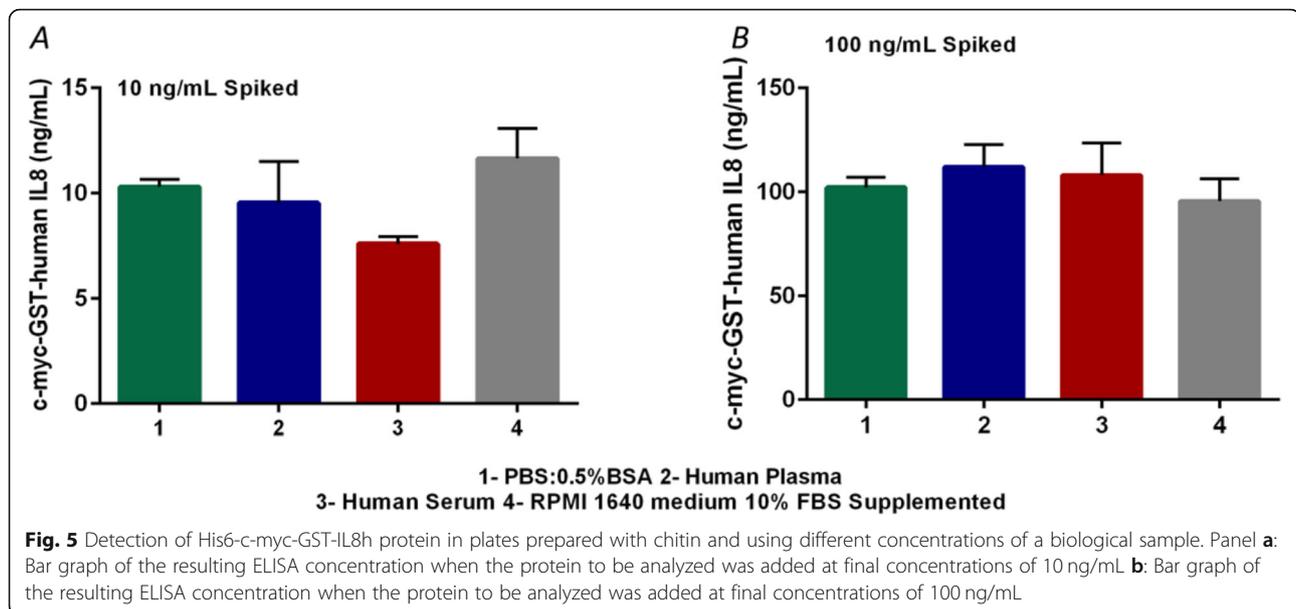
Here we show that the binding of the antibody fused to ChBD to acetylated chitin surfaces is specific. Using neutral or alkaline pH reaction buffer, we obtained better results at higher pH. This result agrees with those reported by Hashimoto et al. [20] since they demonstrated that ChBD from chitinase A1 shows binding activity over a broad range of pHs with the highest binding at pH 9.

Bernard et al. [26] used surfaces coated with acetylated chitosan to detect a ChBD-tagged heterodimeric human glycoprotein hormone analog directly from mammalian cell culture media. They reported that the binding to the surface was stable in sodium dodecyl sulfate and only partially reversed at low pH or in 8 M urea at 37 °C. These facts indicate that ChBD- chitin binding is useful and suitable for ELISA development in those prepared surfaces because of the high ChBD and chitin binding stability. However, these authors did not develop an ELISA to bind an antibody to acetylated chitosan surface.

In our assay we used acetylated surfaces not only to detect ChBD-tagged protein but also to improve the detection of any molecule by immunoassay. Antibodies fused to ChBD enabled us to perform any type of ELISA: sandwich, competitive or indirect. In contrast to this, the method described by Bernard et al. [26] is restricted

**Table 1** Comparison of the obtained results for standard and acetylated chitosan surfaces

	High binding surfaces	Chitosan acetylated surfaces
LOD (ng/ml)	10.38 ± 1.58	1.74 ± 0.23
LOQ (ng/ml)	12.50 ± 1.41	2.40 ± 0.34
%CV Intra-assay	0.27–6.05	0.17–4.90
%CV Inter-assay	0.77–8.35	1.37–6.59



to analytes tagged with the ChBD. In other hand, they used radioactive readout by using radiolabeled monoclonal antibodies. We reported in our work the coupling of acetylated chitosan surface to a colorimetric enzymatic assay.

