







# APLICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONODOMINIO COMO HERRAMIENTA EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO

# Trabajo de tesis para acceder al título de Doctora en Biotecnología



# B.C. Triana Delfin Riela

Orientador: Dr. Gualberto González-Sapienza Co-orientador: Dr. Martín A. Rossotti

Área Inmunología - Facultad de Química/Ciencias - UdelaR

Octubre 2021 Montevideo, Uruguay

#### **Dra. María Moreno** Facultad de Medicina, UdelaR

**Dra. Mabel Berois** Facultad de Ciencias, UdelaR

Tribunal:

**Dr. Andrés Abin** Instituto Pasteur de Montevideo



"Nada en la vida es para ser temido, sólo comprendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos"

Marie Curie

## Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a la Dra. Mabel Berois, Dra. María Moreno y al Dr. Andrés Abin, por haber aceptado ser parte del tribunal y dedicarme su tiempo.

A las agencias de financiación ANII y CSIC.

A todos los compañeros de la Cátedra de Inmunología con los que he compartido muy buenos momentos. En particular, agradezco a mis compañeros de la casita del fondo, Andy, Gaby, Sofi, Noe S., Lu. V, Naty, y a Noe M. por transmitirme siempre su buena energía. Especialmente a Maca por muchas horas de aguante. A las compañeras que empezaron junto conmigo y que hoy son "mis amigas que quiero tanto" Ceci, Lu, Alfy y Cin. A Diego, por haber sido mi "compinche" muchas veces y por haber hecho mucho más divertido mi pasaje por el laboratorio. A los más chicos Pau, Marti, Caro, Diego D., y a Romi que durante los últimos meses me ayudó con su buena onda y disposición.

También agradezco a los vecinos, a la casita de adelante y del medio. A Gus, Ceci S. y Pau por haberme escuchado muchas veces y siempre estar dispuestos a colaborar. Especialmente, a mi amigo Clau, por su inmensa generosidad, por haber estado presente en cada momento, y por siempre ayudarme a ordenar mi cabeza media desordenada.

A Ceci Fernández por haberme invitado a entrar al laboratorio y por sus sabios consejos.

A mis tutores, a Gualberto por haberme dado la oportunidad de incorporarme al equipo y por motivarme a pensar de manera crítica e independiente. A Martín, por haberme compartido su pasión y entusiasmo por "hacer magia". Y por siempre haber trabajado junto a mí desde muy cerca, brindándome todo su apoyo y conocimiento.

A Bioquim, por siempre respetar mis decisiones y acompañarme en mi desarrollo profesional. A Benten por la confianza.

Finalmente, a toda mi familia y amigos, por haberme brindado su soporte y haber compartido mis logros con alegría. A mis abuelos, por siempre haber colaborado con mi crecimiento. A Christian, por acompañarme durante tantos años, por la paciencia, por su contención y siempre motivarme a seguir. Especialmente, a mis padres, por el apoyo y amor incondicional que me dieron en cada una de las etapas de mi vida, y su infinita confianza en mí, es que les dedico esta tesis.

### Resumen

La respuesta inmune humoral de los camélidos presenta un tipo peculiar de anticuerpos carentes de cadena liviana, conocidos como anticuerpos de cadena pesada. En estos, el sitio de unión al antígeno está conformado únicamente por el dominio variable de la cadena pesada, denominado VHH. Este es el fragmento de reconocimiento antigénico más pequeño conocido en la naturaleza (-15 kDa), y su producto de expresión recombinante se denomina Nanobody.Debido a la simplicidad en su manipulación genética, excepcional estabilidad conformacional y facilidad de expresión, los nanobodies constituyen valiosas herramientas biotecnológicas. Actualmente, estos se han convertido en una atractiva alternativa frente a los anticuerpos convencionales para su uso en investigación, diagnóstico y terapia. Su crecimiento en el área diagnóstica ha sido el menos pronunciado, posiblemente debido a lo establecidos que se encuentran los anticuerpos convencionales. Esta tesis se focalizó en consolidar una plataforma para la selección de nanobodies capaces de detectar biomoléculas con valor diagnóstico en matrices de alta complejidad. Mediante el desarrollo de diversos inmunoensayos modelo generados con nanobodies, se pretendió demostrar el potencial que presentan los mismos en aplicaciones diagnósticas.

En una primera etapa se utilizó como modelo el diagnóstico de cáncer de colon, donde la búsqueda de hemoglobina en materia fecal constituye un valioso biomarcador. Inicialmente, se trabajó en la selección de un par de nanobodies capaces de reconocerla. Posteriormente, estos se adaptaron a un enzimoinmunoensayo de tipo ELISA que permite cuantificar dicha proteína. El ensayo generado fue validado analíticamente, y se constató que es capaz de cuantificar con alta sensibilidad y selectividad a la hemoglobina humana en heces. De esta manera, tras su validación con muestras clínicas, podría contribuir al tamizaje masivo de población asintomática.

En una segunda etapa, se empleó como modelo de estudio la infección por el virus del Zika para demostrar la aplicabilidad de los nanobodies a diversos inmunoensayos. En una primera instancia, se seleccionaron nanobodies contra la proteína no estructural 1 (NS1) de este virus. Mediante la optimización de un par de ellos, se generó un ELISA ultrasensible que permite cuantificar selectivamente esta proteína en suero. Tras su validación diagnóstica, este ensayo permitiría detectar al virus en etapas agudas de la infección. En segunda instancia, se adaptó el par de nanobodies seleccionado a una prueba de flujo lateral. Esta constituye una primera aproximación para la detección de NS1, que luego de su optimización, permitiría su determinación in situ. Finalmente, se desarrolló un ensayo de inhibición para la detección de anticuerpos anti-Zika. Debido a la selectividad que presentan los nanobodies por epítopes no conservados de la NS1 de este virus, el ensayo permitió clasificar correctamente a un panel de sueros con anticuerpos contra diversos flavivirus. Tras su validación con un mayor número de muestras, el ELISA de "bloqueo de unión" desarrollado permitiría detectar la infección convaleciente.

Mediante los desarrollos realizados fue posible consolidar una plataforma biotecnológica para la selección de nanobodies que facilita la adaptación de los mismos a inmunoensayos de uso clínico. Estos desarrollos contribuyen a la demostración de que los nanobodies constituyen una saliente opción para la generación de herramientas diagnósticas.

# Índice

Agradecimientos.	
Resumen.	
Abreviaturas y acrónimos	1
Introducción	3
Anticuerpos convencionales	7
I.I Anticuerpos policlonales	8
I.II Anticuerpos monoclonales	9
I.III Fragmentos derivados de anticuerpos convencionales	9
II. Anticuerpos de cadena pesada de camélido	11
II.I Características estructurales de los VHHs	12
II.II Ventajas biotecnológicas de los nanobodies	14
II.III Aplicaciones de los nanobodies como herramientas en el diagnóstico	15
II.IV Generación y selección de nanobodies mediante Phage Display	16
II.V Búsqueda de pares de nanobodies: inmunoensayos sándwich	21
III. Aplicaciones con potencial diagnóstico abordadas en esta tesis	25
III.I Detección de sangre oculta en materia fecal	25
III.II Diagnóstico de la infección por el virus del Zika	28
Objetivos	32
Materiales y métodos	35
Capítulo 1	37
Capítulo 2	43
Capítulo 3	46
Capítulo 4	53
Resultados y discusión	57
Parte I: Contribución al diagnóstico precoz de cáncer colorrectal	57
CAPÍTULO 1. Desarrollo de ELISA para cuantificación de hemoglobina humana	en
materia fecal	59
1.1 Generación y selección de nanobodies contra hemoglobina humana	60
1.2 Optimización de Nbs seleccionados para conformación de ELISA sándwich	64
1.3 Validación analítica del ELISA sándwich desarrollado	69

1.4 Consideraciones finales del	capítulo7	'1
---------------------------------	-----------	----

Parte II: Contribución al diagnóstico de infecciones por el virus de Zika	73
<u>CAPÍTULO 2.</u> Producción recombinante de la proteína NS1 del virus del Zika	75
2.1 Expresión de NS1 en sistema procariota	76
2.2 Expresión de NS1 en sistema eucariota	79
2.3 Consideraciones finales del capítulo	. 82

<u>CAPÍTULO 3.</u> Desarrollo de inmunoensayos para la detección de proteína NS1 en el
diagnóstico de la infección aguda de Zika83
3.1 Desarrollo de ELISA de captura para la cuantificación de la NS1 de Zika84
3.1.1 Generación y selección de nanobodies contra ZIKV-NS1
3.1.2 Optimización del par de Nbs seleccionados en un ELISA sándwich para
cuantificación de ZIKV-NS1 en suero95
3.1.3 Validación analítica del ELISA conformado por el par de Nbs 32/D697
3.1.4 Evaluación de la estabilidad del ensayo100
3.2 Desarrollo de ensayo inmunocromatográfico para detección de ZIKV-NS1102
3.2.1 Formato 1: Detección mediante conjugados con carbón102
3.2.2 Formato 2: Detección mediante conjugados a oro coloidal104
3.3 Consideraciones finales del capítulo106

CAPÍTULO 4. Desarrollo de un ELISA de bloqueo de unión para la detección d	e
anticuerpos contra el virus del Zika10	17
4.1 Selección de nanobodies de trabajo11	0
4.2 Optimización de las condiciones experimentales del ELISA de bloqueo11	3
4.3 Caracterización del ensayo11	5
4.4 Consideraciones finales de este capítulo11	17
Conclusiones finales y perspectivas11	9
Bibliografía124	4
Anexo 113	3
Anexo 2	7

## Abreviaturas y acrónimos

6xHis: Seis histidinas ADN: Ácido desoxirribonucleico ARN: Ácido ribonucleico BSA: Albúmina sérica bovina (Bovine Seric Albumin) Bt: Biotina Buffer: Solución tampón Da: Dalton DV: Virus del Dengue (Dengue Virus) ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Fab: del inglés Fragment Antigen Binding FOBT: del inglés Fecal occult blood test HA: péptido de hemaglutinina HEK 293-T: del inglés, human embryonic kidney 293T cells Hgh: Hemoglobina humana HRP: Peroxidasa del rábano picante (horseradish peroxidase) ill-IgG: inmunoglobulinas de llama inmune Ig: Inmunoglobulina IS: Estándar interno (Internal standard) mAb: Anticuerpo monoclonal (monoclonal antibody) MALDI-TOF: Espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz, tiempo de vuelo (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, Time of Flight) m/z: relación masa/carga Nbs: Dominios variables de anticuerpos de cadena pesada recombinantes (Nanobodies) NIBSC: National Institute of Biological Control NS1 Proteína no estructural 1 (Non Structural Protein) LOD: Límite de detección (Limit Of Detection) LOQ: Límite de cuantificación (Limit Of Quantification) OD: Densidad óptica (Optical Density) OMS: Organización Mundial de la Salud pAb: Anticuerpo policional (Policional antibody) PBS: Solución fosfato salino (Phosphate Buffered Saline) PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) **PEG:** Polietilenglicol **PEI:** Polietilamina RSD: Desviación estándar relativa (%) (Relative Standard Deviation) scFv: del inglés, single chain variable fragment SD: Desviación estándar (Standard Deviation) SLV: Virus de San Luís (Saint Louis Virus) Stp: Estreptavidina Tag: péptido de marcado UV: detector UV/visible VHHs: Dominios variables de anticuerpos de cadena pesada de camélidos WNV: Virus occidental del Nilo (West Nile Virus) YFV: Virus de la Fiebre amarilla (Yellow Fever Virus) ZIKV: Virus del Zika (Zika Virus) ZIKV-NS1: Proteína no estructural del Zika



# Introducción

## Introducción

La medicina de laboratorio y la química clínica son las ciencias dirigidas a generar información clínica relevante mediante el análisis de la concentración, composición y/o estructura de los analitos en material biológico [1]. El número y variedad de pruebas diagnósticas disponibles en el laboratorio clínico, y por tanto su importancia, se ha expandido exponencialmente desde 1920 cuando Folin y Wu reportaron un método para detectar la concentración de glucosa en suero humano [2]. Se estima que hoy en día el laboratorio clínico interviene en más de un 70% de las decisiones médicas [3]. Ello se debe a que participa en distintas áreas del diagnóstico, como ser, en la predicción a desarrollar una patología, en la prevención mediante la detección de indicadores de riesgo, en el pronóstico de la evolución del paciente y en el monitoreo del tratamiento [4, 5]. Debido al avance en el conocimiento de disciplinas como genómica y proteómica, y al desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas, es predecible que en el futuro su rol cobre aún mayor relevancia [3]. Actualmente, existe variedad de metodologías utilizadas en el laboratorio clínico. Entre ellas, de las más antiguas se destacan la microscopía, los métodos microbiológicos y los bioquímicos clásicos. En las últimas décadas comenzó a cobrar importancia la implementación de técnicas para la detección de marcadores biológicos específicos para distintas enfermedades. Los biomarcadores son moléculas que se encuentran en fluidos corporales o tejidos, y que pueden detectarse y evaluarse objetivamente como un signo de un proceso biológico normal o patológico. Entre estos se incluyen antígenos derivados de patógenos, cambios en la actividad enzimática, cambios en el ADN o proteínas, entre otros [6]. Ejemplos de ellos son el antígeno carcinoembrionario como indicador presuntivo de cáncer de colon [7], la enzima sintasa activa en enfermedad de Alzheimer [8] y el antígeno prostático especial para cáncer de próstata [9]. En los últimos años, el tamizaje masivo de moléculas asociadas a una determinada condición de salud ha expandido sustancialmente el descubrimiento de biomarcadores [10]. Esto ha permitido establecer diversos marcadores como patognomónicos para un determinado proceso patogénico. En este sentido, es fundamental diseñar metodologías que permitan la detección de dichos marcador en el material biológico, y así realizar el diagnóstico y/o monitoreo lo más tempranamente posible [10-12]. En la actualidad, dentro de las técnicas más comúnmente utilizadas se encuentran, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la citometría de flujo, los inmunoensayos, y más recientemente la espectrometría de masas [13].

El uso de anticuerpos para la detección de biomarcadores fue descripto en 1960 en el trabajo de Berson y Yalow, quienes inventaron un método radioinmunométrico para la determinación de insulina en plasma, que fue galardonado con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1977 [14]. Este trabajo rápidamente dio lugar a nuevas aplicaciones y desde entonces los inmunoensayos han sido incorporados a la labor diaria del laboratorio clínico para la detección y/o cuantificación de diversas biomoléculas. Esta metodología permite generar una señal medible a partir de la reacción de un anticuerpo con su antígeno, y de esta forma detectar el analito (antígeno) de interés en la muestra. Los inmunoensayos presentan varias ventajas sobre otros métodos, como ser, rapidez, bajo costo y que no requieren operarios especializados, ni instrumentos sofisticados. A su vez, se trata de un método que posee alta especificidad y sensibilidad, conferida por los anticuerpos utilizados en la detección. Otra ventaja es que se aplican en distintos formatos, como inmunohistoquímica, nefelometría, ELISAs (del inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e inmunocromatografía. Entre estos, los más utilizados son los ELISAs, habitualmente empleados como métodos de tamizaje o confirmatorios, y que aportan información cuantitativa o cualitativa. Asimismo, los inmunocromatográficos o de flujo lateral también son extensamente utilizados, principalmente debido a su posibilidad de adaptación a laboratorios extremadamente simples o incluso se pueden utilizar in situ. Los inmunoensayos son técnicas robustas, que por lo general toleran distintos tipos de muestras, tales como sangre, orina, materia fecal o líquido cefalorraquídeo. Como contraparte, cabe mencionar que puede existir efecto matriz, definido como una alteración del resultado generada en respuesta a la presencia de cualquier sustancia interferente en la muestra. Esto debe ser cuidadosamente estudiado, y tenido en cuenta al momento de desarrollar el ensayo. El anticuerpo es la herramienta básica utilizada para constituir un inmunoensayo. Según su forma de obtención, se pueden clasificar en tres tipos, policionales, monocionales y recombinantes, que presentan importantes diferencias en cuanto a su producción y uso,

Características	Monoclonales	Policlonales	Recombinantes
Costo de producción	+++	+	++
Dificultad de producción	+++	+	++
Entrenamiento/Equipamiento	+++	+	++
Tiempo de producción	+++	+	++
Especificidad/Afinidad	+++	+	+++
Cantidad producida	+	++	+++
Disponibilidad comercial	++	+++	+
Variedad	+	+++	+

Tabla 1. Comparación de anticuerpos policionales, monocionales y recombinantes.

Comparación de características de producción y uso de anticuerpos monoclonales, policionales y recombinantes. Las cruces indican niveles bajo (+), medio (++) y alto (+++). Adaptado de *Conroy, P.J., et al. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. Semin Cell Dev Biol, 2009.* 

resumidas en la tabla 1 [15].

A continuación, se repasarán las principales características de los anticuerpos, así como sus tipos y las distintas fuentes utilizadas en el desarrollo de inmunoensayos. Se hará especial énfasis en los anticuerpos monodominio de camélido por ser los utilizados en esta tesis.

#### I. Anticuerpos convencionales

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Igs), son proteínas producidas por los linfocitos B, que cumplen importantes funciones en el sistema inmunitario. Los anticuerpos convencionales presentan un peso molecular de 150 kDa aproximadamente, y una estructura heterotetramérica, conformada por dos cadenas livianas idénticas L (del inglés, *light*) y dos pesadas idénticas H (del inglés, heavy) [16], (figura 1). Las cadenas livianas están formadas por un dominio variable VL y uno constante CL, mientras que las cadenas pesadas consisten en un dominio variable VH y hasta cuatro constantes CH<sub>1-4</sub>, según la clase del anticuerpo. Existen 5 clases de anticuerpos en humanos, IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, donde la más abundante es la primera (- 75% de Igs totales) [17]. En la cadena pesada de la IgG hay una región bisagra (entre CH1 y CH2) que confiere flexibilidad a la molécula. Es allí donde se da la interacción entre los heterodímeros mediante puentes disulfuro, para formar el anticuerpo con su forma típica de "Y" [17, 18]. Estructural y funcionalmente, los anticuerpos comprenden dos regiones bien definidas. Por un lado, la unión de las porciones constantes por debajo de la bisagra constituye la región Fc, por fragmento cristalizable. Esta región cumple importantes funciones efectoras en el sistema inmune, como el reclutamiento de células o la activación del sistema de complemento. Por otro lado, la asociación de los dominios CL-VL con los dominios CH1-VH dan lugar al fragmento de unión al antígeno Fab (del inglés, fragment antigen binding).



**Figura 1. Representación esquemática de la estructura de una IgC convencional.** En azul, cadenas pesadas. En anaranjado, cadenas livianas. Fc.: conformada por CH2 y CH3 de cadenas pesadas. Fabs: conformada por VH, CH1, VL y CL. Sitio de unión al antígeno: conformado por regiones hipervariables en extremo N-terminal de VH Y VL. S-S: puentes disulfuro. Extraída de *Sroga P., et al. Nanobodies: a new approach for the diagnosis and treatment. Future Virology 2020.* 

La variabilidad de secuencia en el Fab (fundamental para reconocer distintos antígenos) está localizada en los dominios VH y VL, particularmente en tres regiones hipervariables, complementariedad, denominadas regiones determinantes de CDR (del inglés complementarity determining región) [19]. Los CDR<sub>1-3</sub> están flanqueados por regiones altamente conservadas, denominadas frameworks (FR), que cumplen un rol fundamental en la preservación de la estructura, plegamiento y estabilidad del anticuerpo [20]. Cuando los dominios VH y VL se aparean, contactan los 6 CDRs conformando así el parátope, capaz de unirse por complementariedad a una región del antígeno denominada epítope. Los dominios VH y VL están codificados por segmentos génicos que, mediante procesos de recombinación somática durante el desarrollo del linfocito B, generan una enorme diversidad combinatoria [21-23]. Esto posibilita que los anticuerpos sean capaces de reconocer virtualmente cualquier molécula. Luego, mediante un proceso reiterativo de hipermutación somática y cambio de clase, que ocurre en el centro germinal durante la respuesta inmune, se aumenta en varios órdenes la fuerza de la interacción (afinidad) de los anticuerpos con el antígeno [24-26]. Desde el punto de vista de sus aplicaciones diagnósticas, la afinidad es uno de los parámetros más relevantes de los anticuerpos, y suele expresarse en función de la constante de disociación, Kd, de la unión antígeno-anticuerpo; los anticuerpos de alta afinidad presentan valores de Kd en el rango nano-picomolar [24, 25]. Por otro lado, dado que los anticuerpos son capaces de reconocer virtualmente cualquier molécula, es de gran importancia para su uso en diagnóstico que sean capaces de distinguir el biomarcador respecto al universo de antígenos presentes en la muestra. Cabe mencionar que esta propiedad no está determinada por la interacción con el antígeno, sino con la posibilidad de reaccionar de forma cruzada con otros componentes de la muestra. Este fenómeno, referido comúnmente como "efecto matriz", puede variar entre muestras y debe ser determinado empíricamente.

#### **I.I Anticuerpos policionales**

Inicialmente, la única fuente disponible para la obtención de anticuerpos eran los sueros hiperinmunes, generados a partir de la inmunización de animales de experimentación con el antígeno de interés. Este antígeno suele ser una estructura compleja con múltiples epítopes, por lo que los sueros obtenidos contra él contienen una población heterogénea de anticuerpos, derivados de múltiples clones de linfocitos B (policlonal) [27]. Los anticuerpos policlonales (pAbs) son robustos, fáciles de generar y económicos, por lo que constituyen una herramienta de gran utilidad. Sin embargo, presentan algunas limitaciones, como el potencial riesgo de efecto matriz, debido a que contiene una enorme cantidad de anticuerpos con especificidad

por otras moléculas, generados a lo largo de la vida del animal. Si bien esto puede disminuirse en parte purificando la fracción específica por cromatografía de afinidad con el antígeno, igualmente el carácter policional de los sueros permanece. A su vez, al ser un material finito y dependiente de la biología de cada animal presentan baja reproducibilidad entre lotes de producción.

#### **I.II Anticuerpos monoclonales**

A diferencia de los anticuerpos policionales, los monocionales (mAbs) derivan de un único cion de células B, por lo que, todas las moléculas de anticuerpos son idénticas entre sí. El término es utilizado comúnmente para referirse a los anticuerpos obtenidos por la tecnología de hibridomas. Esta fue desarrollada por Köhler y Milstein en 1975 y se basa en la generación de líneas celulares estables (hibridomas) capaces de producir una cantidad ilimitada de anticuerpos con una única especificidad y afinidad [28]. Esto se logra a través de la fusión de células B (provenientes del bazo de un animal inmunizado) con una línea celular de mieloma, típicamente derivados de ratón, rata o conejo. Es un proceso laborioso, costoso y lento. De todas formas, este tipo de anticuerpos constituyen, hoy en día, los reactivos más utilizados en investigación biomédica y aplicaciones diagnósticas [6]. Alternativamente, es posible producir anticuerpos monoclonales transfiriendo los genes que los codifican a líneas celulares para su producción transitoria o estable como anticuerpos monoclonales recombinantes. Esta estrategia ha tenido un gran desarrollo en las últimas décadas principalmente en relación a las aplicaciones terapéuticas de los mismos, debido a la posibilidad de expresar anticuerpos humanos [29,30]. Se profundizará en este tipo de anticuerpos más adelante en esta Introducción.

#### I.III Fragmentos derivados de anticuerpos convencionales

Durante las últimas décadas, los fragmentos derivados de anticuerpos, han ganado progresivo interés por parte de la industria farmacéutica y biotecnológica [31, 32]. El objetivo es corregir algunas de las dificultades encontradas en los pAbs y mAbs enteros. Las principales ventajas de los fragmentos son: manipulación genética más sencilla, facilidad de expresión en sistemas procariotas, alta estandarización, gran penetrabilidad en tejidos y baja inmunogenicidad [33-35]. Los fragmentos más pequeños derivados de un anticuerpo convencional los constituyen los dominios VH y VL (**figura 2**). Sin embargo, la expresión de estos dominios en forma aislada no suele ser viable, porque tienden a agregarse y por tanto carecen de utilidad

[36]. La interfase hidrofóbica que estabiliza la interacción entre ambos dominios variables es débil, por lo que para expresarlos en forma recombinante es necesario conectarlos mediante una secuencia peptídica flexible [37]. Estas construcciones, denominadas scFv (del inglés, *single chain Fv*), dependiendo de la longitud del conector peptídico pueden plegarse en forma monomérica, o formar dímeros (diabodies) u otras combinaciones que pueden representar una ventaja dependiendo de la aplicación [38, 39]. Debido a su pequeño tamaño, (25 kDa) pueden ser producidos en bacterias con altos rendimientos [40].

La asociación de los dominios VH y VL puede obtenerse si se conservan los correspondientes dominios CH1 y CL, para generar los fragmentos Fab. De esta forma si bien se aumenta el tamaño, se elimina la necesidad de utilizar el conector peptídico que puede alterar el sitio de unión al antígeno en los scFvs. Los fragmentos Fab pueden ser generados por digestión proteolítica de los anticuerpos enteros o de forma recombinante. Estos últimos pueden expresarse también en sistemas procariotas. Sin embargo, presentan menor rendimiento que los scFvs debido a que son moléculas más complejas y de mayor tamaño (55 kDa) [38].

Ambos tipos de fragmentos presentan, en general, una disminución de afinidad respecto al sitio de unión del antígeno original, posiblemente por cambios estructurales en comparación con las Igs enteras [41].



**Figura 2. Fragmentos de anticuerpos recombinantes.** IgG convencional tetramérica compuesta por dominios VH, CH1, CH2 y CH3 correspondientes a la cadena pesada y dominios CL y VL correspondientes a la cadena liviana. También se representan sus fragmentos derivados (VH, VL, scFv y Fab) generados de forma recombinante.

#### II. Anticuerpos de cadena pesada de camélidos

La estructura convencional de los anticuerpos descripta anteriormente es altamente conservada en todos los vertebrados. Sin embargo, existen algunas desviaciones de la clásica estructura heterotetramérica. En 1993 Hamers-Casterman y colegas, reportaron la existencia de anticuerpos homodiméricos carentes de cadena liviana en camellos [42]. A estos los llamaron anticuerpos de cadena pesada, HcAb (del inglés, Heavy Chain Antibody) (figura 3). A partir de su afinidad diferencial por la proteína G y A, ha sido posible realizar la purificación y caracterización de tres tipos de IgG de camélidos, IgG1, IgG2 e IgG3. El primer tipo corresponde a los anticuerpos heterotetraméricos convencionales, mientras que los subtipos 2 y 3 corresponden a los homodiméricos de cadena pesada. Los HcAb representan del 50 al 80% de la fracción de Igs totales en camellos, en cambio en llamas y alpacas, constituyen del 10 al 25% [43]. Dado que estos anticuerpos carecen de cadena liviana, el sitio de unión al antígeno está conformado únicamente por el dominio variable de la cadena pesada, VHH (para diferenciar del dominio VH de Igs convencionales). El producto de expresión recombinante de dicho dominio se denomina Nanobody (Nb), o anticuerpo monodominio. Contrariamente a los segmentos VH y VL de los anticuerpos convencionales, el fragmento VHH producido de forma recombinante es estable y funcional en forma independiente, siendo el fragmento de anticuerpo recombinante más pequeño hoy en día conocido, con tan sólo 15 kDa.



**Figura 3**. **Representación de IgG convencional y anticuerpos de cadena pesada de camélidos.** IgG convencional con cadenas pesadas (celeste) y livianas (anaranjado). HcAbs carentes de cadena liviana y dominio CH1 de cadena pesada. Cadenas pesada y liviana unidas por puentes disulfuro. Extraído de *Sroga P., et al. Nanobodies: a new approach for the diagnosis and treatment. Future Virology, 2020.* 

Los HcAbs también se observaron en tiburones nodriza y otros peces cartilaginosos (*Chondrichthyes*), recibiendo el nombre de IgNARs [44] Estos también son anticuerpos

homodiméricos, formados por un dominio variable, V-NAR, y cinco dominios constantes (CH<sub>1-5</sub>). A pesar de poseer similitudes con los HcAbs, el análisis evolutivo mostró que los IgNARs surgieron por una vía diferente, independiente y mucho más tempranamente que en camélidos [45]. Tanto los VHHs como los VNARs presentan un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, debido a que los camélidos producen mayor respuesta de anticuerpos que los tiburones, [46] a que la expresión recombinante de su dominio variable suele ser mayor [47] y, principalmente, a la facilidad de manipular dichos animales, el uso de los VHHs es más frecuente. A continuación, se describen las características estructurales de los HcAbs presentes en camélidos y los VHHs, con los cuales se trabajó en esta tesis.

#### II.I Características estructurales de los VHHs

Los HcAb, con una masa molecular aproximada de 90 kDa, carecen de la cadena polipeptídica liviana y del dominio constante CH1 de la cadena pesada. El dominio de unión al antígeno, VHH, al igual que los dominios VH y VL, está constituido por dos hojas  $\beta$  conectadas a través de tres CDRs y por un puente disulfuro conservado entre el FR1 y FR3 [48] (figura 4). Al igual que en las Igs convencionales, el plegamiento de los CDRs genera una superficie continua que constituye el sitio de unión al antígeno. El área de contacto con el antígeno en los VHHs suele ser menor, entre 300-600 Å<sup>2</sup> [49], mientras que para los anticuerpos convencionales oscila entre 600-800 Å<sup>2</sup> [50]. A pesar de que se esperaría que los camélidos generasen una capacidad de reconocimiento inmune más restringida debido a que los HcAbs presentan sólo tres CDRs, en la práctica no se han observado limitaciones en el reconocimiento de antígenos ni en la afinidad alcanzada [51]. De manera de compensar la pérdida de diversidad combinatoria generada por el apareamiento de los seis CDRS de VH y VL del anticuerpo convencional, los VHHs presentan ciertas características distintivas. Una de estas es el mayor número de hotspots vinculados a la hipermutación somática encontrados en los HcAbs [52,53]. A su vez, sus CDRs, son más largos, particularmente el CDR3 que tiene además una gran flexibilidad de plegamiento [48], el cual en algunos casos es estabilizado mediante un puente disulfuro adicional [54]. Este disulfuro no canónico se observa generalmente entre residuos de cisteína presentes en el CDR1 y el CDR3, o en menor proporción (~10%) entre cisteínas del CDR3 y el FR2 [48]. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de VHHs y VHs demostró que existen, a su vez, importantes diferencias a nivel de los FRs. Principalmente, estas diferencias se encuentran en residuos aminoacídicos hidrofóbicos del FR2 de Igs convencionales en las posiciones generalmente ocupadas por V42, G49, L50, W52 [37]. Estos residuos, claves en la interacción con el dominio VL, son sustituidos en los VHHs por aminoácidos más hidrofílicos y de menor tamaño como F42, E49, R50, G52 [51, 55]. Asimismo, en un gran número de VHHs que poseen un CDR3 extenso, el mismo se pliega sobre el FR2 reduciendo la exposición de residuos hidrofóbicos al solvente [48]. Estas modificaciones son responsables de generar HcAbs con un dominio VHH soluble y estable, reduciendo la tendencia a agregarse [56]. Curiosamente, se ha observado que los VHs de diversas especies de mamíferos, que sin su contraparte VL tienden a agregarse, al sustituir los aminoácidos en FR2 por residuos más hidrofílicos en las posiciones mencionadas, permite que los VHs sean estables y presenten total funcionalidad en ausencia del dominio VL. Este proceso se denominó camelización [57].



**Figura 4. Representación del dominio VHH de anticuerpos de cadena pesada.** Plegamiento en hebras (A, B, E y D) que conforman la hoja β posterior y las hebras G, F, C, C' y C'' la β delantera. Se muestran los aminoácidos involucrados en la interacción VH –VL, sustituidos en los VHH, con códigos de tres letras. El CDR3 (rojo) se pliega sobre el FR2. Se representa CDR1 (celeste) y CDR2 (verde). Extraído de *Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. Annu Rev Biochem, 2013.* 

Las mencionadas modificaciones estructurales en los HcAbs generan un gran impacto en la capacidad de reconocimiento de epítopes no tradicionales. En el caso de los anticuerpos convencionales, los paratopes suelen ser cavidades, planos o grietas, donde se alojan pequeñas o grandes moléculas o péptidos, respectivamente [58]. En cambio, el paratope del VHH suele tener forma convexa, por lo que puede penetrar en sitios no accesibles para su contraparte tetramérica [59]. Igualmente, vale la pena mencionar, que no todos los dominios variables encontrados en los HcAbs son VHHs, sino que se estima que hasta un 10% de los mismos portan un dominio VH convencional [55]. La alta solubilidad de este VH especial puede estar dada por dos motivos. Por un lado, debido a la presencia de un CDR3 notablemente largo, que compensa la falta de interacciones con el VL. Por otro, mediante la introducción de un residuo hidrofílico en W110, esencial para la interacción VH-VL [60].

#### II.II Ventajas biotecnológicas de los nanobodies

Desde su descubrimiento el potencial biotecnológico de los Nbs estuvo protegido por la patente original perteneciente a la *Vrije Universiteit Brussel*, posteriormente transferida a la compañía *Ablynx* en 2001. Sin embargo, al vencer la patente, y debido a las numerosas ventajas que presentan los Nbs, en los últimos años se ha impulsado el desarrollo de múltiples aplicaciones biotecnológicas. A continuación, en la **tabla 2**, se repasan las principales ventajas biotecnológicas y sus bases estructurales.

#### Tabla 2. Principales ventajas biotecnológicas de los nanobodies

Ventajas	Base estructural	Aplicación
Especificidad de respuesta inmune original se mantiene al generar la biblioteca [48, 61].	Naturaleza monomérica	Generación de bibliotecas de alta funcionalidad
Sencilla manipulación genética [62, 63].	Naturaleza monomérica	Creación de quimeras recombinantes y formas multivalentes [64-66]
Alta penetrabilidad en tejidos, rápida biodistribución y aclaramiento renal [67, 68].	Pequeño tamaño	Uso en tratamiento o diagnóstico <i>in vivo</i> [69-71].
Reconocimiento de sitios antigénicos no canónicos o poco expuestos [59].	Estructura diferente a Fabs. Pequeño tamaño y CDR3 más largos.	Reconocimiento de nuevos epítopes.
Excepcional estabilidad conformacional. Alta tolerancia a temperaturas, degradación proteolítica, agentes caotrópicos, pHs extremos y solventes orgánicos. [72, 73].	Plegamiento autónomo.	Generación de inmunoensayos en matrices biológicas o con muestras extraídas con solventes [74,75]. En terapia, administración por distintas vías [76].
Baja inmunogenicidad [60].	Alta similitud con familia VH3 humana. Carencia de Fc.	Usos en terapia y como sonda en diagnóstico <i>in vivo</i> .
Producción con alto rendimiento en sistemas procariotas [77, 78].	Pequeño tamaño. Plegamiento autónomo. Aumento de hidrofilicidad	Bajos costos de producción.
Alta solubilidad [56].	Mayor hidrofilicidad, por sustituciones en el FR2.	Alto rendimiento de producción y purificación.
Afinidades en el orden de nanomolar o subnanomolar.		Desarrollo de ensayos ultrasensibles para detección de analitos traza [75].

Se describen las virtudes que poseen los nanobodies para su uso en desarrollos biotecnológicos, basadas en su estructura. Se detallan ejemplos de aplicaciones en el campo del diagnóstico y terapia.

Debido a las ventajas biotecnológicas antes mencionadas, los Nbs se han convertido en una atractiva alternativa frente a los anticuerpos convencionales, para su uso en investigación, diagnóstico y terapia. Algunas de las aplicaciones están extensamente revisadas en la bibliografía por [35, 41, 48, 61, 79, 80]. A continuación, se comentan algunas de sus aplicaciones en diagnóstico, por ser el tema central de esta tesis.

#### II.III Aplicaciones de los nanobodies como herramientas en el diagnóstico

Los Nbs presentan numerosas virtudes para su aplicación en la detección de antígenos de valor diagnóstico. Sin embargo, su crecimiento en esta área ha sido relativamente lento debido, probablemente, a la amplia consolidación que presentan los mAbs y pAbs [48]. El mayor tamaño de los anticuerpos convencionales es una ventaja para su adsorción a superficies sólidas, necesario en la mayoría de las pruebas diagnósticas. Contrariamente, la inmovilización directa de fragmentos de anticuerpos puede generar dificultades en el reconocimiento antígeno-anticuerpo debido a la proximidad que existe con la superficie de absorción y la distorsión estructural promovida por las interacciones con la misma [81]. Sin embargo, dada la facilidad de manipulación genética de los Nbs, se ha simplificado la introducción de tags peptídicos que permiten la inmovilización orientada y uniforme de los mismos [66, 82, 83]. Esto ha permitido desarrollar eficientemente inmunoensayos y sensores con potencial para su uso en diagnóstico in vitro. Particularmente, en biosensores, se ha observado que, debido a su excepcional estabilidad fisicoquímica, los Nbs presentan excelente tolerancia a las condiciones de regeneración de los mismos, extendiendo su vida útil [84]. A su vez, debido a su pequeño tamaño, logran un alto porcentaje de empaquetamiento y, por tanto, de recubrimiento de la superficie del sensor, lo que aumenta en gran medida la sensibilidad del mismo. Un ejemplo de esta utilidad lo constituye un sensor generado con perlas magnéticas para la detección de fibrinógeno en suero de embarazadas, o pacientes con riesgo de trombosis [85]. Asimismo, fue reportado un sensor SPR (del inglés, Surfase Plasmon Resonance) para la detección del antígeno prostático especial, como marcador precoz de cáncer de próstata [81, 86], y otro para la detección de procalcitonina en infecciones bacterianas [87, 88].

En los inmunoensayos, particularmente, los Nbs presentan destacadas ventajas para su generación, como ser alta estabilidad frente a matrices complejas, elevada afinidad, reconocimiento de epítopes no canónicos y bajo costo de producción. Algunos ejemplos de ELISAs desarrollados pero no comercializados aún, son los de tipo sándwich para Norovirus [89] y Brucella [90], así como uno competitivo para el virus de Influenza [91]. Como parte de un

15

novedoso desarrollo, en combinación con haptámeros, fue generado un ELISA sándwich para la detección de *Acinetobacter baumanii* [92]. Por otro lado, es habitual que inmunoensayos que utilizan anticuerpos convencionales presenten limitaciones en lo que se refiere a su reactividad cruzada, dificultando así la identificación de especies dentro de un mismo género. Contrariamente, se han reportado ELISAs con Nbs que permiten el diagnóstico mediante la identificación selectiva inter-especie de patógenos con alta homología. Ejemplos de esto son la detección de *Taenia solium* frente a otras tenias no humanas [93], y la identificación diferencial de *Trypanosoma cognolense* aún en presencia de *T. bruceii* o *T. vivax* [94]. A su vez, debido a su naturaleza monodominio, es muy sencillo expresar a los Nbs como proteínas de fusión o bioconjugados multivalentes, que permiten la funcionalización del anticuerpo ampliando sus aplicaciones [95]. En este sentido, a partir de la fusión de un Nb anti-glicoforina A de glóbulos rojos humanos fusionado a la glicoproteína 24 (gp24) del virus de la inmunodeficiencia humana, fue generado un ensayo de aglutinación para la detección de anticuerpos anti-gp24 [96].

Por otro lado, los Nbs presentan virtuosas características para ser utilizados en diagnóstico in vivo por imagenología molecular. Particularmente, se destacan su excelente estabilidad en ambientes hostiles, rápida biodistribución y aclaramiento renal, y baja inmunogenicidad. En este contexto, varios Nbs contra proteínas asociadas a tumores, han sido marcados con radionucleidos. De esta forma, ha sido posible realizar imagenología no invasiva vía PET (del inglés, Positron Emission Tomography) o SPECT (del inglés, Single-Photon Emission Computed *Tomography*) [97]. Un ejemplo de esto, es un Nb marcado con <sup>99m</sup>Tc utilizado para evaluar el nivel de expresión de EGFR (del inglés, Epidermal Growth Factor Receptor) como marcador pronóstico en algunos cánceres, y para colaborar en el diagnóstico de cáncer de mamas [98-99]. En esta misma línea recientemente fue caracterizado un Nb capaz de unirse a células que expresan el antígeno prostático específico de membrana para el marcado y delivery de drogas quimioterapéuticas para tumores de próstata [101]. Particularmente, su rápida penetración en los tejidos y rápida eliminación renal ha permitido el uso de radionucleidos de vida corta como el <sup>68</sup>Ga o el <sup>18</sup>F [102, 103], lo cual constituye una ventaja para el paciente. Asimismo, se han reportado Nbs para la detección de marcadores a través de la barrera hematoencefálica, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer [104].

#### II.IV Generación y selección de nanobodies mediante Phage Display

La naturaleza modular de los VHHs es central en la generación de bibliotecas de gran eficiencia ya que la especificidad por el antígeno está dada por un único dominio. Por ello, una vez clonado en el vector de expresión, se reproduce la especificidad inmune original del animal inmunizado, generando bibliotecas de alta funcionalidad. Esto es contrario a lo que ocurre con anticuerpos convencionales o sus fragmentos, donde la especificidad original se pierde debido a la combinación aleatoria de VH y VL (clonados individualmente) al conformar la biblioteca. Existen varias opciones para generar bibliotecas de muestreo (*display*) de anticuerpos sobre la superficie de virus [105], bacterias [106] y levaduras [107], o incluso ribosomas [108]. Sin embargo, lo más habitual para obtener VHHs recombinantes derivados de HcAbs es generar bibliotecas sobre la superficie de fagos mediante la tecnología de *Phage Display*.