In biomolecular assays and sensor development, the detection limit is of capital importance and, consequently, numerous investigations to bring the detection limit of bioanalytical techniques to the lowest possible levels have been carried out. In ELISA assays the orientation of immobilized antibodies to improve immunoassays has been extensively investigated [14].

To promote site directed antibody binding, affinity immobilization techniques are good strategies [27]. Among others, these techniques use the affinity of antibodies for Protein A (a surface protein of *Streptococcus*) and Protein G (a surface protein of *Staphylococcus aureus*) [18, 28], specific peptides and aptamers that bind to antibodies Fc region [11, 29] and the biotin-streptavidin interaction [30].

The interaction between streptavidin-coated surfaces and biotinylated antibodies do not support the correct orientation of the antibodies because biotinylation is a

random process. The biotin can attach to the amino group of any lysine and also to an amino terminal. Consequently, the antibody may not be properly oriented on the surface. But by far the most important limitation of this procedure is that generally biotinylated antibodies are used as secondary antibodies, that is, antibodies that are used to detect the analyte bound to a first coating antibody. Cho et al. [31] conjugated antibodies to biotin at the hinge disulfides and found only two-fold improvement in the antigen detection relative to the system using random biotinylation of antibodies. Antibodies immobilization using coating microplates with G protein is a commercial technique and there have been attempts to improve its outcomes [19]. Nevertheless, it has the disadvantage that the use of IgG as secondary antibodies must be avoided as any free G protein will react with such secondary IgG. This fact is very important as most commercial antibodies used today in ELISA are IgG isotype.

As we demonstrated, a recombinant antibody fused to ChBD by the Fc region would be an excellent method to achieve adequate orientation of antibodies in ELISA microplates similar to trapping antibodies with Protein A

**Table 2** ELISA analyte recovery in different media compared to the control

Sample	Spiked level (ng/ml)	ELISA results (ng/ml)	%Recovery
Human Plasma	10	9.54	92.54
	100	112.11	109.73
Human Serum	10	7.59	73.69
	100	108.00	105.70
RPMI medium (10% FBS Supplemented)	10	11.66	113.15
	100	95.53	93.50

or G. This system based on acetylated chitosan surface-ChBD antibody has the additional advantage that all antibody isotypes and any biotinylated antibody can be used for detection.

The employment of chitosan acetylated surfaces and antibodies fused to CHBD greatly increase the ELISA sensitivity through the enhancement of the detection limit. Probably, the improvement is achieved by the adequate orientation of antibodies in the microplates well used in our system. The literature cited in this manuscript shows that the binding to polystyrene surfaces tends to distort some trapping antibodies enough to destroy their value as a capture antibodies [12, 13]. The method described in this paper avoids that tendency because the binding to surface is through affinity and not by hydrophobic and electrostatic interactions.

## Conclusions

In summary, the data showed in this work support that acetylated chitosan surfaces improve biomarkers detection even using low affinity antibodies. ELISA developed on chitin surface was 6-fold more sensitive than those performed on standard surfaces. This method has the advantage that can be developed for any biomarker and any antibody isotype can be used as a detection reagent. The method should be used to quantify a biological sample that has a concentration below the detection limit of traditional ELISA. Given the increase in sensibility, stability in time and the low cost of its preparation, acetylated chitosan surfaces may be an excellent alternative to standard surfaces.

## Methods

### Construction of the pET43a-His6-c-myc-GST- human IL-8 expression plasmid

The synthetic fragment His6-c-myc-GST-human-IL-8 was cloned into the pET43a vector (Novagen) with the restriction enzymes *NdeI* and *SalI*. The chimeric protein was constituted by a six histidine tag, one additional tag derived from a terminal fragment of the proto oncogene c-myc (EQKLISEEDL), the glutation-S-transferase protein (GST) and the human cytokine interleukin-8 (Gb: NM\_00584.4). The sequence of the recombinant plasmid was confirmed by restriction digestion and DNA sequencing.