#### Generación de bibliotecas de fagos

La técnica de Phage display, desarrollada por Smith y colaboradores en 1985 [105], se basa en el uso de virus bacteriófagos modificados para que expresen un elemento foráneo fusionado a una de las proteínas de su cápside, generalmente pIII o pVIII. La tecnología es fácilmente adaptada a cualquier tipo de péptido o fragmento de anticuerpos. Por ejemplo, a partir de camélidos inmunizados con el antígeno de interés, se pueden obtener VHHs recombinantes mediante la generación de bibliotecas de expresión sobre fagos filamentosos [109]. También es posible realizar bibliotecas naïve a partir de un camélido no inmunizado [110], o sintéticas a partir de los genes originales modificados por biología molecular [111]. Sin embargo, por ser el tipo más frecuente y la utilizada en esta tesis, nos centraremos en la generación de bibliotecas inmunes. En estas, luego del periodo de inmunización, se purifica la fracción de células mononucleares a partir de la sangre periférica del animal, donde se encuentran los linfocitos B. Luego, mediante biología molecular y uso de primers específicos son amplificados los genes codificantes de las regiones variables de las cadenas pesadas del repertorio total de anticuerpos. Subsecuentemente, estos genes son clonados en un vector fagémido que permite la generación de la biblioteca en fagos que consiste en un gran repertorio de partículas virales que expresan en su superficie un único fragmento de anticuerpo. Esta población altamente diversa es sometida a un proceso de selección denominado panning. Mediante este, la finalidad es detectar y amplificar aquellas partículas virales que muestran anticuerpos con especificidad contra el antígeno de interés (en este caso la proteína de inmunización), (figura 5) [112, 113].



**Figura 5. Estrategia general para la generación de bibliotecas de nanobodies sobre fagos.** Un camélido es inmunizado con el antígeno de interés. Luego de varias dosis son purificadas las células mononucleares. A partir de estas es extraído el ARN del repertorio inmune total, y se genera ADN copia y amplifican los genes de la región variable de las cadenas pesadas. Los fragmentos son clonados en el vector fagémido pComb 3X mediante sitios de restricción Sfil, para generar la biblioteca. Posteriormente, se realizan sobre la biblioteca etapas de selección (panning) para aislar nanobodies con la especificidad deseada.

El bacteriófago más ampliamente utilizado en *Phage display* es el M13. Este es un fago no lítico que infecta las cepas de *E. coli* mediante el pili F de la bacteria, lo que da lugar a la translocación del ADN viral hacia el citoplasma de la misma. El genoma de M13 (cadena simple de 6.4 kb) codifica para once proteínas, de las cuales cinco componen la cápside y seis están involucradas en la maduración del fago dentro de la célula. La cápside está formada por 2700 copias de la proteína lateral pVIII y 5 copias de pIII, pVI, pVII, pIX, ubicadas en los extremos de la partícula viral (**figura 6**). De estas proteínas las más comúnmente utilizadas para realizar el muestreo son pIII y pVIII [114].



**Figura 6. Estructura del bacteriófago M13.** La cápside está conformada principalmente por la proteína pVIII, situada en los laterales. En un extremo de la cápside viral se encuentran las proteínas pVII y pIX, y en el opuesto se ubican pVI y pIII. En este ejemplo, en su interior el fago contiene la información genética codificante para la proteína de fusión pIII-VHH que porta en su superficie

La proteína pIII, es la más apropiada para el muestreo de fragmentos de anticuerpos o proteínas grandes. Ello se debe a que es la última en incorporarse durante el ensamblaje viral, y por tanto tolera la fusión de moléculas de mayor tamaño sin distorsionar la estructura de la cápside. La proteína pIII presenta un importante rol en el proceso de infección al mediar la unión al pili, la translocación del ADN y la inserción de las proteínas de la cápside en la membrana bacteriana [113, 115]. Durante el proceso de ensamblaje sobre la membrana de la bacteria, las proteínas de fusión (pIII-VHH) son incorporadas al mismo tiempo que es empaquetado el ADN que codifica para dichas proteínas. De esta manera, se establece un vínculo directo entre el genotipo (ADN empaquetado) y el fenotipo (proteína de fusión). Esto, junto con la capacidad de infección del bacteriófago, posibilitan la selección de clones individuales entre los millones de variantes presentes en la biblioteca [116].

Actualmente, las técnicas de *Phage Display* no se basan en el uso del genoma real del bacteriófago M13, sino en el de vectores fagémidos. Estos vectores de expresión contienen el gen de la proteína utilizada para el *display* (por ejemplo, pIII) con un sitio de clonado en su extremo 5' para introducir el gen de la proteína de interés (en este caso, VHH). Además, este vector contiene un origen de replicación "f1" que permite replicar el ADN simple hebra, y un gen de resistencia a un antibiótico para su selección [117]. Sin embargo, carece tanto de los genes responsables del empaquetamiento como de las otras proteínas de la cápside. Por ello, una vez introducido en *E.coli*, el fagémido no puede ser encapsidado por sí solo, y es necesaria la superinfección con un fago colaborador (*helper*) [118]. Por su parte, el genoma del fago *helper* contiene mutaciones para que su replicación y empaquetamiento sea poco eficiente. De esta forma, el fagémido es preferentemente empaquetado en relación al DNA del fago *helper* [119]. En este trabajo se optó por utilizar el vector fagémido pComb3X desarrollado por el laboratorio del Dr. Barbas [113]. Una de las características sobresalientes de este vector es que presenta

una versión truncada de pIII carente del dominio N-terminal. Esto es necesario ya que, en condiciones normales, una vez que dicho dominio se une a la bacteria la vuelve resistente a la infección por otro virus, por lo que la sobreinfección con el fago *helper* sería poco eficiente [113]. El vector tiene, además, una secuencia líder que dirige al VHH-pIII hacia el periplasma, donde el ambiente oxidante es favorable para la formación de los puentes disulfuro y el correcto plegamiento del anticuerpo. Asimismo, dicho vector presenta péptidos *tag* que facilitan la purificación, inmovilización y detección de los fragmentos de anticuerpos seleccionados, estos son: una cola de 6 histidinas (His6X) y el péptido de hemaglutinina (HA) de Influenza. Por último, la introducción de un codón amber entre el gen pIII y el gen del anticuerpo permite la expresión de la proteína de fusión al emplear una cepa de *E. coli* supresora de dicho codón (supE, supF). Contrariamente, permite la generación del anticuerpo independiente del fago, cuando se emplea una cepa de *E. coli* no supresora.

#### Selección de nanobodies específicos: panning

Una vez generada la biblioteca de fagos, es necesario aislar aquellos que expresen los anticuerpos con la especificidad deseada. Este tipo de purificación se logra mediante sucesivas etapas de exposición de los fagos al antígeno selector mediante un proceso denominado *panning*. En una primera instancia, la biblioteca es incubada con el antígeno inmovilizado, como ser en un pocillo de una placa de ELISA, sobre partículas magnéticas o expresado en células. Esto permite la interacción con el antígeno, y mediante exigentes etapas de lavado, los fagos que no hayan interactuado con el antígeno o lo hayan hecho débilmente, son removidos. Posteriormente, los fagos unidos por una interacción específica antígeno-anticuerpo son eluídos, y amplificados mediante infección de *E. coli*. Finalmente, los fagos específicos seleccionados amplificados son expuestos a sucesivas etapas de *panning* con el fin de aumentar su proporción (**figura 7**).



**Figura 7. Proceso de** *panning* **para la selección de** *nanobodies* **con la especificidad deseada.** La biblioteca se incuba con el antígeno selector. Los fagos que expresan anticuerpos que no reconocen al antígeno son eliminados mediante lavados. Luego, los fagos unidos al antígeno son eluídos al desestabilizar la unión con el antígeno. Estos son amplificados por infección de *E.coli*, para la producción de una progenie específica. Dichas partículas amplificadas son incubadas con el antígeno selector nuevamente, iniciando una segunda ronda. Este proceso es repetido dos o tres veces. Finalmente, la especificidad de los clones es evaluada mediante inmunoensayo.

Habitualmente, al realizar este procedimiento durante tres rondas de selección, la mayoría de los clones evaluados son específicos por el antígeno. Para verificar su especificidad se infectan células *E. coli* con los fagos eluidos en la última etapa de *panning* y se expresan clones individuales, y finalmente son expuestos al antígeno de interés. El diseño de las distintas estrategias de *panning*, como la concentración y tipo de inmovilización del antígeno, es fundamental para forzar la selección de Nbs que permitan alcanzar las características analíticas deseadas.

#### II.V Búsqueda de pares de nanobodies: inmunoensayos sándwich

Para detectar biomarcadores en muestras biológicas mediante inmunoensayos, se suelen utilizar los de tipo sándwich, ya que a diferencia de los métodos competitivos permiten utilizar exceso de los anticuerpos involucrados en la detección, por lo que poseen mayor sensibilidad e intervalo de trabajo. A su vez, el reconocimiento del antígeno mediante dos anticuerpos mejora la especificidad [120]. Una vez generados y seleccionados los Nbs específicos mediante Phage display, se procede a realizar la elección de la mejor combinación. El éxito en el encuentro del par de Nbs "ideal" estará sujeto a simular, durante su búsqueda, las condiciones del inmunoensayo final. Por lo tanto, deberá permitir el reconocimiento en presencia de la matriz, así como la unión simultánea a ambos anticuerpos (captura y detección). A su vez, otra de las características deseadas es que logre detectar la concentración esperada del analito en la muestra. A priori, la sensibilidad estará determinada por la afinidad que presenten los anticuerpos utilizados por el analito. Sin embargo, la sensibilidad máxima alcanzable estará condicionada a qué tan buena resulte la combinación entre dichos Nbs. Es decir, no necesariamente dos Nbs con alta afinidad por el analito conformarán la combinación más productiva. Esto se debe, principalmente, al posible solapamiento parcial de los epítopes reconocidos por los anticuerpos, o cambios en la conformación del antígeno causada por la unión al anticuerpo de captura. Teniendo en cuenta el gran número de condiciones que deben cumplirse para conformar una combinación viable, cuanto mayor sea la cantidad de combinaciones evaluadas, más alta será la probabilidad de encontrar el par "ideal". En este sentido, un importante antecedente (y pilar) de esta tesis, lo constituye la generación de una plataforma para facilitar el proceso de elección de pares de Nbs para la detección del analito blanco. Las principales características de dicha plataforma se resumen en dos trabajos de nuestro grupo, y se describen brevemente a continuación [83, 121].

En una primera instancia, se desarrolló un sistema simple y eficiente que facilitó la inmovilización y detección de los Nbs mediante la introducción, sitio-específica, de una única molécula de biotina durante el proceso de producción [83]. En este trabajo fue creado el vector de expresión, pINQ-BtH6, que permite producir un Nb biotinilado (BtNb) al clonar su gen codificante 5' en marco a una secuencia aceptora de biotina (AviTag<sup>™</sup>), desarrollada por Beckett [122]. A su vez, para que el Nb sea biotinilado el vector de expresión se transforma en una cepa de *E. coli* que sobre exprese la enzima biotina ligasa de *E. coli* (BirA) [123]. Contrariamente a lo que ocurre en la biotinilación química donde puede afectarse el reconocimiento del antígeno por adición de biotinas sobre el paratope, esta biotinilación es sitio-específica, preservando así la funcionalidad de los anticuerpos [124-126].

En un segundo trabajo, se utilizó el sistema de biotinilación enzimático *in vivo* para generar una estrategia sencilla y ágil, que permitiese el análisis de cientos de pares de Nbs en formato de *high-throughput* [121]. *Nanobodies* biotinilados (BtNbs) previamente seleccionados en base a su afinidad, fueron inmovilizados en forma orientada con avidina. Luego de capturar bajas concentraciones del analito, se combinaron con cientos de BtNb (candidatos para la

detección). Finalmente, la formación de un par productivo se evidenció por la adición de estreptavidina conjugada a peroxidasa (Stp:HRP), (**figura 8**).



**Figura 8. Diagrama de la estrategia para la búsqueda de pares de** *nanobodies.* **(A)** El BtNb a utilizar en la captura es utilizado para saturar los pocillos sensibilizados con avidina de una placa de ELISA, con el que se captura el antígeno. **(B)** El complejo formado es incubado con decenas de Nbs. Esto puede dar lugar a **(C)** donde los epítopes reconocidos por ambos Nbs se solapan y por lo tanto no es posible el reconocimiento doble, o **(D)** donde el segundo Nb (de detección) reconoce un epítope diferente al Nb de captura y por lo tanto se forma un sándwich. Existirán situaciones intermedias en las que se dé un solapamiento parcial y por tanto señales más débiles.

Los Nbs de detección son en general clonados a otro vector, generado previamente por nuestro grupo, denominado pINQ-H6HA con el que se introduce un *tag* HA para aumentar la sensibilidad del par. Este último vector y el pINQ-BtH6 permiten la transferencia "en masa" del ADN de la población de Nbs desde el vector de selección (fagémido) a un sistema de expresión fuerte. A su vez, permiten el direccionamiento de los Nbs al periplasma, que es fundamental para su correcto plegamiento. En conjunto, esta estrategia logra que el *screening* de clones se realice en un sistema que asegura un alto rendimiento de proteína y permite llevar adelante el análisis de un gran número de clones en paralelo. Ambos vectores presentan un *tag* de seis histidinas que permite la purificación de los Nbs por cromatografía de afinidad. El proceso de clonado desde el vector fagémido para ambos vectores se repasa brevemente en la **figura 9**.

23



**Figura 9. Esquema de vectores utilizados para la selección y expresión de** *nanobodies.* Después del tamizaje inicial, los genes de los Nbs se transfieren "en masa" al vector pINQ-BtH6 para la selección de los Nbs de captura. Una vez elegido el Nb de detección es clonado al vector pINQ-H6HA.

Esta forma de selección de pares implica dos aspectos importantes. Por un lado, se fuerza la selección de Nbs que reconozcan epítopes no solapantes. Por otro, que el analito sea reconocido por el Nb de detección con las modificaciones estructurales que le genere el Nb de captura. Esta plataforma de selección de pares de Nbs para el desarrollo de inmunoensayos sándwich, demostró ser muy efectiva utilizando como antígeno modelo en la prueba de concepto a la epoxi-hidrolasa humana. Tomando este antecedente, en esta tesis se propuso consolidar y ampliar dicha plataforma para su aplicación en la generación de inmunoensayos para la detección/cuantificación de analitos en matrices de alta complejidad. Para ello, fueron elegidos dos antígenos modelo presentes en matrices biológicas diferentes, biomarcadores de dos patologías relevantes en la salud humana.

#### III. Aplicaciones con potencial diagnóstico abordadas en esta tesis

#### III.I Detección de sangre oculta en materia fecal

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer lugar en incidencia y el segundo en mortalidad por cáncer en el mundo, con un estimado de 1,9 millones de casos nuevos y 0,9 millones de muertes al año [127, 128]. A pesar de que la incidencia varía ampliamente, por encima del 65% de los casos ocurren en países con alto índice de desarrollo humano, lo cual indica una conexión con factores demográficos y hábitos occidentales [129]. Sorprendentemente, Uruguay se encuentra dentro del quintil más alto en la escala de incidencia mundial (**figura 10**). En Uruguay, el CCR es el tercer cáncer más frecuente en hombres y el segundo en mujeres, pero ocupa el segundo lugar en mortalidad en ambos casos [130]. A pesar de que el diagnóstico temprano asegura un alto porcentaje de recuperación, la mayoría de los casos se detectan en etapas avanzadas [131]. Esto se debe, principalmente, a la baja adhesión de la población a los programas de tamizaje y a la incapacidad de los métodos diagnósticos de detectar marcadores incipientes.



**Figura 10. Prevalencia global de cáncer colorrectal**. Se muestra el número de casos por país en 2020, en millones de habitantes. La población con mayor prevalencia (azul oscuro) se sitúa principalmente en países desarrollados. Extraído de *Sung, H; et al. Global cancer statistics 2020, GLOBOCAN. Cancer J Clin. 2021.* 

La mayoría de los CCR (70%) se originan de pólipos benignos, como adenomas, que progresan a adenocarcinoma, desarrollando así la enfermedad [132, 133]. El CCR se clasifica según el grado de invasión en localizado, loco-regional o metastásico. Sin embargo, el proceso de malignización podría tardar de 8 a 10 años [133]. Por lo tanto, la detección y resección de lesiones pre-malignas contribuye al descenso de la incidencia de CCR. Asimismo, el diagnóstico y tratamiento del cáncer en etapas precoces disminuye la tasa de mortalidad [134]. La alta incidencia, el lento crecimiento de las lesiones pre-malignas, y la mayor supervivencia de los pacientes diagnosticados en etapas tempranas, fundamenta el tamizaje masivo de CCR. Varias metodologías, de tamizaje y confirmatorias, contribuyen a la detección de adenomas y CCR. Entre estos métodos se destacan la búsqueda de sangre oculta en materia fecal en el tamizaje, y la colonoscopía para la confirmación. Esta última se considera la prueba patrón (*gold standard*) para la detección de lesiones pre-cancerosas, y ha demostrado tener muy alta sensibilidad en el diagnóstico de CCR [135, 136]. Esta técnica permite la visualización de la mucosa intestinal a la vez que, en caso de existir un pólipo, realizar su resección. Sin embargo, esta prueba requiere operadores calificados, y genera gastos elevados para los proveedores de salud. Por otro lado, debido a su naturaleza invasiva y a la serie de inconvenientes que genera al paciente, su aceptación es baja.

El método de tamizaje más ampliamente utilizado es la búsqueda de sangre oculta en materia fecal, FOBT (del inglés, Fecal Occult Blood Test). A la inversa de lo que sucede con el sangrado estomacal o de intestino delgado, la proteólisis de la hemoglobina (Hg) en el colon se produce a un ritmo lento, principalmente por bacterias entéricas [137, 138]. Por lo que, de existir sangrado en el colon, la materia fecal contiene una mezcla de Hg, grupo hemo y derivados porfirínicos, cuya búsqueda es útil en el tamizaje de CCR [139]. Una concentración de Hg alta se ha asociado a una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad o a un estadío más avanzado de la misma [140-143]. Existen dos tipos de pruebas FOBT, las químicas y las inmunoquímicas. Inicialmente, fue desarrollada la prueba de Guaiac (gFOBT), que detecta la presencia del grupo hemo al catalizar la oxidación del ácido alfa-guaiacónico en presencia de peróxido de hidrógeno, lo que produce una quinona de color azul [139, 144]. Sin embargo, este reactivo no es selectivo por la Hg humana (Hgh), sino que detecta la presencia de cualquier compuesto con actividad peroxidasa. Por lo tanto, este método requiere estrictas restricciones dietarias para evitar resultados falsos positivos causados por la presencia de grupos hemo en la carne o por algunos componentes vegetales con actividad peroxidasa. Así mismo, puede arrojar resultados falsos negativos en presencia de antioxidantes como la vitamina C o algunos medicamentos [145]. Además, este método presenta problemas de baja sensibilidad, ya que en general no detecta concentraciones de Hg por debajo de 600 µg/g de materia fecal [146, 147]. Por su parte, las pruebas inmunoquímicas FIT (del inglés, Fecal Immunological Test), se basan en el uso de anticuerpos específicos por la Hgh, para formar ensayos de tipo sándwich. La eficiencia del mismo está directamente relacionada con la afinidad y especificidad del par de
anticuerpos anti-Hgh, ya que debe detectar cantidades traza en una matriz altamente compleja. Diferentes estudios han comparado las pruebas FIT y gFOBT, demostrando un rendimiento superior de los primeros para la detección de CCR y adenomas [148-150]. A su vez, debido a que no requieren restricciones dietarias, logran una participación mayor de la población en los programas de tamizaje [151, 152]. Los FIT en general presentan una sensibilidad más alta, detectando alrededor de 20 µg/g de materia fecal [150]. Desde hace décadas, existen FIT cualitativos y cuantitativos comerciales, aunque ambos aún afrontan ciertas limitaciones [153]. En el caso de las pruebas cualitativas, la interpretación es subjetiva ya que la lectura se realiza en forma visual, lo que introduce considerable variación inter-operador [154]. En estos ensayos, el fabricante establece un valor de corte en base al cual se informa un resultado como positivo o negativo. Sin embargo, dicho punto de corte, no siempre presenta valor diagnóstico, sino que, en general, representa la sensibilidad analítica alcanzada por el fabricante [155]. En el caso de los FIT cuantitativos, aunque menos, también afrontan algunas limitaciones. Se ha demostrado que la Hg sufre un proceso de degradación enzimática en muestras mal conservadas [156-158], por lo que su correcta cuantificación estará determinada por la capacidad del fabricante de estabilizar la muestra [159]. A su vez, el límite de cuantificación del ensayo depende de la afinidad alcanzada con el par de anticuerpos seleccionado, y muchas veces se encuentra cercano a los límites de decisión clínica, lo cual constituye un grave problema [140], tabla 3. Finalmente, a pesar de que el FIT cuantitativo presenta la gran ventaja de ajustar el valor de corte a las características de la población a la cual se aplica, dicho valor es controversial. Su elección determina la sensibilidad y especificidad diagnóstica del FIT, así como la cantidad de colonoscopias necesarias para completar el diagnóstico. En Uruguay, según la última resolución del Ministerio de Salud Pública de 2018, se toma como valor de corte de 10 a 20 µg de Hgh/g de materia fecal, en concordancia con resultados de estudios internacionales [160-163], hasta tanto se realicen los nacionales

Nombre comercial	Marca	Origen	Sensibilidad (ng/mL)*
Hemoglobin ELISA kit	Immun Diagnostik	Alemania	42
Hemoglobin ELISA kit	ALPCO	EE.UU.	670
qFOB Quantitative kit	Epitope Diagnostics	EE.UU.	0,5
Human Hemoglobin kit	RayTech	EE.UU.	150

#### Tabla 3. Límites de cuantificación de diversos inmunoensayos cuantitativos comerciales

Se muestran ejemplos de ELISAS comerciales, especificando marca y origen, con sus respectivas sensibilidades según lo expresado por el fabricante. \*Sensibilidad analítica equivalente al límite de cuantificación.

La disponibilidad de un inmunoensayo que corrija las limitaciones mencionadas podría promover su uso en el tamizaje masivo de población asintomática. De esta forma se lograría acelerar el diagnóstico precoz de CCR, y en último término, la reducción de la tasa de mortalidad por dicha enfermedad.

Con este objetivo, se propuso generar Nbs contra la Hgh y desarrollar un FIT de bajo costo, capaz de cuantificar la proteína en materia fecal con alta sensibilidad y especificidad analítica. El mismo podría contribuir como herramienta de tamizaje de CCR, incluso en laboratorios de bajos recursos. Los principales resultados de la selección y desarrollo de estos anticuerpos, así como la puesta a punto y validación analítica del ELISA sándwich anti-Hgh en materia fecal, se reportan en el Capítulo I y el Artículo I de esta tesis [75].

#### III.II Diagnóstico de la infección por el virus del Zika

El virus del Zika (ZIKV) perteneciente a la familia Flaviviridae, es un virus envuelto de 50 nm de diámetro, que presenta un genoma de ARN de cadena simple que codifica para una poli-proteína. Mediante procesamiento proteolítico, la misma da lugar a 3 proteínas estructurales (C, E y prM) y 7 de tipo no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). El ZIKV fue aislado por primera vez en primates en 1947, Uganda, sin embargo en humanos se identificó por primera vez en 1954 [164, 165]. Desde la fecha fueron detectadas únicamente infecciones esporádicas hasta 2007, año en el que ocurrió un primer brote en Micronesia [166], seguido de la Polinesia Francesa en 2013 [167]. Una vez introducido en Brasil en 2015 se extendió en más de 80 países, declarándose "Estado de emergencia de salud pública internacional" por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2016 [168, 169]. La principal forma de transmisión de este arbovirus es a través de la picadura de mosquitos del género Aedes. Otras vías de transmisión son la vertical durante el embarazo y lactancia, y la propagación por contacto sexual o transfusión sanguínea [170]. El ZIKV se ha aislado de diversos fluidos como sangre, leche materna, saliva, orina y semen. Por lo tanto, su capacidad de adaptarse a distintos ambientes y formas de transmisión hace muy complejo el control de su diseminación. El periodo de incubación estimado es entre 3 y 14 días, siendo la mayoría de los pacientes oligosintomáticos, y los síntomas más frecuentes, inespecíficos y moderados, los del síndrome febril. Sin embargo, las complicaciones suelen ser graves, dado que se vinculan con el neurotropismo de este virus, afectando al sistema nervioso. En el caso de los adultos la infección puede desencadenar en mielitis y el síndrome de Guillan Barré [171, 172]. Durante el embarazo, el ZIKV se asocia al parto prematuro y muerte intrauterina. Asimismo, en el feto puede ser causal de microcefalia, hipertonía muscular, alteraciones oculares y sordera, conocidas en conjunto como síndrome congénito por el virus del Zika (SCZ) [173-175].

Debido a su excepcional capacidad de diseminación, alto porcentaje de casos silentes, la gravedad de las complicaciones asociadas, la falta de métodos profilácticos y de tratamientos, es esencial disponer de pruebas diagnósticas confiables y rápidas para contener rápidamente la propagación de la infección. La elección del método diagnóstico más apropiado depende de la etapa de la infección, aguda o convaleciente.

#### Diagnóstico de la infección aguda

La sintomatología de la infección aguda es muy variada e inespecífica [176], por esta razón es de gran importancia contar con métodos diagnósticos que permitan el manejo dirigido de la enfermedad, evitar la transmisión y facilitar el control en casos de brotes. El diagnóstico de la infección por ZIKV en fases tempranas puede realizarse mediante métodos directos para la detección del ARN viral. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es la técnica más comúnmente utilizada. Esta es altamente sensible y específica, por lo que un resultado positivo confirma la infección. Sin embargo, el ARN es detectable únicamente durante un breve período, aproximadamente hasta 9 días post-síntomas, por lo que un resultado negativo no descarta la infección [177]. Asimismo, el proceso requiere equipos costosos y operadores especializados.

En este contexto, la proteína no estructural 1 (NS1) representa un ventajoso biomarcador [178]. Esta proteína se encuentra involucrada en la patogénesis de todos los flavivirus, mediante la evasión del sistema inmune, por inhibición del sistema del complemento [179, 180]. La NS1 es detectada concomitantemente con la viremia, y se mantiene hasta aproximadamente 8 días luego de iniciados los síntomas, por lo que constituye un indicador de infección en curso o reciente [178, 181-183]. A pesar de que existe discrepancia sobre la concentración de NS1 en suero humano infectado, y para ZIKV no existen mayores estudios al respecto, en la mayoría de los flavivirus circula a concentraciones en el entorno de µg/mL [183-186]. Por lo tanto, aunque la información para ZIKV es más escasa, potencialmente podría resultar útil poder realizar el diagnóstico de la infección aguda detectando NS1 en suero de pacientes infectados mediante un inmunoensayos de captura [187]. Esta glicoproteína presenta una forma dimérica intracelular y una forma hexamérica que es secretada a circulación. En sangre presenta estructura de barril, con un peso molecular de 352 kDa, y circula asociada a 70 tipos diferentes de lípidos [179]. Cada monómero está conformado por tres dominios: *beta-roll* (aa 1-29), *alfa-beta Wing* (aa 30-180) y *beta-ladder* (aa 181-352), (**figura 11**) [173, 178]. La similitud de la

NS1 de Zika con sus homólogas es moderada, y comparativamente menor que la que existe con proteínas estructurales de otros flavivirus. A su vez, se ha constatado que la proteína NS1 es un factor de virulencia muy inmunogénico [100]. Por lo que, estos aspectos en conjunto ofrecen una oportunidad para generar anticuerpos que carezcan de reactividad cruzada, con utilidad diagnóstica en contextos endémicos para más de un flavivirus.



**Figura 11. Estructura de barril hexamérica de la proteína NS1 del virus del Zika.** En distintos colores se representan los tres dominios del monómero: beta-roll (aa 1-29), alfa-beta Wing (aa 30-180) y beta-ladder (aa 181-352). Extraído de *Muller, D.A. et al. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. Antiviral Res, 2013.* 

Es importante notar que se ha demostrado, mediante la evaluación de varias pruebas disponibles para la detección de la NS1 de Dengue mediante mAbs, que existe reactividad cruzada con la proteína NS1 de ZIKV [188]. Actualmente existen pocos reportes del desarrollo de ELISAs para la detección de la NS1 de ZIKV, y ninguno de ellos se ha validado exitosamente a nivel comercial [189].

#### Diagnóstico de la infección convaleciente

Durante la etapa tardía de la infección, a partir del día 8 post-síntomas la respuesta de anticuerpos comienza a hacerse evidente [190, 191]. Esto, sumado al corto periodo en donde la viremia está presente en ZIKV, ha llevado a que la OMS recomiende a partir del día 7 recurrir a la detección de Igs para realizar el diagnóstico [192]. La prueba de neutralización en placa es la metodología *gold standard*, sin embargo, es costosa, requiere personal capacitado y un laboratorio de alta complejidad no compatible con un laboratorio clínico. Por lo tanto, los inmunoensayos son en general los elegidos. Sin embargo, debido a las similitudes compartidas entre los antígenos de ZIKV y otros virus del mismo género como el Dengue (DV), virus del Nilo

Occidental (WNV) o de la Fiebre Amarilla (YFV), se ha observado presencia de reactividad cruzada entre ellos [193-195]. En consecuencia, dicho aspecto constituye un inconveniente importante en el uso de pruebas serológicas debido a la posibilidad de obtener resultados falsos positivos. Esto constituye una problemática primordial en residentes de áreas endémicas para más de un flavivirus, como es el caso de Brasil donde por encima de un 50% de las embarazadas presentan anticuerpos contra DV [196]. La mayoría de los ensayos de serología disponibles, se basan en la detección directa de anticuerpos contra antígenos estructurales muy conservados, como la proteína de la envoltura (E), y no permiten su correcta diferenciación [193, 197]. Dada su menor similitud dentro de las proteínas flavivirales, una alternativa es realizar serología utilizando como antígeno la proteína NS1, para la cual se ha demostrado que tempranamente induce una fuerte respuesta de anticuerpos [100, 198]. Sin embargo, los inmunoensayos disponibles para la detección de anticuerpos utilizando NS1 dan lugar a una baja especificidad debido a la reactividad cruzada derivada de epítopes conservados entre los flavivirus [199]. Es importante destacar que la mayoría de las pruebas serológicas detectan directamente la unión de Igs a la proteína inmovilizada en fase sólida. Para eliminar esta dificultad Balmaceda et al. reportaron un ensayo de bloqueo de unión que mide la disminución de la unión de un anticuerpo que define un epítope específico del ZIKV, debido al bloqueo ejercido por los anticuerpos con especificidad por dicho epítope en el suero de pacientes [200, 201]. La falta de pruebas diagnósticas confiables para la identificación de infecciones por ZIKV ha dificultado no sólo el diagnóstico diferencial, sino también la realización de estudios de seroprevalencia, evaluación de incidencia del SCZ entre embarazadas y la asociación con otras posibles complicaciones.

En este contexto, se propuso generar Nbs específicos por la NS1 de Zika y desarrollar inmunoensayos con potencial diagnóstico de la infección aguda y convaleciente. Asimismo, como complemento al desarrollo biotecnológico se decidió generar la proteína NS1 recombinante.

Los principales resultados de la selección de estos anticuerpos, así como la puesta a punto y validación de los ensayos, se reportan en los capítulos II, III y IV, y en el *Artículo II [202] y Manuscrito I* de esta tesis.



# Objetivos

### **Objetivo general**

Consolidar una plataforma biotecnológica desarrollada por el grupo de investigación que permita, mediante el uso de anticuerpos monodominio de camélido, la generación de inmunoensayos para detectar biomarcadores en matrices complejas.

### **Objetivos específicos**

- Generar anticuerpos monodominio anti hemoglobina humana.
- Desarrollar y optimizar un ELISA sándwich para la cuantificación de hemoglobina humana en materia fecal.
- Producir de forma recombinante la proteína NS1 del virus del Zika.
- Generar anticuerpos monodominio de camélido contra la NS1 del Zika.
- Desarrollar inmunoensayos de captura basados en el uso de nanobodies para la cuantificación de la proteína NS1 del Zika en suero.
- Desarrollar un inmunoensayo de inhibición para detectar anticuerpos anti-Zika.



# Materiales y métodos

### Materiales y Métodos

## Capítulo 1: Desarrollo de ELISA sándwich para la cuantificación de hemoglobina humana en materia fecal

#### Materiales.

La Hgh (y su forma biotinilada) fueron preparadas en el laboratorio, como se describirá en la sección Métodos. Los reactivos de biología molecular son de Thermo Fisher (CA, USA). Polietilenglicol 8000 (PEG), albúmina de suero bovino (BSA), histopaque-1077, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), D-biotina y otros productos químicos comunes fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO). El vector pComb3X fue cedido por el Dr. Carlos Barbas, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA. Anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa se adquirió en Roche (Madison, WI). Anticuerpo anti-His6X-HRP de Abcam (MA, EE.UU.). Los cebadores se obtuvieron de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA). Células electrocompetentes E. coli ER2738 de Lucigen Corporation (Middleton, WI). Placas HisPur Ni-NTA, NHS (N-hidroxisuccinimida)-biotina, Stp:HRP y avidina de Pierce (Rockford, IL). Placas de ELISA y bloques de cultivo de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Monroe, NC). Las columnas de cromatografía se compraron en GE Healthcare (Piscataway, NJ). Complete Bacterial Protein Extraction Reagent (BPER) obtendio en Thermo Fisher (CA, USA). Cóctel completo de inhibidores de proteasa sin EDTA comprado en Roche (Madison, WI). Otros reactivos se detallan en Métodos.

#### Preparación de hemoglobina humana y de otras especies animales.

Se extrajo 20 mL de sangre humana de donantes sanos con anticoagulante citrato dextrosa (ACD), preparado en el laboratorio. Los glóbulos rojos se obtuvieron mediante centrifugación a 2000 × g durante 15 minutos, se lavaron con solución salina isotónica y luego se lisaron con agua milliQ. Luego de centrifugar a 14000 × g durante 15 minutos se recuperó el sobrenadante. Éste se dializó contra Tris 50 mM y EDTA 0,1 mM, pH 8,3 (buffer A) y se sometió a cromatografía de intercambio iónico en columna HiTrap DEAE FF, en sistema purificador ÄKTA (GE Healthcare). Después de lavar la columna con buffer A, se eluyó la Hgh por gradiente lineal de 0 a 100% de *buffer* B (Tris 50 mM, 0,1 mM EDTA, pH 7,0). Las fracciones se dializaron contra agua destilada y se liofilizaron. La cuantificación se realizó por gravimetría y la pureza se evaluó mediante SDS-PAGE 15% y comparó con Hgh adquirida comercialmente (Sigma St. Louis, MO).

Las alícuotas se almacenaron a -20 °C. Se siguió igual procedimiento para la purificación de Hg de otras especies animales.

Se obtuvo Hgh biotinilada (Hgh-Bt) mediante conjugación con NHS ((+)-biotina N-hidroxisuccinimida éster) (Thermo Fisher, CA, USA) según instrucciones del fabricante. La conjugación se optimizó de manera de acoplar aproximadamente 1 molécula de biotina por monómero de hemoglobina. El grado de biotinilación de la Hgh biotinilada (Bt-Hgh) se confirmó por análisis en MALDI-TOF,

#### Inmunización.

Una llama (*Lama glama*) del Parque Zoológico Municipal Lecocq de Montevideo se inmunizó con el fin de generar una respuesta de anticuerpos anti-Hgh. Se realizó una primera inoculación subcutánea con 500 µg de Hgh en adyuvante Incompleto de Freund. Luego, se realizaron dos refuerzos en iguales condiciones en los días 15 y 30. Finalmente, a los quince días de la última inoculación se extrajeron 150 mL de sangre con ACD. Las actividades fueron aprobadas por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Parque Lecocq, según protocolo CEUA-1-141107.

#### Construcción de biblioteca de VHHs expresados en fagos.

A partir de 150 mL de sangre extraída se aislaron los leucocitos mononucleares por gradiente de densidad utilizando Histopaque 1077. Luego, se procedió a la extracción del ARN total con reactivo Trizol (Thermo Fisher). Se realizó la transcripción reversa del ARN mediante la retrotranscriptasa M-MuLV, según recomendaciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA). El ADN copia luego se usó para amplificar mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) los genes de la porción variable de los anticuerpos convencionales (VH) y de cadena pesada (VHH). En la PCR se utilizaron tres cebadores directos:

VH1 (catgccatgactcgcggcccaggcggccatggcccaggtgcagctggtgcagtctgg),

VH3 (catgccatgactcgcggcccaggcggccatggccgaggtgcagctggtggagtctgg),

VH4 (catgccatgactcgcggcccaggcggccatggcccaggtgcagctgcaggagtcggg);

y un cebador reverso:

JH (ccacgattctggccggcctggcctgaggagacrgtgacctgggtcc), donde R = A o G.

Los productos de la PCR correspondientes a los VHH/VH (-400 pares de bases), fueron purificados por gel y clonados en el vector fagémido pComb3X mediante los sitios de restricción Sfil introducidos por los cebadores. El vector ligado fue purificado por precipitación con etanol y transformado en células competentes *E. coli* ER2738. Las células transformadas se

cultivaron en medio líquido Super Broth (SB) suplementado con ampicilina 50 µg/mL. Al comienzo de la fase exponencial fueron superinfectadas con fago helper M13KO7 (New England Biolabs, Ipswich, MA). A las 2 horas se agregó kanamicina 40 µg/mL y se dejó creciendo durante 20 horas a 28°C con agitación a 250 rpm. Al otro día se centrifugó el cultivo a 6000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y los fagos fueron precipitados por adición de 1/5 del volumen de 20% polietilenglicol (PEG) 8000 en PBS. Se incubó durante 1 hora en baño de hielo y luego se centrifugó a 18000 x g a 4°C durante 30 minutos. El sedimento fue resuspendido en 30 mL de PBS y se agregaron 6 mL de 20% PEG-8000 en PBS y se incubó durante 1 hora en baño de hielo. Luego, fue centrifugada a 18000 x g a 4°C durante 30 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender en 3 mL de *buffer* de resuspensión (PBS conteniendo 3% BSA + 10% glicerol + 0,3% tween + 150 mM arginina).

#### Panning para la selección de VHH anti-hemoglobina humana desde la biblioteca de fagos.

Se realizaron 2 estrategias de *panning* diferentes (A y B), variando en ellas la forma de inmovilización del antígeno:

A. Se sensibilizaron tiras de microtitulación para ELISA con 5  $\mu$ g/mL de Hgh (100  $\mu$ L/pozo), a 4°C, durante 16 horas. Luego se bloquearon con 1% BSA en PBS (250  $\mu$ L/pozo) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA).

B. Se sensibilizaron tiras de microtitulación para ELISA con 1 μg/mL de avidina (100 μL/pozo), durante 16 horas a 4°C. Se bloquearon con 1% BSA en PBS (250 μL/pozo) durante 1 hora, TA. Posteriormente, se inmovilizó 10 μg/mL de Hgh-Bt (100 μL/pozo) durante 1 hora con agitación a TA.

Luego, tanto en A como en B, se sembró la biblioteca de fagos (con un título de 10<sup>12</sup> unidades de transducción) en PBS conteniendo 0,1% de Tween 20 y 3% de BSA, se dispensaron en tres pozos (100 µL/pozo) y se incubó a 4°C con agitación. Tras dos horas, se lavó con PBS conteniendo 0,1% Tween 20 (PBS-T) y se incubó 30 minutos con PBS-T a 4°C. Luego del lavado, los fagos unidos en los pozos se eluyeron con tripsina 10 mg/mL en buffer Tris a 37°C por 30 minutos. Finalmente, los fagos fueron recolectados y utilizados para titulación y amplificación en *E. coli* ER2738 para una ronda adicional de selección. Se realizaron dos rondas en total.

#### Expresión de nanobodies biotinilados.

Luego de la segunda ronda de selección, al conjunto de fagos seleccionados en cada una de las estrategias de *panning* se le extrajo el ADN. Los genes codificantes para los anticuerpos se

digirieron con Sfil desde el plásmido fagémido y se purificaron por gel. Estos fragmentos fueron clonados en masa en el vector pINQ-BtH6.; el plásmido se transformó en células competentes *E. coli* BL21 (DE3) co-transformadas con el vector pCY216, inducible por arabinosa, que sobreexpresa la biotina ligasa (BirA) de *E. coli*. Para realizar un tamizaje de alto rendimiento (*high throughput screening*) de los Nbs, se inocularon 500 µL de medio Luria Bertani (LB) (conteniendo 50 µg/mL de kanamicina, 35 µg/mL de cloranfenicol, 0,04% de L-arabinosa y 100 µM de D-biotina) con colonias aisladas, en bloques de cultivo de 96 pocillos. La expresión de los Nbs biotinilados (BtNbs) fue inducida a una absorbancia a 600 nm - 0,5 UA con 3 µM de IPTG, durante 4 horas a 37°C. El pellet bacteriano fue obtenido por centrifugación, resuspendidos en PBS y lisados mediante 3 ciclos de congelado y descongelado. Luego los Nbs se purificaron con placas de Ni-NTA HisPur. A partir de los BtNbs puros se generaron las "placas maestras A y B" según la estrategia de panning proveniente. Éstas, se utilizaron como fuente de Nbs candidatos para la selección del anticuerpo de captura, y luego para la identificación de pares.

#### Elección del nanobody de captura.

Se sensibilizaron placas de ELISA durante 16 horas, con 2 µg/mL de avidina en PBS (100 μL/pozo) a 4°C. Luego de bloquear con 1% BSA en PBS (250 μL/pozo) por 1 hora a TA las placas se lavaron con PBS-T y se incubaron con 10 µg/mL de Hgh-Bt en PBS (100 µL/pocillo). Luego de lavar con PBS-T se dispensó 100 µL de los clones de la placa maestra B diluida 1/10, 1/100 y 1/1000 en BSA 0,1% PBS-T. La unión de los clones a la Hgh-Bt se evidenció con la adición de 100 µL/pozo de anticuerpo anti-His6x conjugado a peroxidasa. Luego, la actividad de la enzima (HRP) se desarrolló mediante la adición de 100 µL/pocillo de solución de sustrato (6 mg de TMB en DMSO + 0,1 mL de 1%  $H_2O_2$  en agua, en un total de 12,5 mL de *buffer* acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5) y se incubó durante 15 minutos a TA. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 50 μL/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, y la densidad óptica (OD) se leyó a 450 nm en un lector Fluostar Optima (BMG, Ortenberg, Alemania). Los clones con señales más altas a la dilución más alta fueron enviados a secuenciar. Los Nbs con secuencia única se diluyeron a una concentración de 1 µg/mL y fueron enfrentados a curvas de Hgh-Bt (desde 1 a 1000 ng/mL), inmovilizada por avidina. La unión del BtNb se evidenció mediante el agregado de anticuerpo anti-His6X:HRP. La actividad de la peroxidasa fue desarrollada como se describió anteriormente.