### Induction, expression and purification of protein His6-c-myc-GST- human IL-8

*E. coli* BL21 (DE3) cells carrying the recombinant plasmid pET43a-His6-c-myc-GST-human IL-8 were grown in 0.5 L Luria Bertani (LB) medium containing 100 µg/mL of ampicillin at 37 °C. When the bacterial

growth reached optical density of 0.8 at 600 nm ( $OD_{600\text{ nm}}$ ), 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the culture to induce expression of the protein. The culture was incubated for a further 4 h at 37 °C. Then cells were collected by centrifugation (5000 x g for 5 min), washed with PBS supplemented with 1 mM EDTA and resuspended in the same buffer. The cells were disrupted by sonication with a Bandelin Sonoplus disruptor set at 70% of power. The soluble fraction was clarified by centrifugation (4 °C, 14000 x g, 30 min) and was filtered through 0.22 µm filter. Then it was loaded on a 1 mL HisTrap HP column (GE Healthcare 17-5247-01) connected to an AKTA Prime plus (GE Healthcare). After washing with 20 mM sodium phosphate pH 7.4, proteins were eluted by applying the same buffer plus 500 mM imidazole. Protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin (BSA) as standard. Sodium dodecyl sulfate (SDS) -polyacrylamide gel electrophoresis with 12% polyacrylamide was carried out.

### Comparative ELISA assays for the detection of bi-specific model c-myc-GST-human IL-8 protein using two coating antibodies with different affinity

Maxisorp plates (Thermo 442,404) were coated with the antibodies anti-human IL-8 clone MT8H6 or anti-c-myc purified from 9E10 hybridoma diluted to 2 µg/mL each other in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6 and incubated overnight at 4 °C. After blocking with PBS pH 7 containing 1% (w/v) BSA, the model protein GST-c-myc-human IL-8 was added in serially dilutions from 4 to 1000 pg/mL in the anti-human IL-8 plates and from 0.4 to 200 ng/mL on anti-cmyc coated plates. The next steps were as those described for ELISA as follow. Both ELISAs were developed using an anti-human IL-8 biotin clone MT8F19 antibody at 1 µg/mL. After 5 washing steps 100 µl per well of streptavidin-HRP diluted at 100 ng/mL and TMB (3, 3',5,5'- tetramethylbenzidine) were sequentially added to them. Enzyme reaction was stopped with 1 M HCl and color development was measured at 450 nm on a microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech).

### Chimeric antibody anti c-myc-ChBD

#### Cloning of anti-cmyc 9E10 antibody from hybridoma cells and fusion with ChBD

RNA was isolated from 10<sup>6</sup> cells 9E10 hybridoma using the PRImeZOL™ Reagent (Canvax AN1100) following the manufacture's protocol, reverse-transcribed (RT) into cDNA and VH and VL genes was amplified by PCR with the high-fidelity DNA polymerase (Canvax P0032). Retro transcription of the fragment VK-CK was

performed with the primer pCK-2rev (5'TATGCGGCCGCTTTGTCTCTAACACT-CATTCTG 3'). The primers pVK-1fw (5'GGGGA-TATCCACCATGGAGACAGACACTCTGCTAT 3') and pCK-2rev were used for the amplification. On the other hand, VH fragment cDNA was obtained using the antisense primer pVH9E10-6rev (5'TTTTAGATC-TAATTTTCTTGTCCACCTTGGTGC 3') and the elongation was developed with pVH9E10-4fw (5'TTTAAGCTTCGCCACCATGAACTTCGGGCTCAG 3') and pVH9E10-6rev. PCR products were cloned into pSPARK® vector (Canvax C0001). The pSPARK® vector used for this purpose encoded the LacZ  $\alpha$ -peptide when no insert was present. This allowed a blue/white selection on IPTG and X-gal containing LB-agar plates. The functional obtained sequences were then subcloned into mammalian expression vector pCDNA3.4 driven by cytomegalovirus promoter. The VH fragment cloned was fused to the murine FC IgG.