#### Expresión y producción a gran escala de nanobodies.

Se utilizó una colonia *E. coli* BL21 (DE3)/pCY216 transformada con el Nb de interés clonado en el vector pINQ-BtH6 para inocular 500 mL de medio LB suplementado con kanamicina, cloranfenicol y L-arabinosa. La expresión de los Nbs se realizó en las mismas condiciones que se describieron anteriormente para los bloques de 96 pozos. Finalmente, el cultivo bacteriano fue sedimentado por centrifugación y, luego de sonicar, el extracto celular se incubó 1 hora a 37°C con 100 µM de biotina. Posteriormente, se centrifugó a 20000 x g, y los BtNbs se purificaron mediante cromatografía de afinidad con columnas de agarosa Ni-NTA mediante sistema de alta presión ÄKTA. Los Nbs se dializaron contra PBS, se determinó su concentración empleando un ensayo comercial de ácido bicinconínico (kit BCA) y se almacenaron a -20°C. Para la expresión de Nbs con un *tag* de hemaglutinina (HA), el pINQ-BtH6 que porta el Nb de interés se digirió con Sfil, y la banda de - 400 pb correspondiente al gen VHH se purificó y clonó en el vector pINQ-H6HA digerido por Sfil. La expresión y purificación del HANb se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito para el BtNb.

#### Selección del par de nanobodies para conformación del sándwich.

Para seleccionar los pares de Nbs más prometedores, se utilizó el método de *screening high throughput* desarrollado por el laboratorio [110]. Brevemente, placas de ELISA se sensibilizaron con 2 µg/mL de avidina (100 µL/pozo) por 16 horas, a 4°C. Luego del bloqueo con 1% BSA en PBS durante 1 hora, se dispensaron 100 µL/pozo del BtNb de captura (10 µg/mL en PBS) y se incubó 1 hora a TA. Luego de lavar con PBS-T, las placas individuales se incubaron con 0, 10 o 100 ng/mL de Hgh en PBS (100 µL/pozo) durante 1 hora a TA. Después del lavado, cada placa se incubó con una dilución 1/100 en PBS de 96 BtNbs de la "Placa madre A". La unión del anticuerpo secundario se detectó mediante Stp:HRP y la actividad de la enzima se desarrolló como se describió anteriormente. Aquellos clones que consiguieron la mayor absorbancia a la menor concentración de Hgh fueron producidos a gran escala, y purificados. Estos fueron utilizados como anticuerpos de detección en ELISAs capturando la Hgh con el Nb E11 para determinar la combinación con el mejor desempeño.

#### Preparación de muestras de materia fecal y adiciones con hemoglobina humana.

Las muestras de materia fecal fueron donadas por el Departamento de Micología y Parasitología del Hospital Pasteur. Se tomaron 10 mg de heces sólidas y se resuspendieron en 1 mL de buffer de muestra (0,4% de BSA, 0,05% de Tween 20 y 4% de cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA en PBS). La suspensión se centrifugó durante 5 minutos, a 18000 × g, a 4°C y el sobrenadante se filtró por 0,22 µm; se mantuvieron en hielo hasta su utilización. Los extractos fueron enriquecidos con distintas concentraciones de Hgh. Para ello, se les adicionó 20 o 40 ng/mL (correspondiente a 2,0 o 4,0 µg/g de materia fecal), luego las muestras fueron diluidas al décimo y sembradas en la placa de ELISA. El porcentaje de recuperación se calculó como el cociente entre la concentración medida con el ELISA y la concentración real adicionada, multiplicado por cien.

#### Optimización del ELISA sándwich.

Placas de microtitulación fueron sensibilizadas con 5  $\mu$ g/mL de Stp (100  $\mu$ L/pozo) por 16 horas, a 4°C. Al otro día se bloquearon con 250  $\mu$ L de 1% de BSA en PBS durante 1 hora a TA. Luego, fueron incubadas con 5  $\mu$ g/mL de BtNb de captura (100  $\mu$ L/pozo) durante 1 hora a TA. Se lavaron con PBS-T se les adicionó 100  $\mu$ L/pozo de estándares de Hgh o diluciones 1/10 de las muestras de materia fecal e incubaron durante 1 hora a TA. Luego de lavar, se añadió 1  $\mu$ g/mL del HANb de detección (100  $\mu$ L/pozo) durante 1 hora a TA. La unión del Nb se detectó mediante la adición de un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa. Finalmente, luego de lavar, la actividad de la enzima se desarrolló por agregado de su sustrato. La reacción se detuvo luego de 15 minutos mediante adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (50  $\mu$ L/pozo) y la absorbancia se leyó a 450 nm.

#### Estudio de reactividad cruzada con hemoglobinas de otras especies animales.

La reactividad cruzada del ensayo se evaluó frente a Hgs de otras especies animales, siguiendo el mismo procedimiento que con Hgh. Fueron realizadas curvas de titulación comenzando desde 10 µg/mL de Hg derivadas de sangre de vaca, oveja, cerdo, pollo, conejo y pescado.

#### Evaluación de parámetros analíticos.

Para determinar el rango de trabajo se utilizó un modelo de regresión log-lineal y se verificó que este ajuste es adecuado a través del coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) de la curva de calibración. Se estimó el límite de detección (LOD) como la concentración de Hgh correspondiente a 3 veces la desviación estándar (SD) del cero de la curva de calibración. El límite de cuantificación (LOQ) se estimó como 10 veces la SD del cero de la curva de calibración. En ambos casos se promediaron los valores de triplicados para cada medida.

#### Validación analítica del ensayo utilizando el par E11/B9.

Se realizaron estudios de recuperación en matriz sobre 18 muestras de materia fecal sin historia de patología colónica. Cada muestra fue adicionada con dos concentraciones de Hgh (2,0 y 4,0 µg/g) y procesada en el ELISA E11/B9. La veracidad se expresó como porcentaje de recuperación, calculado como: (concentración teórica interpolada en la recta) x

100/(concentración real adicionada). La precisión se expresó por la desviación estándar relativa (RSD), y se evaluó mediante el cálculo de la dispersión en los resultados de recuperación de réplicas de adiciones de Hgh (20 y 200 µg/g) sobre una mezcla de materias fecales de donantes sanos, procesadas en el ELISA.

#### Capítulo 2: Producción recombinante de la proteína NS1 del virus de Zika

#### Producción del dominio beta-ladder.

Se diseñaron dos fragmentos de ADN que codifican para el dominio *beta-ladder* (aa 181-352) con distintos sitios de restricción Nco-XhoI y EcoRI-Xba para el clonado en los vectores pET28a+ y pMAL, y fueron electroporadas en E. coli Shuffle y BL21/DE3, respectivamente. Se tomó una colonia individual y se corroboró la correcta inserción del fragmento mediante colony PCR, utilizando primers específicos para el gen de beta-ladder. La colonia fresca se inoculó en 2 mL de medio LB, adicionado con kanamicina 50 µg/mL o ampicilina 40 µg/mL para pET28a y pMAL, respectivamente. Se cultivó durante 16 horas a 37°C, con agitación. Luego, se inocularon 150 µL del cultivo en 15 mL de medio LB (dilución 1/100) adicionado con su respectivo antibiótico. Se creció a 37°C con agitación, hasta una OD aproximada a 0,6 UA. Para el estudio y optimización de la expresión de la proteína recombinante el cultivo se dividió en 7 tubos de 2 mL cada uno, y se indujo la expresión con distintas concentraciones de IPTG (1000, 300, 100, 30, 10, 3 y 0 µM). Luego de 4 horas, 1 mL del cultivo bacteriano fue sedimentado por centrifugación a 6000 x g a 4°C, durante 10 minutos. El sedimento fue almacenado a -20°C para su posterior procesamiento. Luego de 20 horas, el mL de cultivo restante fue sedimentado de igual manera. Para cada tubo, el sedimento (4 y 20 horas) fue disgregado por adición de 300 µL de BPER. Mediante centrifugación a 18000 x g a 4°C durante 20 minutos, fue obtenida la fracción soluble. Posteriormente, a partir del sedimento, fue obtenida la fracción insoluble por la adición de 300 µL de urea 8 M y sonicado en iguales condiciones. Cada una de las fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) de 4 y 20 horas, para *betta ladder* y *beta ladder:MBP* fueron evaluadas por SDS-PAGE en geles al 10%.

#### Producción de ZIKV-NS1 entera en E. coli.

Se diseñó un fragmento génico con la secuencia de ZIKV-NS1 entera (aa 1-352) con codones optimizados para producción procariota, y con sitios de restricción para el clonado en pET28a+ (Nco-XhoI) y expresión citoplasmática. La construcción fue electroporada en *E. coli Shuffle*, y la correcta inserción del fragmento recombinante fue evaluada por *colony* PCR sobre colonias individuales. Una colonia conteniendo el inserto se inoculó en 2 mL de medio LB adicionado

con kanamicina 50 µg/mL, y se cultivó durante 16 horas a 37°C con agitación. Luego, se inocularon 100 µL del cultivo en 10 mL de medio LB (dilución 1/100) con kanamicina, hasta una OD de 0,6 UA. El cultivo se dividió en 5 tubos de 2 mL cada uno, y se indujo la expresión con distintas concentraciones de IPTG (300, 100, 30, 10 y 0 µM). Luego de 4 horas, 1 mL del cultivo bacteriano fue sedimentado por centrifugación a 6000xg 4°C durante 10 minutos, y el sedimento fue reservado. Luego de 20 horas, el mL de cultivo restante fue sedimentado de igual forma. La FS y FI fueron procesadas de igual manera a lo descripto para el dominio *beta-ladder*, y evaluadas por SDS-PAGE en geles al 10%.

#### Producción de ZIKV-NS1 en células de mamífero HEK293T.

Se diseñó un fragmento génico con la secuencia de ZIKV-NS1 entera (aa 1-352) con codones optimizados para producción eucariota, una cola de 6 histidinas para su purificación, y sitios de restricción SfiI para el clonado en el vector pcDNA3.1 modificado. Las células HEK293 (del inglés, *human embryonic kidney*) fueron cultivadas en adherencia, en medio DMEM conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos estreptomicina (100 µg/mL) y penicilina (100 units/mL) atmósfera a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al llegar al 80% de confluencia aproximadamente, las células se desprendieron mediante tratamiento con tripsina (0.05% tripsina, 0.02% EDTA), durante 5 minutos a 37°C y fueron sub-cultivadas en medio DMEM. Para los ensayos, se sembraron 2 mL de medio conteniendo 1x10<sup>6</sup> células en placa de 6 pozos. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con 2 µg de ADN por pozo, previamente incubando 30 minutos con el agente transfectante polietilenimina (PEI). La mezcla de transfección fue adicionada a las células en medio completo (volumen final 1 mL), e incubada por 6 horas. Pasado este tiempo, se realizó un cambio de medio, con 2 mL de DMEM fresco, y las células se incubaron durante 72 horas para evaluar la producción de ZIKV-NS1 por el ELISA 32/D6 desarrollado en el capítulo III de esta tesis.

Para la optimización de las condiciones de producción fueron evaluadas las siguientes formas de cultivo:

1) Determinación de la frecuencia de recolección y cambio de medio. Se evaluaron 2 estrategias distintas. Por un lado, se realizó la recolección y reposición de medio cada 24 horas, hasta completar las 72 horas. Por otro, la recolección se realizó luego de las 72 horas, sin cambios de medio. En este caso la relación ADN:PEI fue 1:13, debido a que es la más frecuentemente utilizada.

*2)* Determinación del contenido de suero fetal bovino en el medio de cultivo. Luego de la transfección, se probaron distintas concentraciones de SFB: 0% 0,5%, 2%, 5% y 10%. Se utilizó

una relación ADN:PEI de 1:13, y la recolección del medio se realizó a las 72 horas, según los resultados obtenidos en 1).

*3)* Determinación de la relación ADN:PEI. Se evaluaron 3 relaciones entre el ADN y el agente transfectante, que fueron 1:5, 1:13 y 1:20. La concentración de SFB utilizada fue 5%, según los resultados obtenidos en 2). La recolección del medio se realizó a las 72 horas, según los resultados obtenidos en 1).

A las condiciones optimizadas para la producción de ZIKV-NS1 en placas de 6 pozos se realizó la expresión de la proteína a mayor escala. Para ello, se sembraron 15x10<sup>6</sup> células en botellas 4 botellas T175 con 30 mL de medio completo en cada una de ellas. Al día siguiente, se realizó la transfección con una relación ADN:PEI de 1:13 y en medio DMEM con 5% de SFB. Luego de 72 horas, se recogió el sobrenadante.

#### Purificación y caracterización de la ZIKV-NS1 producida en células HEK 293T.

El sobrenadante de cultivo fue dializado en PBS durante 24 horas a 4ºC. Se realizó una primera purificación de la ZIKV-NS1 mediante cromatografía de afinidad con níquel inmovilizado (Ni-NTA). La fracción coorespondiente al eluído con 500 mM de imidazol, se dializó con PBS y se analizó su pureza por SDS-PAGE en geles al 12,5%. El eluato dializado fue concentrado mediante rotaevaporación (Speedvac, Thermo Scientific, MA, EE.UU.) y fue sometido a gel filtración. Con este fin se cargaron 120 µL del concentrado en una columna Superosa 12 (General Electric, NY, EE.UU.) a un flujo de 0,7 mL/minuto. Por comparación con la curva estándar para los volúmenes de elución se recogieron las distintas fracciones y se les estudió su pureza por SDS-PAGE al 12,5%. Finalmente, la fracción obtenida a partir de la gel-filtración en la que se visualizó una proteína con un peso cercano a 50 kDa fue cargada en condiciones desnaturalizantes en un gel 12,5 % para realizar un western blot. Se transfirió a membrana de nitrocelulosa durante 2 horas a 400mA y se bloqueó por 16 horas a 4°C. Luego de lavados con PBST, se incubó con 2 mL del Nb específico por ZIKV-NS1, el Nb D6 a 1 µg/mL (generado en capítulo III), durante 1 hora a TA. Luego de lavados con PBST, para el revelado se incubó con 2mL de un anticuerpo comercial anti-HA:HRP (4 ng/mL) durante 1 hora a TA. La reacción de la enzima se realizó mediante la adición de sustrato de la peroxidasa quimioluminiscente (Thermofisher Scientific, MA, EE.UU.).

## Capítulo 3: Desarrollo de inmunoensayos para la detección de la proteína NS1 en el diagnóstico de la infección aguda de Zika

#### Materiales.

La Proteína No estructural 1 del Zika (ZIKV-NS1) y de los distintos Flavivirus, así como el anticuerpo anti-ZIKV-NS1 de ratón se adquirieron en The Native Antigen Company (Oxfordshire, UK). Histopaque-1077, polietilenglicol 8000 (PEG), albúmina de suero bovino (BSA), isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido(IPTG), D-biotina, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y otros productos químicos comunes se compraron en Sigma-Aldrich (MA, EE.UU.). Reactivo TRIzol de Invitrogen (CA, EE.UU.). La transcriptasa reversa M-MuLV y la mezcla de cebadores aleatorios (random primers) de New England Biolabs (Ipswich, MA). La polimerasa Taq, y todas las enzimas de restricción se compraron en Thermofisher (MA, EE.UU.). El vector pComb3X fue una donación del Dr. Carlos Barbas (Instituto de Investigación Scripps, CA, EE.UU.). Células electrocompetentes E. coli ER2738 de Lucigen Corporation (Middleton, WI). Los cebadores se obtuvieron de Integrated DNA Technologies (IA, EE.UU). NHS (N-hidroxisuccinimida)-biotina, Stp, Stp:HRP y Bacterial Protein Extraction Reagent (BPER) se compraron en Thermofisher (MA, EE. UU.). Tiras y placas ELISA compradas en Greiner Bio-One (NC, EE.UU.). Anticuerpo anti-hemaglutinina conjugado a HRP en Roche (Madison, EE. UU.) Los sueros estándar anti-ZIKV fueron donados por la Dra. Giada Mattiuzzo del National Institute for Biological Standards and Control (London, UK). Tiras de nitrocelulosa Hi-Flow Plus 120 Cards, y papel absorbente para inmunocromatografía adquiridos de Merck, Millipore (Darmstadt, Germany). Columnas de cromatografía de proteína A y Ni-NTA y columnas de exclusión molecular Superosa 12 de GE Healthcare (MA, EE.UU.). Columna de Iminobiotina agarosa de Thermofisher (MA, EE. UU.). Vector de expresión pET11b (T7-ST), cedido por el Laboratorio del Dr. Thomas Ward, Universidad de Basel, Suiza. Nanoparticulas con oro coloidal 150nm carboxilo activadas BioReady™ de NanoComposix (CA, EE.UU.) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), PBS para cultivo y Suero Fetal Bovino (SFB) de Capricorn (Ebsdorfergrund, Alemania). Línea celular HEK 293 de ATCC (VA, EE.UU.) Botellas T25, T75, T175 y placas de cultivo de 6 pozos de Greiner Bio One (NC, EE.UU.) Tripsina y mix estreptomicina-penicilina de Sigma (St. Louis, MO). Otros reactivos particulares especificados en Métodos.

#### Inmunización.

Una llama (*Lama glama*) del Parque Zoológico Municipal Lecocq de Montevideo fue inmunizada. Se realizó una primera inoculación subcutánea con 250 µg de ZIKV-NS1 en adyuvante incompleto de Freund. Luego, se realizaron tres refuerzos, en iguales condiciones, en

los días 15, 30 y 45. Finalmente, a los quince días de la última inoculación se extrajeron 150 mL de sangre con Anticoagulante Citrato Dextrosa (ACD). Las actividades fueron aprobadas por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Parque Zoológico Municipal Lecocq de Montevideo, según protocolo CEUA-1-141107.

#### Preparación ZIKV-NS1-biotina.

Con el fin de generar ZIKV-NS1 biotinilada (ZIKV-NS1-Bt) se utilizó N-hidroxisuccinimido-biotina, según protocolo del fabricante, en una relación NS1:biotina de 1:5.

### Purificación de inmunoglobulinas G del suero de la llama inmune, y evaluación de concentración de saturación para la captura de ZIKV-NS1.

A partir del suero de la llama inmunizada se purificaron las inmunoglobulinas G (ill-IgG) mediante cromatografía de afinidad con proteína A, como se describió anteriormente (16). Las ill-IgG puras se dializaron contra PBS y almacenaron a -20°C. Para estudiar la concentración de saturación con ill-IgG, se sensibilizaron pozos de una placa de ELISA con 100 µL/pozo de distintas concentraciones (1,0; 2,5; 5,0; 10 y 20 µg/mL) en PBS, durante 16 horas, a 4°C. Luego del bloqueo con 1% BSA en PBS por 1 hora se lavó con PBST. Se agregó 100 µL/pozo de ZIKV-NS1 100 ng/mL en PBS. Después de 1 hora de incubación a TA, las placas se lavaron con PBST e incubaron con un anticuerpo anti-His6X conjugado a peroxidasa. La actividad de la enzima se evidenció por agregado de su sustrato. La condición de saturación del pocillo se definió como la concentración mínima a la que se observó señal constante.

#### Construcción de biblioteca de VHHs expresados en fagos.

La construcción de la biblioteca de fagos se realizó de igual manera a lo detallado en la sección Métodos del Capítulo I.

#### Selección de VHH anti-ZIKV-NS1 desde la biblioteca de fagos.

Se diseñaron 3 estrategias de *panning* (I, II y III), variando la inmovilización del antígeno: I. Se sensibilizaron tiras de microtitulación con 1 μg/mL de NS1 (100 μL/pozo) en PBS, durante 16 horas, a 4°C. Luego se bloqueó con 1% BSA en PBS (250 μL/pozo) durante 1 hora a TA. II. Se sensibilizaron tiras de microtitulación con 1 μg/mL de Stp (100 μL/pozo), durante 16 horas, a 4°C. Se bloqueó con 1% BSA en PBS (250 μL/pozo) durante 1 hora, TA. Luego, se inmovilizó 1 μg/mL de NS1-Bt (100 μL/pozo) durante 1 hora a TA. III. Se sensibilizaron tiras de microtitulación con una concentración de saturación de ill-IgC (10  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L/pozo), durante 16 horas, a 4°C. Se bloqueó con 1% BSA en PBS (250  $\mu$ L/pozo) durante 1 hora a TA. Luego, se inmovilizó 1  $\mu$ g/mL de NS1 (100  $\mu$ L/pozo) por 1 hora a TA. Luego, en cada una de las 3 estrategias, se dispensó 100  $\mu$ L/pozo de la biblioteca de fagos (con un título de 10<sup>13</sup> unidades de transducción) diluida 1/100 en 50% suero humano, 0,5% Tween-20 y 3% BSA en PBS. Se incubó a 4°C durante 2 horas. Luego, cada pozo se lavó 10 veces con 250  $\mu$ L de PBS conteniendo 0,1% Tween 20 (PBST) y se incubó 30 minutos adicionales con PBST a 4°C. Los fagos unidos se eluyeron con tripsina 10 mg/mL en buffer Tris a 37°C por 30 minutos. Finalmente, los fagos resultantes (*output*) fueron recolectados y utilizados para titulación y amplificación en *E. coli* ER2738 para una ronda adicional de selección. Se realizaron tres en total.

#### Expresión de nanobodies desde vector fagémido pComb3X.

Se diseñó una "placa madre" incluyendo 72 clones de las distintas estrategias de selección (I, II y III), como se describió anteriormente (23). Brevemente, se inocularon al azar 24 colonias individuales (provenientes de la titulación del tercer *output* de cada estrategia de *panning*) en 0,5 mL de SB-ampicilina en un bloque de cultivo de 96 pocillos. Se incubó a 37°C hasta una OD de 1 y luego se indujo la expresión de los Nbs monoméricos (independientes del fago) fusionados a un *tag* HA, mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Luego, el cultivo se incubó a 37°C, durante 16 horas. Al día siguiente, el bloque se centrifugó a 1200 x g durante 20 minutos, a 4°C y los sobrenadantes fueron reservados para la elección de los Nbs.

#### Selección del nanobody de captura.

Para la identificación de clones reactivos contra ZIKV-NS1, 100  $\mu$ L/pozo de ZIKV-NS1 100 ng/mL en PBS fue inmovilizada de manera similar a las estrategias de *panning*: placa 1) ZIKV-NS1 sensibilizada directamente en el pozo; 2) ZIKV-NS1-Bt capturada por Stp 2  $\mu$ g/mL, previamente sensibilizada; 3) ZIKV-NS1 capturada por ill-IgG 10  $\mu$ g/mL, previamente sensibilizadas. Luego de 1 hora a TA, las placas fueron bloqueadas con 1% BSA en PBS durante 1 hora adicional a TA. Luego de lavados con PBST se incubaron con 100  $\mu$ L/pozo de los 72 sobrenadantes diluidos 1/10 en BSA 0,2%-Tween 0,05% en PBS, durante 1 hora a TA. Se detectó la unión de los Nbs mediante una solución a 3 ng/mL de un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (100  $\mu$ L/pozo). Después del lavado, la actividad de la peroxidasa se desarrolló mediante la adición de 100  $\mu$ L/pozo del sustrato (6 mg de TMB en 1 mL de DMSO + 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% en agua, en un total de 25 mL de 0,1 M *buffer* de acetato, pH 5,5) y se incubó a TA, durante 15 minutos. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 50

 $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, y la absorbancia se leyó a 450 nm en un lector Fluostar Optima (BMG, Ortenberg, Alemania). El 50% de los clones con la señal de absorbancia más alta fueron enviados a secuenciar; y con los Nbs de secuencia única se realizaron pruebas de selección más exhaustivas.

#### Evaluación de reconocimiento de ZIKV-NS1 en suero humano.

Una placa de ELISA fue sensibilizada con 100  $\mu$ L/pozo de ZIKV-NS1 a 100 ng/mL en PBS, durante 16 horas, a 4°C. Al otro día, se bloqueó con 1% BSA en PBS (250  $\mu$ L/pozo). Luego de lavar con PBST, se incubó en paralelo con una dilución 1/10, en suero 0% o 50% en PBS, de los Nbs de secuencia única (100  $\mu$ L/pozo), durante 1 hora a TA. La unión de los Nbs fue detectada mediante la adición de un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa. La actividad de la enzima fue desarrollada por adición de su sustrato y la OD se midió a 450 nm.

#### Evaluación de la reactividad con concentraciones bajas de ZIKV-NS1.

Una placa de ELISA fue sensibilizada con 100 µL/pozo de ZIKV-NS1 a tres concentraciones (0,5; 5,0 o 100 ng/mL en PBS) durante 16 horas, a 4°C. Al otro día, luego del bloqueo con 1% BSA en PBS los pozos se lavaron con PBST y se incubaron con una dilución 1/10 en BSA 0,2%-PBS de los sobrenadantes de Nbs de secuencia única (100 µL/pozo), durante 1 hora a TA. La unión de los Nbs fue detectada mediante la adición de un anticuerpo anti-HA:HRP y la actividad de la enzima fue desarrollada por adición de su sustrato, la OD se midió a 450 nm.

#### Titulación de nanobodies contra ZIKV-NS1.

Una placa de ELISA fue sensibilizada con 1 µg/mL de NS1 (100 µL/pozo) durante 16 horas, a 4°C. Los Nbs puros, se evaluaron mediante curvas de titulación desde una concentración de 1000 ng/mL con diluciones al cuarto. La unión del anticuerpo biotinilado fue detectada mediante adición de Stp:HRP (concentración recomendada por fabricante). La actividad de la enzima se evidenció por adición de su sustrato y la OD se midió a 450 nm.

#### Evaluación de reactividad de nanobodies de captura con NS1 de otros Flavivirus.

Placas de ELISA fueron sensibilizadas con 1,0 µg/mL de NS1 (100 µL/pozo) perteneciente a diferentes flavivirus, específicamente: DV, WNV, SLV y YFV. Al día siguiente, se bloqueó con 1% BSA en PBS y luego de lavados con PBST cada proteína fue incubada con 100 µL/pozo de los Nb candidatos (1 µg/mL en PBS) durante 1 hora a TA. Luego de lavados con PBST la detección se realizó mediante Stp:HRP durante 1 hora a TA. La actividad de la enzima se evidenció por adición de su sustrato y la OD se midió a 450 nm.

#### Expresión y producción a gran escala de nanobodies.

Los Nbs candidatos a ser utilizados para la captura o para la detección fueron expresados fusionados a un taq biotina (Bt) o hemaglutinina (HA), respectivamente. La expresión en grandes cantidades tanto de los BtNbs como la de los HANbs se realizó según lo detallado en la sección Métodos del Capítulo II. Brevemente, en ambos casos se digirieron las porciones génicas correspondientes a los VHH desde el vector fagémido pComb3X y se clonaron al vector pINQ-BtH6 o pINQ-H6HA. Cada una de las construcciones fue transformada en E. coli BL21 (DE3)/pCY216. Para la expresión de cada Nb se tomó una colonia y se inoculó 500 mL de medio LB adicionado con kanamicina (50 µg/mL) y cloranfenicol (35 µg/mL). En el caso de las colonias en pINQ-BtH6 el medio también contiene el inductor del vector de la biotina ligasa de E. coli (L-arabinosa 0,04%). Se incubó con agitación 250 rpm, a 37°C hasta OD 0,6 UA, donde se indujo con IPTG 10 µM. Luego de 4 horas, el cultivo bacteriano fue sedimentado por centrifugación a 6000 x g a 4°C, durante 20 minutos. Posteriormente, el sedimento fue sonicado a una amplitud del 50%, durante 15 minutos, para obtener la fracción soluble. En el caso del BtNb el extracto celular se incubó 2 horas a 37°C con 100 µM de biotina. Para separar los restos celulares se centrifugó a 20000 x g a 4°C por 30 minutos. Los Nbs fueron purificados mediante cromatografía de afinidad con columnas de agarosa Ni-NTA mediante sistema de alta presión ÄKTA. Los Nbs puros se dializaron contra PBS y se almacenaron a –20°C.

#### Elección del par de nanobodies.

Para seleccionar los pares de Nbs más prometedores, se utilizó el método de *screening high throughput* descripto en la sección Introducción de esta tesis. Brevemente, placas de ELISA se sensibilizaron con 1 µg/mL de Stp (100 µL/pozo) durante 16 horas, a 4°C. Luego del bloqueo con 1% BSA en PBS durante 1 hora se dispensaron 100 µL/pozo de 4 BtNbs de captura (1 µg/mL en PBS) en diferentes placas y se incubó 1 hora a TA. Luego de lavar con PBST, las placas individuales se incubaron con 0 o 20 ng/mL de NS1 en PBS (100 µL/pozo) durante 1 hora a TA. Después del lavado, cada placa se incubó con una dilución 1/10 en PBS del sobrenadante de los 72 Nbs de la "placa madre". La unión de los clones de detección se detectó mediante una solución 3 ng/mL del anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa. La actividad de la enzima se desarrolló como se describió anteriormente. En una segunda instancia, se realizó una nueva búsqueda de pares utilizando el BtNb elegido (BtNb-32). En este caso, se capturó una concentración de ZIKV-NS1 de 2 ng/mL. Los 16 clones de detección que en estas condiciones generaron la mayor absorbancia fueron enviados a secuenciar. Los Nbs con secuencia única fueron clonados desde el vector fagémido al pINQ-H6HA, y fueron producidos como Nbs fusionados a un *tag* HA (HANb) en grandes cantidades. A partir de estos HANbs, y utilizando el

BtNb-32 para la captura, se construyeron curvas estándar para determinar el mejor par, estimado mediante el índice de saturación 50%,  $SC_{50}$ .

#### Evaluación de reactividad de los nanobodies de detección con NS1 de otros Flavivirus.

Se desarrolló de manera idéntica a los Nbs de captura, pero en este caso para evidenciar la unión de los HANb se incubó con 100 µL de solución 3 ng/mL de anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa. La actividad de la enzima se desarrolló como se describió anteriormente.

#### Procedimiento del ELISA 32/D6 anti-ZIKV-NS1.

Placas de microtitulación fueron sensibilizadas con 2 µg/mL de Stp (100 µL/pozo) durante 16 horas, a 4°C. Al otro día, luego del bloqueo con 250 µL de 1% BSA en PBS durante 1 hora a TA, fueron incubadas con 2 µg/mL del BtNb-32 (100 µL/pozo) durante 1 hora a TA. Se lavaron con PBST y se les adicionó 100 µL/pozo de estándares de ZIKV-NS1 (o muestras) y se incubaron durante 1 hora a TA. Luego de lavados con PBST, se añadió 1 µg/mL del HANbD6 (100 µL/pozo) durante 1 hora a TA. Luego de lavar con PBST la unión fue detectada mediante la adición de una solución 3 ng/mL de un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa. Finalmente, luego de lavados con PBST, la actividad de la enzima se desarrolló por agregado de su sustrato. La reacción se detuvo luego de 15 minutos mediante adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (50 µL/pozo) y la absorbancia se leyó a 450 nm, tomando como absorbancia de referencia a 620 nm.

#### Evaluación de parámetros analíticos.

Para determinar el rango de trabajo se utilizó un modelo de regresión log-lineal y se verificó que este ajuste es adecuado a través del coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) de la curva de calibración. Se estimó el límite de detección (LOD) como la concentración de NS1 correspondiente a 3 veces la desviación estándar (SD) del cero de la curva de calibración. El límite de cuantificación (LOQ) se estimó como 10 veces la SD del cero de la curva de calibración. En ambos casos se promediaron los valores de triplicados para cada medida.

#### Evaluación de la especificidad.

Se realizaron curvas de calibración para las NS1 recombinantes de ZIKV, DV, WNV, SLV y YFV, con 8 diluciones secuenciales al medio desde una concentración de 4,5 µg/mL. En paralelo se realizó la curva de calibración con ZIKV-NS1 desde 0,5 µg/mL.

#### Validación analítica del ensayo utilizando el par 32/D6.

Se realizaron estudios de recuperación en matriz sobre 27 sueros de donantes sanos. Cada muestra fue adicionada con dos concentraciones de ZIKV-NS1 (1,5 y 4,5 ng/mL) y procesada en el ELISA 32/D6. Se calculó el porcentaje de recuperación del analito como: (concentración teórica interpolada en la recta) x 100/(concentración real adicionada). La precisión se evaluó mediante el cálculo de la dispersión en los resultados de recuperación de réplicas de adiciones de ZIKV-NS1 (0,80; 1,6 y 3,1 ng/mL) sobre un *pool* de sueros de donantes sanos, procesadas en el ELISA. Esta se expresó en base a la SD relativa (RSD).

#### Preparación de tiras de nitrocelulosa.

Las membranas de nitrocelulosa se sensibilizaron utilizando la plataforma para aspirar y dispensar BIODOT (modelo AD1520). A tales efectos como línea *test* se dispensó el Nb de captura (1 mg/mL) en PBS conteniendo 5% sacarosa, y como línea control de corrida BSA-biotina, 250 µg/mL en PBS-sacarosa 5%. Cada solución se dispensó utilizando un volumen de 0,8 µL/cm de nitrocelulosa, con una distancia entre líneas de 4 mm. La membrana de nitrocelulosa se secó a 37°C durante 2 horas, se acopló al papel absorbente y se cortó en tiras de aproximadamente 4 mm de ancho.

#### Preparación de BSA biotinilada.

Se utilizó N-hidroxisuccinimido-biotina, siguiendo el protocolo del fabricante, utilizando una relación BSA:biotina de 1:20.

#### Producción de estreptavidina recombinante.

Se utilizó Stp recombinante, producida en forma soluble a partir de la adaptación de protocolos reportados previamente [203-205]. Brevemente, se transformaron células de *E. coli* cepa BL21 con el vector de expresión pET11b (T7-ST). Las células transformadas se cultivan en 250 mL de medio LB con ampicilina a 25°C hasta alcanzar una OD de 0,6; se realizó la inducción con 0,5 mM de IPTG e incubó 4 horas a 25°C. Las células se centrifugaron a 5000 x g, 15 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 7,4; 1 mM de floruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), luego se sonicó durante 15 minutos a potencia de 60 e intervalos de 50%. Las fracciones soluble e insoluble se separaron por centrifugación a 18000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se enfrió en hielo y se centrifugó a 10000 x g durante 30 minutos. La Stp soluble se purificó con columna de iminobiotina agarosa, según protocolo del fabricante. Se evaluó la pureza por SDS-PAGE.

#### Preparación de conjugados a Carbón.

Una solución 5% de carbón (P-101) en agua Milli-Q (Milli-Q plus 185, Millipore) se sonicó en baño ultrasonido (un total de 5 minutos, con descansos de 30 segundos cada un minuto de sonicación). Se diluyó a 0,2% en *buffer* bórico 5 mM pH 8,8 y sonicó nuevamente. Se mezclaron 200 µg de proteína en buffer bórico 5 mM, pH 8,8 (volumen máximo 200 µL) con la suspensión de carbón al 0,2% en un volumen final de 500 µL, se sonicó y se incubó 3 horas a TA y 16 horas a 4°C. Las partículas se separaron por centrifugación y resuspendieron en 500 µL de *buffer* bórico pH 8,8 (borato de sodio 0,1 M; conteniendo 1% de BSA y 0,05% de Tween 20). Se sonicó e incubó durante 10 minutos a TA. Este paso se repitió 2 veces con el fin de lavar la proteína libre de carbón. Finalmente, se resuspendió en *buffer* bórico conteniendo 0,05% azida de sodio y se conservó a 4°C.

#### Preparación estreptavidina conjugada a oro coloidal.

La Stp fue conjugada de forma covalente a nanopartículas recubiertas con oro coloidal de 150 nm carboxilo-activadas, mediante enlaces amida. Se conjugaron en total 25 µg de Stp en un volumen final de 1mL, según protocolo del fabricante.

#### Procedimiento para inmunocromatografía de flujo lateral para detección de ZIKV-NS1

En un pozo de una placa de ELISA de baja adsorción, se dispensaron 25 µL de muestra enriquecida con ZIKV-NS1 (distintas concentraciones), o de PBS (control negativo). Se agregaron 50 µL de agua desionizada, 10 µL de *buffer* concentrado (PBS 10X-Tween 1%) y 5 µL de solución de Nb de detección (20 µg/mL en PBS). La mezcla se homogeneizó e incubó 5 minutos a TA y se agregaron 10 µL de solución de Stp marcada con oro (Stp-oro). Se homogeneizó e inmediatamente se sumergió la tira de nitrocelulosa y se dejó migrar la mezcla por capilaridad. La lectura se realizó en forma visual luego de 10 minutos de corrida.

## Capítulo 4: Desarrollo de un ELISA de bloqueo de unión para la detección de anticuerpos contra el virus del Zika

#### Materiales.

La proteína no estructural 1 del Zika (ZIKV-NS1) y de los distintos flavivirus, así como el anticuerpo anti-ZIKV-NS1 de ratón se adquirieron en The Native Antigen Company (Oxfordshire, UK). Las columnas de cromatografía de proteína A y Ni-NTA y columnas de exclusión molecular Superosa 12 fueron de GE Healthcare (MA, EE.UU.). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), PBS para cultivo y Suero Fetal Bovino (SFB) fueron de Capricorn

(Ebsdorfergrund, Alemania). La línea celular HEK 293T de ATCC (VA, EE.UU.) Botellas T25, T75, T175 y placas de cultivo de 6 pozos de Greiner Bio One (NC, EE.UU.) Tripsina y mix estreptomicina-penicilina de Sigma (St. Louis, MO). Otros reactivos particulares especificado en Métodos.

#### Muestras.

Los estándares internacionales (IS) para anticuerpos anti-ZIKV 16\_352, 16\_320 y 16\_328 fueron donados por el *National Institute of Biological Standard Control* (NIBSC) del Reino Unido. Los sueros de pacientes infectados con diferentes flavivirus (confirmados por RT-PCR y serología), incluidos ZIKV (n = 3), Dengue (DV, n = 11), Fiebre amarilla (YFV, n = 8) y Saint Louis (SLV, n = 5) fueron muestras remanentes de-identificadas proporcionadas por el Ministerio de Salud Pública (MSP) de Uruguay. Los sueros de donantes sanos sin historia de exposición a Zika estaban disponibles en el laboratorio de estudios anteriores. Todas las muestras fueron de-identificadas y procesadas siguiendo las recomendaciones de la Comisión de Ética en la Investigación con Seres Humanos de la Facultad de Química, UDELAR.

### Estudio de reactividad cruzada en ELISA directo para la detección de anticuerpos anti-ZIKV-NS1, en sueros inmunes a flavivirus.

Placas de ELISA se sensibilizaron con 20 ng por pozo de NS1 recombinante de los virus: ZIKV, DV, YFV y SLV, por 16 horas, a 4°C. Las placas se lavaron con PBST y se bloquearon con 1% BSA en PBS por 1 hora a TA. Luego de lavar con PBST cada placa se incubó durante 1 hora con 100 μL/pozo de una dilución 1/500 de suero de pacientes con infección por flavivirus. Para cada NS1 también se incluyó un conjunto de sueros sin historia de infección por flavivirus como control negativo. Después del lavado, 100 μL/pozo de una mezcla de anticuerpos anti-IgG y anti-IgM humanas conjugados a peroxidasa (concentración recomendada por el fabricante), se incubaron por 1 hora a TA. Finalmente, las placas se lavaron con PBST y se añadió sustrato TMB durante 10 minutos. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 50 μL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y la OD se midió a 450 nm.

## Comparación del bloqueo generado por un suero estándar anti-Zika, en la unión de los distintos nanobodies a la ZIKV-NS1.

Se sensibilizó una placa de ELISA con 20 ng por pozo de NS1, durante 16 horas a 4°C. Se bloqueó con 1% BSA en PBS durante 1 hora a TA. Luego del lavado con PBST se agregó 100 µL/pozo de tres diluciones del estándar IS 16\_352 (1/20, 1/40 y 1/80 en PBS) y se incubó durante 1 hora a TA. Después de lavar con PBST, las placas se cargaron por separado con 100

µL/pozo de 10 BtNbs anti-ZIKV-NS1 por 1 hora a TA. La concentración de trabajo de cada Nb (5,0 a 12 ng/mL) se seleccionó previamente, como la cantidad de Nb capaz de generar una OD - 1 UA, al exponerlo a 20 ng/pozo de ZIKV-NS1. Las placas se lavaron con PBST, y se añadió Stp conjugada a peroxidasa y se incubó por 1 hora a TA. La reacción enzimática se desarrolló como se describió anteriormente. El porcentaje de inhibición de unión (% BI) se calculó de la siguiente manera: % BI = [1- (OD muestra / OD PBS)] × 100. Con los Nbs que experimentaron %BI mayores a 40% se repitió la reacción descripta anteriormente para los estándares IS 16\_320 e IS 16\_328.

## Evaluación del bloqueo en la unión nanobody-ZIKV-NS1 mediante sueros con infección por otros flavivirus.

El procedimiento fue idéntico al descripto para los sueros de referencia, pero utilizando mezclas de sueros inmunes a DV, SLV y YFV diluidos 1/20. El % BI generado para cada BtNb se comparó con el obtenido con el estándar IS 16\_352. A partir de las dos pruebas realizadas anteriormente, un conjunto de *nanobodies* fue seleccionado para trabajar, al cual se denominó *pool* de Nbs (pNbs).