ChBD (chitin binding domain) of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 was synthesized with the flank restriction enzymes 5' *NheI*/ 3' *NotI*. The fragment was ligated simultaneously with the PCR fragment performed with the primers pVH9E10-4fw and pIgG1m-25rev (5'GATAGC-TAGCTTTACCAGGAGAGTGGGAGAG 3') on the pCDNA3.4 vector coding the VH fragment digested by the restriction enzymes *HindIII*/ *NheI*. Both fragments were ligated at once into the expression vector opened with the restriction enzymes *HindIII*/ *NotI*.

#### **Expression and purification of anti c-myc- ChBD antibody in mammalian cells**

Both VH-IgG1 and VL-CK chain of the anti c-myc-ChBD expression vectors were co-transfected in CHO-S (Chinese hamster ovary) cells using the ExpiCHO Expression system kit (Thermo A29133). The antibody was expressed at 32 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 10 days attending to the manufacturer's instructions. Cells were isolated by centrifugation and the supernatant was measured by mouse IgG sandwich ELISA and purified by affinity chromatography with protein G column (HiTrap Protein G, GE Healthcare 29-0485-81). Pure antibody concentration was measured by absorbance at 280 nm and purity grade was analyzed by SDS-PAGE.

#### **Flow cytometry to detect chitin binding domain activity using chitin magnetic beads**

For the activity detection of the chitin binding domain fused to the heavy chain of anti c-myc antibody, chitin magnetic beads were used (BioLabs E8036S), following the manufacturer's guidelines. The antibodies were diluted in binding buffer at 1  $\mu$ g/mL (500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton-X100, pH 8) and incubated with 50  $\mu$ l of beads

at 4 °C for 1 h. After 3 washing steps with the same buffer, 1  $\mu$ g/mL of anti-mouse FITC was added and incubated at 4 °C for 30 min. Beads were analyzed on a flow cytometer (Guava EasyCyte mini, Guava Technologies).

#### **ELISA to detect anti c-myc-ChBD antibody activity compared with the antibody 9E10 from hybridoma**

A microplate coated with 2  $\mu$ g/mL c-myc-GST-human IL-8 antigen was blocked with PBS containing 1% (w/v) BSA. Then serially dilution of the anti-c-myc-ChBD antibody from CHO-S or anti c-myc 9E10 antibody from hybridoma were added and incubated at 37 °C for 1 h. Both antibodies concentrations were ranging from 100 to 0.078 ng/mL. After microplates washing, anti-mouse HRP (Sigma A2554) and TMB were sequentially added to them. Enzyme reaction was stopped with 1 M HCl and color development was measured at 450 nm on a microtiter reader.

#### **Preparation of microtiter plates with acetylated chitosan**

The procedure described by Bernard et al., 2004 with modifications was used. Deacetylated chitosan (30 mg) were dissolved in 5 mL of 0.1 M Sodium acetate pH 3. Two deacetylated chitosans with different grades of deacetylation were used: chitosan from white mushroom (60% deacetylation, Sigma 740,063) and chitosan from crab shells (80% deacetylation, Sigma 48,165). Each solution was diluted 20-fold in sodium acetate pH 5, and the polystyrene plates filled with 50  $\mu$ l per well. Afterward, 8  $\mu$ l per well of acetic anhydride (Sigma 320,102) were added. The plate was placed in a fume hood and allowed to dry overnight. Eventually, the plate was washed using PBS 10X pH 7.4 and blocked with 0.3 mL PBS (10x) pH 7.4: BSA (1  $\mu$ g/mL).

#### **Comparison of microplates coated with two different deacetylated chitosans by binding of the chimeric anti-c-myc-ChBD antibody**

Two different chitosan acetylated microplates prepared using white mushroom and crab shells chitosan. Anti-c-myc-ChBD antibody in serial dilutions ranging from 0.039 to 50 ng/mL were added. Microplates were incubated at 37 °C for 2 h. After washing, anti-mouse HRP (Sigma A2554) and TMB were sequentially added to them. Enzyme reaction was stopped with 1 M HCl and color development was measured at 450 nm on a microtiter reader.