#### Elección de dilución de muestra para el ensayo de bloqueo de unión.

Se sensibilizó una placa de ELISA con 20 ng/pozo de ZIKV-NS1 durante 16 horas a 4°C. Luego de bloqueada con 1% BSA en PBS durante 1 hora a TA, se sembraron 100 µL/pozo de los estándares IS 16\_320, 16\_328 y 16\_352, diluciones al medio desde 1/20 hasta 1/2560, y se incubaron 1 hora a TA. Luego, se dispensaron 100 µL/pozo del pNb y se incubó por 1 hora a TA. La unión se evidenció por el agregado de Stp:HRP durante 1 hora a TA. Finalmente, las placas se lavaron con PBST y se desarrolló la reacción de la peroxidasa según lo detallado anteriormente.

#### Estudio de condiciones para la optimización del bloqueo de unión: secuencial o simultáneo.

Se sensibilizó una placa de ELISA con 20 ng/pozo de ZIKV-NS1 durante 16 horas a 4°C. Se bloqueó con 1% BSA en PBS durante 1 hora a TA. Luego del lavado con PBST se realizaron dos estrategias: I) secuencial: se sembraron 100 µL/pozo de dilución 1/40 del estándar 16\_352, luego de 1 hora a TA se lavó con PBST y se incubó con 100 µL/pozo de la solución del pNb durante 1 hora a TA. II) simultáneo: se sembraron 50 µL/pozo de una dilución 1/20 del estándar IS 16\_352 más 50 µL/pozo de la solución del pNb y se incubó 1 hora a TA. Finalmente, en ambos casos los pozos fueron lavados con PBST e incubados con Stp:HRP. La reacción de la enzima se desarrolló como se describió anteriormente.

#### Estimación del valor de corte.

Se sensibilizaron placas de ELISA con 20 ng/pozo de ZIKV-NS1 durante 16 horas a 4 °C. Se bloqueó con 1% BSA en PBS durante 1 hora a TA. Luego del lavado con PBST, se sembraron 100  $\mu$ L/pozo de una dilución 1/40 de sueros individuales (n=98) de donantes sin historia de exposición a Zika, se incubaron 1 hora a TA. Luego de lavar con PBST, se dispensaron 100  $\mu$ L/pozo del pNb y se incubó por 1 hora a TA. La unión se evidenció por el agregado Stp:HRP por 1 hora a TA. Finalmente, la reacción de la enzima se desarrolló según detallado anteriormente. El punto de corte fue estimado como el %BI promedio más 3 SD.

#### Evaluación de la especificidad del ensayo.

Se sensibilizó una placa de ELISA con 20 ng/pozo de ZIKV-NS1 durante 16 horas a 4°C. Se bloqueó con 1% BSA en PBS durante 1 hora a TA. Luego del lavado con PBST, se sembraron 100 µL/pozo de una dilución 1/40 des sueros de pacientes infectados con DV (n=11), SLV (n=5), YFV (n=8) y ZIKV (n=3), por 1 hora a TA. Luego, se dispensaron 100 µL/pozo del *pool* de Nbs (pNb) y se incubó por 1 hora a TA. La unión se evidenció por el agregado de Stp:HRP durante 1 hora a TA. La reacción de la enzima por el agregado del sustrato TMB.

#### Evaluación de la precisión del ensayo.

Se procesó el estándar IS 16\_352 en una dilución 1/40 por cinco réplicas en un mismo día (variación intra-ensayo) y durante cinco días consecutivos (variabilidad inter-ensayo) y se calculó el RSD en cada caso.



# Resultados y discusión

### Parte I

Contribución al diagnóstico precoz de cáncer colorrectal







# Capítulo 1

Desarrollo de ELISA para cuantificación de hemoglobina humana en materia fecal











# 1. Desarrollo de ELISA para cuantificación de hemoglobina humana en materia fecal

El diagnóstico temprano de CCR asegura un alto porcentaje de recuperación. Sin embargo, la mayoría de los casos se detectan en etapas avanzadas. Esto se debe, principalmente, a la baja adhesión de la población a los programas de tamizaje y a la incapacidad de los métodos diagnósticos de detectar marcadores precoces [131]. La forma de tamizaje más utilizada es la búsqueda de sangre oculta en materia fecal, mediante la utilización de pruebas inmunoquímicas basadas en el uso de anticuerpos específicos por la Hgh. Sin embargo, estas presentan algunas dificultades como ser: insuficiente sensibilidad, presencia de reactividad cruzada, valor de corte inadecuado e incorrecta estabilización de la muestra [157-159, 206]. Debido a la naturaleza compleja de la matriz, y a la necesidad de cuantificar cantidades traza de Hgh, su detección representa un modelo atractivo para la optimización de la plataforma de generación de Nbs con potencial aplicación diagnóstica. Por ello, en este capítulo fue abordado el objetivo de generar anticuerpos monodominio capaces de reconocer a la Hgh, y su posterior adaptación a un ELISA que permita su cuantificación en materia fecal. Finalmente, se validó analíticamente para su potencial contribución al diagnóstico no invasivo de CCR.

Los resultados correspondientes a este capítulo dieron lugar al *Artículo I* de esta tesis, adjunto en Anexo II.

#### 1.1 Generación y selección de nanobodies contra hemoglobina humana

#### Preparación de hemoglobina humana

Con la finalidad de realizar la inmunización de los animales de experimentación y proceder en las etapas de selección de los anticuerpos, así como en la validación del ensayo a desarrollarse, se purificó Hg a partir de sangre humana. La misma fue obtenida a partir de un protocolo diseñado en el laboratorio y su concentración fue determinada por gravimetría. Mediante este procedimiento fue posible obtener un rendimiento de 1 mg de peso seco de proteína por mililitro de sangre. Su pureza fue evaluada mediante SDS-PAGE, pudiéndose corroborar un alto grado de pureza, que al compararlo con Hgh comercial se observa que es similar a la misma (Sigma, St. Louis, MO), (**figura 12**).

La Hgh obtenida fue la utilizada durante las etapas de inmunización y como estándar durante el desarrollo del ensayo.



Figura 12. SDS-PAGE de hemoglobina humana preparada en el laboratorio y comercial. Se muestra una corrida electroforética en gel de acrilamida 15%. En cada caso fue sembrado 5,0 y 10 µg/pozo de proteína.

Posteriormente, una fracción de la Hgh purificada en el laboratorio fue conjugada químicamente a biotina con bajo nivel de derivatización. En la **figura 13** se observa el grado de biotinilación, según su análisis en MALDI-TOF. Las condiciones de conjugación fueron optimizadas hasta que fue posible controlar la incorporación de un promedio de una única molécula de biotina por monómero de Hgh. Esto es importante de manera de comprometer lo menos posible los epítopes que pudiesen reconocer los Nbs sobre la molécula de Hg. De esta forma, fue plausible preparar Hgh biotinilada (Hgh-Bt) lo cual permitiría, posteriormente, la inmovilización de la misma en su forma nativa, mediante la unión Stp/avidina-biotina, minimizando la afectación de los epítopes de la proteína.



**Figura 13.** Análisis de biotinilación de hemoglobina humana por MALDI-TOF. Arriba- Hgh no biotinilada. Además de la señal correspondiente a las subunidades alfa y beta, hay picos adicionales (+215 Da) correspondientes a una modificación desconocida. **Abajo-** Hgh obtenida tras moderada biotinilación in vitro. La adición de biotina está indicada por la aparición de un pico con un incremento de aproximadamente 227 Da y cambios en la intensidad relativa de los picos.

#### Generación de biblioteca de fagos y selección de VHHs anti-hemoglobina humana

A partir de los genes que codifican para los VHH/VH de leucocitos mononucleares periféricos de una llama inmunizada con Hgh, se generó una biblioteca con una diversidad de 4x10<sup>7</sup> transformantes, evaluado como el número de colonias bacterianas independientes obtenidas tras el proceso de electroporación con la biblioteca de DNA. Con el fin de seleccionar fagos portadores de VHHs con alta afinidad por distintos epítopes de la Hgh, de manera que permitiese montar un ELISA sándwich, se plantearon dos estrategias de panning. En la estrategia A, la biblioteca se seleccionó en pozos de placas de ELISA recubiertos directamente con el antígeno. Por otro lado, con el objetivo de preservar los epítopes nativos de la proteína (que podrían perderse por adsorción directa en los pozos), en una estrategia B, la biblioteca se seleccionó contra Hgh-Bt inmovilizada mediante avidina. Luego de dos rondas de panning los genes VHH de los fagos seleccionados en cada estrategia (output) fueron transferidos "en masa" al vector de expresión pINQ-BtH6. Esto, permitió la expresión soluble y monomérica, es decir independiente del fago, de Nbs biotinilados (BtNbs) en el periplasma de E. coli BL21 (DE3). Noventa y seis BtNb individuales se cultivaron y purificaron para generar dos "placas madre, A y B", cada una correspondiente a la estrategia de panning A y B, respectivamente; a partir de las cuales se eligió el Nb de captura y el de detección.

#### Elección del nanobody de captura

Como se comentó anteriormente, en la estrategia B la biblioteca fue seleccionada sobre Hgh-Bt inmovilizada por su unión a la avidina. Esta estrategia se diseñó de manera de forzar la selección de Nbs capaces de reconocer epítopes conformacionales sobre la proteína. Este tipo de reconocimiento es relevante al momento de seleccionar un anticuerpo de captura, dado que este debe identificar al analito en solución bajo su forma nativa. Por este motivo, la placa maestra B fue la utilizada para la elección del Nb de captura.

Al realizar el tamizaje primario de 96 clones biotinilados provenientes de la placa maestra B sobre Hgh-Bt, se seleccionaron aquellos que produjeron la absorbancia más alta a la mayor dilución. Luego de secuenciar, se identificaron cinco Nbs diferentes, con los que se realizaron curvas estándar, (**figura 14**). Como estimador de la afinidad de cada Nb por la Hgh se utilizó la concentración de Hgh-Bt que produce el 50% de saturación (SC<sub>50</sub>). Los cinco Nbs presentaron valores de SC<sub>50</sub> dispares lo que permitió elegir al Nb E11 como anticuerpo de captura debido a su menor SC<sub>50</sub>, lo cual podría sugerir que reconoce al antígeno con mayor afinidad.


**Figura 14. Curvas estándar con los nanobodies seleccionados del panning B**. Se realizaron curvas estándar de Hgh-Bt para Nbs obtenidos de panning estrategia B. Se utilizó como control negativo un Nb con especificidad por otra proteína. Los valores se graficaron con ajuste sigmoidal con 4 parámetros, usando software GraphPad Prism 7.00. SC<sub>50</sub>: Concentración de saturación 50%.

#### Selección de pares de nanobodies

A partir de los clones obtenidos con la estrategia de *panning* A, donde la Hgh fue sensibilizada directamente en el pozo de ELISA, se confeccionó la placa madre A con noventa y seis clones. En este caso los anticuerpos podrían haberse seleccionado tanto contra epítopes nativos como parcialmente desnaturalizados. Esta forma de inmovilización es de utilidad al seleccionar un Nb de detección, ya que éste debe reconocer al antígeno previamente inmovilizado por otro Nb (el de captura), que eventualmente podría generar un cambio conformacional en el mismo. Por otro lado, de esta forma pueden incluirse epitopes nativos que se destruyen al biotinilar debido a la presencia de residuos críticos de lisina, ampliando así el repertorio de Nbs a considerar.

Tal como se describió en la sección Métodos de este capítulo, el BtNb E11 (captura) inmovilizado se ensayó con los clones de la placa madre A, generando así 96 pares que se estudiaron con dos concentraciones muy bajas de Hgh en solución. A partir de aquellos clones de detección que produjeron los pares con mayor señal de absorbancia se realizaron curvas estándar para cada uno de ellos utilizando a BtNb E11 como anticuerpo de captura, (**figura 15**). El SC<sub>50</sub> se utilizó como estimativo de sensibilidad, donde la mayoría de los valores obtenidos estuvieron dentro del mismo orden. Debido a que el Nb B9 fue el que dio lugar a la mayor sensibilidad (SC<sub>50</sub> = 6,0 ng/mL) y a que presentó muy buen rendimiento de producción fue elegido como Nb de detección.



**Figura 15. Curvas estándar obtenidas con distintos** *nanobodies* **formando par con BtNb E11.** Los valores se graficaron con ajuste sigmoidal con 4 parámetros, usando el *software GraphPad Prism 7.00.* SC<sub>50</sub>: Concentración de saturación 50%. Como control negativo se utilizó un Nb con especificidad por otra proteína.

De esta manera, los Nbs E11 y B9 fueron seleccionados para desarrollar el ELISA sándwich. Sus secuencias aminoacídicas se pueden apreciar en la **figura 16** (ampliada en *Anexo I*, figura A1). Ambos Nbs tienen los residuos característicos de los VHHs, y un CDR3 relativamente largo.

------FR1------ CDR1 ------FR2------ CDR2 ----FR3------- CDR3 ---FR4-----B9 QVQLVQSGGGLVQPGGSLRVSCAAS GRIPSRYV MAWFRQAAGRGREFVAG ISESGTRT VYADSVKGRFTISTDNVKNILNLQMNDLKPEDTAVYYC AIDHRGTTDYWAQSEWGY WGQGTQVTVSS B11 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFIFSTYS MGWFRQAPGKEREFVAA STWGGVTT NYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLQMNSLNSGDTAVYYC AAARFLQNARLTTGPYDY WGQGTQVTVSS

Figura 16. Alineamiento de secuencias de los nanobodies seleccionados. Se muestran las secuencias aminoacídicas obtenidas para los Nbs E11 y B9. \*En Anexo I, figura A1.

#### 1.2 Optimización de Nbs seleccionados para conformación de ELISA sándwich

#### Caracterización de ELISA E11/B9

Se seleccionó al Nb E11 como anticuerpo de captura y al Nb B9 como anticuerpo de detección para confeccionar el ELISA sándwich que permita cuantificar Hgh en materia fecal. Una vez establecidas las condiciones de uso finales se caracterizó al inmunoensayo.

#### Evaluación del efecto matriz

A partir de las heces donadas por el Departamento de Parasitología y Micología del Hospital Pasteur, se generaron extractos. Como forma de evaluar el efecto de la materia fecal sobre la combinación de Nbs E11/B9 se evaluó su desempeño en dicha matriz mediante ensayos de recuperación. Para esto, se enriquecieron muestras con cantidades conocidas de Hgh y se calculó el porcentaje de recuperación al procesarlas en el ensayo. Se constataron dos problemáticas asociadas al efecto matriz: ruido de fondo elevado en el blanco de adición (0 ng/mL de Hgh) y porcentajes de recuperación bajos; las mismas se detallan a continuación.

Al procesar en el ELISA E11/B9 extractos sin adicionar (para evaluar absorbancia de blanco de adición) se obtuvieron señales de absorbancia saturadas para todas las muestras. El ruido en el blanco de adición era demasiado elevado, y por tanto inadecuado para trabajar. Ante esto, se propuso que se podrían estar presentando una de las siguientes situaciones: o bien las muestras presentaban originalmente cantidades de Hgh medibles, o en la muestra existía una interferencia positiva capaz de interactuar inespecíficamente con los reactivos del ensayo, sobreestimando la concentración de Hgh.

De manera de evaluar la primera hipótesis, varias muestras de materia fecal fueron incubadas con una resina de Stp unida a los Nbs E11 y B9 biotinilados. En caso de haber Hgh en la muestra antes de adicionar, esta quedaría unida a la resina. Se analizaron por el ELISA E11/B9 las muestras antes y después de la incubación con la resina; sin embargo, los resultados de ambas fueron similares. Por lo tanto, se concluyó que el ruido no estaba dado por Hgh presente originalmente en la muestra, sino por la existencia de una interferencia positiva en la matriz. Con el fin de reducir la unión entre el "componente interferente" y los reactivos, se procedió a la modificación de diferentes condiciones del ensayo. Algunas de las modificaciones exploradas fueron: la composición de los buffers utilizados para la dilución de muestra (variando fuerza iónica, pH, incorporación de detergentes y agentes caotrópicos), el agente bloqueante (ovoalbúmina, gelatina y caseína, en lugar de BSA) y la proteína de sensibilización (Stp en vez de avidina). No se observó ninguna mejoría al modificar la solución buffer o el bloqueante. Sin embargo, el ruido de fondo se hizo indetectable al utilizar Stp, en vez de avidina. Este hecho está en consonancia con lo reportado en bibliografía, que la Stp y neutravidina constituyen una buena alternativa a la avidina, cuando se utilizan matrices de alta complejidad. Se postula que esto puede deberse a la interacción inespecífica resultante del alto número de residuos cargados positivamente de la avidina y su glicosilación [207].

Sin embargo, como efecto secundario al cambio de proteína de sensibilización hubo una pérdida de sensibilidad en la curva estándar. Como forma de compensar dicha pérdida y

teniendo como antecedente que la fusión de los Nbs a un *tag* HA (en vez de una biotina) puede mejorar la sensibilidad, se clonó el Nb B9 al vector pINQ-H6HA que permite la expresión del Nb fusionado a un péptido hemaglutinina, HANb. De esta manera, se logró mejorar sustancialmente la sensibilidad alcanzando un SC<sub>50</sub> similar al obtenido previamente con avidina, **figura 17**.



**Figura 17. Efecto del** *tag* utilizado en el *nanobody* de detección. Las curvas estándar se realizaron utilizando el Nb biotinilado (BtB9, línea discontinua) o con un *tag* HA (HAB9, línea continua). Los resultados son los valores promedio de las mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar. Los valores se graficaron con ajuste sigmoidal con 4 parámetros, usando el *software GraphPad Prism 7.00* 

A pesar de haber superado el primer obstáculo, se constató un segundo inconveniente asociado al uso de matriz. Al procesar en el ELISA E11/B9 las muestras adicionadas con cantidades conocidas de Hgh se obtuvieron porcentajes de recuperación excesivamente bajos (20% – 50%). En este caso, se plantearon dos escenarios posibles, por un lado, se consideró que la presencia de algún compuesto en la matriz estaba "enmascarando" a la Hgh, la cual no podía ser reconocida por los Nbs. Por otro lado, se propuso que algún compuesto presente en la matriz degradaba a la Hgh. Con el fin de eliminar al posible "agente enmascarante", se aplicaron distintas alternativas como la deslipidización o la inactivación por calor de las muestras, sin éxito. En cambio, de manera de estudiar si algún componente presente en la matriz era capaz de degradar a la Hgh, se evaluó la relación entre el porcentaje de recuperación y el tiempo transcurrido desde la adición de Hgh a la muestra hasta su sembrado en el ELISA. En este caso, se confirmó que cuanto mayor era el tiempo transcurrido entre la adición y el

sembrado, menor el porcentaje de recuperación. Esto apoyó la idea de que algún compuesto, probablemente proteasas, presente en la matriz degradaba a la Hgh en solución. En este contexto, se exploró la adición de distintos inhibidores de proteasas al *buffer* del ensayo, consiguiendo una notoria mejoría en la recuperación al agregar un cóctel de inhibidores comercial.

#### Determinación de los parámetros analíticos para ELISA E11-B9

Una vez optimizado el ELISA E11/B9 se realizó su caracterización. Con este fin se determinaron los parámetros analíticos, como ser el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ) y el intervalo de trabajo. La **figura 18** muestra las curvas estándar obtenidas en el rango de 0,3-300 ng/mL (curva sigmoidea) y el rango de 0-10 ng/mL (curva lineal).



**Figura 18. Curva estándar del par E11/B9 en** *buffer salino.* Los resultados son los valores promedio de las mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar. Los valores se graficaron con ajuste sigmoidal (izquierda) y lineal (derecha), usando el *software GraphPad Prism 7.00.* SC<sub>50</sub>: Concentración de saturación 50 %.

En relación al desempeño de la prueba en *buffer* salino, el LOD (calculado como 3 SD del cero), fue de 0,08 ng/mL y el LOQ (calculado como 10 SD del cero), fue de 0,27 ng/mL. De todas maneras, la sensibilidad práctica del ensayo aplicado a muestras reales se estableció como se describe más adelante.

#### Evaluación de la reactividad cruzada con hemoglobinas provenientes de la dieta

Como se mencionó en la Introducción, debido a la alta homología entre las Hgs de distintas especies animales, algunas de las pruebas disponibles para su detección presentan reactividad cruzada, lo que genera resultados falsos positivos. Este inconveniente lleva a la necesidad de hacer una dieta libre de carne en los días previos a la realización de la prueba. Esto, constituye un posible motivo de no concurrencia el día del examen, por lo que dificulta la implementación del método para tamizaje masivo. Por esta razón, es de gran importancia conocer la reactividad cruzada del ensayo frente a distintas Hgs presentes usualmente en una dieta carnívora. Con este fin, se purificó la Hg a partir de sangre de especies usualmente incluidas en una dieta carnívora, como vaca, oveja, cerdo, pescado, pollo y conejo. Como es posible observar en la figura 19, cada una de estas proteínas se analizó en el ELISA E11/B9 en un amplio rango de concentraciones y no se observó reactividad significativa, incluso a la concentración más alta testeada, 10 µg/mL. Esto es destacable teniendo en cuenta el alto grado de conservación de secuencia que presentan entre las Hgs de las distintas especies (Anexo I, figura A2). A su vez, este hallazgo tiene gran relevancia al desarrollar una prueba diagnóstica, ya que haría innecesaria cualquier restricción dietaria previo a la recolección de la muestra. Esto tiene gran relevancia ya que haría innecesaria cualquier restricción dietaria previo a la recolección de la muestra.



**Figura 19. Reactividad cruzada del ELISA E11/B9 con hemoglobinas de distintas especies animales.** Curvas estándar testeadas entre O a 10 µg/mL. Todos los estándares se analizaron por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar. Los valores se graficaron con ajuste sigmoidal usando software GraphPad Prism 7.00.

#### 1.3 Validación analítica del ELISA sándwich desarrollado

Para realizar la validación analítica del ensayo se procedió a determinar la exactitud del método. Según la Organización Internacional para la Estandarización la exactitud de una medición es la proximidad de un único resultado a un valor de referencia, y para su estudio se deben tener en cuenta los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales [208, 209]. Por lo tanto, la exactitud se estudia mediante dos componentes: veracidad y precisión.

#### Evaluación de la veracidad del método

La veracidad de medición expresa la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. En la práctica, la veracidad se expresa cuantitativamente en términos de sesgo. Existen tres enfoques para su determinación: a) análisis de materiales de referencia, b) experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas, y c) comparación con resultados obtenidos mediante un método de referencia. Debido a la carencia de materiales o métodos de referencia para la cuantificación de Hgh en materia fecal, se realizaron adiciones de cantidades conocidas de Hgh sobre las muestras y se calculó el porcentaje de recuperación. Utilizando el ELISA E11/B9, se analizaron 18 muestras de materia fecal antes y después de la adición de dos concentraciones de Hgh. Teniendo en cuenta que la concentración se encuentre por debajo del valor de corte diagnóstico recomendado (10-20 µg/g) y dentro del rango lineal de la curva se adicionaron con 2,0 y 4,0 µg/g. Las recuperaciones fueron excelentes en ambas concentraciones, demostrándo la aplicabilidad de este ensayo para la cuantificación incluso de concentraciones del orden de las partes por millón de Hgh que están muy por debajo del valor de corte. Se logró obtener porcentajes de recuperación en el rango óptimo (80-120%), según lo recomendado por la guía de validación de ensayos analíticos, como se puede observar en la tabla 4 [210].

	Sin adición	Adición hHG 2.0 µa/a			Adición hHG 4.0 µa/a			
Muestra	Hgh µg/g	Hgh µg/g Hgh µg/g % Recuperación		% Recuperación	Hgh µg/g % Recuper		% Recuperación	
1	<loo< td=""><td>1,51</td><td>± 0,06</td><td>75</td><td>4,14</td><td>± 0,08</td><td>103</td></loo<>	1,51	± 0,06	75	4,14	± 0,08	103	
2	<loq< td=""><td>1,96</td><td>± 0,14</td><td>98</td><td>3,27</td><td>± 0,12</td><td>82</td></loq<>	1,96	± 0,14	98	3,27	± 0,12	82	
3	0,35 ± 0,02	2,09	± 0,02	87	4,26	± 0,04	98	
4	<loq< td=""><td>1,45</td><td>± 0,22</td><td>73</td><td>3,18</td><td>± 0,23</td><td>80</td></loq<>	1,45	± 0,22	73	3,18	± 0,23	80	
5	<loq< td=""><td>2,07</td><td>± 0,13</td><td>104</td><td>4,36</td><td>± 0,10</td><td>109</td></loq<>	2,07	± 0,13	104	4,36	± 0,10	109	
6	<loq< td=""><td>2,12</td><td>± 0,02</td><td>106</td><td>3,53</td><td>± 0,04</td><td>88</td></loq<>	2,12	± 0,02	106	3,53	± 0,04	88	
7	<loq< td=""><td>1,55</td><td>± 0,06</td><td>78</td><td>4,01</td><td>± 0,07</td><td>100</td></loq<>	1,55	± 0,06	78	4,01	± 0,07	100	
8	15,2 ± 0,40	17,30	± 0,35	105	19,85	± 0,17	116	
9	0,15 ± 0,03	1,73	± 0,10	79	3,30	± 0,12	79	
10	0,72 ± 0,10	2,63	± 0,05	96	4,41	± 0,15	92	
11	<loq< td=""><td>1,43</td><td>± 0,10</td><td>72</td><td>3,85</td><td>± 0,01</td><td>96</td></loq<>	1,43	± 0,10	72	3,85	± 0,01	96	
12	<loq< td=""><td>1,49</td><td>± 0,09</td><td>74</td><td>3,15</td><td>± 0,10</td><td>79</td></loq<>	1,49	± 0,09	74	3,15	± 0,10	79	
13	2,20 ± 0,04	4,42	± 0,21	111	5,62	± 0,02	86	
14	<loq< td=""><td>2,02</td><td>± 0,04</td><td>101</td><td>4,47</td><td>± 0,27</td><td>112</td></loq<>	2,02	± 0,04	101	4,47	± 0,27	112	
15	<loq< td=""><td>1,85</td><td>± 0,14</td><td>92</td><td>4,04</td><td>± 0,07</td><td>101</td></loq<>	1,85	± 0,14	92	4,04	± 0,07	101	
16	<loq< td=""><td>2,19</td><td>± 0,07</td><td>109</td><td>4,06</td><td>± 0,16</td><td>101</td></loq<>	2,19	± 0,07	109	4,06	± 0,16	101	
17	<loq< td=""><td>1,87</td><td>± 0,13</td><td>93</td><td>4,40</td><td>± 0,34</td><td>110</td></loq<>	1,87	± 0,13	93	4,40	± 0,34	110	
18	4,60 ± 0,30	6,38	± 0,10	89	8,54	± 0,16	99	

#### Tabla 4. Ensayo de recuperación para el ELISA E11/B9

Muestras 1-18: corresponden a materia fecal de 18 pacientes donadas por Hospital Pasteur de Montevideo. <LOQ: por debajo del límite de cuantificación. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### Evaluación de la precisión del método

La precisión se expresó como la desviación estándar de mediciones repetidas, mediante el estudio de la repetibilidad y reproducibilidad de medición. La repetibilidad (precisión intra-ensayo), evalúa la variabilidad cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista, con el mismo equipo en un corto periodo [208, 211]. La reproducibilidad, por su parte, evalúa la variabilidad en los resultados entre laboratorios utilizando el mismo método. En esta tesis se estudió, la precisión intermedia (precisión inter-ensayo) variación de mediciones en un solo laboratorio, pero en distintos días.

Con este fin se realizó la determinación de la variabilidad correspondiente al análisis de réplicas de una muestra enriquecida con dos concentraciones de Hgh. En el primer caso se adicionó una concentración de Hgh que representa el valor de corte más utilizado, 20 µg/g, y en el segundo caso se utilizó una concentración alta, similar a la que podría encontrarse en un paciente con CCR, 200 µg/g. Para esta evaluación se calcularon las desviaciones estándar relativas (RSD) expresadas en porcentaje, tanto intra-ensayo con cinco réplicas en un mismo día, e inter-ensayo en cinco días para cada estándar (**tabla 5**).

El ELISA presenta baja variabilidad intra-ensayo (RSD < 8%) e inter-ensayo (RSD < 15%), cumpliendo con los requisitos de las guías para validación [210]. El resultado es destacable considerando que se trata de la cuantificación de un analito a muy bajas concentraciones y en una matriz de gran complejidad.

Concentración de Hgh adicionada (µg/g)	20	200
Precisión intra-día		
Réplicas	5	5
Media (µg/g)	22,3	206
RSD%	2	8
Precisión inter-día		
Días	5	5
Media (µg/g)	17,8	203
RSD%	15	12

#### Tabla 5. Evaluación de la precisión del ensayo

La repetibilidad corresponde a variabilidad *intra-ensayo* de 5 réplicas. Precisión intermedia corresponde a la variabilidad *inter-ensayo* de medidas de 5 réplicas tomadas en 5 días (n=15). RSD: desviación estándar relativa.

#### . 1.4 Consideraciones finales del capítulo

El objetivo de esta etapa de la tesis fue generar un ELISA sándwich que permita la cuantificación de Hgh en materia fecal. Para ello, a partir de una llama inmunizada, y mediante el diseño de diferentes estrategias de selección con la técnica de *Phage display*, se seleccionaron Nbs anti-Hgh. Posteriormente, a través de la aplicación de un *screening high-throughput* de pares, fue posible seleccionar dos Nbs que reconocen epítopes no solapantes en la proteína. A partir del estudio de reactividad cruzada se constató la ausencia de reconocimiento de Hgs de otras especies por el par de Nbs seleccionado, demostrando su selectividad. La combinación de Nbs fue optimizada para ser utilizada en muestras de materia fecal. Para la validación analítica del método no existen materiales de referencia ni método *gold standard* para la cuantificación de Hgh. Debido a ello, el estudio del desempeño en matriz se realizó mediante análisis de recuperación sobre un panel de muestras adicionadas con trazas de Hgh. A partir de dicho estudio, el ELISA fue capaz de cuantificar a la proteína en baja concentración (nanogramos de Hgh por gramo de materia fecal), con excelente exactitud y precisión.



## Resultados y discusión

### Parte II

Contribución al diagnóstico de infecciones por el virus Zika







# Capítulo 2

Producción recombinante de la proteína NS1 del virus del Zika











#### 2. Producción recombinante de proteína NS1 del virus del Zika

La NS1 de Zika es una glicoproteína que presenta una forma dimérica intracelular, y una hexamérica excretada de 352 kDa. Cada monómero está conformado por tres dominios: *beta-roll* (aa 1-29), *alfa-beta Wing* (aa 30-180) y *beta-ladder* (aa 181-352) [173]. La similitud de la NS1 de Zika con sus homólogas de otros flavivirus es moderada, y comparativamente menor que la existente entre proteínas estructurales. Debido a que esta proteína circula en sangre en etapas tempranas y a que es un factor muy inmunogénico, constituye un ventajoso biomarcador para el diagnóstico de la infección aguda y convaleciente, respectivamente [100, 178]. Estas características hacen a la NS1 atractiva para la generación de inmunoensayos con utilidad diagnóstica en distintas etapas de la infección.

La Parte II de esta tesis se focalizó en el desarrollo de inmunoensayos para el diagnóstico del virus del Zika, utilizando como antígeno a la NS1. Dado que se requería disponer de esta proteína, inicialmente se trabajó en su producción recombinante. En este capítulo se muestran los principales resultados obtenidos en esta etapa.

#### 2.1 Expresión de NS1 en sistema procariota

#### Producción del fragmento beta-ladder

Fueron llevadas a cabo distintas estrategias para producir en forma recombinante tanto a la ZIKV-NS1 en toda su extensión, como al fragmento *beta-ladder* de la misma. En una primera instancia, se planteó producir el dominio *beta-ladder* (aa 181-352, aproximadamente 37 kDa), en un sistema procariota, para utilizarlo como antígeno en las etapas de inmunización y selección. Esta elección se basó en que, debido a la baja similitud que presenta este dominio en comparación con sus homólogos en otros flavivirus, es probable que existan en este un menor número de epítopes que pudieran ser reconocidos de forma cruzada. A su vez, dado el gran tamaño de este dominio, potencialmente permitiría seleccionar anticuerpos contra epítopes no solapantes para diseñar inmunoensayos de tipo sándwich (**figura 20**) [173].



**Figura 20. Estructura de la proteína ZIKV-NS1.** Los dominios *beta-roll* aminoácidos 1-29, *alfa-beta Wing* aminoácidos 30-180 y *beta-ladder* aminoácidos 181-352, se muestran en verde, rojo, y azul, respectivamente.

Con este objetivo, se diseñó el gen sintético correspondiente al dominio *beta-ladder* con sitios de restricción que permitieran el clonado en dos vectores de expresión, pET28a+ y pMAL. De modo de preservar la formación de los puentes disulfuro, se realizó la expresión utilizando el plásmido pET28a+ en la cepa *Shuffle* de *E. coli*, que presenta un citoplasma reductor. Adicionalmente se utilizó el vector pMAL para promover la expresión soluble del fragmento fusionado a la proteína MBP (del inglés *Maltose Binding Protein*). Para esta última construcción, la expresión se realizó en la cepa BL21 de *E. coli*. En ambos casos, se logró la producción en alta concentración tanto del fragmento *beta-ladder* como de *beta-ladder:MBP*. Sin embargo, a pesar de la variación de las condiciones de cultivo, como el tiempo y concentración de inducción, temperatura y pH, la expresión del fragmento se obtuvo únicamente en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión (**figura 21**).



**Figura 21- Producción del fragmento** *beta-ladder* **de la NS1 de Zika. (A)** Expresión desde vector pMAL en *E. coli* BL21/DE3. Fracción insoluble (izquierda) y soluble (derecha) obtenida por inducción con IPTG. **(B)** Producción desde vector pET28a+ en *E.coli Shuffle*. Fracción insoluble (izquierda) y soluble (derecha) tras inducción con IPTG. Carril BL21: corresponde a *E. coli* sin transformar. PM: marcador de peso molecular.

Debido a que la producción del fragmento *beta-ladder* fusionado a la MBP no mejoró su solubilidad, se continuó trabajando principalmente con el sistema pET28a+/*E. coli Shuffle* por simplicidad. La purificación de la proteína, desde los cuerpos de inclusión, se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando Ni-NTA-agarosa, en condiciones desnaturalizantes (8 M de urea). Los rendimientos de la producción y purificación fueron altamente satisfactorios, lo cual puede observarse mediante la saturación de la resina, y la consiguiente pérdida de proteína en

las etapas de lavado (figura 22A). De forma de solubilizar al dominio *betta-ladder* se exploraron distintas maneras de renaturalización. En principio se intentó renaturalizarlo directamente en la columna de Ni-NTA mediante la realización de un gradiente de urea. Sin embargo, no fue posible obtener la proteína soluble en el eluato con esta estrategia. En una segunda instancia, con la intención de promover la correcta formación de los puentes disulfuro, se exploró realizar la renaturalización en diálisis mediante la remoción gradual de la urea en presencia de un par redox (cistamina/cisteamina o glutatión oxidado/reducido). A su vez, la diálisis fue llevada a cabo en presencia de arginina para desestimular las interacciones electroestáticas que pudiesen contribuir al precipitado de la proteína. Tal como se observa en la figura 22B para ambos pares redox fue posible obtener aproximadamente la mitad de la proteína en la fracción soluble en presencia de arginina y del par redox. Desafortunadamente, como se observa en la figura 22C, en ningún caso se logró obtener el fragmento en la fracción soluble en ausencia de los aditivos de renaturalización.



**Figura 22- SDS-PAGE de purificación de ZIKV-NS1 y renaturalización. (A)** Purificación por cromatografía de afinidad. FT: *flowthrough*. Lavados con imidazol (0, 20, 40 50 mM); Eluato (500 mM de imidazol), **(B)** Renaturalización en diálisis con par redox glutatión oxidado-glutatión reducido en presencia de arginina (CSH/CSSG/Arg) y con par redox cistamina-cisteamina en presencia de arginina (CIS/CIS/Arg). (FS) Fracción soluble y (FI) Fracción Insoluble. **(C)** Renaturalización con par redox cistamina-cisteamina. Carril 1: FS renaturalizada; Carril 2: FS en PBS en presencia de arginina; carril 3; FS en PBS en ausencia de arginina. PM: Marcador de peso molecular.

#### Producción de NS1 completa

Dada la dificultad encontrada en la renaturalización del fragmento del dominio *beta-ladder* se podría suponer que el correcto plegamiento del mismo requiere de los otros dos dominios. Por lo tanto, se procedió a expresar la proteína completa (aa 1-352, peso molecular aproximadamente 45 kDa) a partir de su gen sintético con codones optimizados para su producción en células procariotas. El gen fue clonado en el vector pET28a+, y se expresó en *E. coli Shuffle.* Lamentablemente, en este caso también la proteína se produjo principalmente en

forma insoluble como cuerpos de inclusión, (figura 23). Asimismo, los posteriores intentos de renaturalización no permitieron obtener la proteína en forma soluble.



**Figura 23- SDS-PAGE de producción de ZIKV-NS1 entera en sistema procariota.** Expresión desde vector pET28a+ en *E.coli Shuffle.* Izquierda: fracción soluble (FS); Derecha: fracción insoluble(FI). La posición de la ZIKV-NS1 se indica con la flecha. PM: Marcador de peso molecular.

De acuerdo a los resultados obtenidos, y debido a la necesidad de dar inicio a la inmunización de los animales, se procedió a utilizar una forma comercial de la proteína, producida por la compañía *The Native Antigen*. Esta deriva de la cepa Surinam (la más frecuentemente encontrada en América), es producida en la línea celular derivada de riñón embrionario humano HEK 293, lo que permite la realización de las modificaciones postraduccionales presentes en la proteína nativa. De todas formas, en paralelo, se procuró explorar la producción de ZIKV-NS1, mediante la optimización del sistema de expresión en células HEK 293T del laboratorio.

#### 2.2 Expresión de NS1 en sistema eucariota

#### Optimización de condiciones de cultivo

Para este fin se utilizó la línea celular de mamífero HEK 293T, las cuales fueron transfectadas con el gen sintético de la proteína completa con codones optimizados para su expresión en células eucariotas, y sitios de restricción que permitieron el clonado en el vector pcDNA3.1. De manera de explorar distintas condiciones de expresión, se realizaron pruebas variando la relación entre la cantidad de ADN plasmídico y el agente transfectante (PEI), así como la frecuencia de cambio de medio y la concentración de suero fetal bovino (SFB). Luego, para

evaluar la expresión soluble de la proteína, se recolectó sobrenadante de cada condición y se analizó utilizando el ELISA 32/D6 para determinación de ZIKV-NS1 (desarrollado en el Capítulo 3 de esta tesis).



**Figura 24. Expresión de ZIKV-NS1 en células de mamífero. Evaluación de condiciones de cultivo. (A)** Comparación de la frecuencia de cambio y recolección de medio. Final corresponde a una única recolección a las 72 h. Diaria, corresponde al acumulado de la recolección y cambio de medio cada 24 horas por 3 días. (B) Estudio de relación ADN:PEI (1:5; 1:13; 1:20). (C) Efecto del porcentaje de SFB (0; 0,5; 2; 5 ó 10%). Niveles de producción evaluados en µg en 72 horas de producción por mL de sobrenadante. Cada condición se realizó por triplicado y la barra de error corresponde a la SD.

Como se observa en la **figura 24**, en este caso fue posible producir la proteína en forma soluble en varias de las condiciones ensayadas. Respecto a la forma de cultivo, se constató que en las 72 h posteriores a la transfección, la frecuencia de cambio de medio no fue un factor determinante, (**figura 24A**). En cambio, una relación 1:20 de ADN:PEI (**figura 24B**), y concentración de SFB del 5% (**figura 24C**), fueron las condiciones que arrojaron los mejores rendimientos de producción.

#### Producción a gran escala y purificación

A partir de los resultados anteriores se escaló la producción para poder evaluar rendimiento y pureza. En estas condiciones la NS1 fue expresada con un rendimiento de 2 mg/L, medido mediante el ELISA 32/D6 y utilizando como estándar la ZIKV-NS1 comercial.

Para su purificación, en una primera instancia, se utilizó cromatografía de afinidad con níquel inmovilizado y se realizó un SDS-PAGE de la fracción eluída para evaluar el grado de pureza y cantidad purificada (**figura 25A**). En esta se puede observar una banda cercana a los 45 kDa consistente con el peso de un monómero de ZIKV-NS1. Por comparación con la cantidad de BSA corrida en el gel como referencia, se estima que se logró purificar aproximadamente 200 µg de los 500 µg producidos. Sin embargo, tal como se observa en la figura el eluído presenta

un alto nivel de impurezas que co-eluyen con la ZIKV-NS1, principalmente se puede visualizar una gran proporción de lo que probablemente represente albúmina. De manera de disminuir estas impurezas se realizaron pruebas de producción con menor concentración de SFB, sin éxito debido a la significativa disminución en los niveles de producción. Por lo que se decidió incluir nuevas etapas en el protocolo de purificación para eliminar estos contaminantes.



**Figura 25. Purificación de ZIKV-NS1 producida en células eucariotas por cromatografía de afinidad y gel- filtración. (A)** SDS-PAGE de cromatografía de afinidad. Eluato: pico eluído con 100 mM de imidazol. BSA: 5 µg de seroalbúmina bovina **(B)** SDS-PAGE de fracciones recolectadas de gel filtración (f1, f2 y f3).**(C)** Western-Blot: Carril 1: incubación sólo con mAb anti-HA:HRP. Carril 2 revelado con HANb-D6 +mAb anti-HA:HRP; Carril 3 revelado con anti-His:HRP;. PM: marcador de peso molecular.

A estos efectos, la fracción obtenida de la cromatografía quelante fue concentrada por rotaevaporación de manera de cargarla en una columna de gel-filtración para separar la ZIKV-NS1 de las impurezas. Mediante esta purificación fue posible distinguir claramente entre tres fracciones correspondientes a distintos volúmenes de elución, fracciones 1, 2 y 3. Según la curva estándar obtenida para dicha columna con un flujo de 0,7 mL/minuto, lo esperado era que el hexámero de ZIKV-NS1 (PM= 276-300 kDa) eluyese aproximadamente a los 9 mL y que la BSA (PM 67 kDa) lo hiciese alrededor de un volumen de 11 mL. Estos volúmenes son compatibles con las fracciones 2 y 3, respectivamente. A partir de estas fracciones, se realizó un SDS-PAGE para evaluar su pureza (**figura 25B**). Como se observa, efectivamente una proteína de peso molecular cercano a los 45 kDa (presuntamente ZIKV-NS1) eluyó en la fracción 2 de la gel-filtración. Sin embargo, este no es el componente principal, sino una proteína de alto PM que apenas ingresa en el gel. Por último, como forma de corroborar que la banda observada a 45 kDa en la fracción 2 correspondiese a ZIKV-NS1 se realizó un *western* 

*blot* (**figura 25C**). En este caso, el revelado se realizó con el HANb D6 anti-ZIKV-NS1 (generado como se describe en el Capítulo III). Como se observa, la banda de peso molecular cercana a 45 kDa efectivamente corresponde a la ZIKV-NS1 ya que es reconocida por el NbD6. Como control positivo fue utilizado un anticuerpo comercial anti-His:HRP el cual reconoce el *tag* en la proteína recombinante y por lo tanto se ubica a la misma altura, lo cual confirma la identidad de la proteína producida y purificada.

#### 2.3 Consideraciones finales del capítulo

En este capítulo, inicialmente se exploró la producción de la NS1 en un sistema procariota. Sin embargo, no fue posible obtenerla de forma soluble. Posteriormente, se exploró su producción en un sistema eucariota. Utilizando la línea celular HEK 293T se logró obtener la proteína soluble en cantidades significativas, alcanzando niveles del orden de los miligramos por litro de cultivo. Sin embargo, se presentaron inconvenientes durante su purificación. Por un lado, no fue posible obtenerla con un grado de pureza aceptable para su aplicación en los distintos inmunoensayos en desarrollo (descritos en Capítulos III y IV). Por otro lado, el rendimiento logrado según la estrategia de purificación aplicada fue muy bajo, perdiéndose gran parte de la proteína durante el proceso. Una alternativa a esta estrategia sería rediseñar el casete de expresión sustituyendo el tag de 6xhis por otro de mayor selectividad que no presente interferencias con compuestos quelantes que pueda haber en el medio de cultivo. En este sentido. recientemente comenzamos а utilizar en el grupo el taq Twin-Strep-tag-Strep-TactinXT [212], que presenta alta afinidad y selectividad, y permite en un único paso alcanzar mejores niveles de pureza. Si bien esta opción no se concretó en el transcurso de esta tesis, podría representar una alternativa para lograr la producción local de este antígeno.







# Capítulo 3

Desarrollo de inmunoensayos para la detección de la proteína NS1 en el diagnóstico de la infección aguda de Zika









#### 3. Desarrollo de inmunoensayos para la detección de proteína NS1 en el diagnóstico de la infección aguda de Zika

Durante la infección aguda por Zika, la proteína NS1 está presente en sangre concomitantemente a la viremia, por lo que constituye un biomarcador de infección en curso o reciente [178, 183]. La búsqueda de esta proteína presenta ventajas frente a la del ARN, ya que podría detectarse en suero mediante técnicas menos laboriosas y costosas, como un inmunoensayo [185, 186]. Sin embargo, estos métodos basados en el reconocimiento por anticuerpos convencionales presentan algunas limitaciones. Por un lado, debido a la similitud entre las NS1 de distintos flavivirus, se ha reportado la presencia de reactividad cruzada [188, 189]. A su vez, a pesar de que la información sobre los niveles de ZIKV-NS1 en sangre es escasa, algunos reportes indican que sería del orden de ng/mL, sustancialmente inferior a la encontrada para el virus del Dengue [186, 189].

Por lo tanto, estas dificultades de inespecificidad y baja concentración, otorgan una oportunidad de demostrar el potencial de los Nbs para generar ensayos que permitan subsanar algunas de estas limitaciones. En este capítulo fue abordado el objetivo de generar Nbs capaces de reconocer selectivamente a la NS1 del Zika, y su posterior adaptación a inmunoensayos. Se realizó la validación analítica de dichos ensayos para evaluar su potencial contribución al diagnóstico de la infección aguda.

Los principales resultados correspondientes a este capítulo dieron lugar al *Artículo II* de esta tesis, adjunto en Anexo II.

#### 3.1 Desarrollo de ELISA de captura para la cuantificación de la NS1 de Zika

#### 3.1.1 Generación y selección de nanobodies contra ZIKV-NS1

#### Generación de biblioteca de fagos y selección de VHH anti-ZIKV-NS1

Una llama fue inmunizada con ZIKV-NS1 y el título de anticuerpos generado tras cada inoculación fue seguido mediante ELISA, (**figura 26**). A partir de los genes que codifican para los VHH/VH de 1x10<sup>7</sup> leucocitos mononucleares periféricos de la llama inmune, se generó una biblioteca de anticuerpos con una diversidad total de 3x10<sup>8</sup> clones. Con el fin de seleccionar una variedad de Nbs capaces de reconocer distintos epítopes del antígeno, se realizaron tres estrategias de *panning*: I) ZIKV-NS1 inmovilizada directamente en placa de ELISA, II) ZIKV-NS1-Bt inmovilizada mediante Stp, y III) ZIKV-NS1 capturada por las IgG de la llama inmune (ill-IgG). Las últimas dos estrategias fueron realizadas con el objetivo de preservar los

epítopes nativos de la proteína. Luego de tres rondas de *panning*, se diseñó una placa madre de cultivo con 72 clones, 24 provenientes de cada estrategia de selección (I, II y III). Se crecieron los cultivos y se realizó la expresión soluble de los Nbs, desde el vector fagémido pComb3X, como anticuerpos monoméricos (independientes del fago), fusionados a un *tag* HA.



**Figura 26. Titulación de anticuerpos generados contra ZIKV-NS1 durante el proceso de inmunización.** El título, calculado como la concentración que causa una disminución del 50% en la señal máxima (SC<sub>50</sub>) se muestra en el inserto y se utilizó como indicador de la progresión de la respuesta inmune de la llama.

#### Elección del nanobody de captura

#### -Tamizaje primario

A partir de la placa madre de cultivo conteniendo los sobrenadantes de 72 clones se realizó un primer tamizaje de manera de evaluar el porcentaje de los Nbs seleccionados capaces de reconocer a la NS1. Los Nbs fueron expuestos a la proteína capturada de igual forma que en el *panning*: I) ZIKV-NS1 sensibilizada directo en el pozo de ELISA, II) ZIKV-NS1-Bt capturada por Stp, III) ZIKV-NS1 capturada por ill-IgG. Mediante esta primera prueba fue posible constatar el éxito en la selección de VHHs anti-ZIKV-NS1 ya que la mayoría de los clones (alrededor de un 90%) reconocieron a la proteína, (**figura 27**). A pesar de que la gran mayoría de los clones fueron capaces de reconocer a la ZIKV-NS1 inmovilizada de diferentes formas, algunos presentaron un reconocimiento diferencial (como ser los clones 4, 30, 33 y 35). Esto permitió suponer que, debido a que entre el gran número de clones positivos existía diversidad de

reconocimiento, probablemente representasen distintas secuencias. De todas formas, por razones de simplicidad, costo y estandarización, en las siguientes etapas de tamizaje se continuó trabajando únicamente con la ZIKV-NS1 sensibilizada directamente en el pozo.



**Figura 27. Tamizaje primario de clones reactivos contra ZIKV-NS1.** El sobrenadante de 72 clones fue expuesto a una concentración fija de ZIKV-NS1 (100 ng/pozo) inmovilizada de 3 formas distintas: directa (verde), capturada por las IgG de la llama (celeste) y por Stp (rosado).

A partir de esta primera selección, y basado en la intensidad de la señal de absorbancia obtenida y en el reconocimiento diferencial de la NS1 se seleccionaron 34 clones. Estos fueron enviados a secuenciar y se obtuvieron 22 secuencias distintas, como se muestra en **figura 28** (ampliada en *Anexo I*, figura A3). El hecho de que el 65% de las secuencias fueran únicas, y la mayoría de ellas no relacionadas, sugiere que entre estos Nbs estaban representados una gran cantidad de epítopes. Curiosamente, al estudiar las secuencias de los 23 clones, se notó que siete (32%) de estos correspondieron a dominios VH, con el característico motivo GLEW en FR 2 y la sustitución de triptofano por arginina en el FR 4, encontrado en HcAbs que portan este dominio variable. Este hallazgo es un hecho inusual debido a que los dominios VH sólo se encuentran en 10% de los HcAbs aproximadamente [55]. Esto tampoco está en línea con lo hallado en otros desarrollos del grupo. Si bien la estrategia de construcción de la biblioteca

utilizada en este trabajo amplifica indistintamente los exones tanto de genes VHH como VH, es poco probable que los VHs aislados deriven de anticuerpos convencionales. Esto se debe a que la carencia de la cadena liviana dejaría expuestas regiones hidrofóbicas de los VHs en la zona de contacto con la VL promoviendo la agregación de la forma recombinante de los mismos. A su vez, la afinidad por el antígeno se vería fuertemente afectada por la pérdida de la contribución de los CDRs de la cadena liviana. A pesar de que no fue realizado durante el trabajo de esta tesis, resultaría interesante profundizar en el origen de estos VHs.

	FR1	CDR1FR2	CDR2	FR3		CDR3	FR4
22	EVOLVESGGGLVOTGGSLRLSCAAS	GTIFSTKA MGWYRQAPGKRRE	VAL IAPGGDI	<ul> <li>TYADSAEGRFTISRDSAKGTV-</li> </ul>	-WLQMNDLKAEDTAVYYC	NTVPRTQD	WGQGTQVTVSS
278	QVQLVQSGGGLVRPGGSLRLSCAAS	GNIFSTKA MGWYRQAPGKRRE	VAL IDPAGST	<ul> <li>TYADSVEGRFTISKDSAKGTV-</li> </ul>	-WLQMNDLKAEDTAVYYC	NTVPRVQD	WGQGTQVTVSS
274	EVQLVESGGGTVQTGGSLRLSCAAF	GSIFSRKA VGWYRQAPGKQRE	LAL IAPAGDT	<ul> <li>TYADSVEGRFTISRDSATNTV-</li> </ul>	-WLQMNNLEPEDTAAYYC	NTIPRVKD	WGQGTQVTVSS
337	EVOLVESGGGLVOTGGSLRLSCVTS	GVIFSRSA VGWYRQAPGERRE	FVAL IDPAGTT	-TYADAVEGRFTISRDSAKNTV-	-WLQMNDLKAEDTSVYYC	NTVPRIKD	WGQGTQVTVSS(2)
326	QVQLVQSGGGLVQAGGSLTLSCSDS	GSIFRHNS MGWYRQVPGKQRE	LVAV ITKGGET	-TYEDTVKGRFTISMNSARNSV-	-YLQMNSLKPADTAVYYC	NAKWGYNNSDY	-WGQGTQVTVSS
34	QVQLVQSGGGLVQAGGSLTLSCSAS	GSILRFNS MGWYRQAPGKQRE	LVAV ITKEGSA	-TYSDSVMGRFTITMNSARNSM-	-WMQMNSLKPADTAIYYC	NAKWGYNNSDY	WGQGTQVTVSS
39	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCGRS	GSFSSLNS MGWFRQAPGKERE	PIAS ITIGGGTT	RYADFVKGRFTISRDNGKNTV-	-YLQMNSLKPEDTAVYYC	NADAIVNNRRMQY	WGQGTQVTVSS
210	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAAS	GRFFSRYA LGWYRQAPGKQRE	LVAH ITNGDTT	<ul> <li>DYANSVKGRFTISRDNAKNTG-</li> </ul>	-YLQMNNLKPEDTAVYYC	NLGFGGTGGSNSF	WGQGTQVTVSS(2)
255	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAVS	GTFSSITA MGWYRQAPGQQRE	LVAT FTSGGRT	<ul> <li>NYVDSVKGRFTVSRDNARNTVE</li> </ul>	LYLQMNSLKPEDTAVYYC	NVEGLWNNKRERA	WGQGTQVTVSS
340	QVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS	GTFSSITS MGWYRQAPGKQRE	LVAT FSGGRTN	-YVDSVKGRFTVSRDNARSTVDL	-YLQMNSLKPEDTAVYYC	NVEGLWNNRRGRA	WGQGTQVTVSS
325	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	GSIFSRGNAMAWSRQAPGKQRE	LVAS ITSDGGA	-YYDDSVKGRFTISADNAKNMV-	-FLQMNSLKPEDTAVYYC	NTLPRRWA	WGQGTQVTVSS
212	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAAS	GNIFSSNAVGWWRRAPGROORE	WAT ITSGDST	<ul> <li>HYADSVEGRFTISGDNAKNTV-</li> </ul>	-YLQMDSLKPEDTAVYYC	TTVPRRGD	WGQGTQVTVSS
32	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVS	GIDFSRYAITWNRQSPGNQRRE	WAT LPPADTT	-VYADAVKGRFTISRDNTKNTV-	-YLQMNSLKPEDTAVYYC	ATSPRIHN	WGQGTQVTVSS
230	QVQLVQSGGGSVQAGGSLRLSCAAT	RRVYDTKV MGWYRQAPGKQRE	LVAD FLIINGRVRQ	NYAAPVNGRFTISRDSAKDTV-	-DLQMNSLKPEDTAVYYC	SMKLGYPTVSEEY	WGQGTQVTVSS
246	EVOLVESGGGRVQAGGSLRLSCAGS	ARLSSIKA MOWSROAPGKORE	WAT VTPGGST	<ul> <li>IYADSVEGRFTISRDNAKNTV-</li> </ul>	-YLQMDNLKPEDTGMYYC	NEMPRIMP	WGQGTQVTVSS(3)
344	QVKLVESGGGWVQPGGSLRLSCAAS	EFTFNTYF MYWARQAPGKGLE	VST ITPGGERT	<ul> <li>VYADSVQGRFTVSRDNAKNTL-</li> </ul>	-YLQMNSLKPEDTALYFC	ARGLAAGIANSAAYRY	RGQGTQVTVSS
273	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTAS	GFTFSDAA MVWVRQAPGKGLE	VST IRSDGS-T	<ul> <li>IYAESVKGRFTISRDNAKKTL-</li> </ul>	-YLQMNSLKPEDTAVYYC	RRPPMGPDRGDY	RGQGTQVTVSS
224	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFAHYA MTWARQAPGKGLE	VSV INSDGSDT	-AYADSVKGRFTISRDNAQSTL-	-YLQMAGLKPGDTAVYYC	SIGRPDWTRE	RGQGTQVTVSS
24	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFANYA MTWYRQAPGKGLE	VSV INSDGSDT	AYADSVKGRFTISKDNAKNTL-	-YLQMNSLKPEDTAVYFC	GIGRPNWTRE	RGQGTQVTVSS
38	QVQLQESGGGRVQPGGSLRLSCAAS	GFTFAHYP MSWVRQAPGKGIE	VSV INSDGSDT	-AYADSVKGRFTISRDNAKDTL-	-YLQMNSLKPEDTAVYYC	QIGRPSVTRE	RGQGTQVTVSS(4)
329	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSLYA MNWVRQAPGKGLE	VSV INSDGSDT	-AYADSVKGRFTIARDNAKNTL-	-YLQMNSLKPEDTAVYYC	ARGRPGSSSQP	RGRGTQVTVSS (5)
345	EVOLVESGGGLVOPGGSLRLSCAAS	GFAFGSYA MTWVRQAPGKGLE	VSV INSDGSDI	-AYADSVKGRFTASRDNAKNTL-	-YLQMNSLKPEDTAVYFC	TIGRPTPNWTRE	RGQGTQVTVSS(2)

**Figura 28.** Alineamiento de secuencias de nanobodies de captura. Se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los clones candidatos a anticuerpos de captura. En rojo se marcan los aminoácidos característicos que definen el origen VHH de los nanobodies seleccionados. A su vez, los motivos GLEW y los residuos de arginina que sustituyen al triptófano en FR4 en los VHs se marcan en celeste. Entre paréntesis se señala la frecuencia de aparición de cada clon. \*Anexo I, figura A3.

#### -Tamizaje secundario

En una segunda instancia, los Nbs de secuencia única fueron seleccionados para evaluar su capacidad de reconocer a la ZIKV-NS1 en condiciones más exigentes. Considerando que las características que se pretenden lograr en el ELISA anti-NS1, como buena sensibilidad y especificidad, están determinadas en gran medida por el Nb de captura, se diseñaron estrategias de elección secundarias que contemplasen estos aspectos. Una de las propiedades deseables es que el Nb de captura sea capaz de detectar al antígeno en matrices de alta complejidad, en este caso suero. Con el fin de evaluar dicha característica, los clones se expusieron a pozos sensibilizados con una concentración fija de ZIKV-NS1 en presencia o ausencia de una mezcla de sueros negativos para Zika (50% v/v en PBS) (**figura 29**). A pesar de que todos los clones presentaron un mejor desempeño en ausencia de suero, un número considerablemente alto exhibió un rendimiento aceptable en presencia de esta matriz (absorbancia mayor al 80% de la correspondiente en ausencia de suero).



**Figura 29. Efecto del suero sobre el desempeño de los distintos** *nanobodies*. El sobrenadante de cada Nb fue expuesto a una concentración fija de ZIKV-NS1, en presencia o ausencia de suero humano al 50%. La línea punteada corresponde a un 80% de la absorbancia obtenida en ausencia de suero. Los resultados corresponden al promedio de medidas realizadas por triplicado

Por otro lado, con el objetivo de contribuir al diagnóstico de la infección en etapas iniciales, es fundamental detectar bajas concentraciones del biomarcador. Con este propósito, se evaluó la capacidad de los distintos Nbs para detectar cantidades limitantes de ZIKV-NS1, al exponerlos a tres concentraciones de la misma (**figura 30**). En este caso, se observó una marcada diferencia entre los Nbs en su capacidad para detectar concentraciones bajas de la proteína. De los 23 Nbs evaluados, 7 de ellos fueron capaces de reconocer a la ZIKV-NS1 a una concentración de 0,5 ng/mL con una señal de absorbancia aceptable (mayor a 0,1 UA). El resto arrojaron señales bajas o nulas. La absorbancia observada es el reflejo de la afinidad de los Nbs por la ZIKV-NS1 y/o del nivel de producción de dicho clon. Por lo tanto, la elección en base a estos dos criterios representa una forma útil de filtrar a los mejores candidatos.



**Figura 30. Reactividad de** *nanobodies* **contra diferentes concentraciones de ZIKV-NS1.** Cada sobrenadante de Nb se expuso a tres concentraciones bajas de NS1 (0,50 ng/mL; 5,0 ng/mL y 100 ng/mL) La línea punteada se encuentra a una OD<sub>450nm</sub>= 0,1 UA. Los resultados corresponden al promedio de medidas realizadas por triplicado

En base a la capacidad de los Nbs de interaccionar satisfactoriamente con la proteína en presencia de suero (figura 29), y de detectar bajos niveles de la misma (figura 30), se seleccionaron nueve clones. Estos Nbs se clonaron al vector pINQ-BtH6, que permite la expresión con alto rendimiento de los Nbs solubles, así como su biotinilación enzimática dirigida sobre un péptido aceptor de biotina. La obtención de los Nbs biotinilados es necesaria para la inmovilización orientada del anticuerpo de captura en la placa de ELISA. De esta manera, los Nbs fueron producidos fusionados a una biotina, purificados por cromatografía de afinidad, y se les determinó su concentración. Los rendimientos de producción se describen en la **tabla 6**, y como es posible observar, la mayoría de los Nbs se obtuvieron con niveles de producción aceptables.

Nb	Nb Rendimiento de producción					
	(mg/L cultivo)					
22	24					
212	4,O					
246	4,0					
278	24					
32	33					
38	9,6					
326	11					
340	27					
345	26					

Tabla 6. Comparación de rendimientos de producción de los nanobodies de captura

Rendimiento de la producción y purificación de Nbs, expresado en mg por litro de cultivo bacteriano.

Posteriormente, con el objetivo de obtener una mejor aproximación de la afinidad relativa por la ZIKV-NS1 de los nueve Nbs producidos, estos fueron titulados contra una concentración fija de proteína inmovilizada. Con este propósito, la concentración del Nb que causó el 50% de la saturación de la señal (SC<sub>50</sub>) se utilizó como un estimador de la afinidad relativa de los mismos (**figura 31**). A pesar de algunas diferencias menores, los SC<sub>50</sub> para la mayoría de los Nbs fueron similares, en el rango de 1,5 a 8,2 ng/mL, por lo que este criterio no permitió descartar a ninguno de ellos.



**Figura 31. Curvas de titulación de los candidatos a** *nanobodies* **de captura.** Concentraciones decrecientes de cada Nb se expusieron a una concentración fija de NS1. Los resultados se expresaron como absorbancia relativa a la obtenida con la mayor concentración de Nb. Los valores se graficaron con ajuste sigmoidal con 4 parámetros, usando el *software GraphPad Prism 7.00.* SC<sub>50</sub>: Concentración de saturación 50 %. Los resultados corresponden al promedio de medidas realizadas por triplicado. Se incluyó un Nb contra otra proteína como control negativo.

Debido a la similitud existente entre las NS1 de distintos flavivirus (47–57% de identidad) [213], se analizó el reconocimiento de las mismas por parte de los Nbs. Con esta finalidad, se evaluó la reactividad de los Nbs al exponerlos a una concentración alta (1,0 µg/mL) de la NS1 de DV, YFV, WNV y SLV (**figura 32**). Se observó que, a excepción del Nb38, las señales de absorbancia obtenidas contra las NS1 de otros flavivirus fueron insignificantes en comparación a la ZIKV-NS1. Debido a ello, únicamente el Nb 38 fue descartado, por presentar un bajo nivel de reconocimiento de la NS1 de YFV, DV y WNV. El reconocimiento de epítopes ZIKV específicos por parte de los Nbs, y por tanto la ausencia de reactividad cruzada, presenta gran relevancia diagnóstica, principalmente, en países endémicos para más de un flavivirus.



**Figura 32. Evaluación de la reactividad cruzada con NS1 de otros flavivirus de los candidatos a** *nanobody* **de captura**. Virus Zika (ZIKV), virus del dengue (DV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del Nilo Occidental (WNV) y virus San Luís (SLV). La BSA se incluyó como proteína de control negativo. Los resultados corresponden al promedio de medidas realizadas por duplicado.

En base a los resultados obtenidos al evaluar: I) efecto del suero sobre el reconocimiento de la ZIKV-NS1, II) sensibilidad alcanzada, III) rendimientos de producción de cada Nb, y IV) reactividad cruzada, se eligieron los Nbs 22, 246, 278 y 32 potenciales Nb de captura para realizar el tamizaje de pares.

#### Elección del par de nanobodies

A partir de los candidatos a Nbs de captura elegidos, se realizó un *screening high throughput*, en el que se expuso a cada uno de ellos a los 72 clones de la placa de cultivo madre, para evaluar así la formación de 288 pares. Con este fin, los BtNbs primero se inmovilizaron individualmente mediante Stp a placas de ELISA para capturar una baja concentración de ZIKV-NS1 (20 ng/mL). Luego, cada placa fue expuesta a los 72 Nbs de la placa madre, utilizando un anticuerpo anti-HA para su detección. Para los cuatro BtNbs de captura, las combinaciones de pares fueron muy similares entre ellos (**figura 33**). Este resultado hace suponer que, a pesar de obtener una gran cantidad de secuencias diferentes para los Nbs de captura, probablemente estos reconozcan el mismo epítope (o cercano) en la proteína.



**Figura 33. Búsqueda de pares de** *nanobodies* **para la detección de ZIKV-NS1.** Se formaron pares utilizando a los BtNbs 22, 246, 278 y 32 para la captura, en combinación con sobrenadantes de 72 clones. La concentración de ZIKV-NS1 capturada fue 20 ng/mL La línea horizontal indica el valor medio de absorbancia para cada Nb de captura. La forma de inmovilización del antígeno usado para el *panning* original de los clones de detección ensayados se indica como: violeta, adsorción directa; verde, captura con Stp; celeste captura con IgG de llama inmune. Los resultados corresponden al promedio de medidas realizadas por duplicado.

En general todos los anticuerpos de captura formaron pares productivos con varios de los clones ensayados para la detección. Globalmente las señales mayores se obtuvieron con el Nb 32Bt, y en combinación con clones seleccionados originalmente contra el antígeno capturado sobre Stp o mediante IgGs, indicando que la sensibilización directa en la placa de ELISA pudo resultar en la selección de algunos Nbs contra epítopes desnaturalizados. En función de estos resultados, el Nb 32Bt fue elegido para realizar una segunda búsqueda de pares, en este caso más exigente al utilizar menores cantidades de ZIKV-NS1 (2 ng/mL) (**figura 34**).



**Figura 34. Búsqueda de pares de** *nanobodies* **para la detección de ZIKV-NS1.** Se formaron pares utilizando al Nb 32Bt para la captura en combinación con los sobrenadantes de 72 clones de detección. La concentración de ZIKV-NS1 capturada fue 2,0 ng/mL. La línea punteada corresponde a OD=0,15 UA. Los resultados corresponden al promedio de medidas realizadas por triplicado.

Los clones que presentaron una absorbancia mayor a 0,15 UA (n=16) fueron enviados a secuenciar y se obtuvieron 10 secuencias distintas, como se muestra en la **figura 35** (ampliada en *Anexo I*, figura A3).

	FR1	CDR1FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	
A1	2 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCGAS	GSFSSINS MGWFRQAPGKERE	LVAS TTLGGGGA	KYADSVKDRFTISRDLAKMTV-FLQMSSLKPEDTAVYYC	NADGIFNNRRMQY	WGQGTQVTVSS	
C7	QVKLLESGGGLVQAGGSLRLSCGAS	GSFSSINS MGWFRQAPGKERE	LVAS TTLGGGTA	NYAESVKDRFTISRDLVTMTL-FLQMNSLKPEDTAVYYC	NADAIFNNRRMRY	WGQGTQVTVSS	(2)
B8	QVQLVQSGGDLVQPGGSLRLSCAAS	GRFFSRYA LGWYRQAPGKQRE	LVAH ITNGDTT	DYANSVKGRFTISRDNAQSTG-YLQMNNLKPEDTAVYYC	NLGFGGTGGSNSF	WGQGTQVTVSS	(2)
H3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	GAIARVNT MAWYRQPSGSQRE	LVAS WTSTYSEGVT	EYADSVKGRFTISRDSAKNTYLQMKMLRPEDTAVYYC	NLEQHGQLRGVY-	WGQGTQVTVSS	
E1	0 QVKLVESGGGLVQAGGSLRLSCKGS	ASVSSNKG MQWSRQAPGKQRE	WVAT VTPGAST	IYADSVEGRFTITRDDAQNTV-DLQMDNLQPEDTGIYYC	NTMPRTMP	WGQGTQVTVSS	
F6	EVQLVESEGGWVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSLYA MNWVRQAPGKGLE	WVSV INSDGSDT	AYADSVKGRFTIARDNAKNTL-YLQMNSLKPEDTAVYYC	ARGRPGSSSQP	RGRGTQVTVSS	(3)
E1	QVQLVQSGGGRVQPGGSLRLSCAAS	GFTFAHYP MSWVRQAPGKGIE	WVSV INSDGSDT	AYADSVKGRFTISRDNAQDTL-YLQMNSLKPEDTAVYYC	QIGRPSVTRE	RGQGTQVTVSS	(2)
A7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFAHYA MTWARQAPGKGLE	WVSV INSDGSDT	AYADSVKGRFTISRDNAQSTL-YLQMAGLKPGDTAVYYC	SIGRPDWTRE	RGQGTQVTVSS	
D6	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAAS	GFAFSHYA MRWVRQAPGKGLE	WVSV INSDGEDT	WYADSVKGRFTISRDNAKNTL-YLQMNSLKPEDTGVYYC	AIGRTHDT	REQGTOVTVSS	
D9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFAFSHYA MRWLRQAPGKGLE	MVSV INSNGDDT	WYADSVKGRFTISRDNAQNTL-YLQMDMLKPEDTAVYFC	AQGRTHDT	KGQGTQVTVSS	(2)

**Figura 35.** Alineamiento de secuencias de *nanobodies* de detección. Se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los clones candidatos a anticuerpos de captura. En rojo se marcan los aminoácidos característicos que definen el origen VHH de los nanobodies seleccionados. A su vez, los motivos GLEW y los residuos de arginina que sustituyen al triptófano en FR4 en los VHs se marcan en celeste. Entre paréntesis se señala la frecuencia de aparición de cada clon. En Anexo I, A3.

Sin embargo, la mayor señal de absorbancia de estos clones podría estar dada por mayores niveles de expresión y no necesariamente representar una mayor afinidad del Nb de detección. Por lo tanto, el ADN de cada uno de ellos fue transferido al vector pINQ-H6HA, que permite la expresión con alto rendimiento del Nb soluble fusionado a un *tag* HA. Luego de su producción a gran escala y su purificación, se obtuvieron los rendimientos que se describen en la **tabla 7**.

Nb	Rendimiento de producciór (mg/L cultivo)
A7	6,0
A12	1,8
B8	9,0
C7	3,6
D6	62
D9	25
E1	3,0
E10	24
F6	23
H3	21

#### Tabla 7. Comparación de rendimientos de producción de los nanobodies de detección

Rendimiento de la producción y purificación de Nbs, expresado en mg por litro de cultivo bacteriano

Posteriormente, se verificó la reactividad de los 10 Nbs candidatos a ser utilizados para la detección, respecto a la NS1 de otros flavivirus, (**figura 36**). No se observaron inconvenientes de especificidad, excepto en el caso del Nb A7, que presentó una baja reactividad con la ZIKV-NS1 de WNV, que se consideró despreciable.



**Figura 36. Evaluación de la reactividad cruzada de los candidatos a** *nanobodies* **de detección.** Los Nbs fueron expuestos a NS1 de diferentes flavivirus: virus Zika (ZIKV), virus Dengue (DV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del Nilo Occidental (WNV). La BSA se utilizó como proteína de control negativo de reactividad.

Por último, la elección del par de Nbs se basó en la comparación de la sensibilidad lograda para cada una de las combinaciones del anticuerpo Nb 32Bt en la captura con los distintos Nbs de detección. Con este objetivo, se realizaron curvas estándar con los distintos pares, utilizando un anticuerpo anti-HA:HRP para detectar al HANb de detección (**figura 37**). Los valores de SC<sub>50</sub> fueron utilizados como indicadores de la sensibilidad del ensayo. Se observó que los pares de

Nbs presentaron una notoria diferencia en términos de sensibilidad, siendo el HANb D6 el que presentó mejores resultados (SC<sub>50</sub> = 6,8 ± 0,19 ng/mL).



**Figura 37. Curvas de calibración de los mejores pares de** *nanobodies*. Comparación de 9 Nbs de detección con BtNb 32 en la captura. Como control negativo se usó un Nb con especificidad por otra proteína. Los estándares se analizaron por triplicado. Los valores se graficaron con ajuste sigmoidal con 4 parámetros, con *software GraphPad Prism 7.00*. SC<sub>50</sub>: Concentración de saturación 50 %.

A pesar de que algunos Nbs como ser A7, D9 y F6 lograron una similar sensibilidad, teniendo en cuenta los otros parámetros ensayados (reactividad cruzada y niveles de producción) se eligió al HANb D6 para realizar la detección. Por lo que la combinación de Nbs 32Bt/D6HA fue la seleccionada para desarrollar el ELISA sándwich para la detección de la ZIKV-NS1.

### 3.1.2 Optimización del par de Nbs seleccionados en un ELISA sándwich para cuantificación de ZIKV-NS1 en suero.

Se seleccionó al BtNb 32 como anticuerpo de captura y al HANb D6 como anticuerpo de detección para confeccionar el ELISA sándwich (32/D6) para la cuantificación de ZIKV-NS1 en suero humano.

#### Determinación de los parámetros analíticos

Para caracterizar al ELISA desarrollado, se determinaron los parámetros analíticos: LOD, LOQ y rango lineal. En la **figura 38** se representan las curvas estándar obtenidas en el rango de 0,20 a

200 ng/mL (curva sigmoidea) y en el rango de 0,20 a 6,25 ng/mL (curva lineal). El LOD (calculado como 3 SD del cero), fue de 0,027 ng/mL. El LOQ (definido como 10 SD del cero) fue de 0,061 ng/mL. Asimismo, con el fin de evaluar un posible efecto matriz, se realizaron curvas estándar con dos diluciones (1/2 y 1/10) de una mezcla de sueros negativos (n=10). De acuerdo a lo esperado, dado que se utilizó matriz durante las etapas de *panning*, el desempeño en suero fue muy similar al obtenido en PBS.



**Figura 38. Curva estándar del ELISA 32/D6 en** *buffer salino y suero.* Los resultados son promedio de las mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar. Ajuste sigmoidal (**izquierda**) y lineal (**derecha**), con *software GraphPad Prism 7.00.* SC<sub>50</sub>: Concentración de saturación 50%. Suero 1/2 y 1/10 corresponde a una mezcla de sueros sin historia de infección por Zika, diluídos al medio y al décimo, respectivamente.

#### Evaluación de reactividad contra otros flavivirus

Durante las etapas de selección se estudió la reactividad de cada uno de los Nbs por las NS1 de otros flavivirus sensibilizadas directamente en la placa de ELISA. Sin embargo, con el fin de evaluar la selectividad del par de Nbs 32/D6 por la NS1 en solución fueron realizadas curvas estándar para dichas proteínas. Como se observa en **figura 39** no se constató reactividad cruzada con NS1 inespecíficas, ni siquiera a la concentración más alta evaluada (4,5 µg/mL). Por lo que concluimos que el ELISA sándwich desarrollado es selectivo por NS1 de Zika en el rango estudiado.



**Figura 39.** Análisis de reactividad cruzada del par de *nanobodies* **32/D6 con NS1 de distintos flavivirus**. Cada NS1 se probó individualmente en el rango de 0,3 a 4500 ng/mL. Los resultados son los valores promedio de mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar.

#### 3.1.3 Validación analítica del ELISA conformado por el par de Nbs 32/D6

#### Evaluación de la exactitud del método

En la actualidad, no existen métodos ni materiales de referencia para la cuantificación de ZIKV-NS1 en suero. Por lo tanto, para realizar la validación analítica del ELISA se optó por llevar a cabo una de las metodologías recomendadas por las guías para validación de ensayos [214]. Estos son los experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas. Para ello, se realizaron adiciones de cantidades conocidas de ZIKV-NS1 sobre muestras de suero individuales de donantes sanos, y se calculó la recuperación al procesarlas en el ELISA. Existe escasa información de la concentración circulante de NS1 en sangre de pacientes infectados con Zika. Sin embargo, mientras que los niveles de NS1 de DV son aproximadamente 120 ng/mL, el valor informado para Zika fue cuatro veces menor (30 ng/mL) [184, 215]. Con la finalidad de evaluar la detección de cantidades limitantes del analito, fueron adicionadas un total de 27 muestras con dos concentraciones de NS1 (1,5 y 4,5 ng/mL). Ambas concentraciones se encuentran en el rango lineal del ensayo, por lo que fue innecesaria la dilución de las muestras para su sembrado en el ELISA. Estas condiciones son las más exigentes en caso de existir efecto matriz. Como se observa en la tabla 8, se logró obtener porcentajes de recuperación en el rango óptimo (70-120%). Según las recomendaciones de guías de validación, las recuperaciones fueron excelentes en ambos

casos, demostrándose la aplicabilidad de este ensayo para la cuantificación incluso de bajas concentraciones de ZIKV-NSI [210].

	Sin adición	Adición ZIKV-NS1 1,50 ng/mL			Adición ZIKV-NS1 4,50 ng/mL			
	ZIKV-NS1	ZIKV-NS1		%	ZIKV-NS1		%	
Muestra	ng/mL	ng	g/mL	Recuperación	n	g/mL	Recuperación	
1	<loq< td=""><td>1,18</td><td>± 0,10</td><td>78</td><td>4,62</td><td>± 0,13</td><td>103</td></loq<>	1,18	± 0,10	78	4,62	± 0,13	103	
2	<loq< td=""><td>1,35</td><td>± 0,03</td><td>90</td><td>3,54</td><td>± 0,04</td><td>79</td></loq<>	1,35	± 0,03	90	3,54	± 0,04	79	
3	<loq< td=""><td>1,55</td><td>± 0,01</td><td>103</td><td>4,35</td><td>± 0,09</td><td>97</td></loq<>	1,55	± 0,01	103	4,35	± 0,09	97	
4	< LOQ	1,43	± 0,19	95	3,97	± 0,12	88	
5	< LOQ	1,36	± 0,01	90	4,20	± 0,01	93	
6	< LOQ	1,32	± 0,20	88	3,68	± 0,23	82	
7	< LOQ	1,33	± 0,16	89	4,14	± 0,05	92	
8	< LOQ	1,66	± 0,09	110	5,26	± 0,07	117	
9	< LOQ	1,57	± 0,12	105	4,96	± 0,13	110	
10	< LOQ	1,08	± 0,05	72	4,02	± 0,15	89	
11	< LOQ	1,27	± 0,10	84	3,91	± 0,01	87	
12	<loq< td=""><td>1,77</td><td>± 0,09</td><td>118</td><td>4,10</td><td>± 0,10</td><td>91</td></loq<>	1,77	± 0,09	118	4,10	± 0,10	91	
13	<loq< td=""><td>1,17</td><td>± 0,21</td><td>78</td><td>3,96</td><td>± 0,02</td><td>88</td></loq<>	1,17	± 0,21	78	3,96	± 0,02	88	
14	< LOQ	1,53	± 0,14	102	3,46	± 0,15	77	
15	<loq< td=""><td>1,29</td><td>± 0,18</td><td>86</td><td>4,58</td><td>± 0,10</td><td>102</td></loq<>	1,29	± 0,18	86	4,58	± 0,10	102	
16	< LOQ	1,30	± 0,06	87	4,20	± 0,03	93	
17	< LOQ	1,30	± 0,30	86	4,17	± 0,21	93	
18	< LOQ	1,54	± 0,11	102	4,77	± 0,04	106	
19	< LOQ	1,31	± 0,02	87	4,49	± 0,13	100	
20	< LOQ	1,82	± 0,09	121	4,22	± 0,20	94	
21	< LOQ	1,60	± 0,14	107	4,19	± 0,05	93	
22	< LOQ	1,38	± 0,25	92	4,47	± 0,19	99	
23	< LOQ	1,48	± 0,06	99	4,62	± 0,01	103	
24	< LOQ	1,14	± 0,10	76	4,19	± 0,10	93	
25	< LOQ	1,34	± 0,19	89	3,88	± 0,31	86	
26	<loq< td=""><td>1,30</td><td>± 0,01</td><td>86</td><td>3,14</td><td>± 0,04</td><td>70</td></loq<>	1,30	± 0,01	86	3,14	± 0,04	70	
27	<loo< td=""><td>1,54</td><td>± 0,27</td><td>103</td><td>3,89</td><td>± 0,11</td><td>86</td></loo<>	1,54	± 0,27	103	3,89	± 0,11	86	

Tabla 8. Estudio de recuperación sobre muestras adicionadas

Muestras 1-27: corresponden a suero de 27 de-identificados presentes en el laboratorio pertenecientes a otro proyecto. <LOQ: por debajo del límite de cuantificación. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados corresponden al valor promedio.

#### Evaluación de la precisión del método

Se evaluó la dispersión de mediciones repetidas de 3 concentraciones de ZIKV-NS1 cercanas al límite inferior del rango lineal del ensayo (0,80; 1,6 y 3,1 ng/mL), adicionadas en sueros de donantes sanos. Se determinó la variabilidad intra-ensayo analizando las muestras por quintuplicado en un mismo día. En el caso del estudio de la variabilidad inter-ensayo se realizaron las medidas por triplicado durante 5 días consecutivos. En cada caso, la variabilidad se expresó en base al RSD. Los resultados se muestran en la **tabla 9**. El ELISA presenta valores
aceptables de variabilidad intra-ensayo (RSD < 5,1%) e inter-ensayo (RSD < 16%) según las recomendaciones de guías para validación de ensayos (RSD < 20%) [210].

Adición ZIKV-NS1 (ng/mL)	0,80	1,6	3,1				
Precisión intra-día							
Réplicas	5	5	5				
Media (ng/mL)	0,77	1,5	3,2				
RSD%	5,1	2,3	2,3				
Precisión Inter-día							
Días	5	5	5				
Media (ng/mL)	0,69	1,5	3,0				
RSD%	8,1	9,8	16				

#### Tabla 9. Evaluación de la precisión del ensayo

RSD: desviación estándar relativa. Repetibilidad corresponde a la variabilidad *intra-ensayo* (n=5). Precisión intermedia corresponde a la variabilidad *inter-ensayo* en cinco días (n=15).

#### Evaluación del desempeño del ensayo en otras matrices de interés

De forma adicional a la evaluación del desempeño en suero, se exploró la posibilidad del uso del ensayo en otras matrices de interés. Debido a que se ha reportado la presencia del virus en orina y leche humana, se evaluó la cuantificación de ZIKV-NS1 mediante la realización de curvas estándar en dichas matrices. Como se observa en la **figura 40**, la sensibilidad del ensayo se ve notoriamente afectada, perdiendo sensibilidad. Al comparar el SC50 para leche y orina se observó que este fue 3 y 10 veces peor al obtenido en PBS, respectivamente. Eventualmente, mediante posteriores pasos de optimización estos valores podrían ser mejorados. Sin embargo, este resultado demuestra la importancia de incluir la matriz sobre la cual será aplicado el inmunoensayo durante las etapas de *panning* y selección del par de Nbs.