#### **Optimization of protein c-myc-GST-human IL-8 detection in acetylated chitosan microplates**

Anti c-myc-ChBD antibody concentration, incubation time (1, 2, 4, 8 and 16 h) and the binding buffer for the

binding reaction chitin- chitin binding domain were established. Concentrations ranging 0.312 to 1 µg/mL of anti c-myc-ChBD antibody and PBS pH 7.4 or NaHCO<sub>3</sub> pH 9 buffers were used. ELISA assays were carried out on chitosan acetylated surfaces. Anti c-myc antibody from 9E10 hybridoma was used as negative control of the chitin specific binding. ELISA was revealed with an anti-mouse HRP (Sigma A2554).

#### Comparative ELISA between standard polystyrene and chitosan acetylated surfaces

ELISA assays were performed simultaneously in standard polystyrene (Maxisorp, Thermo 442,404) and in chitosan acetylated microplates (Fig. 6). Standard microplates were coated with the anti-c-myc antibody while chitosan acetylated plates were coated with the anti-c-myc-ChBD antibody. Afterwards, a concentration range of the chimeric protein His6-c-myc-GST- human IL-8 from 100 to 0.39 ng/mL, was prepared. 100 µL of samples per well were added and incubated at 37 °C for 1 h. After washing steps, the biotinylated antibody anti IL-8 (clone MT8F19) and streptavidin- conjugated horseradish peroxidase were used. TMB was added for color development and plates were measured at 450 nm on a microtiter reader. Both ELISAs were performed simultaneously under the same conditions, on 5 different days, using three replicates of each concentration and 10 replicates of the target.

#### Influence of serum, plasma and cell culture medium using acetylated chitosan microplates

The c-myc-GST-human IL-8 spiked samples were prepared by mixing two different concentrations of protein,

100 ng/mL and 10 ng/mL in human serum, human plasma, PBS: BSA 0.5% and cell culture medium (RPMI 1640 medium). The sample concentrations were determined in chitosan acetylated microplates plotting in control curve performed in PBS-BSA 0.5%.

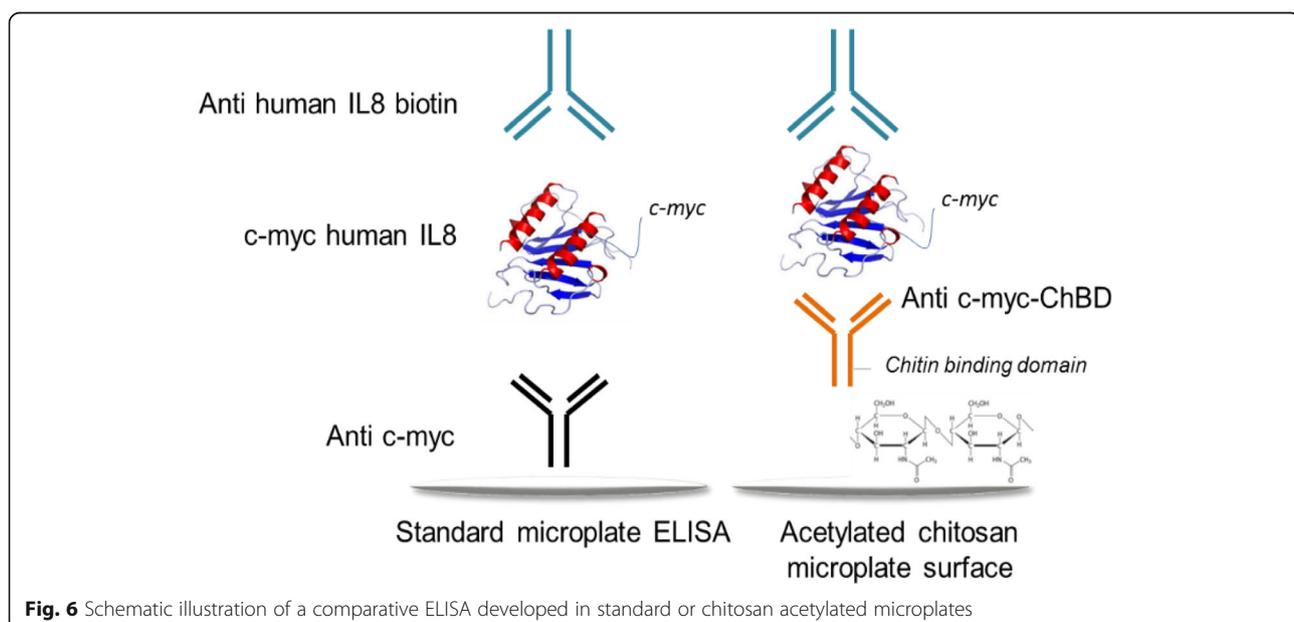
The recovery percentages were calculated using the concentrations measured in PBS: BSA as 100% of recovery or expected concentration. We used the equation:

$$\% \text{ recovery} = (\text{Sample concentration observed} - \text{medium concentration unspiked}) / \text{Concentration obtained in PBS: BSA 0.5\%}$$

#### Assay performance analysis

All datasets obtained from the developed ELISA procedures were subjected to four-parameter logistic function- based standard curve analysis in the GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA): EC<sub>50</sub>, R<sup>2</sup>, to determine limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). The EC<sub>50</sub> indicates the concentration at which half of the test signal is obtained or the half maximal effective concentration, and R-squared, is a statistical measure of how close the data are to the fitted curve. Both parameters were determined from the report data generated by the software.

Absorbance corresponding to the detection limit was the result of the average absorbance of the blank from all the repeats plus 3 standard deviations of the blank while for quantification limit was the same but 10 standard deviations. Then, by plotting the absorbance on the standard curve, the values of the LOD and LOQ concentration are obtained.



**Abbreviations**

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; ChBD: Chitin binding domain; Fc: fragment crystallizable; LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantification; Kd: Dissociation constant; CV: Coefficient of variation; GST: Glutathion-S-transferase; IL8: Interleukin-8; BSA: Bovine serum albumin

**Acknowledgements**

Not applicable.

**Authors' contributions**

All authors participated in the design of the study and the interpretation of the results; TGM executed the experiments with the help of FIGM; TGM, FIGM and JAGR 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 TGM. All authors read and approved the manuscript on its current form.

**Funding**

This work was partially supported by the project number 360229 (Reference: 76359) from "Junta de Andalucía". 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.

**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Canvax Biotech; Parque Científico y Tecnológico Rabanales 21, c/Astrónoma Cecilia Payne s/n, Edificio Canvax, 14014 Córdoba, Spain. <sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3, 14014 Córdoba, Spain.