**Figura 40. Curva estándar del ELISA 32/D6 en** *buffer* **salino, leche y orina. Los resultados son promedio de las mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar. Ajuste sigmoidal (izquierda) y lineal (derecha), con** *software GraphPad Prism 7.00.* **SC<sub>50</sub>: Concentración de saturación 50%. Las muestras de leche y orina se encuentran procesadas en dilución al medio.** 

#### 3.1.4 Evaluación de la estabilidad del ensayo

#### Estabilidad acelerada de los reactivos

Primeramente, se estudió la estabilidad acelerada de los anticuerpos que componen al ELISA 32/D6. Con esta finalidad, se incubaron los Nbs 32Bt y D6HA, así como el conjugado anti-HA-peroxidasa a 37 °C. Se evaluó el desempeño en el ensayo de cada reactivo por separado en los días 7, 15, 21, 30 y 60. Se comparó el SC<sub>50</sub> obtenido, en cada caso, con el de una placa "fresca" procesada con un conjunto de reactivos mantenidos a -20 °C (día O), (**figura 41**). Como se observa, la estabilidad de ambos Nbs se mantuvo inalterada durante los días ensayados, sin notorias variaciones. Contrariamente, en el caso del anticuerpo comercial anti-HA conjugado a peroxidasa se mantuvo la estabilidad hasta el día 21, luego del cual el SC<sub>50</sub> aumentó 10 veces para el día 60. No se exploraron otras formulaciones de este conjugado, dado que se trata de un reactivo costoso, por lo que para desarrollos posteriores vinculados a la producción del ensayo en un formato *kit*, deberían explorarse otros formatos, como la conjugación directa de peroxidasa al Nb de detección.



**Figura 41. Estabilidad acelerada de reactivos ELISA 32/D6.** Se estudió la estabilidad de los tres anticuerpos utilizados en el ensayo: Nb32, NbD6 y anti-HA:HRP, durante 60 días. Los resultados son los valores promedio de mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar.

#### Estabilidad de placas de ELISA

Se evaluó la estabilidad de las placas de ELISA "listas para usar". Con este fin, se realizaron dos tipos de sensibilización: A) Stp o B) Nb32 directo. A su vez, se estudiaron tres proteínas de bloqueo (BSA, caseína y gelatina). A cada opción, se le aplicó dos formas de lavado, antes del secado: I) PBS conteniendo BSA 0,1%, sacarosa 5%, azida sódica 0,02%, o II) PBS sin aditivos. En todos los casos, luego del lavado las placas se secaron en una cámara de humedad relativa al 50%, durante 4 horas. No se observaron diferencias en las formas de lavado, por lo que por simplicidad se muestran los resultados de sensibilización y bloqueo de la placa lavada con PBS. En todos los casos se graficaron los SC<sub>50</sub> obtenidos para cada condición relativos al SC<sub>50</sub> de la placa preparada en el día (fresca), (**figura 42**).



**Figura 42. Evaluación de estabilidad de diferentes condiciones de sensibilización y bloqueo.** Se grafica SC<sub>50</sub> para cada condición relativo a SC<sub>50</sub> a una placa preparada en el día. Condiciones de sensibilización: **(A)** Stp y **(B)** Nb32 directo. Condiciones de bloqueo: BSA, caseína y gelatina. Los resultados son el promedio de mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar

En cuanto al tipo de sensibilización, se observó que las dos maneras fueron adecuadas dentro de los 180 días testeados. Sin embargo, la forma de sensibilización más conveniente es la que se realiza con el Nb 32 directo debido a que se elimina un paso del ensayo. Por otro lado, al comparar los distintos bloqueantes se observó que gelatina y BSA serían más adecuadas que caseína, debido a la menor variación que presentaron las dos primeras. A su vez, caseína y BSA presentaron un SC<sub>50</sub> relativo cercano a 1, por lo que su desempeño, incluso a los 180 días de secadas, es similar al de la placa preparada en el día.

#### 3.2 Desarrollo de ensayo inmunocromatográfico para detección in situ de ZIKV-NS1

Debido a la importancia de disponer de pruebas para facilitar el diagnóstico *in situ* de la infección por Zika en contextos de bajos recursos, se planteó adaptar el par de Nbs 32/D6 anti-ZIKV NS1 a una prueba de flujo lateral. Se generó un ensayo inmunocromatográfico de tipo sándwich, cualitativo, donde la presencia del analito en la muestra genera la aparición de una señal de color visible sobre la línea *test*.

Se muestran a continuación los resultados para los dos formatos de detección que fueron explorados.

#### 3.2.1 Formato 1: Detección mediante conjugados con carbón

En una primera instancia fue reproducido el formato del ELISA sobre la tira de nitrocelulosa, revelando la presencia de NS1 con el Nb de detección (D6) conjugado a carbón (D6-C). Para esto, se sensibilizaron tiras de nitrocelulosa con Stp, que fueron sumergidas en un pozo de

ELISA, y se dejó pasar por capilaridad una mezcla del BtNb 32 y del Nb D6-C en PBS, en presencia o ausencia de ZIKV-NS1 (**figura 43A**). Como se observa, se evidenció la aparición de señal tanto en presencia como en ausencia de ZIKV-NS1, e incluso al incubar en ausencia de BtNb 32. Por lo tanto, dicha señal es probable que represente una interacción inespecífica entre la Stp y el conjugado D6-C. A pesar de variar condiciones de: i) fuerza iónica, ii) pH, iii) adición de detergentes al *buffer* de corrida y iv) disminuir la concentración de sensibilización de Stp, no fue posible eliminar dicha señal. Por lo tanto, este formato fue descartado.

De manera de evitar una posible interacción con la proteína de sensibilización (Stp), se recubrió la línea *test* con el Nb 32 directamente. Luego, al igual que en el caso anterior se incubó con el Nb D6-C en PBS, en presencia o ausencia de ZIKV-NS1 (**figura 43B**). En este caso, la sensibilidad fue insuficiente, por lo que se realizaron ajustes sobre la concentración de los Nbs de captura y detección, así como en la composición de los *buffers* de sensibilización y corrida. Sin embargo, no fue posible aumentar la sensibilidad, por lo que este formato fue descartado.

A		В		С		D	
1 2	3	1	2	1	2	1	2

**Figura 43. Ensayo inmunocormatográfico en** *buffer* **salino. A)** Carril 1 y 2: adiciones de 0 y 1000 ng/mL de ZIKV-NS1, respectivamente. Carril 3: adición de 0 ng/mL pero en ausencia de BtNb32. **B)** Adiciones de 0 y 1000 ng/mL de ZIKV-NS1 **C)** Adición de 0 y 1000 ng/mL de ZIKV-NS1 en PBS y **D)** Adición de 0 y 1000 ng/mL de ZIKV-NS1 en *pool* de suero diluido al cuarto.

Finalmente, de manera de mejorar la sensibilidad se propuso utilizar como conjugado de revelado Stp conjugada a carbón (Stp-C), en vez del Nb D6-C. Esta elección se basó en que esta proteína presenta mayor tamaño que el Nb, y por tanto se puede unir a un mayor número de moléculas de carbón comparado con el Nb, amplificando la señal. Para ello, se sensibilizó

sobre la línea *test* al Nb 32 directamente en la membrana, y luego se incubó con una mezcla del BtNb D6 y Stp-carbón en PBS, en presencia o ausencia de ZIKV-NS1 (**figura 43C**). En este caso, la sensibilidad fue aceptable y no hubo reactividad inespecífica, por lo que en una segunda etapa se evaluó su desempeño en suero (**figura 43D**). Sin embargo, al incubar la tira con suero adicionado con ZIKV-NS1 no se formó la línea de reacción, por lo que debido a dicho efecto matriz este formato fue también descartado.

A pesar de que los conjugados con carbón son sensibles y económicos, no se obtuvieron buenos resultados en nuestro caso, por lo que no se continuó trabajando con ellos.

#### 3.2.2 Formato 2: Detección mediante conjugados a oro coloidal

En este formato de tiras se eligió como conjugado de revelado a la Stp conjugada a oro (Stp-oro). Como parte del desarrollo, se produjo dicha proteína de forma recombinante por un sistema procariota. La expresión se realizó en *E. coli* y su purificación mediante columnas de iminobiotina. A partir de la optimización de las condiciones de producción y cromatografía fue posible obtener un rendimiento de 24 mg por litro de cultivo. Este desarrollo generó valor, permitiendo disminuir considerablemente los costos del ensayo, y logrando la independización de reactivos comerciales. A efectos, de utilizar Stp para detección, esta fue conjugada covalentemente a nanopartículas carboxilo-activadas, recubiertas con oro.

En este formato se utilizaron tiras de nitrocelulosa sensibilizadas en la línea *test* con Nb 32 para la captura. La tira se sumergió en un pozo de ELISA, y se dejó pasar por capilaridad una mezcla del BtNb D6 y Stp-oro en PBS, en presencia o ausencia de ZIKV-NS1 (**figura 43**). En este caso también fue incluida una línea control, sensibilizada con BSA conjugada a biotina.





Con el fin de optimizar el ensayo y minimizar el límite de detección, se estudiaron variaciones de distintas condiciones, como la concentración de los Nbs y la cantidad de conjugado Stp-oro a ser utilizado. En cuanto a estos parámetros, se observó que la disponibilidad de Nb de captura en la línea *test* fue determinante para la sensibilidad alcanzada. Siendo la concentración óptima de sensibilización del Nb 32, 1 mg/mL, ya que a valores menores disminuyó considerablemente la sensibilidad. Debido a que los rendimientos de producción para dicho Nb son altos esto no generó ningún inconveniente. Por otro lado, debió ser realizado un ajuste muy fino de la concentración a utilizar de BtNb D6. La mayor intensidad de señal en la línea de reacción, se obtuvo al emplear una concentración de 20 µg/mL, ya que con menor cantidad la sensibilidad decreció. Sin embargo, a mayores concentraciones, el exceso de BtNb bloquea la capacidad de unión del complejo Stp-oro para unirse a la BSA-Bt de la línea control. Por su parte, 10 µL/pozo de una solución 25 µg/mL de conjugado Stp-oro fue suficiente, ya que mayor cantidad no mejoró la sensibilidad. Al obtener resultados promisorios con este formato en *buffer* salino se pasó directo a probarlo en matrices enriquecidas.

#### Evaluación del desempeño del ensayo en matrices adicionadas

Una vez ajustadas las condiciones en *buffer* salino, se procedió a evaluar su desempeño en matrices enriquecidas con ZIKV-NS1. Se realizaron adiciones sobre suero y sangre capilar. En el caso del suero se realizaron adiciones decrecientes de ZIKV-NS1 con el fin de evaluar el LOD del ensayo (**figura 45A**). Cada muestra enriquecida se incubó con una tira. Como se observa, se detectó señal hasta una concentración correspondiente a 30 ng/mL en suero puro. De todas formas, basado en las concentraciones circulantes de NS1 para otros flavivirus, el ensayo desarrollado presentaría una sensibilidad aceptable para el análisis primario de sueros.



Figura 45. A) Ensayo inmunocromatográfico en suero. Pool de sueros adicionado con: 500; 250; 120; 90; 60, 30 y 0 ng/mL de ZIKV-NS1. B) Ensayo inmunocromatográfico en sangre capilar entera. Sangre capilar, previa lisis de eritrocitos, (diluida 1/4) adicionada con: 500; 120; 60; 30 y 0 ng/mL de ZIKV-NS1.

De manera de simplificar aún más las condiciones del ensayo se exploró la posibilidad de llevarlo a cabo sin ningún tipo de equipamiento, para realizar la detección *in situ*. Con este objetivo, se realizaron adiciones de ZIKV-NS1 en sangre capilar entera (dilución 1/4). En este caso, los eritrocitos presentes en la muestra hicieron inviable la visualización de la línea *test* y control. Dada esta limitación, se repitió el ensayo lisando, previamente, dichas células con el agregado de agua. Luego de cinco minutos se agregaron el resto de los reactivos (dilución final 1/4) (**figura 45B**). Tal como se observa, en este caso la detección de ZIKV-NS1 fue posible. Sin embargo, la sensibilidad disminuyó con respecto al suero, siendo el límite de detección cercano a 60 ng/mL. Cabe destacar, que aunque no se pudo explorar en este trabajo de tesis, existen distintos materiales que se incluyen en los dispositivos de flujo lateral, los cuales por filtración actúan como separadores de eritrocitos permitiendo trabajar con sangre entera, de forma que el plasma por capilaridad constituya la fase que llegue a la línea de reacción [216].

#### 3.3 Consideraciones finales del capítulo

El objetivo de este capítulo fue generar inmunoensayos de tipo sándwich para determinar la NS1 de Zika en muestras de suero humano. Para ello, se generó una biblioteca de fagos a partir de la inmunización de una llama. Mediante el diseño de diversas estrategias de panning, fue posible seleccionar una gran diversidad de Nbs capaces de reconocer a la NS1 de Zika. A través de la aplicación de un screening high throughput fueron testeadas cientos de combinaciones de Nbs, lo que permitió obtener un par que define epítopes no solapantes de la proteína. A partir de este par, en una primera instancia, se generó un inmunoensayo de tipo ELISA que permitió la cuantificación selectiva de la NS1 de Zika en suero. El ensayo presentó un excelente desempeño analítico, detectando niveles tan bajos como 800 pg/mL. En una segunda etapa, el par se adaptó a un inmunoensayo de flujo lateral como forma de exploración inicial del potencial uso de los Nbs en este formato. Es importante resaltar que, a pesar de haber alcanzado una sensibilidad inferior a la del ELISA, fue aceptable desde el punto de vista clínico tanto en suero como en sangre capilar. De todas formas, constituye una primera aproximación y se debe considerar que aún resta optimizar diversos parámetros para mejorar el ensayo. Considerando su rapidez y mínimos requerimientos de equipamiento y operadores capacitados, el ensayo inmunocromatográfico ofrece una enorme ventaja para realizar un análisis rápido e in situ de población poco accesible.







# Capítulo 4

Desarrollo de un ELISA de bloqueo de unión para la detección de anticuerpos contra el virus del Zika







107

## 4. Desarrollo de un ELISA de bloqueo de unión para la detección de anticuerpos contra el virus del Zika

Los métodos serológicos más comúnmente utilizados para el diagnóstico de la infección por flavivirus en etapa convaleciente consisten en detectar anticuerpos por unión directa al antígeno [198]. Sin embargo, debido a la gran similitud que existe entre los antígenos de estos virus, es común encontrar reactividad cruzada principalmente en zonas endémicas para más de un flavivirus [193-195]. Para superar esta dificultad se han desarrollado ensayos de inhibición, llamados de bloqueo de unión [200]. Los mismos se basan en el uso de anticuerpos que reconocen epítopes especie/cepa específicos, donde el resultado se considera positivo si el suero es capaz de bloquear la unión de estos anticuerpos al antígeno. Para su desarrollo es necesario que los anticuerpos utilizados reconozcan no sólo epítopes únicos del virus, sino que además estos deben ser inmunogénicos durante la infección en humanos. En este capítulo se llevó a cabo el objetivo de desarrollar un inmunoensayo de bloqueo de unión, utilizando los Nbs producidos en capítulo III. La lógica para la selección de los Nbs se representa esquemáticamente en la **figura 46**.

Los resultados correspondientes a este capítulo dieron lugar al *Manuscrito I*, adjunto en el Anexo II.



Figura 46. Representación de nanobodies a seleccionar para el desarrollo de ensayo de bloqueo de unión para serología del virus de Zika. La ZIKV-NS1 y la de otros flavivirus presentan epítopes únicos (A, B, A 'y B'), y otros conservados entre especies (C). Para el desarrollo de un ensayo de bloqueo de unión, sólo los Nbs contra epítopes no compartidos serían adecuados (NbA y NbB). Además, sólo aquellos que reconocen el mismo epítope que anticuerpos humanos competidores (verde) serían "bloqueados" (NbA) y por lo tanto útiles.

#### Estudio de reactividad cruzada en ELISA directo para anticuerpos anti-NS1

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la detección de la unión directa de las Igs al antígeno inmovilizado en fase sólida puede generar falsos positivos en el diagnóstico de estas infecciones [194, 199, 200]. Esto fue verificado experimentalmente al evaluar la reactividad de sueros de pacientes con infecciones flavivirales (ZIKV, DV, YFV y SLV) de más de 10 días de evolución contra distintas NS1 (**figura 47**).



Figura 47. Reactividad de sueros de pacientes convalecientes contra NS1 de distintos flavivirus. Los sueros se analizaron para determinar la unión de anticuerpos (IgG + IgM) a los pozos recubiertos con NS1 de los flavivirus ZIKV, DV, SLV y YFV, como se indica en el ángulo superior izquierdo de cada gráfico. Los valores de OD representan el valor promedio de medidas realizadas por duplicado. Los sueros control representan sueros de pacientes sin historia de infección por flavivirus. Estudio estadístico utilizando el test de Mann-Whitney, Se indica con "\*" la diferencia estadísticamente significativa con el grupo control (\*  $\leq$  0,05%)

Como se observa en esta figura, la reactividad de los sueros muestra una clara correlación entre el agente causal de la infección y el origen de la NS1, pero la mayoría de los sueros presentaron además un importante grado de reactividad cruzada con la NS1 de otros flavivirus; la cual es significativamente mayor que la que mostraron los sueros sin infección. A pesar de que se trata de un antígeno, menos conservado que otros antígenos estructurales del virus, esto confirma la dificultad de utilizar la ZIKV-NS1 como antígeno para serología directa. Esto es especialmente relevante en zonas que co-circulan más de un virus de esta familia, donde el anticuerpo generado por una infección pasada contra otro flavivirus podría reconocer a ZIKV-NS1.

#### 4.1 Selección de nanobodies de trabajo

#### Comparación del bloqueo generado por sueros anti-Zika de referencia, de la unión de distintos nanobodies a la ZIKV-NS1

Como se mencionó, en esta etapa se trabajó con los Nbs generados en el estudio descripto en el Capítulo III. Inicialmente se analizó el grado de inhibición de la unión de estos Nbs a la ZIKV-NS1 utilizando distintas diluciones del suero de referencia anti-Zika IS 16\_352, constituido por un conjunto de seis sueros inmunes proporcionado por el *NIBSC*. La concentración utilizada de cada Nb fue previamente seleccionada para producir una lectura de absorbancia cercana a 1 UA al exponerlo directamente a la ZIKV-NS1 inmovilizada.



**Figura 48.** Porcentaje de inhibición generado por suero estándar sobre diferentes *nanobodies.* Suero estándar IS 16\_352 procesado en diluciones 1/20, 1/40 y 1/80. *Mezcla* de sueros *naïve* sin historia de infección por flavivirus, dilución 1/20, se incluyó como control negativo. Se muestra el porcentaje de inhibición de unión para cada Nb. Los resultados son el promedio de duplicados.

Como se observa en la **figura 48**, para algunos Nbs el porcentaje de inhibición de unión a ZIKV-NS1, incluso al utilizar la menor dilución del suero de referencia, fue muy bajo. Esto indicaría que dichos Nbs se unen a epítopes que no resultan inmunogénicos en la infección en humanos, por lo cual no son "bloqueados" por las Igs presentes en el suero del paciente. Este

es el caso de los Nbs 38, D6, 326 y 345, por lo cual fueron descartados. Por otro lado, el resto de los Nbs mostró un comportamiento similar en los porcentajes de inhibición obtenidos, logrando valores cercanos al 80% a la menor dilución de suero. Con el fin de determinar si este comportamiento está condicionado por la respuesta inmune particular de los individuos incluidos en este suero de referencia, se evaluó el porcentaje de inhibición de los Nbs logrado por otros dos estándares del NIBSC (IS 16\_320 y 16\_328), (figura 49). Dichos sueros incluyen distinto número de individuos provenientes de diversas regiones. En general, se observó que todos los Nbs testeados son inhibidos por los tres sueros de referencia testeados, alcanzando porcentajes de inhibición superiores al 20%, a la dilución 1/80. Dada las limitaciones en relación al volumen de sueros disponibles, no fue posible realizar determinaciones con suficientes réplicas como para aplicar test estadísticos. Con esa salvedad, parecería que el porcentaje de inhibición logrado con el IS 16\_328 fue menor a la alcanzada con los otros dos estándares. Sería interesante, en caso de acceder a sueros de varios pacientes, ampliar estos resultados y profundizar sobre las diferencias relativas que puedan existir en el grado de inhibición de cada uno de los Nbs. Esta información sería de utilidad para seleccionar aquellos Nbs que definan epítopes inmunodominantes en el curso de la infección, y que por tanto darían lugar a los ensayos más sensibles. De todas formas, con los elementos disponibles al momento de realizar este trabajo, resulta claro que los Nbs 22, 212, 246, 278, 32, 340 y H3 reconocen epítopes que son inmunogénicos en humanos, mostrando su potencial para el desarrollo de un ensayo de bloqueo de unión.



**Figura 49. Inhibición generada por tres estándares sobre** *nanobodies.* Suero estándar IS 16\_320, IS 16-328 e IS 16-352 procesados en dilución 1/80. *Mezcla* de sueros sin historia de infección por flavivirus, dilución 1/20, se incluyó como control negativo. Se muestra el porcentaje de inhibición de unión para cada Nb. Los resultados corresponden al promedio de medidas realizadas por duplicado.

#### Verificación de la especificidad de bloqueo para los Nbs individuales

En el capítulo anterior se mostró que los Nbs con los que estamos trabajando reconocen epítopes que se encuentran sólo en la NS1 de ZIKV. Sin embargo, es posible que los anticuerpos de pacientes generados contra otros flavivirus pudiesen presentar reactividad cruzada con epítopes cercanos a los definidos por los Nbs, causando su inhibición. Por esta razón se evaluó la especificidad del bloqueo de unión tras la incubación de la ZIKV-NS1 con una mezcla de sueros de pacientes de DV, YFV y SLV, disponibles en el país y donados por el MSP. Como se observa en la **figura 50** el Nb H3 presentó, aunque moderada, una inhibición por parte de los sueros contra otros flavivirus, por lo que fue descartado.



**Figura 50. Evaluación de la inhibición generada por sueros contra distintos flavivirus.** Porcentajes de inhibición generados sobre cada Nb por *pooles* de sueros inmunes para: DV, YFV, SLV, y estándar anti-Zika IS 16\_352, dilución 1/20. Se incluyeron sueros *naive*, sin historia de infección por flavivirus, dilución 1/20, como control negativo de inhibición. Las líneas punteadas corresponden a 10% y 60% de inhibición de unión. Los resultados corresponden al promedio de duplicados.

De esta manera, los Nbs 22, 212, 246, 278, 32, y 340 fueron elegidos para conformar un *pool* de Nbs (pNb) con el cual desarrollar el ensayo de bloqueo. Para generar el ELISA de bloqueo se utilizó un conjunto de Nbs, en vez de trabajar con estos de forma individual, para cubrir un número de epítopes representativos sobre la molécula de ZIKV-NS1. Esto aumenta las oportunidades de competencia entre los Nbs y los anticuerpos del suero. Si bien existen grandes diferencias en la secuencia de sus CDR3 que indicarían que definen distintos epítopes, una limitación de nuestro estudio es que no se analizó la posibilidad de epítopes solapantes,

dado que la existencia de Nbs que se inhiben entre sí conspira contra la sensibilidad del ensayo, por lo cual los mismos podrían ser excluidos del *pool*.

#### 4.2 Optimización de las condiciones experimentales del ELISA de bloqueo

Una vez elegidos los Nbs para desarrollar el ELISA de inhibición, fue necesario determinar las condiciones de trabajo, tales como, la dilución apropiada para procesar las muestras y definir un valor de corte para clasificar a las mismas como positivas o negativas.

#### Elección de dilución de muestra

Con este objetivo, se construyeron tres curvas de inhibición con los sueros de referencia en diluciones seriadas al medio desde 1/20 (**figura 51**). Como se observa, incluso una dilución 1/1280 de los estándares mostró cierto grado de inhibición en la unión del pNb a la ZIKV-NS1. No obstante, se consideró como dilución óptima de las muestras 1/40, ya que, a esta dilución se alcanzó el grado de inhibición máximo (60-70%) siendo despreciable el efecto observado con el *pool* de sueros control.



**Figura 51. Elección de la dilución de procesamiento de muestra**. Se realizaron diluciones seriadas al medio desde 1/20 a 1/2560 de los estándares IS 16\_320, 16\_328 y 16\_352. Se incluyó una mezclal de sueros *naive*, sin historia de infección por flavivirus, como control negativo. Los porcentajes de inhibición representan el promedio de medidas realizadas por triplicado. Las barras de error representan la SD.

#### Elección del método de inhibición: bloqueo o competencia

Una vez establecida la dilución de trabajo, con el fin de lograr el máximo nivel de inhibición, fueron evaluadas dos formas alternativas (bloqueo y competencia). Por un lado, siguiendo la técnica utilizada para el desarrollo inicial, se realizó el agregado secuencial del estándar anti-Zika y luego el del pool de Nbs (inhibición por bloqueo). Alternativamente, para explorar la disminución de etapas, se realizó el agregado en simultáneo del estándar y de los Nbs (inhibición por competencia). Estas condiciones fueron ensayadas para IS 16\_328 e IS 16\_352, de manera de comparar ambas modalidades en una condición de baja inhibición y alta inhibición, respectivamente. Como se observa en la figura 52, la pre-incubación del antígeno inmovilizado con el suero de referencia logró una mejora significativa en el porcentaje de inhibición en comparación con la incubación simultánea del estándar y los Nbs competidores. El resultado está dentro de lo esperado, en el caso de la incubación simultánea cobran relevancia parámetros tales como la concentración relativa, la afinidad y la cinética de unión tanto de los anticuerpos como de los Nbs. Sin embargo, en el caso de la pre-incubación con el suero, la posibilidad de desplazamiento de las IgGs por los Nbs está determinada principalmente por la koff de las IgGs que ya se encuentran unidas. En base a este resultado, se continuó con la modalidad secuencial, aunque agregue una etapa al ELISA y por tanto aumente los tiempos, con el fin de maximizar la sensibilidad del test.



**Figura 52.** Prueba de inhibición realizada de forma secuencial o simultánea. Se utilizaron dos condiciones de inhibición: (secuencial) primero se añadió el estándar y luego los Nbs; y (simultánea) suero estándar y Nbs fueron agregados al mismo tiempo. Los estándares IS 16\_352 e IS 16\_328 se analizaron en dilución final 1/40. Se aplicó la prueba ANOVA de 1 vía para el análisis de significancia. Los porcentajes de inhibición son el promedio de medidas realizadas por triplicado y las barras de error representan la SD.

#### 4.3 Caracterización del ensayo

#### Estimación del valor de corte

Finalmente, luego de establecidas las condiciones para realizar el ensayo fue necesario establecer un valor de corte (VC). A partir de este es posible clasificar las muestras como negativas o positivas, según se encuentren por debajo o por encima del mismo, respectivamente. Debido a la escasa disponibilidad en el país de muestras confirmadas con anticuerpos contra flavivirus, no fue posible establecer este VC a partir de curvas ROC (del inglés, *Receiver Operator Characteristic*). A pesar de que esta es la forma correcta de estimar dicho valor, su realización deriva del análisis de un alto número de sueros de infecciones por flavivirus confirmadas además de sueros negativos. Por lo tanto, como primera aproximación, se estudió la dispersión que presentaba un conjunto de 98 muestras negativas, y se estimó lo que sería el VC obtenido sobre esta base, como el porcentaje de inhibición promedio de las muestras negativas, más tres desviaciones estándar (**figura 53**). Al procesar este número de muestras el VC calculado fue de 32%, por lo que, sueros con un porcentaje de inhibición por Zika, respectivamente.



**Sueros negativos** 

Figura 53. Determinación del valor de corte mediante análisis de muestras negativas. Fueron procesadas 98 muestras sin historia previa de exposición a flavivirus y se calculó el valor de corte (VC) como el % de inhibición promedio más 3 SD. Las muestras fueron analizadas en una dilución 1/40.

#### Estudio de especificidad

Con el fin de evaluar la especificidad del ensayo desarrollado fueron procesadas muestras individuales de sueros inmunes contra otros flavivirus, en particular DV, YFV y SLV. En las mismas condiciones se procesaron los sueros estándar anti-Zika (IS 16\_320, 16\_328 y 16\_352) como control positivo, y 3 muestras de pacientes positivos para infección convaleciente de Zika, así como sueros de pacientes sin infección (figura 54). Como se observa, los sueros de pacientes infectados con otros flavivirus (n=24) presentaron una inhibición entre O y 20%, similar al observado para los sueros control. Por lo tanto, utilizando el VC de 32%, se clasifican como negativos. Esto se diferencia notablemente de lo observado al evaluar la reactividad de las muestras contra la proteína de forma directa (figura 46). Por otro lado, todos los sueros con anticuerpos para Zika presentaron valores superiores (40-73%) al de corte, y por lo tanto fueron clasificados como positivos. Si bien se trata de una única muestra, resulta interesante mencionar que la muestra con un valor de inhibición de 40% corresponde a una muestra de infección reciente, 10 días post infección. De confirmarse con un mayor número de muestras, esto indicaría que el test podría aplicarse a etapas tempranas de la infección. En efecto, este trabajo se llevó adelante con todas las muestras disponibles en el país aptas para serología de flavivirus (mayores de 10 días de infección), por lo que este estudio sólo puede considerarse como una primera estimación del valor diagnóstico del test.



Figura 54. Evaluación de la inhibición generada por sueros individuales convalecientes a distintas infecciones por flavivirus. Se procesaron sueros con infección para YFV, DV, SLV y Zika, y tres estándares anti-Zika (IS 16-320, IS 16-328 e IS 16-352). Se incluyeron sueros control sin historia de infección por flavivirus, como controles negativos. VC: valor de corte. Las líneas punteadas representan el 10% y el 60% de la inhibición. En rosa se representan sueros de referencia (IS 16\_320, 16\_328 y 16\_352), en azul se representan sueros de pacientes con más de 10 días de infección por Zika.Estudio estadístico utilizando el test de Mann-Whitney, Se indica con "\*" la diferencia estadísticamente significativa con el grupo control (\*  $\leq$  0,05%)

#### Estudio de reproducibilidad intra e inter-ensayo

Este método es cualitativo por lo que no es posible calcular parámetros analíticos como exactitud o límites de detección, sin embargo, es posible estudiar su precisión. En este sentido fue evaluado el desvío intra-ensayo (reproducibilidad) al procesar el suero de referencia IS 16\_352 por quintuplicado en un mismo día. A su vez, se determinó el desvío inter-ensayo (precisión intermedia), al procesar dicho suero de referencia por quintuplicado en cinco días diferentes (**tabla 10**). En ambos casos, el RSD es adecuado según los criterios de aceptación (RSD<20%) recomendados para ensayos clínicos [210].

Estándar IS 16_352	Dilución 1/40			
Precisión intra-día				
Réplicas	5,0			
Media (% inhibición)	68			
RSD%	2,7			
Precisión inter-día				
Días	5,0			
Media (% inhibición)	65			
RSD%	7,7			

#### Tabla 10. Evaluación de la precisión del ensayo

RSD: desviación estándar relativa. Repetibilidad corresponde a la variabilidad *intra-ensayo* (n=5). Precisión intermedia corresponde a la variabilidad *inter-ensayo* en cinco días (n=15).

#### 4.4 Consideraciones finales del capítulo

El objetivo de este capítulo fue generar un ELISA de bloqueo de unión para la detección de anticuerpos anti-Zika utilizando Nbs. Para ello, a partir de un panel de los Nbs producidos en el capítulo III, se generó una mezcla de aquellos que cumpliesen con dos aspectos. Por un lado, se eligieron los que fueron inhibidos por sueros de pacientes infectados por Zika, indicando que reconocerían una región inmunogénica de la NS1. Por otro, se corroboró que no fueran inhibidos por sueros de pacientes que cursaron infecciones por otros flavivius. Debido a la carencia de un alto número de muestras positivas para la infección por Zika, no se pudo construir curvas ROC para evaluar el desempeño del test. Sin embargo, como primera aproximación, mediante el análisis de un gran número de sueros negativos se estimó un valor de corte que permitió clasificar a las muestras. A partir de este valor, y mediante el análisis de sueros inmunes para distintos flavivirus, se constató que el ELISA clasificó correctamente a la totalidad de las muestras.



# Conclusiones generales y perspectivas

### **Conclusiones generales y perspectivas**

Esta tesis se enfocó en demostrar la utilidad que presentan los Nbs como herramientas para generar inmunoensayos con potencial diagnóstico. En particular, se buscó consolidar un sistema que permitiese seleccionar Nbs capaces de detectar, con alta afinidad y selectividad, biomarcadores en matrices biológicas complejas. La técnica más utilizada en el laboratorio clínico para la detección de dichas biomoléculas es el inmunoensayo. Estos se basan en el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales convencionales. Sin embargo, no existen en la actualidad inmunoensayos comerciales con fines diagnósticos que utilicen Nbs. Como se ha mencionado, estos presentan numerosas ventajas respecto a los anticuerpos convencionales. En este contexto, se propuso demostrar su potencial en el uso como herramientas diagnósticas, validando analíticamente distintos modelos de inmunoensayos en dos matrices biológicas de alta complejidad. Por un lado, se abordó el método de tamizaje para vigilancia de cáncer de colon, por ser una enfermedad de muy alta prevalencia en Uruguay. Por otro, se propuso la identificación de la infección aguda y convaleciente del Zika, debido a que era un virus emergente en el año que se planteó el proyecto.

En una etapa inicial se generó un ELISA sándwich para la cuantificación de Hgh en materia fecal. Para esto se diseñó un screening de pares que permitió evaluar cientos de combinaciones de Nbs para la detección ultrasensible de Hgh. Esto es crítico, ya que, si bien es una condición necesaria, no es suficiente que dos anticuerpos que definen epítopes no solapantes funcionen en conjunto para la detección de cantidades trazas del biomarcador. En efecto, además de la afinidad de los anticuerpos, hay factores empíricos que determinan el límite de detección que es posible alcanzar. De esta forma, se seleccionó un par de Nbs que permitió detectar pg/mL de Hgh. A pesar de que esta proteína presenta un importante grado de identidad de secuencia entre especies, el ensayo se mostró excepcionalmente selectivo para Hgh. Esto podría deberse a que la llama inmunizada sólo genere respuesta de anticuerpos contra regiones no conservadas de la proteína. De todas formas, de manera de evitar la reactividad cruzada de los Nbs, podría haberse incluido etapas de pre-adsorción de la biblioteca con Hgs de otras especies durante el panning. La selectividad del ensayo es relevante en caso de utilizarse para el tamizaje de CCR, ya que haría innecesaria la restricción dietaria previo a realizarse la prueba. Dado que no existen materiales de referencia ni método gold standard para la cuantificación de Hgh, la evaluación del desempeño en matriz se realizó mediante estudios de recuperación. En un principio se presentaron varios inconvenientes debido a la presencia de interferencias positivas y de degradación de la Hgh. Esto puede estar asociado, en parte, a la ausencia de la matriz durante el proceso de selección de los Nbs,

aspecto que no fue considerado en esta etapa. Este hecho constituyó un antecedente clave para el diseño de los posteriores desarrollos del grupo que impliquen el estudio de analitos en matrices complejas. Una vez sorteados los inconvenientes, se evaluó el desempeño analítico sobre un panel de materias fecales adicionadas con trazas de Hgh. La validación arrojó excelentes resultados de exactitud, lo cual implica dos aspectos importantes. Por un lado, al tratarse de una matriz de alta complejidad se evidenció la gran estabilidad conformacional y fisicoquímica que presentan los Nbs, y por ende sus virtudes para ser utilizados en material biológico. Por otro lado, el ELISA fue capaz de detectar con excelente exactitud y precisión cantidades de Hgh muy por debajo del valor de corte diagnóstico recomendado, mostrando la robustez y valor diagnóstico del ensayo. Esto es especialmente importante, ya que permitiría alertar sobre la existencia de una posible patología de colon en etapas iniciales. Los aspectos demográficos y raciales determinan la incidencia de CCR, por lo que la elección del valor de corte debe ser ajustado para cada población. En Uruguay, no se ha realizado este estudio, por lo que se utiliza un valor de corte basado en datos internacionales. Por lo tanto, el contar con un ELISA que permita cuantificar a la Hgh brinda la oportunidad de desarrollar estudios poblacionales para determinar el valor de corte apropiado para el país. Debido a que la relación entre la presencia de Hgh en heces y la probabilidad de desarrollar CCR se encuentra extensamente probada desde hace décadas, no fue objeto de este trabajo. Sin embargo, a pesar de que la validación analítica de este ensayo mostró un desempeño excelente, lo que resalta su potencial valor en el laboratorio clínico, es imprescindible realizar la validación diagnóstica para utilizarlo con dicho fin.

En la segunda parte de este trabajo, se tomó como modelo el diagnóstico de la infección generada por el virus del Zika, tanto en relación a pruebas antigénicas como serológicas. Un valioso biomarcador para realizar el diagnóstico en etapas tempranas es la proteína NS1. Por ello, inicialmente se exploró la producción recombinante de esta proteína en un sistema procariota. Debido a que no se obtuvo de forma soluble se estudió su producción en un sistema eucariota. De esta manera, fue posible generar la NS1 de forma soluble. Sin embargo, si bien se avanzó en su purificación, no se logró obtener con pureza suficiente, por lo que no fue utilizada en los inmunoensayos generados posteriormente. De todas formas, esta primera exploración contribuyó a sentar las bases de la utilización de sistemas eucariotas en la síntesis de proteínas recombinantes en nuestro grupo de investigación.

Posteriormente, se desarrolló un ELISA sándwich capaz de cuantificar la NS1 de Zika en suero humano. Durante las etapas de *panning*, se incluyó la matriz en base a la experiencia generada en el desarrollo del ELISA para Hgh. A su vez, en la selección de los Nbs de captura y detección fueron tenidas en cuenta las condiciones del ensayo, como concentración de NS1 a detectar y

121

reactividad cruzada. A pesar de que no se consideró incluir pasos de pre-adsorción con NS1 de otros flavivirus durante el panning, ello podría haber evitado la posible reactividad cruzada. Con estas consideraciones, se obtuvo un par de Nbs que presentó excelente desempeño, tanto en términos de sensibilidad como de selectividad. La validación analítica demostró que el método cumple con altos requerimientos de reproducibilidad y veracidad para la cuantificación de bajas concentraciones de NS1 en suero. Por otro lado, se evaluó el desempeño del ELISA desarrollado en calostro y orina, dos matrices en las que se ha reportado la presencia del virus. En ambos casos, se observó que la matriz afecta considerablemente la cuantificación de NS1. Ello demuestra la importancia de incluir la matriz en la cual se encuentra el analito en las etapas de *panning* y durante todo el proceso de selección de los Nbs. Dada la alta sensibilidad y selectividad del ELISA, este constituye una potencial herramienta para el diagnóstico temprano de la infección por Zika. Contrariamente a lo que sucede con otros flavivirus como Dengue o Fiebre amarilla, para Zika no está bien establecida la concentración de la NS1 en sangre. A su vez, tampoco existen estudios en los que se correlacione el tiempo de infección o el pronóstico con la concentración de esta proteína. En este sentido, dada la excelente sensibilidad del ELISA desarrollado, se podría utilizar para analizar la concentración de este parámetro en los distintos días de infección y correlacionarla con la evolución del paciente. Dado que en Uruguay no se dispone de muestras para realizar este estudio, en 2020 se programó una colaboración con los laboratorios del Dr. Orlando Ferreira en la Universidad Federal de Río de Janeiro y del Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro en el Instituto Fiocruz de Bahía, en Brasil. Sin embargo, debido a la pandemia por COVID-19 no fue posible realizarla, así como tampoco el envío de muestras.

En una segunda etapa, el par de Nbs seleccionado fue adaptado a un ensayo de flujo lateral. Tras la exploración de distintos formatos, se consiguió inmovilizar al Nb de captura en una membrana de nitrocelulosa y se utilizó un conjugado de Stp-oro para el revelado de la prueba. Se demostró la aplicabilidad de la misma tanto en muestras de suero como en sangre capilar. Esto evidencia la robustez que presentan los Nbs al poder ser adaptados a distintos soportes y tipos de matriz. Sin embargo, al estudiar el límite de detección para cada matriz se constató que la sensibilidad alcanzada fue dos órdenes menor que la del ELISA. Igualmente, consideramos esta etapa como una prueba de concepto, y como se ha mencionado, existe un importante espacio para mejorarlo. Futuros desarrollos en torno a este formato serían importantes, dada la rapidez y mínimos requerimientos de equipamiento y operadores calificados. Por otro lado, debido a la facilidad de producir Nbs en sistemas procariotas, posibilita la generación de un producto muy económico. Esto es especialmente interesante en países de bajos recursos en donde se desarrolla principalmente esta infección. Por lo que, este ensayo representa un primer antecedente que luego de su optimización, permitiría realizar un análisis rápido, de bajo costo e *in situ* de muestras de poblaciones poco accesibles.

En la última parte del trabajo se realizó un ELISA serológico para la detección de anticuerpos anti-Zika. La mayoría de los ensayos de serología disponibles para flavivirus, se basan en la detección de anticuerpos por unión directa a una de sus proteínas. Sin embargo, dado que estas presentan alta homología entre flavivirus, los ensayos enfrentan serios problemas de reactividad cruzada. Para superar estas limitaciones, en este trabajo se desarrolló un ELISA de bloqueo de unión. A partir del panel inicial de Nbs anti-NS1, se realizó una cuidadosa selección de aquellos que fueron inhibidos exclusivamente por sueros de pacientes infectados con Zika. Debido a la carencia de un número importante de muestras positivas para la infección por Zika no se pudo construir curvas ROC para evaluar el desempeño del test. De todas formas, como primera aproximación, mediante el análisis de un gran número de sueros negativos se estimó un valor de corte. Tomando al mismo como referencia, los sueros inmunes para distintos flavivirus fueron clasificados correctamente como positivos y negativos en todos los casos. Si bien este resultado sólo tiene carácter preliminar, resulta auspicioso para proceder a analizar un número mayor de sueros. Particularmente, vista la alta especificidad, sería relevante su estudio en regiones endémicas para más de un flavivirus, así como en individuos vacunados contra fiebre amarilla.

En resumen, en esta tesis fueron generados tres ensayos antigénicos y uno serológico, que fueron validados desde el punto de vista analítico. La experiencia ha permitido consolidar y ampliar en el laboratorio una plataforma de selección de Nbs para la detección de biomarcadores en matrices biológicas. En esta, se puede orientar la selección en función de la sensibilidad, selectividad y matriz blanco con la que se va a trabajar. Los ejemplos desarrollados evidenciaron las distintas ventajas de los Nbs, como su alta estabilidad, afinidad y selectividad. A esto se suma la posibilidad de producirlos con alta estandarización y excelentes rendimientos en sistemas económicos y sencillos. Finalmente, en las publicaciones que resultaron de este trabajo las secuencias de los Nbs se han hecho públicas. En efecto, los ensayos desarrollados pueden ser reproducidos en cualquier laboratorio con capacidad de producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, contribuyendo a construir capacidad diagnóstica local en países de menores recursos.

### Bibliografía

1. Burke, M.D., *Laboratory medicine in the 21st Century*. Am J Clin Pathol, 2000. **114**(6): p. 841-6.

2. Folin, O. and H. Wu, A SYSTEM OF BLOOD ANALYSIS: Supplement I. A SIMPLIFIED AND IMPROVED METHOD FOR DETERMINATION OF SUGAR. Journal of Biological Chemistry, 1920. **41**(3): p. 367-374.

3. Hallworth, M.J., *That '70%' claim again.* Ann Clin Biochem, 2018. **55**(4): p. 517-518.

4. Plebani, M., M. Laposata, and G. Lippi, *A manifesto for the future of laboratory medicine professionals.* Clin Chim Acta, 2019. **489**: p. 49-52.

5. Plebani, M. and G. Lippi, *Improving diagnosis and reducing diagnostic errors: the next frontier of laboratory medicine*. Clin Chem Lab Med, 2016. **54**(7): p. 1117-8.

6. Leow, C.H., et al., *Single Domain Antibodies as New Biomarker Detectors*. Diagnostics (Basel), 2017. **7**(4).

7. Tiernan, J.P., et al., *Carcinoembryonic antigen is the preferred biomarker for in vivo colorectal cancer targeting.* Br J Cancer, 2013. **108**(3): p. 662-7.

8. Watabe-Rudolph, M., et al., *Chitinase enzyme activity in CSF is a powerful biomarker of Alzheimer disease*. Neurology, 2012. **78**(8): p. 569-77.

9. Lilja, H., D. Ulmert, and A.J. Vickers, *Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring.* Nat Rev Cancer, 2008. **8**(4): p. 268-78.

10. Niedbala, R.S., et al., *Biomarker discovery: validation and decision-making in product development.* Sex Transm Dis, 2009. **36**(3 Suppl): p. S76-80.

11. Rai, A.J., et al., *Proteomic approaches to tumor marker discovery*. Arch Pathol Lab Med, 2002. **126**(12): p. 1518-26.

12. Lopez, M.M., et al., *Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria*. Int Microbiol, 2003. **6**(4): p. 233-43.

13. Tessitore, A., et al., *Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors.* Int J Proteomics, 2013. **2013**: p. 125858.

14. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.* J Clin Invest, 1960. **39**(7): p. 1157-75.

15. Conroy, P.J., et al., *Antibody production, design and use for biosensor-based applications*. Semin Cell Dev Biol, 2009. **20**(1): p. 10-26.

16. Porter, R.R., *Chemical Structure of Gamma-Globulin and Antibodies*. Br Med Bull, 1963. **19**: p. 197-201.

17. Cohen, S. and C. Milstein, *Structure and biological properties of immunoglobulins*. Adv Immunol, 1967. **7**: p. 1-89.

18. Riesen, W., [Structure and biological properties of immunoglobulins and gamma-globulin preparations. I. Structure and function of immunoglobulins]. Schweiz Med Wochenschr, 1980. **110**(3): p. 74-9.

19. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 2012, New York: Garland Science.

20. Padlan, E.A., *Anatomy of the antibody molecule*. Mol Immunol, 1994. **31**(3): p. 169-217.

21. Flajnik, M.F., N. Deschacht, and S. Muyldermans, *A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels?* PLoS Biol, 2011. **9**(8): p. e1001120.

22. Hozumi, N. and S. Tonegawa, *Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(10): p. 3628-32.

23. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity*. Nature, 1983. **302**(5909): p. 575-81.

24. Rajewsky, K., I. Forster, and A. Cumano, *Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse*. Science, 1987. **238**(4830): p. 1088-94.

25. Honjo, T., K. Kinoshita, and M. Muramatsu, *Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 165-96.

26. Chowdhury, D. and R. Sen, *Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements.* Immunol Rev, 2004. **200**: p. 182-96.

27. Murphy, K., et al., Janeway's Immunobiology. 8th edition. 8th ed. 2012, New York: Garland Science.

28. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.

29. Boss, M.A., et al., *Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in E. coli*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(9): p. 3791-806.

30. Frenzel, A., M. Hust, and T. Schirrmann, *Expression of recombinant antibodies*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 217.

31. De Meyer, T., et al., *Generation of VHH antibodies against the Arabidopsis thaliana seed storage proteins*. Plant Mol Biol, 2014. **84**(1-2): p. 83-93.

32. Siontorou, C.G., *Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 4215-27.

33. Ahmad, Z.A., et al., *scFv antibody: principles and clinical application*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 980250.

34. O'Kennedy, R. and P. Roben, *Antibody engineering: an overview*. Essays Biochem, 1991. **26**: p. 59-75.

35. De Meyer, T., S. Muyldermans, and A. Depicker, *Nanobody-based products as research and diagnostic tools*. Trends Biotechnol, 2014. **32**(5): p. 263-70.

36. Winter, G. and C. Milstein, *Man-made antibodies*. Nature, 1991. **349**(6307): p. 293-9.

37. Chothia, C., et al., *Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains.* J Mol Biol, 1985. **186**(3): p. 651-63.

38. Hudson, P.J., *Recombinant antibody fragments*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(4): p. 395-402.

39. Huston, J.S., et al., *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5879-83.

40. Skerra, A. and A. Pluckthun, *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli.* Science, 1988. **240**(4855): p. 1038-41.

41. Salvador, J.P., L. Vilaplana, and M.P. Marco, *Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications*. Anal Bioanal Chem, 2019. **411**(9): p. 1703-1713.

42. Hamers-Casterman, C., et al., *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. Nature, 1993. **363**(6428): p. 446-8.

43. Blanc, M.R., et al., *A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type gamma-globulins from camelid sera*. Biotechnol Appl Biochem, 2009. **54**(4): p. 207-12.

44. Roux, K.H., et al., *Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11804-9.

45. Nguyen, V.K., et al., *Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation.* Immunogenetics, 2002. **54**(1): p. 39-47.

46. Dooley, H. and M.F. Flajnik, *Shark immunity bites back: affinity maturation and memory response in the nurse shark, Ginglymostoma cirratum.* Eur J Immunol, 2005. **35**(3): p. 936-45.

47. Crouch, K., et al., *Humoral immune response of the small-spotted catshark, Scyliorhinus canicula*. Fish Shellfish Immunol, 2013. **34**(5): p. 1158-69.

48. Muyldermans, S., *Nanobodies: natural single-domain antibodies*. Annu Rev Biochem, 2013. **82**: p. 775-97.

49. Mitchell, L.S. and L.J. Colwell, *Comparative analysis of nanobody sequence and structure data*. Proteins, 2018. **86**(7): p. 697-706.

50. De Genst, E., et al., *Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(12): p. 4586-91.

51. Muyldermans, S., C. Cambillau, and L. Wyns, *Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains.* Trends Biochem Sci, 2001. **26**(4): p. 230-5.

52. De Genst, E., et al., *Antibody repertoire development in camelids*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 187-98.

53. Conrath, K.E., et al., *Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(2): p. 87-103.

54. Govaert, J., et al., *Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments*. J Biol Chem, 2012. **287**(3): p. 1970-9.

55. Harmsen, M.M., et al., *Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features*. Mol Immunol, 2000. **37**(10): p. 579-90.

56. Muyldermans, S., *Single domain camel antibodies: current status.* J Biotechnol, 2001. **74**(4): p. 277-302.

57. Davies, J. and L. Riechmann, '*Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains*. FEBS Lett, 1994. **339**(3): p. 285-90.

58. Sundberg, E.J. and R.A. Mariuzza, *Molecular recognition in antibody-antigen complexes*. Adv Protein Chem, 2002. **61**: p. 119-60.

59. Desmyter, A., et al., *Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme.* Nat Struct Biol, 1996. **3**(9): p. 803-11.

60. Deschacht, N., et al., *A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire.* J Immunol, 2010. **184**(10): p. 5696-704.

61. Gonzalez-Sapienza, G., M.A. Rossotti, and S. Tabares-da Rosa, *Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 977.

62. Harmsen, M.M. and H.J. De Haard, *Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments.* Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **77**(1): p. 13-22.

63. Els Conrath, K., et al., *Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs.* J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7346-50.

64. Muller, B.H., et al., *Improving Escherichia coli alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket.* Chembiochem, 2001. **2**(7-8): p. 517-23.

65. Liu, J.L., et al., *Bioconjugates of rhizavidin with single domain antibodies as bifunctional immunoreagents.* J Immunol Methods, 2014. **411**: p. 37-42.

66. Li, M., et al., Uniform orientation of biotinylated nanobody as an affinity binder for detection of Bacillus thuringiensis (Bt) Cry1Ac toxin. Toxins (Basel), 2014. **6**(12): p. 3208-22.

67. Vaneycken, I., et al., *Immuno-imaging using nanobodies*. Curr Opin Biotechnol, 2011. **22**(6): p. 877-81.

68. Chakravarty, R., S. Goel, and W. Cai, *Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging?* Theranostics, 2014. **4**(4): p. 386-98.

69. Abulrob, A., et al., *The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells*. J Neurochem, 2005. **95**(4): p. 1201-14.
70. Ingram, J.R., F.I. Schmidt, and H.L. Ploegh, *Exploiting Nanobodies' Singular Traits*. Annu Rev Immunol, 2018. **36**: p. 695-715.

Lafaye, P., et al., Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. Mol Immunol, 2009. 46(4): p. 695-704.
van der Linden, R.H., et al., Comparison of physical chemical properties of Ilama VHH antibody

*fragments and mouse monoclonal antibodies.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1431**(1): p. 37-46.

73. Dumoulin, M., et al., *Single-domain antibody fragments with high conformational stability*. Protein Sci, 2002. **11**(3): p. 500-15.

74. Tabares-da Rosa, S., et al., *Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response*. Anal Chem, 2011. **83**(18): p. 7213-20.

75. Delfin-Riela, T., et al., *A nanobody-based test for highly sensitive detection of hemoglobin in fecal samples*. Anal Bioanal Chem, 2020. **412**(2): p. 389-396.

76. Ladenson, R.C., et al., *Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment*. Anal Chem, 2006. **78**(13): p. 4501-8.

77. Thomassen, Y.E., et al., *Specific production rate of VHH antibody fragments by Saccharomyces cerevisiae is correlated with growth rate, independent of nutrient limitation.* J Biotechnol, 2005. **118**(3): p. 270-7.

78. Liu, Y. and H. Huang, *Expression of single-domain antibody in different systems*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018. **102**(2): p. 539-551.

79. Sanaei, M., et al., *Nanobodies in Human Infections: Prevention, Detection, and Treatment*. Immunol Invest, 2019: p. 1-22.

80. Helma, J., et al., *Nanobodies and recombinant binders in cell biology.* J Cell Biol, 2015. **209**(5): p. 633-44.

81. Saerens, D., et al., *Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing*. Anal Chem, 2005. **77**(23): p. 7547-55.

Harmsen, M.M. and H.P. Fijten, *Improved functional immobilization of llama single-domain antibody fragments to polystyrene surfaces using small peptides*. J Immunoassay Immunochem, 2012. **33**(3): p. 234-51.
Rossotti, M., et al., *Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to*

membrane receptors on whole cells. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(7): p. 1397-404.

84. Singh, A., et al., *Single-domain antibody based thermally stable electrochemical immunosensor.* Biosens Bioelectron, 2016. **83**: p. 162-8.

85. Campuzano, S., et al., *Disposable amperometric magnetoimmunosensors using nanobodies as biorecognition element. Determination of fibrinogen in plasma*. Biosens Bioelectron, 2014. **52**: p. 255-60.
86. Saerens, D., et al., *Antibody Fragments as Probe in Biosensor Development*. Sensors (Basel), 2008. **8**(8): p. 4669-4686.

87. Li, H., et al., *A nanobody-based electrochemiluminescent immunosensor for sensitive detection of human procalcitonin.* Analyst, 2014. **139**(15): p. 3718-21.

88. Yan, J., et al., *Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naive Nanobody phage display library.* J Nanobiotechnology, 2015. **13**: p. 33.

89. Doerflinger, S.Y., et al., *Development of a Nanobody-Based Lateral Flow Immunoassay for Detection of Human Norovirus*. mSphere, 2016. **1**(5).

90. Abbady, A.Q., et al., *Chaperonin GroEL a Brucella immunodominant antigen identified using Nanobody and MALDI-TOF-MS technologies.* Vet Immunol Immunopathol, 2012. **146**(3-4): p. 254-63.

91. Du, T., et al., *Biotinylated Single-Domain Antibody-Based Blocking ELISA for Detection of Antibodies Against Swine Influenza Virus*. Int J Nanomedicine, 2019. **14**: p. 9337-9349.

92. Rasoulinejad, S. and S.L.M. Gargari, *Aptamer-nanobody based ELASA for specific detection of Acinetobacter baumannii isolates.* J Biotechnol, 2016. **231**: p. 46-54.

93. Deckers, N., et al., *Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of Taenia solium cysticercosis.* Int J Parasitol, 2009. **39**(5): p. 625-33.

94. Pinto Torres, J.E., et al., *Development of a Nanobody-based lateral flow assay to detect active Trypanosoma congolense infections.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 9019.

95. Schumacher, D., et al., *Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications*. Angew Chem Int Ed Engl, 2018. **57**(9): p. 2314-2333.

96. Habib, I., et al., *V*(*H*)*H* (nanobody) directed against human glycophorin A: a tool for autologous red cell agglutination assays. Anal Biochem, 2013. **438**(1): p. 82-9.

97. Chanier, T. and P. Chames, *Nanobody Engineering: Toward Next Generation Immunotherapies and Immunoimaging of Cancer.* Antibodies (Basel), 2019. **8**(1).

98. Debie, P., et al., *Effect of Dye and Conjugation Chemistry on the Biodistribution Profile of Near-Infrared-Labeled Nanobodies as Tracers for Image-Guided Surgery*. Mol Pharm, 2017. 14(4): p. 1145-1153.
99. Vaneycken, I., et al., *Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer.* FASEB J, 2011. 25(7): p. 2433-46.

100. Huang, J.H., et al., Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. J Med Virol, 1999. **57**(1): p. 1-8.

101. Rosenfeld, L., et al., *Nanobodies Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen for the Imaging and Therapy of Prostate Cancer.* J Med Chem, 2020. **63**(14): p. 7601-7615.

Vosjan, M.J., et al., Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor Nanobody with 68Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011. 38(4): p. 753-63.
 Schornack, S., et al., Protein mislocalization in plant cells using a GFP-binding chromobody. Plant J, 2009. 60(4): p. 744-54.

104. Vandesquille, M., et al., *Chemically-defined camelid antibody bioconjugate for the magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease*. MAbs, 2017. **9**(6): p. 1016-1027.

105. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.* Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.

106. Becker, S., et al., *A generic system for the Escherichia coli cell-surface display of lipolytic enzymes.* FEBS Lett, 2005. **579**(5): p. 1177-82.

107. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.

108. Hanes, J. and A. Pluckthun, *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 4937-42.

109. Holliger, P. and P.J. Hudson, *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(9): p. 1126-36.

110. Monegal, A., et al., *Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library*. Protein Eng Des Sel, 2009. **22**(4): p. 273-80.

111. Goldman, E.R., et al., *Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library.* Anal Chem, 2006. **78**(24): p. 8245-55.

112. van der Linden, R., et al., *Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama.* J Immunol Methods, 2000. **240**(1-2): p. 185-95.

113. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 7978-82.

114. Chan, C.E., et al., *The role of phage display in therapeutic antibody discovery*. Int Immunol, 2014. **26**(12): p. 649-57.

115. Stengele, I., et al., *Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites.* J Mol Biol, 1990. **212**(1): p. 143-9.

116. Barbas, C.F. *Phage display : a laboratory manual*. 2001; Available from: <u>http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/43903550.html</u>.

117. Arbabi Ghahroudi, M., et al., *Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies.* FEBS Lett, 1997. **414**(3): p. 521-6.

118. Gupta, A., et al., *A novel helper phage enabling construction of genome-scale ORF-enriched phage display libraries.* PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75212.

119. Vieira, J. and J. Messing, *Production of single-stranded plasmid DNA*. Methods Enzymol, 1987. **153**: p. 3-11.

120. Jackson, T.M. and R.P. Ekins, *Theoretical limitations on immunoassay sensitivity. Current practice and potential advantages of fluorescent Eu3+ chelates as non-radioisotopic tracers.* J Immunol Methods, 1986. **87**(1): p. 13-20.

121. Rossotti, M.A., et al., *Method for Sorting and Pairwise Selection of Nanobodies for the Development of Highly Sensitive Sandwich Immunoassays.* Anal Chem, 2015. **87**(23): p. 11907-14.

122. Beckett, D., E. Kovaleva, and P.J. Schatz, *A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation.* Protein Sci, 1999. **8**(4): p. 921-9.

123. Tsao, K.L., et al., *A versatile plasmid expression vector for the production of biotinylated proteins by site-specific, enzymatic modification in Escherichia coli.* Gene, 1996. **169**(1): p. 59-64.

124. Muzykantov, V.R., et al., *The functional effects of biotinylation of anti-angiotensin-converting enzyme monoclonal antibody in terms of targeting in vivo*. Anal Biochem, 1995. **226**(2): p. 279-87.

125. Panyutich, A.V., et al., *The effect of biotinylation on the antigenic specificity of anti-defensin monoclonal antibodies*. J Immunol Methods, 1993. **158**(2): p. 237-42.

126. Even-Desrumeaux, K., D. Baty, and P. Chames, *Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation*. Mol Biosyst, 2010. **6**(11): p. 2241-8.

127. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality* worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.

128. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.* CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.

129. Bray, F., et al., *Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study.* Lancet Oncol, 2012. **13**(8): p. 790-801.

130. Barrios E, G.M., Alonso R, Musetti C, *IV Atlas de Incidencia del Cáncer en Uruguay: 2007-2011.* 2014: Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer.

131. Dr. Marta AGHAZARIAN, A.A., Caterina AUSQUI, Carlos BAUBET, Lucía DELGADO, Eduardo FENOCCHI, Mariela GARAU, Oscar GIANNEO, Álvaro LUONGO, Carolina OLANO, Asadur Jorge TCHEKMEDYIAN, Luis UBILLOS, Andrea SCHIAVONE, *Guía de práctica clínica de tamizaje del cáncer colo-rectal* 2018: Ministerio de Salud Pública.

132. Bethesda, M. *Prevención del cáncer colo-rectal*. 2016 [cited 2021; Available from: https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/pro/prevencion-colorrectal-pdq.

133. Heitman, S.J., et al., *Prevalence of adenomas and colorectal cancer in average risk individuals: a systematic review and meta-analysis.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2009. **7**(12): p. 1272-8.

134. Brenner, H., et al., *Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: the EUROCARE study.* Int J Cancer, 2012. **131**(7): p. 1649-58.

135. Nishihara, R., et al., *Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy*. N Engl J Med, 2013. **369**(12): p. 1095-105.

136. Schoen, R.E., et al., *Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy*. N Engl J Med, 2012. **366**(25): p. 2345-57.

137. Rose, I.S., et al., *Effect of ingestion of hemoproteins on fecal excretion of hemes and porphyrins.* Clin Chem, 1989. **35**(12): p. 2290-6.

138. Rockey, D.C., A. Auslander, and P.D. Greenberg, *Detection of upper gastrointestinal blood with fecal occult blood tests*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(2): p. 344-50.

139. Young, G.P., et al., *Haem in the gut. Part II. Faecal excretion of haem and haem-derived porphyrins and their detection.* J Gastroenterol Hepatol, 1990. **5**(2): p. 194-203.

140. Digby, J., et al., *Faecal haemoglobin concentration is related to severity of colorectal neoplasia*. J Clin Pathol, 2013. **66**(5): p. 415-9.

141. Hol, L., et al., *Screening for colorectal cancer: random comparison of guaiac and immunochemical faecal occult blood testing at different cut-off levels.* Br J Cancer, 2009. **100**(7): p. 1103-10.

142. van Doorn, S.C., et al., *Fecal immunochemical testing results and characteristics of colonic lesions*. Endoscopy, 2015. **47**(11): p. 1011-7.

143. Chen, C.H., C.P. Wen, and M.K. Tsai, *Fecal immunochemical test for colorectal cancer from a prospective cohort with 513,283 individuals: Providing detailed number needed to scope (NNS) before colonoscopy.* Medicine (Baltimore), 2016. **95**(36): p. e4414.

144. Kratochvil, J.F., et al., *Isolation and Characterization of Alpha-Guaiaconic Acid and Nature of Guaiacum Blue.* Phytochemistry, 1971. **10**(10): p. 2529-+.

145. Young, G.P., et al., *Advances in Fecal Occult Blood Tests: the FIT revolution.* Dig Dis Sci, 2015. **60**(3): p. 609-22.

146. Tinmouth, J., I. Lansdorp-Vogelaar, and J.E. Allison, *Faecal immunochemical tests versus guaiac faecal occult blood tests: what clinicians and colorectal cancer screening programme organisers need to know.* Gut, 2015. **64**(8): p. 1327-37.

147. Mannucci, A., et al., *Colorectal cancer screening from 45 years of age: Thesis, antithesis and synthesis.* World J Gastroenterol, 2019. **25**(21): p. 2565-2580.

Hassan, C., et al., *Meta-analysis: adherence to colorectal cancer screening and the detection rate for advanced neoplasia, according to the type of screening test.* Aliment Pharmacol Ther, 2012. **36**(10): p. 929-40.
Parra-Blanco, A., et al., *Diagnostic accuracy of immunochemical versus guaiac faecal occult blood tests for colorectal cancer screening.* J Gastroenterol, 2010. **45**(7): p. 703-12.

150. Brenner, H. and S. Tao, *Superior diagnostic performance of faecal immunochemical tests for haemoglobin in a head-to-head comparison with guaiac based faecal occult blood test among 2235 participants of screening colonoscopy*. Eur J Cancer, 2013. **49**(14): p. 3049-54.

151. van Rossum, L.G., et al., *Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population.* Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 82-90.

152. Hoffman, R.M., et al., *Colorectal cancer screening adherence is higher with fecal immunochemical tests than guaiac-based fecal occult blood tests: a randomized, controlled trial.* Prev Med, 2010. **50**(5-6): p. 297-9.

153. Gies, A., et al., *Direct Comparison of Diagnostic Performance of 9 Quantitative Fecal Immunochemical Tests for Colorectal Cancer Screening*. Gastroenterology, 2018. **154**(1): p. 93-104.

154. Hundt, S., U. Haug, and H. Brenner, *Comparative evaluation of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal adenoma detection.* Ann Intern Med, 2009. **150**(3): p. 162-9.

155. Tao, S., et al., *Comparative evaluation of nine faecal immunochemical tests for the detection of colorectal cancer.* Acta Oncol, 2013. **52**(8): p. 1667-75.

156. van Rossum, L.G., et al., *False negative fecal occult blood tests due to delayed sample return in colorectal cancer screening.* Int J Cancer, 2009. **125**(4): p. 746-50.

157. Brown, L.F. and C.G. Fraser, *Effect of delay in sampling on haemoglobin determined by faecal immunochemical tests.* Ann Clin Biochem, 2008. **45**(Pt 6): p. 604-5.

158. Doubeni, C.A., et al., *Fecal Immunochemical Test (FIT) for Colon Cancer Screening: Variable Performance with Ambient Temperature.* J Am Board Fam Med, 2016. **29**(6): p. 672-681.

159. Dancourt, V., et al., *Influence of sample return time and ambient temperature on the performance of an immunochemical faecal occult blood test with a new buffer for colorectal cancer screening*. Eur J Cancer Prev, 2016. **25**(2): p. 109-14.

160. Grobbee, E.J., et al., *Association Between Concentrations of Hemoglobin Determined by Fecal Immunochemical Tests and Long-term Development of Advanced Colorectal Neoplasia*. Gastroenterology, 2017. **153**(5): p. 1251-1259 e2.

161. Wilschut, J.A., et al., *Cost-effectiveness analysis of a quantitative immunochemical test for colorectal cancer screening.* Gastroenterology, 2011. **141**(5): p. 1648-55 e1.

162. Rubeca, T., et al., *Guidance for faecal occult blood testing: quantitative immunochemical method (FIT-HB) in colorectal cancer screening programmes.* Epidemiol Prev, 2017. **41**(5-6 (Suppl 1)): p. 1-31.

163. Allison, J.E., et al., *Population screening for colorectal cancer means getting FIT: the past, present, and future of colorectal cancer screening using the fecal immunochemical test for hemoglobin (FIT).* Gut Liver, 2014. **8**(2): p. 117-30.

164. Dick, G.W., S.F. Kitchen, and A.J. Haddow, *Zika virus. I. Isolations and serological specificity.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1952. **46**(5): p. 509-20.

165. Song, B.H., et al., *Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation.* J Neuroimmunol, 2017. **308**: p. 50-64.

166. Duffy, M.R., et al., *Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia*. N Engl J Med, 2009. **360**(24): p. 2536-43.

167. Cao-Lormeau, V.M., et al., *Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013.* Emerg Infect Dis, 2014. **20**(6): p. 1085-6.

168. Heukelbach, J., et al., *Zika virus outbreak in Brazil*. J Infect Dev Ctries, 2016. **10**(2): p. 116-20.

169. Faria, N.R., et al., *Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings.* Science, 2016. **352**(6283): p. 345-349.

170. Eppes, C., et al., *Testing for Zika virus infection in pregnancy: key concepts to deal with an emerging epidemic.* Am J Obstet Gynecol, 2017. **216**(3): p. 209-225.

171. Katz, I., B. Gilburd, and O. Shovman, *Zika autoimmunity and Guillain-Barre syndrome*. Curr Opin Rheumatol, 2019. **31**(5): p. 484-487.

172. Barbi, L., et al., *Prevalence of Guillain-Barre syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis.* Braz J Infect Dis, 2018. **22**(2): p. 137-141.

173. Brown, W.C., et al., *Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure.* Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(9): p. 865-7.

174. Landry, M.L. and K. St George, *Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection*. Arch Pathol Lab Med, 2017. **141**(1): p. 60-67.

175. Krauer, F., et al., *Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barre Syndrome: Systematic Review.* PLoS Med, 2017. **14**(1): p. e1002203.

176. Musso, D., et al., *Zika virus in French Polynesia 2013-14: anatomy of a completed outbreak*. Lancet Infect Dis, 2018. **18**(5): p. e172-e182.

177. Lessler, J., et al., *Assessing the global threat from Zika virus*. Science, 2016. **353**(6300): p. aaf8160.
178. Muller, D.A. and P.R. Young, *The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker*. Antiviral Res, 2013. **98**(2): p. 192-208.

179. Akey, D.L., et al., *Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system.* Science, 2014. **343**(6173): p. 881-5.

180. Akey, D.L., et al., *Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection.* Bioessays, 2015. **37**(5): p. 489-94.

181. Gutsche, I., et al., *Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(19): p. 8003-8.

182. Alcon, S., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections.* J Clin Microbiol, 2002. **40**(2): p. 376-81.

183. Allonso, D., et al., *Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from a 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113634.

184. De La Cruz Hernandez, S.I., et al., *Viral load in patients infected with dengue is modulated by the presence of anti-dengue IgM antibodies.* J Clin Virol, 2013. **58**(1): p. 258-61.

185. Nunes, P.C.G., et al., *NS1 Antigenemia and Viraemia Load: Potential Markers of Progression to Dengue Fatal Outcome?* Viruses, 2018. **10**(6).

186. Young, P.R., et al., *An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1053-7.

187. Russo, F.B., P. Jungmann, and P.C.B. Beltrao-Braga, *Zika infection and the development of neurological defects*. Cell Microbiol, 2017. **19**(6).

188. Andreata-Santos, R., et al., *Specificity of NS1-based immunochromatographic tests for dengue virus with regard to the Zika virus protein.* Int J Infect Dis, 2020. **95**: p. 276-278.

189. Zhang, L., et al., *Development and Characterization of Double-Antibody Sandwich ELISA for Detection of Zika Virus Infection.* Viruses, 2018. **10**(11).

190. Medialdea-Carrera, R., et al., *A systematic evaluation of IgM and IgG antibody assay accuracy in diagnosing acute Zika Virus infection in Brazil; lessons relevant to emerging infections.* J Clin Microbiol, 2021: p. JCM0289320.

191. Hoen, B., et al., *Kinetics of Anti-Zika Virus Antibodies after Acute Infection in Pregnant Women.* J Clin Microbiol, 2019. **57**(11).

192. Organization, W.H., *Laboratory testing for Zika virus infection. Interim guidance World Health Organization*. 2017.

193. Priyamvada, L., et al., *Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(28): p. 7852-7.

194. Dejnirattisai, W., et al., *Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus*. Nat Immunol, 2016. **17**(9): p. 1102-8.

195. Zaidi, M.B., et al., *Serological tests reveal significant cross-reactive human antibody responses to Zika and Dengue viruses in the Mexican population.* Acta Trop, 2020. **201**: p. 105201.

196. Chiaravalloti-Neto, F., et al., *Seroprevalence for dengue virus in a hyperendemic area and associated socioeconomic and demographic factors using a cross-sectional design and a geostatistical approach, state of Sao Paulo, Brazil.* BMC Infect Dis, 2019. **19**(1): p. 441.

197. Rockstroh, A., et al., *Dengue Virus IgM Serotyping by ELISA with Recombinant Mutant Envelope Proteins*. Emerg Infect Dis, 2019. **25**(1): p. 1111-1115.

198. Shu, P.Y., et al., *Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(6): p. 2489-94.

199. Felix, A.C., et al., *Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection.* J Med Virol, 2017. **89**(8): p. 1477-1479.

200. Balmaseda, A., et al., *Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(31): p. 8384-8389.

201. Steinhagen, K., et al., *Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016.* Euro Surveill, 2016. **21**(50).

202. Delfin-Riela, T., et al., *Highly Sensitive Detection of Zika Virus Nonstructural Protein 1 in Serum Samples by a Two-Site Nanobody ELISA*. Biomolecules, 2020. **10**(12).

203. Gallizia, A., et al., *Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 1998. **14**(2): p. 192-6.

204. Humbert, N., et al., *High-Yield Production and Purification of Recombinant T7-Tag Mature Streptavidin in Glucose-Stressed E. coli*, in *Avidin-Biotin Interactions, Methods and Applications*, R.J. McMahon, Editor. 2008, Humana Press: Totowa, NJ.

205. Ward, T.R., *High-Yield Production and Purification of Recombinant T7-Tag Mature Streptavidin in Glucose-Stressed E. coli*, in *Avidin-Biotin Interactions, Methods and Applications* H. Press, Editor. 2008.

206. van Rossum, L.G., et al., *Colorectal cancer screening comparing no screening, immunochemical and guaiac fecal occult blood tests: a cost-effectiveness analysis.* Int J Cancer, 2011. **128**(8): p. 1908-17.

207. Jain, A. and K. Cheng, *The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis.* J Control Release, 2017. **245**: p. 27-40.

208. Standardization, I.O.f., *ISO* 5725 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results 2020.

209. Standardization, I.O.f., ISO, 3534 Statistics – Vocabulary and symbols 2019.

210. Morillas, P.P., *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. 2016: EURACHEM, Eurolab España.
211. Standardization, I.O.f., *ISO, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms*. 2020.

212. Schmidt, T.G., et al., *Development of the Twin-Strep-tag(R) and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants*. Protein Expr Purif, 2013. **92**(1): p. 54-61.

213. Song, H., et al., *Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses.* Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(5): p. 456-8.

214. colaboradores, P.P.M.y., *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados.* 2016, España: Eurolab España.

215. Bosch, I., et al., *Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum*. Sci Transl Med, 2017. **9**(409).

216. Parolo, C., et al., *Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays.* Nat Protoc, 2020. **15**(12): p. 3788-3816.



## Anexo I

## **Secuencias**




			7
<b>Fig</b> i de c	F6 E1 A7 D6 D9	A12 C7 B8 H3 E10	
<b>Jira A</b> Jetec	EVQ QVQ EVQ EVQ	EVQ QVKI QVKI QVKI	
<b>4. Al</b> ción. que :	LVES LVQS LVES LVES		
<b>inea</b> En r sustit	EGGW GGGR GGGL GGGL	E GGGL GGGL GGGL	
<b>mier</b> ojo s	VQPG VQPG VQPG	R1 VQAG VQAG VQPG VQAG	
i <b>to d</b> ie ma	GSLR GSLR GSLR GSLR GSLR	 GSLR GSLR GSLR GSLR	
e sec arcan	LSCA LSCA LSCA LSCA LSCA	 LSCG LSCG LSCA LSCA	
<b>l</b> los a	AS G G G	GASGG ASGG ASGG	
<b>ias d</b> mino en FR	FTFS FTFA FTFA FAFS	CDR SESS SESS REES SVSS	
l <b>e na</b> vácido 4 en	LYA HYP HYA HYA	1 INS INS INS RYA RYA VNT VNT	
nobc os cal los V	MNWV MSWV MTWA MRWV	 MGWF MGWF LGWY MAWY	
<b>odies</b> racter Hs se	RQAP RQAP RQAP RQAP RQAP	FI RQAP( RQAP( RQAP( RQAP(	
<b>de d</b> rístico e mar	SKGLI SKGLI SKGLI SKGLI	SKERI SKERI SKORI SKORI	
e <b>tec</b> os qu can e	EMA2 EMA2 EMA2 EMA2	SLVAS SLVAS SLVAS SLVAS SLVAS	
<b>ción.</b> e def		C VII	
Se m inen este.	IDGSI IDGSI IDGSI IDGEI	DR2 GGGG GDTI GDTI STYSE	
iuestr el ori Entre	AAAAA 	A GVT	
a el a gen ∖ paré	AYAD AYAD AYAD AYAD WYAD	 KYAD NYAE DYAN EYAD IYAD	
alinea /HH (	SVKG SVKG SVKG SVKG	 SVKD SVKG SVKG	
imien de los is se s	RFTI RFTI RFTI RFTI	RFTI RFTI RFTI	
ito de s nan señal	ARDN SRDN SRDN SRDN SRDN	SRDL SRDL SRDL SRDN SRDS	
e las s loboc a la fi	AKNTI AQDTI AQSTI AKNTI	-FR3- AKMTV AKMTV AQSTC AQNTV AQNTV	
secue fies s		7-FL( 7-FL( 7-DL(	
elecc elecc	DMNSI DMNSI DMAGI DMNSI DMNSI	2MSSI 2MNSI 2MNNI 2MKMI 2MKMI	
iona de ap	LKPEI LKPEI LKPGI LKPEI	JKPEI JKPEI JRPEI	
noaci dos. / parici	DTAVS DTAVS DTAVS DTAVS	DTAV) DTAV) DTAV) DTAV) DTAV]	
ídica: A su v			
s de l /ez, lo e cad	ARGRI DIGRI SIGRI AJGRI	C IADGJ IADAJ ILGFG ILGFG ILEQF	
os clo os mo	GSSS SVTF DWTF DWTF	DR3 FNNF FNNF GTGG GTGQLF	
ones otivos n.	E E P	REMOY REMEY SNSF	
candi ; GLE	RGR RGQ RGQ KGQ		
idato: W y le	GIQV. GIQV. GIQV.	FR4- GIQV GIQV GIQV7 GIQV7	
s a an os res	TVSS TVSS TVSS TVSS	TVSS TVSS TVSS TVSS	
iticue	(2) (2)	(2)	
rpos s de			

345	329	38	24	224	273	344	246	230	32	212	325	340	255	210	39	34
EVQLVE	EVQLVE	OVOLOE	QVQLVQ	QVQLVQ	OVDINO	QVKLVE	EVQLVE	OVOLVO	EVQLVE	QVQLVQ	EVQLVE	QVKLVE	QVQLVQ	OVOLVO	EVQLVE	OVDING
SGGGLV	SGGGLV	SGGGRV	SGGGLV	SGGGLV	SGGGLV	SGGGWV	SGGGRV	SGGGSV	SGGGLV	SGGGLV	SGGGLV	SGGGLV	ISGGGLV	SGGGLV	SGGGLV	SGGGLV
OPGGSL	OPGGSL	<b>OPGGSI</b>	OPGGSI	<b>OPGGSI</b>	OPGGSL	<b>OPGGSI</b>	QAGGSI	QAGGSL	QAGGSI	QAGGSI	QAGGSL	<b>OPGGSI</b>	OPGGSI	QAGGSL	QAGGSI	QAGGSL
RLSCAAS	RLSCAAS	RLSCAAS	RLSCAAS	RLSCAAS	RLSCTAS	RLSCAAS	RLSCAGS	RLSCAAT	RLSCAVS	RLSCAAS	RLSCAAS	RLSCAVS	RLSCAVS	RLSCAAS	RLSCGRS	TLSCSAS
GFAFGS	GFTFSI	GFTFAH	GFTFAN	GETEAH	GFTFSI	EFTENI	ARLSSI	RRVYDI	GIDESE	GNIFSS	GSIFSF	GTESSI	GTESSI	GRFFSF	GSESSI	GSILRE
YA MTW	YA MNW	IYP MSW	IYA MTW	IYA MTW	AA MVW	YF MYW	KA MOW	KV MGW	YAITWN	MAVGWW	GNAMAW	TS MGW	TA MGW	YA LGW	'NS MGW	INS MGW
WRQAPG	WRQAPG	WRQAPG	IYRQAPG	IARQAPG	WRQAPG	IARQAPG	ISROAPG	YRQAPG	ROSPGN	RRAPGR	ISROAPG	YRQAPG	YRQAPC	YRQAPG	FROAPG	YRQAPG
KGLEWV	KGLEWV	KGIEWV	KGLEWV	KGLEWV	KGLEWV	KGLEWV	KOREWVI	KORELVI	ORREWVI	<b>QQREWV</b>	KORELVI	KORELVI	QQRELVI	KORELVI	KEREFI	KORELVI
ISNI AS	ISNI AS	ISNI AS	ISNI AS	ISNI AS	ST IRSI	ST ITPO	AT VTPO	AD FLID	AT LPPI	AT ITSO	AS ITSI	AT FSG	AT FISC	AH ITNO	AS ITIC	AV ITKE
)GSDI	GSDT	GSDT	OGSDT	OGSDT	)GS-T	GERT	GST	INGRVRO	DTT	DST	)GGA	BRTN	GRT	DTT	GGTT	GSA
AYAD	AYAD	AYAD	- AYAD	AYAD	- IYAE	- VYAD	- IYAD	P NYAA	VYAD	- HYAD	YYDD	YVDS	- NYVD	- DYAN	RYAD	TYSD
SVKGRF	SVKGRF	SVKGRF	SVKGRF	SVKGRF	SVKGRF	SVQGRF	SVEGRF	PVNGRF	AVKGRF	SVEGRE	SVKGRF	VKGRFT	SVKGRF	SVKGRF	FVKGRF	SVMGRF
TASRDN	<b>FIARDN</b>	<b>FISRDN</b>	<b>TISKDN</b>	<b>TISRDN</b>	<b>FISRDN</b>	<b>TVSRDN</b>	<b>TISRDN</b>	<b>TISRDS</b>	LISRDN.	<b>TISGDN</b>	<b>FISADN</b>	VSRDNAI	<b>TVSRDN</b>	<b>TISRDN</b>	<b>TISRDN</b>	TITMNS
AKNTL	AKNTL	AKDTL	AKNTL	AQSTL	AKKTL	AKNTL	AKNTV	AKDTV	<b>FKNTV</b>	AKNTV	AKNMV	RSTVDL-	ARNTVDI	AKNTG	GKNTV	ARNSM
-YLOMNS	YLOMN:	YLOWN:	-YLOWNS	YLOMAG	YLOMN:	YLOMN:	YLOMDN	-DLOMNS	-YLOWNS	YLOMD:	-FLOMNS	YLOMN:	TTOWN:	-YLOMNN	YLOMNS	-WMQMNS
LKPEDI	LKPEDI	LKPEDI	LKPEDT	LKPGDT	LKPEDI	LKPEDT	ILKPEDI	LKPEDI	LKPEDI	LKPEDT	LKPEDI	LKPEDT	LKPEDI	ILKPEDI	LKPEDT	LKPADT
AVYEC	AVYYC	AVYYC	AVYEC	AVYYC	AVYYC	ALYFC	GMYYC	AVYYC	AVYYC	AVYYC	AVYYC	AVYYC	AVYYC	AVYYC	AVYYC	AIYYC
TIGRPT	ARGRPG:	QIGRPS	GIGRPN	SIGRPD	RRPPMG	ARGLAA	NEMPRI	SMKLGY	ATSPRI	TTVPRR	NTLPRR	NVEGLWI	NVEGLW	NLGFGG	NADAIVI	NAKWGYI
PNWTRE-	SSSQP	VTRE	WTRE	WTRE	PDRGDY-	GIANSA	MP	PTVSEEY	HN	GD	WA	<b>NNRRGR</b>	NNKRER/	IGGSNSI	NNRRMOY	NNSDY
R	R(	R(	R(	R(	R(	AYRY RO	W(	Z W(	W(	W(	W(	4 W(	4 W(	2 W(	Z W(	W(
OGTOVI	RGTOVI	BOGTOVI	BOGTOVI	BOGTOVI	BOGTOVI	BOGTOVI	BOGTOVI	BOGTOVI	BOGTOVI	BOGTOVI						
VSS (2)	VSS (5)	VSS (4)	SSA	SSA	SSA	SSA	VSS (3)	SSA	SSA	SSA	SSA	SSA	VSS	VSS (2)	SSA	SSA

arginina que sustituyen al triptófano en FR4 en los VHs se marcan en celeste. Entre paréntesis se señala la frecuencia de aparición de cada clon.

captura. En rojo se marcan los aminoácidos característicos que definen el origen VHH de los nanobodies seleccionados. A su vez, los motivos GLEW y los residuos de Figura A3. Alineamiento de secuencias de nanobodies de captura. Se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los clones candidatos a anticuerpos de 22 EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAAS GTIFSTKA MGWYRQAPGKRREFVAL IAPGGDI----278 QVQLVQSGGGLVRPGGSLRLSCAAS GNIFSTKA MGWYRQAPGKRREFVAL IDPAGST----274 EVQLVESGGGTVQTGGSLRLSCAAF GSIFSRKA VGWYRQAPGKQREFLAL IAPAGDT----337 EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVTS GVIFSRSA VGWYRQAPGERREFVAL IDPAGTT-----326 QVQLVQSGGGLVQAGGSLTLSCSDS GSIFRHNS MGWYRQVPGKQRELVAV ITKGGET-----

-FR1--

CDR1

-FR2---

CDR2

-TYADAVEGRFTISRDSAKNTV--WLQMNDLKAEDTSVYYC NTVPRIKD -TYSDSVMGRFTITMNSARNSM--WMQMNSLKPADTAIYYC NAKWGYNNSDY--

-TYEDTVKGRFTISMNSARNSV--YLOMNSLKPADTAVYYC NAKWGYNNSDY TYADSVEGRFTISRDSATNTV--WLQMNNLEPEDTAAYYC NTIPRVKD-TYADSVEGRFTISKDSAKGTV--WLOMNDLKAEDTAVYYC NTVPRVOD-

WGQGTQVTVSS WGQGTQVTVSS WGQGTQVTVSS (2) WGQGTQVTVSS WGQGTQVTVSS WGQGTQVTVSS --FR4----

TYADSAEGRFTISRDSAKGTV--WLOMNDLKAEDTAVYYC NTVPRTQD

-FR3-

CDR3



# Anexo II

# Artículos y manuscrito

#### **RESEARCH PAPER**



# A nanobody-based test for highly sensitive detection of hemoglobin in fecal samples

Triana Delfin-Riela<sup>1</sup> · Martín A. Rossotti<sup>1</sup> · César Echaides<sup>2</sup> · Gualberto González-Sapienza<sup>1</sup>

Received: 23 August 2019 / Revised: 9 October 2019 / Accepted: 29 October 2019 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

#### Abstract

Colon cancer has a high prevalence worldwide and is a serious public health problem. Early diagnosis greatly improves its prognosis and, among the existing methods, the detection of fecal occult blood is the only noninvasive test recommended for screening of the disease. To promote its massive application as a screening tool for asymptomatic populations in low-resource settings, the availability of a reliable and cost-effective method is imperative. Here, we describe the development and validation of a sensitive nanobody-based immunoassay for the detection of hemoglobin in human fecal samples. The nanobodies were selected from a library generated from a llama immunized with human hemoglobin, using a high-throughput platform that enabled the identification of the best nanobody pair. The assay allowed a sub-ng/mL limit of detection to be reached in phosphate-buffered saline, and was validated with stool samples, showing excellent reproducibility (CV% < 15 inter-day precision) and accuracy at 2 and 4  $\mu$ g of hemoglobin per gram of feces, which are well below the recommended cutoff for this test (10–20  $\mu$ g/g). Moreover, no cross-reactivity was observed with a panel of dietary non-human hemoglobins removing the need for pre-test dietary restrictions. Considering that the monodomain nature of nanobodies facilitates their straightforward and low-cost production by bacterial fermentation, with their provided sequences and using synthetic genes, the assay reported here could be replicated in any laboratory to perform thousands of tests for early detection of colorectal cancer at almost no cost.