Received: 25 April 2020 Accepted: 10 August 2020

Published online: 19 August 2020

**References**

- Hornbeck P. Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 2:Unit 2.1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s01>.
- Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*. 2005;51:2415–8.
- Wayner EA, Quek S-I, Ahmad R, Ho ME, Loprieno MA, Zhou Y, Ellis WJ, True LD, Liu AY. Development of an ELISA to detect the secreted prostate cancer biomarker AGR2 in voided urine. *Prostate*. 2012;72(9):1023–34.
- Vashist SK, Schneider EM, Lam E, Hrapovic S, Luong JHT. One-step antibody immobilization-based rapid and highly-sensitive sandwich ELISA procedure for potential in vitro diagnostics. *Sci Rep*. 2014;4:4407.
- Dixit CK, Vashist SK, MacCraith BD, O'Kennedy R. Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays. *Nat Protoc*. 2011;6(4):439–44.
- Faget L, Hnasko TS. Tyramide Signal Amplification for Immunofluorescent Enhancement. In: Hnasko R. [ed] *ELISA. Methods in Molecular Biology*. 2015; 1318:161–172. Humana Press, New York, NY.
- LakshmiPriya T, Gopinath SCB, Tang T-H. Biotin-streptavidin competition mediates sensitive detection of biomolecules in enzyme linked immunosorbent assay. *PLoS One*. 2016;11(3):1–14.
- Varnum SM, Warner MG, Dockendorff B, Anheier NC, Lou J, Marks JD, Smith LA, Feldhaus MJ, Grate JW, Bruckner-Lea CJ. Enzyme-amplified protein microarray and a fluidic renewable surface fluorescence immunoassay for botulinum neurotoxin detection using high-affinity recombinant antibodies. *Anal Chim Acta*. 2006;570(2):137–43.
- Yu R, Ma W, Liu X, Jin H, Han H, Wang H, Tian H, Long Y. Metal-linked immunosorbent assay [MeLISA]: the enzyme free alternative to ELISA for biomarker detection in serum. *Theranostics*. 2016;6(10):1732–9.
- Zhang Y, Yang J, Nie J, Yang J, Gao D, Zhang L, Li J. Enhanced ELISA using a handheld pH meter and enzyme-coated microparticles for the portable, sensitive detection of proteins. *Chem Commun*. 2016;52:3474.
- Jung Y, Jeong JY, Chung BH. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. *Analyst*. 2008;133(6):697–701.
- Butler JE. Solid support in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods*. 2000;22(1):4–23.
- Butler JE, Ni L, Brown WR, Joshi KS, Chang J, Rosenberg B, Voss EW. The immunochemistry of sandwich ELISAs—VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescein capture antibodies [CAbs] are denatured by passive adsorption. *Mol Immunol*. 1993;30:1165.
- Welch NG, Scoble JA, Muir BW, Pigram PJ. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays. *Biointerphases*. 2017;12:02D301.
- Hasan A, Pandey LM. Polymers, surface-modified polymers, and self assembled monolayers as surface-modifying agents for biomaterials. *Polym-Plast Technol Eng*. 2015;54(13):1358–78.
- Lebec V, Boujday S, Poleunis C, Pradier CM, Delcorte A. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry investigation of the orientation of adsorbed antibodies on SAMs correlated to biorecognition tests. *J Phys Chem C*. 2014;118(4):2085–92.
- Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog Polym Sci*. 2007;32(7):698–725.
- Karyakin AA, Presnova GV, Rubtsova MY, Egorov AM. Oriented immobilization of antibodies onto the gold surfaces via their native Thiol groups. *Anal Chem*. 2000;72(16):3805–11.
- Chen YJ, Chen M, Hsieh YC, Su YC, Wang C, Chen C, Kao AP, Wang KH, Cheng JJ, Chuang KH. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) through use of poly-protein G-expressing cell-based microplates. *Sci Rep*. 2018;8:17868.
- Hashimoto M, Ikegami T, Seino S, Ohuchi N, Fukuda H, Sugiyama J, Shirakawa M, Watanabe T. Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *J Bacteriol*. 2000;182(11):305–3054.
- Heinrich L, Tissot N, Hartmann DJ, Cohen R. Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity. *J Immunol Methods*. 2010;352(1–2):13–22.
- Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*. 1985;5(12):3610–6.
- Hilpert K, Hansen G, Wessner H, Küttner G, Welfle K, Seifert M, Höhne W. Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Eng Des Sel*. 2001;14(10):803–6.
- Zhang S, Garcia-D'Angeli A, Brennan JP, Huo Q. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA] and bioanalytical techniques in general. *Analyst*. 2014;139:439.
- Kast CE, Bernkop-Schnürch A. Thiolated polymers—thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan–thioglycolic acid conjugates. *Biomaterials*. 2001;22(17):2345–52.
- Bernard MP, Cao D, Myers RV, Moyle WR. Tight attachment of chitin-binding-domain-tagged proteins to surfaces coated with acetylated chitosan. *Anal Biochem*. 2004;327:278–83.
- Wang C, Feng B. Research progress on site-oriented and three-dimensional immobilization of protein. *Mol Biol*. 2015;49(1):1–20.
- Nilsson B, Moks T, Jansson B, Abrahamson L, Elmblad A, Holmgren E, Henrichson C, Jones TA, Uhlen M. A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein a. *Protein Eng Des Sel*. 1987;1(2):107–13.
- Miyakawa S, Oguro A, Ohtsu T, Imataka H, Sonenberg N, Nakamura Y. RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent

translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *RNA*. 2006;12:1825–34.

30. Turkova J. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *J Chromatogr B*. 1999;722: 11–31.
31. Cho IH, Paek EH, Lee H, Kang JY, Kim TS, Paek SH. Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces. *Anal Biochem*. 2007;365(1):14–23.

### **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](https://biomedcentral.com/submissions)