Keywords Immunoassay/ELISA · Phage display · Colorectar cancer · FOBT · Nanobody

# Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a worldwide public health problem; it ranks third in incidence and fourth in mortality with an estimated 1.4 million cases and 0.7 million deaths annually [1]. Although early detection ensures a high percentage of healing, the majority of cases are detected in advanced stages. Colonoscopy is considered the gold standard for diagnosis of CRC, but due to its invasive nature, the acceptance of the method among patients is low, and it represents a high cost

**Electronic supplementary material** The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s00216-019-02246-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

<sup>2</sup> Parque Lecocq, IM, 12600 Montevideo, Uruguay

for health providers. Alternatively, the use of simpler costeffective tests that look for occult blood in stool (FOB) have proven to be useful tools for CRC primary screening and helped to reduce mortality [2–4]. Initially, the most common method for FOB detection was the guaiac-based test, which detects the presence of the heme moiety of hemoglobin because it catalyzes the oxidation of the alpha-guaiaconic acid by hydrogen peroxide yielding a blue-colored quinone [5, 6]. However, it requires strict dietary restrictions to avoid falsepositive results caused by meat myoglobin or the peroxidase or catalase activity of vegetables, as well as false-negative results in the presence of antioxidants such as vitamin C [7]. Other FOB tests are based on the detection of hemoglobin using antibodies. These fecal immunochemical tests (FITs) detect the globin moiety of human hemoglobin that can be found as a result of colon bleeding, because, conversely to the fate of hemoglobin in the stomach or small intestine where it is actively digested/degraded by the patient proteases, the proteolysis of hemoglobin in the colon proceeds at a slow rate by bacterial degradation [6]. Owing to their higher specificity, most FITs do not require dietary restrictions and participation

Gualberto González-Sapienza ggonzal@fq.edu.uy

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Cátedra de Inmunología, DEPBIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UDELAR, Av. A. Navarro 3051, 11600 Montevideo, Uruguay

rates are higher for the immunochemical methods than for the guaiac FOB tests [8, 9]. Different studies that have compared FIT and guaiac FOB tests have found a superior performance of FITs for the detection of colorectal cancer and advanced neoplasia [10-12].

The performance of FITs is directly related to the affinity and specificity of the antibody pair used to quantitate hemoglobin in the sandwich assay. It is a challenging test because it needs to detect trace amounts of globin in a highly complex matrix where numerous interfering substances are present. Although many qualitative and quantitative FITs have been reported and various are in the market, there are still issues related to their sensitivity, thresholds, and cost [13], and they cannot be replicated in other laboratories if the access to the test antibodies is not granted. The availability of an assay that corrects these aspects could encourage its massive use, even in settings of low resources, improving early diagnosis of CRC. To fulfil this aim, we investigated the use of single-domain antibodies (nanobodies) as affinity reagents for the development of a FIT. Nanobodies (Nbs) are recombinant antibody fragments (15 kDa) derived from the variable domain (VHH) of a special type of antibodies found in camelids that are devoid of light chain [14]. They have remarkable physicochemical properties including low tendency to aggregate, high thermal stability, and tolerance to non-aqueous solvents, which make them robust immunoassay reagents [15–17]. Despite having only three complementarity determining region (CDRs) to conform the antigen binding site, their affinity rivals those of conventional antibodies. These remarkable features along with their soluble expression with high yields in prokaryotic systems make nanobodies to stand out as advantageous low-cost affinity reagents for immunoassay development [18]. In addition, their monodomain nature facilitates the construction of phage display libraries with a comprehensive representation of the elicited immune response, which offers the possibility of isolating nanobodies with the desired properties even when they are a minority population [18]. In that line, we have recently report a method for in vivo biotinylation of nanobodies coupled to a high-throughput screening that allows confronting in parallel hundreds of nanobodies to select the best pairs for the development of highly sensitive twosite immunoassays [19, 20]. Applying this strategy, we selected a nanobody pair with high sensitivity and specificity for human hemoglobin in stools, providing a low-cost and highly standardizable test as an early CRC screening tool.

# Materials and methods

**Reagents** Tween 20, polyethylene glycol 8000 (PEG), bovine serum albumin (BSA), histopaque-1077, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside), anti-coagulant citrate dextrose solution

(ACD), D-biotin, trypsin from bovine pancreas, and other common chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Helper phage M13KO7 was purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA). Anti-HA tag antibody conjugated to peroxidase (high affinity 3F10) was purchased from Roche (Madison, WI). The primers used for library construction were obtained from Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA). *E. coli* ER2738 electrocompetent cells were purchased from Lucigen Corporation (Middleton, WI). HisPur Ni-NTA Spin Plates, NHS (N-Hydroxysuccinimide)biotin, streptavidin peroxidase, and avidin were purchased from Pierce (Rockford, IL). Chromatography columns were purchased from GE Healthcare (Piscataway, NJ). Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail purchased from Roche (Madison, WI).

Purification of human hemoglobin Human hemoglobin (hHg) was purified from 20 mL of human blood drawn from healthy donors with citrate dextrose anti-coagulant solution (ACD, sodium citrate, anhydrous 7.3 g; sodium citrate, dihydrate 22.0 g; dextrose, monohydrate 0.245 g; water up to 1 L). Red blood cells were immediately pelleted by centrifugation at 2000 $\times$ g for 15 min, washed three times with isotonic saline (0.9% w/v) solution, and then selectively lysed with cold milliQ water for 30 min and finally centrifuged at  $14.000 \times g$ for 15 min at 4 °C. The supernatant was dialyzed against 50 mM Tris and 0.1 mM EDTA pH 8.3 (buffer A) and then was subjected to ion exchange chromatography onto a HiTrap DEAE FF 5 mL column using an ÄKTA purifier system (GE Healthcare). After washing with 5 column volumes of buffer A, hemoglobin was eluted using a linear gradient from 0-100% of buffer B (Tris 50 mM, 0.1 mM EDTA, pH 7.0) in 10 column volumes. The peak fractions were dialyzed against distilled water, lyophilized, quantified by gravimetry, and resuspended in PBS at 1 mg/mL (working solution) and stored at - 20 °C until used. Purity was evaluated by SDS-PAGE 15%, see Electronic Supplementary Material (ESM) Fig. S1. The same procedure was followed for the purification of nonhuman hemoglobins.

An aliquot of hHg was gently labeled with Biotin-NHS in order to couple about 1 biotin molecule per hemoglobin monomer, as determined by MALDI-TOF analysis, see ESM Fig. S2, and then the biotinylated hHg (1xbiotinylatedy hHg) was dialyzed against PBS.

**Library construction** A 2-year-old llama (*Lama glama*) from Montevideo municipal zoo was immunized with 3 doses of 500  $\mu$ g of purified human hemoglobin in incomplete Freund adjuvant by sub-cutaneous injection. Two weeks after the second booster, the antibody titer was high, see ESM Fig. S3, and 200 mL of blood was drawn. The peripheral blood mononuclear cell were isolated by Histopaque-1077 gradients according to manufacturer's instructions, the total RNA from 10<sup>8</sup> cells was extracted with TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad), quantified spectrophotometrically and 10 µg were reverse transcribed using oligo dT. Then the genes of the heavy chain variable domains of the conventional (VH) and heavy chain only antibody (VHH) isotypes were amplified by PCR using the forward primers VH1, VH3, VH4, and the reverse primer JH as previously described [17]. Two micrograms of SfiI-digested and gelpurified VH/VHH gene products was ligated with 5 µg of phagemid vector pComb3X (from Dr. Barbas, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) overnight at 16 °C. Next day, the ligation was ethanol precipitated, resuspended in 10 µL of water and electroporated into competent E. coli ER2738 cells. The cells were resuspended in Recovery Medium (Lucigen Corp, Middleton, WI) and allowed to recover for 1 h at 37 °C with agitation. Then, the cells were inoculated to 10 mL of LB containing 100 µg/mL of ampicillin, and incubated for 2 h in the same conditions before being superinfected with M13KO7 helper phage [17, 20, 21]. After 30 min without agitation, kanamycin was added (50 µg/mL) and the cells were cultured overnight. The supernatant was harvested by centrifugation and phages were precipitated twice with 0.2 volumes of 20% polyethylene glycol 8000 in 2.5 M NaCl, and resuspended in phosphate buffer saline (PBS) containing BSA (3%) and cOmplete<sup>™</sup>, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail. The phage VH/VHH library was filtered by 0.22  $\mu$ m and stored at – 80 °C.

Panning strategies for the selection of hHg-specific nanobodies Method A: Hundred microliters/well of human hemoglobin in PBS (5 µg/mL) was dispensed and incubated overnight at 4 °C on high-binding 8-well strips (Greiner Bio-One, Monroe, NC). The wells were blocked for 1 h at room temperature (RT) with PBS-1% BSA, washed with PBS-0.1% Tween 20 (PBST), and then incubated in three wells (100  $\mu$ L/ well) with  $1 \times 10^{12}$  colony-forming units (cfu) of the VH/ VHH library for 2 h with gentle agitation at 4 °C. Method B: High-binding well strips were coated overnight at 4 °C with 100 µL of avidin (1 µg/mL), blocked for 1 h at RT with PBS-1% BSA, and washed with PBST. The wells were then loaded with 100 µL of 1x-biotinylated hHg (10 µg/mL) for 1 h, washed with PBST, and incubated with  $1 \times 10^{12}$  cfu of the VH/VHH library for 2 h with gentle agitation at RT. In both cases, the wells were washed 10 times with PBST and the bound phages were eluted by incubation for 30 min. at 37 °C with 100 µL/well of 10 mg/mL trypsin. Finally, the phages were collected and used for titration and subsequent amplification in ER2738 E.coli for an additional round of selection. Two rounds were done in total.

**Expression of** *in vivo* **biotinylated nanobodies in 96-well culture blocks** ER2738 cells were infected with the output phage obtained from the different panning strategies and cultured overnight in LB ampicillin. Ten micrograms of the extracted plasmid DNA (GeneJet Miniprep Kit, Thermo Fisher) was digested with SfiI for 4 h. The  $\approx$ 400 bp band corresponding to the VH/VHH genes was gel-purified and cloned into the pINQ-BtH<sub>6</sub> vector [20], see ESM Fig. S5. The ligated vector was electroporated into competent E. coli BL21(DE3) cells carrying the pCY216 vector for overexpression of the biotin ligase of E. coli [22], and parallel cultures of individual colonies were then produced as described before [20]. Briefly, 96 colonies from each panning strategy (A and B) were inoculated to 500 µL of LB medium containing 50 µg/mL kanamycin, 35 µg/mL chloramphenicol, 0.04% of L-arabinose, and 100 µM D-biotin in 96-deep-well culture blocks (Greiner Bio-One, Monroe, NC). After 3 h (OD600  $\approx$  0.6 AU), the expression of the *in vivo* biotinylated Nbs was induced with 3 µM IPTG for 4 h at 37 °C with shaking. The bacterial pellets were harvested by centrifugation, resuspended in PBS, and lysated by three freeze-thaw cycles [20]. The antibodies were purified using HisPur Ni-NTA Spin Plates and the bound nanobodies were eluted with 250 mM imidazole in PBS to generate "Master Plates A and B," see ESM Fig. S5, which was used as a source of biotinylated Nb candidates for the initial selection of the capturing antibodies, and later for pairwise identification.

Selection of capturing nanobodies The binding capacity of avidin-coated plates were saturated with 100  $\mu$ L/well of biotinylated hHg in PBS (10  $\mu$ g/mL), blocked with PBS-1%BSA, washed and dispensed with 100  $\mu$ L of the Nbs clones from the Master Plate B diluted 1/100 or 1/1000 in PBST. VHH detection was performed using streptavidin peroxidase (1  $\mu$ g/mL). After extensive washing, the peroxidase activity was developed by addition of 100  $\mu$ L/well of HRP substrate solution (0.4 mL of 6 mg of 3,3',5,5'tetramethylbenzidine in 1 mL of DMSO + 0.1 mL of 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in water, in a total of 25 mL of 0.1 M acetate buffer, pH 5.5) and incubated for 15 min at RT. The enzyme reaction was stopped by the addition of 50  $\mu$ L of 2 N H2SO4, and the absorbance was read at 450 nm on a Fluostar Optima Reader (BMG, Ortenberg, Germany).

Large-scale production of nanobodies For the expression of the biotinylated Nbs (BtNbs), an individual colony of *E. coli* BL21(DE3)/pCY216 freshly transformed with the Nb of interest cloned into the pINQ-BtH6 vector was used to inoculate 500 mL of LB containing 50 µg/mL kanamycin, 35 µg/mL chloramphenicol, 0.04% of L-arabinose, and 100 µM D-biotin in shaking flasks. Cells were grown overnight and the Nb expression was induced as described above. The cell pellet was then resuspended in 10 mL of PBS supplemented with 100 µM D-biotin, lysed by sonication, and incubated for 2 h at 37 °C to allow complete biotinylation of the Nb [20]. After

centrifugation (18,000×g), the BtNb were purified on 1 mL Ni-NTA columns (GE Health Care, Pittsburgh) according to manufacturer's instructions, and the imidazole eluted fractions were dialyzed against PBS, and quantified spectrophotometrically (Abs 280 nm 0.1% = 1.9). For expression of Nbs equipped with an hemagglutinin peptide tag (HA), the pINQ-BtH6 bearing the Nb of interest was digested with SfiI, and the ≈ 400 bp band corresponding to the VHH gene was cloned into the pINQ-H6HA vector [17], see ESM Fig. S5.

Sandwich pair selection To select the most promising pairs, we used the high-throughput method previously described [19]. To this end, avidin-coated plates (100 ng/well) were blocked with PBS-1% BSA for 1 h at RT and then dispensed with 10  $\mu$ g/mL (100  $\mu$ L) of the purified capturing BtNb (100  $\mu$ L/well). After washing, individual plates were incubated with 0, 10, or 100 ng/mL of human hemoglobin in PBS (100  $\mu$ L/well) for 1 h at RT. After washing, each plate was incubated with a 1/100 dilution of the "Master Plate" BtNbs in PBST. The binding of the secondary antibody was detected using streptavidin peroxidase.

### Nanobody sandwich ELISA for the detection of human hemo-

globin in fecal samples Fecal sample extracts were prepared by suspending 10 mg of stools in 1 mL of assay buffer (PBS, 0.4% BSA, 0.05% Tween 20 containing 4% of cOmplete<sup>™</sup>, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail). The suspension was then centrifuged for 5 min, at  $18,000 \times g$ , and the supernatant was finally filtered through a 0.22 µm pore size filter. These fecal sample extracts, from now on referred to as "samples" were kept on ice until used. Streptavidin-coated plates (5 µg/mL, 100 µL) were blocked as described above and then dispensed with 100 µL of the purified capturing BtNb (500 ng/well); after washing, 100 µL of human hemoglobin standards or proper dilutions of the samples in assay buffer (typically 1/10 dilutions) were loaded and incubated for 1 h at RT. After washing, the purified detecting Nb (carrying an hemagglutinin peptide tag (HA)) was added (1 µg/mL, 100  $\mu$ L) for 1 h at RT, and then the binding of the Nb was detected by addition of anti-HA peroxidase conjugate. After extensive washing, the peroxidase activity was developed as described above.

**Preparation of spiked samples** To evaluate the test performance, stool samples obtained from healthy donors were spiked with hHg. To this end, the fecal samples were resuspended in 0.9 mL of assay buffer as described above, and then were supplemented with 100  $\mu$ L containing different concentrations of hHg in assay buffer. After proper dilution, the samples were analyzed by the nanobody sandwich ELISA.

# **Results and discussion**

Selection of capturing nanobodies A Nb library with a size of  $4 \times 10^7$  transformants was generated from the blood of a llama immunized with hHg. For the isolation of hHgspecific antibodies, the library was initially panned on microtiter wells directly coated with the antigen (panning A). In addition, aiming to preserve the native epitopes of the protein that could be lost by direct adsorption onto the plastic wells, the library was also panned against biotinylated hHg immobilized on avidin-coated microtiter wells (panning B). After two rounds of selection, individual clones from panning A and B were grown and the Nb were expressed from the phagemid pComb3X vector as soluble HA-tagged proteins. Then, their reactivity against the antigen was tested on wells directly coated with unlabeled hHg or biotinylated hHg immovilized on avidincoated plates, respectively. In both cases, ten out of ten clones were positive confirming the efficiency of the selection process. On the basis of this result, we proceeded to the next step transferring en masse the VHH genes selected from each panning strategy to the pINQ-BtH6 vector, which facilitates the Nb selection by allowing high-yield expression of the soluble nanobodies as well as their in vivo biotinylation [20]. Ninety six individual clones were grown under this condition and the BtNb purified in parallel on Ni-NTA plates to generate Master Plate A and B, corresponding to BtNb obtained from panning A and B, respectively. To increase the odds of hitting native epitopes, the initial selection of capturing antibodies was performed with the Master Plate B clones assayed at different concentrations on plates coated with biotinylated hHg. Based on their sequences and reactivity at the highest dilution tested, the BtNb G12 and E11 were selected as capturing antibody candidates (data not shown).

**Pairwise selection of Nb for hHg detection** The BtNb G12 and E11 were produced in large scale and were immobilized individually on avidin-coated microtiters plates using saturating concentrations (2  $\mu$ g/well). Each of these plates was then incubated with 100 ng/mL of hHg, and tested in a sandwich ELISA format with the 96 BtNb clones from the Master Plate A (Fig. 1). The largest number of productive pairs was formed in the plates where BtNbE11 was used as capturing antibody, suggesting that this Nb recognizes with high affinity an uncommon hHg epitope that does not overlap with the majority of the clones. BtNbG12 could be combined with a lower number of clones and yielded lower signals with the same amount of antigen (Fig. 1).

Based on the pairwise screening results, BtNb E11 was selected as capturing antibody and its performance was further analyzed by decreasing the amount of hHg to 10 ng/mL in the assay (Fig. 2). Under this condition, no signal saturation was



Fig. 1 Screening of nanobody pairs for hHg detection. The two-site ELISAs for the detection of 100 (black) or 0 ng/mL of hHg (gray) were performed using BtNbs E11 (a) or G12 (b) as capturing antibodies, in combination with 96 Nbs from the Master Plate A

observed and 13 of the clones producing the highest readouts were selected, individually purified and identical concentrations (10  $\mu$ g/mL) were used to analyze their performance by building titrations curves (Fig. 3). The hHg concentration values causing 50% signal saturation (SC<sub>50</sub>) were then used as indicator of the assay sensitivity, and based on this, parameter clone B9 was chosen as detecting Nb. The amino acid sequence of the NbE11 and B9 is shown in ESM Fig. S4; both Nbs have the hallmark residue characteristic of these antibodies and rather long CDR3.

**Cross-reactivity with non-human hemoglobins** After identifying the best nanobody pair for the assay, we checked its reactivity with hemoglobins of dietary origin because this could give place to false positives. To this end, rabbit, sheep, pig, fish, cow, and chicken hemoglobins were purified from blood samples as described above. Each of these proteins was assayed in a wide range of concentrations and no significant reactivity was observed, even at the highest concentration tested, 10  $\mu$ g/mL. This was considered of high relevance because it will make unnecessary any dietary restriction prior to the collection of the samples for the test (Fig. 4).



**Fig. 2** Screening of NbE11 as capturing antibody with low concentration of hHg. The two-site ELISA for the detection of 10 (black) or 0 ng/mL of hHg (gray) was performed using BtNb E11 as capturing antibody in combination with 96 Nbs from the Master Plate A

**Optimization of the E11/B9 sandwich ELISA for measurement of hHg** Once the lack of cross-reactivity with non-human hemoglobins was confirmed, the biotinylated B9 detecting nanobody was produced in large scale and purified as described above. Using the purified BtNbs and streptavidin peroxidase for detection, the analytical parameters of the sandwich ELISA in saline buffer were determined. Figure 5 shows the titration curves obtained in the 0.3–300 ng/ml range (sigmoidal curve) and 0–10 ng/ml range (linear curve). A high sensitivity, as compared with available commercial tests (ESM Table S3), was attained, with a SC<sub>50</sub> of 8.7  $\pm$  0.5 ng/mL, and detection and quantitation limits (LOD and LOQ) defined as the blank value plus 3 or 10 standard deviations, of 0.08 and 0.27 ng/mL respectively.

Analysis of the assay performance with stool samples Initial experiments to measure hHg in fecal samples using the test showed significant and variable background readouts



**Fig. 3** Titration curves of best performing pairs. Sandwich ELISA performed with BtNbE11 as capturing nanobody in combination with 13 of the best performing clones as judged from the data shown in Fig. 2. The BtNb T5, with specificity for the tetanus toxoid, was used as negative control. The concentration corresponding to 50% of the maximum readout, SC<sub>50</sub> (ng/mL) is shown in the insert



**Fig. 4** Analysis of cross-reactivity of the E11/B9 nanobody pair with non-human hemoglobins. Each hemoglobin was individually tested in the 0.3–10,000 ng/mL range. The results are the average values of triplicate measurements and the error bars represent the standard deviation

when healthy donor samples were analyzed. Different attempts to solve this problem by changing the buffer composition were only partially successful, however it was corrected when avidin was substituted by streptavidin for BtNb E11 immobilization. Nevertheless, these changes decreased the sensitivity of the test. We then explored the use of an alternative peptide tag to improve the detection limit of the assay. To this end, the detecting Nb was cloned in the pINQ-H6HA vector that allows its expression with a C-terminal hemagglutinin epitope (HA) tag [17]. The use of this tag and the subsequent detection of the Nb with an anti-HA peroxidase conjugate allowed to recover the loss of sensitivity (Fig. 6).

We then evaluated the accuracy and precision of the test by analyzing spiked samples. Since our goal was to develop a method that could accurately detect concentration of hHg in fecal samples that are well below the recommended diagnostic cutoff,  $9-20 \ \mu g/g$  [7], the recovery of the method was evaluated using spiking concentrations of 2.0 and 4.0  $\mu g/g$  on samples collected from 18 healthy donors. Table 1 summarizes the concentrations of hHg measured by the nanobody ELISA before and after spiking, and the calculated recovery. At both concentrations tested, the recoveries for all the samples were within the



**Fig. 6** Effect of the tag used to detect the binding of NbB9. The titration curves were performed using the biotinylated nanobody (BtNbB9, dashed line) or the same nanobody with a C-terminal HA tag (HANbB9, solid line). The  $SC_{50}$  are shown on top. The results are the average values of triplicate measurements and the error bars represent the standard deviation

range recommended by the SANTE guidance document for method validation of the European Union [23], showing that it can accurately detect low concentration of hHg in feces. The precision of the method was assessed using fecal samples spiked with a concentration of hHg representing the most commonly used cutoff, 20 µg/g, and also at a high concentration as could be found in a CRC patient, 200  $\mu$ g/g. Each sample was analyzed in quintuplicates, five times in the same day (intra-day precision) and five times in five different days (inter-day precision). Table 2 shows the precision parameters obtained with one samples, and similar values were also found with additional samples, see ESM Tables S1 and S2. In both cases, the coefficient of variation in percentage (CV%) was significantly lower than the acceptance criterion (CV < 20%) recommended by the SANTE guidelines [23].

# Conclusions

By building a comprehensive Nb library and using a highthroughput selection process, we were able to identify a nanobody pair for sensitive detection of hHg. The usefulness

**Fig. 5** E11/B9 nanobody sandwich ELISA for the detection of hHg in saline buffer. Extended (left) and linear (right) range titration curves. The results are the average values of triplicate measurements and the error bars represent the standard deviation.



Table 1Analysis of recoveryusing spiked fecal samples

Sample	Unspiked	Spiked hHg 2.0	µg/g	Spiked hHg 4.0	Spiked hHg 4.0 µg/g		
	hHg µg/g	hHg µg/g	% recovery	hHg μg/g	% recovery		
1	< LOQ	$1.51 \pm 0.06$	75	$4.14\pm0.08$	103		
2	< LOQ	$1.96\pm0.14$	98	$3.27\pm0.12$	82		
3	$0.35\pm0.02$	$2.09\pm0.02$	87	$4.26\pm0.04$	98		
4	< LOQ	$1.45\pm0.22$	73	$3.18\pm0.23$	80		
5	< LOQ	$2.07\pm0.13$	104	$4.36\pm0.10$	109		
6	< LOQ	$2.12\pm0.02$	106	$3.53\pm 0.04$	88		
7	< LOQ	$1.55\pm0.06$	78	$4.01\pm0.07$	100		
8	$15.2\pm0.4$	$17.3\pm0.4$	105	$19.8\pm0.2$	116		
9	$0.15\pm0.03$	$1.73\pm0.10$	79	$3.30 \pm 0.12$	79		
10	$0.72\pm0.10$	$2.63\pm0.05$	96	$4.41\pm0.15$	92		
11	< LOQ	$1.43\pm0.10$	72	$3.85\pm0.01$	96		
12	< LOQ	$1.49\pm0.09$	74	$3.15\pm0.10$	79		
13	$2.20\pm0.04$	$4.42\pm0.21$	111	$5.62\pm0.02$	86		
14	< LOQ	$2.02\pm0.04$	101	$4.47\pm0.27$	112		
15	< LOQ	$1.85\pm0.14$	92	$4.04\pm0.07$	101		
16	< LOQ	$2.19\pm0.07$	109	$4.06\pm0.16$	101		
17	< LOQ	$1.87\pm0.13$	93	$4.40\pm0.34$	110		
18	$4.60 \pm 0.30$	$6.38\pm0.10$	89	$8.54\pm0.16$	99		

Samples were diluted 10-fold and measured in triplicates. The mean value ± the standard deviation is displayed

of these nanobodies for the detection of the presence of hHg in feces was demonstrated with a panel of fecal samples spiked with concentrations of hHg that are well below the recommended cut-off for CRC screening. The two-site assay performed with excellent accuracy and precision. In addition, their lack of cross-reactivity with non-human hemoglobins removes the need of dietary restrictions previous to the test, a condition that will favor its acceptance among patients. This fulfils a major goal of our study, which was to facilitate the large scale CRC screening by developing a reliable test that could be reproduced in other laboratories. Regarding the latter, we provide as ESM the oligonucleotide sequences of Nbs E11 and B9

 Table 2
 Precision parameters of the E11/B9 nanobody ELISA

Amount of hHg spiked (µg/g)	20	200
Intra-day precision		
Replicates	5	5
Mean value ( $\mu g/g$ )	22.3	206
CV%	1.9	8.2
Inter-day precision		
Days	5	5
Mean value ( $\mu g/g$ )	17.8	203
CV%	15.2	11.6

CV% coefficient of variation in percentage

with their respective peptide tags, as "ready to clone" genes (ESM Fig. S6), which can be ordered as synthetic genes to be cloned into the pET-28a(+) vector (Novagen), and then directly used for high-yield recombinant production of these Nbs in *E. coli* BL21(DE3). Since, the hHg standard can also be easily prepared in-house; the assay could be economically produced in any laboratory allowing to carry out massive population screenings of CRC.

Acknowledgements Dr. Ana Acuña and Dr. Mariana González from Parasitology and Mycology Department from Central Laboratory of Pasteur Hospital who kindly provided the stool samples used in this study.

**Funding information** This work was supported with funds provided by CSIC-149 UdelaR. Triana Delfin is the recipient of a scholarship from ANII-Uruguay.

### Compliance with ethical standards

All fecal samples were collected with informed consent of donors and studied according to the ethic protocols followed by the Laboratory of Mycology and Parasitology of the Hospital Pasteur, Montevideo, Uruguay.

The blood sample used for the preparation of hemoglobin was donated for this purpose with informed consent by one of the authors of this study, and was taken by trained personnel in a local hospital.

The use of a 2-year-old llama for this study was approved by the authorities of the Zoológico Parque Lecocq, Montevideo, Uruguay, and all the procedures were carried out by the veterinarians of the zoo following the protocol approved by the Comisión de Ética en el Uso de Animales del Parque Lecocq (CEUA).

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

# References

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136(5):E359–86.
- Chiu HM, Chen SL, Yen AM, Chiu SY, Fann JC, Lee YC, et al. Effectiveness of fecal immunochemical testing in reducing colorectal cancer mortality from the One Million Taiwanese Screening Program. Cancer. 2015;121(18):3221–9.
- Hewitson P, Glasziou P, Watson E, Towler B, Irwig L. Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. Am J Gastroenterol. 2008;103(6):1541–9.
- Shaukat A, Mongin SJ, Geisser MS, Lederle FA, Bond JH, Mandel JS, et al. Long-term mortality after screening for colorectal cancer. N Engl J Med. 2013;369(12):1106–14.
- Kratochvil JF, Burris RH, Seikel MK, Harkin JM. Isolation and characterization of alpha-guaiaconic acid and nature of guaiacum blue. Phytochemistry. 1971;10(10):2529.
- Young GP, St John DJ, Rose IS, Blake D. Haem in the gut. Part II. Faecal excretion of haem and haem-derived porphyrins and their detection. J Gastroenterol Hepatol. 1990;5(2):194–203.
- Young GP, Symonds EL, Allison JE, Cole SR, Fraser CG, Halloran SP, et al. Advances in fecal occult blood tests: the FIT revolution. Dig Dis Sci. 2015;60(3):609–22.
- Hoffman RM, Steel S, Yee EF, Massie L, Schrader RM, Murata GH. Colorectal cancer screening adherence is higher with fecal immunochemical tests than guaiac-based fecal occult blood tests: a randomized, controlled trial. Prev Med. 2010;50(5-6):297–9.
- van Rossum LG, van Rijn AF, Laheij RJ, van Oijen MG, Fockens P, van Krieken HH, et al. Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population. Gastroenterology. 2008;135(1):82–90.
- Brenner H, Tao S. Superior diagnostic performance of faecal immunochemical tests for haemoglobin in a head-to-head comparison with guaiac based faecal occult blood test among 2235 participants of screening colonoscopy. Eur J Cancer. 2013;49(14):3049–54.
- Hassan C, Giorgi Rossi P, Camilloni L, Rex DK, Jimenez-Cendales B, Ferroni E, et al. HTA Group. Meta-analysis: adherence to colorectal cancer screening and the detection rate for advanced neoplasia, according to the type of screening test. Aliment Pharmacol Ther. 2012;36(10):929–40.

- Parra-Blanco A, Gimeno-Garcia AZ, Quintero E, Nicolás D, Moreno SG, Jimenez A, et al. Diagnostic accuracy of immunochemical versus guaiac faecal occult blood tests for colorectal cancer screening. J Gastroenterol. 2010;45(7):703–12.
- Gies A, Cuk K, Schrotz-King P, Brenner H. Direct comparison of diagnostic performance of 9 quantitative fecal immunochemical tests for colorectal cancer screening. Gastroenterology. 2018;154(1):93–104.
- Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. Annu Rev Biochem. 2013;82:775–97.
- van der Linden RH, Frenken LG, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. Biochim Biophys Acta. 1999;1431(1):37–46.
- Ewert S, Cambillau C, Conrath K, Pluckthun A. Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains. Biochemistry. 2002;41(11):3628–36.
- Tabares-da Rosa S, Rossotti M, Carleiza C, Carrion F, Pritsch O, Ahn KC, et al. Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response. Anal Chem. 2011;83(18):7213–20.
- Gonzalez-Sapienza G, Rossotti MA, Tabares-da RS. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications. Front Immunol. 2017;8:977.
- Rossotti MA, Pirez M, Gonzalez-Techera A, Cui Y, Bever CS, Lee KS, et al. Method for sorting and pairwise selection of nanobodies for the development of highly sensitive sandwich immunoassays. Anal Chem. 2015;87(23):11907–14.
- Rossotti M, Tabares S, Alfaya L, Leizagoyen C, Moron G, Gonzalez-Sapienza G. Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. Biochim Biophys Acta. 2015;1850(7):1397–404.
- Pirez-Schirmer M, Rossotti M, Badagian N, Leizagoyen C, Brena BM, Gonzalez-Sapienza G. Comparison of three antihapten VHH selection strategies for the development of highly sensitive immunoassays for microcystins. Anal Chem. 2017;89(12):6800–6.
- Chapman-Smith A, Turner DL, Cronan JE Jr, Morris TW, Wallace JC. Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of Escherichia coli acetyl-CoA carboxylase. Biochem J. 1994;302(Pt 3):881–7.
- 23. SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. European Commission.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Article

# Highly Sensitive Detection of Zika Virus Nonstructural Protein 1 in Serum Samples by a **Two-Site Nanobody ELISA**

Triana Delfin-Riela<sup>1</sup>, Martín Rossotti<sup>1</sup>, Romina Alvez-Rosado<sup>1</sup>, Carmen Leizagoyen<sup>2</sup> and Gualberto González-Sapienza <sup>1,\*</sup>

- 1 Cátedra de Inmunología, DEPBIO, Instituto de Higiene, Facultad de Química, UDELAR, Montevideo 11600, Uruguay; triana@fq.edu.uy (T.D.-R.); martinrossotti@gmail.com (M.R.); ralvezrosado@gmail.com (R.A.-R.)
- 2 Parque Lecoq, IMM, Montevideo 12600, Uruguay; carmenleizagoyen@gmail.com
- Correspondence: ggonzal@fq.edu.uy; Tel.: +598-2487-4334

Received: 29 October 2020; Accepted: 23 November 2020; Published: 9 December 2020



Abstract: The Zika virus was introduced in Brazil in 2015 and, shortly after, spread all over the Americas. Nowadays, it remains present in more than 80 countries and represents a major threat due to some singularities among other flaviviruses. Due to its easy transmission, high percentage of silent cases, the severity of its associated complications, and the lack of prophylactic methods and effective treatments, it is essential to develop reliable and rapid diagnostic tests for early containment of the infection. Nonstructural protein 1 (NS1), a glycoprotein involved in all flavivirus infections, is secreted since the beginning of the infection into the blood stream and has proven to be a valuable biomarker for the early diagnosis of other flaviviral infections. Here, we describe the development of a highly sensitive nanobody ELISA for the detection of the NS1 protein in serum samples. Nanobodies were selected from a library generated from a llama immunized with Zika NS1 (ZVNS1) by a two-step high-throughput screening geared to identify the most sensitive and specific nanobody pairs. The assay was performed with a sub-ng/mL detection limit in the sera and showed excellent reproducibility and accuracy when validated with serum samples spiked with 0.80, 1.60, or 3.10 ng/mL of ZVNS1. Furthermore, the specificity of the developed ELISA was demonstrated using a panel of flavivirus' NS1 proteins; this is of extreme relevance in countries endemic for more than one flavivirus. Considering that the nanobody sequences are provided, the assay can be reproduced in any laboratory at low cost, which may help to strengthen the diagnostic capacity of the disease even in low-resource countries.

Keywords: diagnosis; flavivirus; NS1; immunoassay; phage display; single-domain antibody

# 1. Introduction

The Zika virus (ZV) is an arthropod-borne virus, isolated for the first time in Uganda in 1947 [1], that belongs to the Flaviviridae family. Nevertheless, ZV remained almost unnoticed for fifty years, until, in 2015, it was introduced in Brazil and, shortly after, spread all over the continent [2,3]. Thus, in 2016, the World Health Organization (WHO) declared the ZV epidemic as an international public emergency. This virus represents a major threat due to some singularities not common among other flaviviruses. In particular, apart from the bite of infected Aedes spp. mosquitoes, ZV can be vertically transmitted during pregnancy or breastfeeding, as well as spread through sexual contact or blood transfusion [4]. Moreover, although symptoms are usually mild, complications are severe. In particular, a ZV infection carries the risk of Guillain-Barré Syndrome and several adverse pregnancy



and congenital outcomes, collectively known as congenital Zika syndrome [5,6]. Although the intensity of the epidemic decreased in the past years, it is important to have a rapid and reliable diagnostic test to monitor the transmission and help to contain eventual outbreaks. Until now, a ZV diagnosis mainly depends on the detection of viral RNA in patients' sera by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). RNA quantification is highly specific, but its efficiency drops after seven days of the onset of symptoms [7]. At the same time, the process is laborious and requires expensive equipment and specialized operators. On the other hand, when the viremia is about to disappear, the antibody response begins to become evident; therefore, during the convalescent phase, the detection of immunoglobulin M (IgM) and later immunoglobulin G (IgG) by immunoassays are preferred. However, due to extensive shared similarities between ZV and other flaviviruses, such as Dengue (DV), West Nile (WN), and Yellow fever (YF), considerable immunological cross-reactivity has been observed [8]. There is plenty of evidence of false-positive results for patients living in endemic areas for more than one Flavivirus [9,10]. Consequently, this constitutes a major drawback in the use of serology tests.

Nonstructural protein 1 (NS1) is a glycoprotein involved in Flavivirus infection, and its secreted form is demonstrated to be highly immunogenic; therefore, it might be used as a diagnostic biomarker of the disease [11]. It is known, from other flavivirus infections, that NS1 appears in blood concomitantly with viremia and circulates in large amounts, even up to twelve days after fever onset; hence, it is an indicator of ongoing or recent infection [11–14]. Even more, the detection of this protein can be carried out through a simple capture ELISA [15]. Nonetheless, the evaluation of several presently available DV serological tests based on the NS1 detection cross-react with the ZV protein, probably due to the important structure similarity between them [16]. In addition, little progress has been made on the Zika NS1 (ZVNS1) detection, and the evaluation of cross-reactivity is limited.

In the past years, nanobodies (Nbs), the recombinant fragment derived from the variable domain (VHH) of camelid heavy-chain-only antibodies, have been recognized as versatile and advantageous diagnostic reagents [17,18]. Their monodomain nature facilitates the construction and expression of highly diverse libraries using phage displays. Once isolated, the Nbs are easily expressed in soluble form in the periplasm of *Escherichia coli*, with much higher expression levels than those of conventional antibodies fragments [19]. Furthermore, due to their high stability and robustness, outstanding stability, low-cost production in bacteria, and indefinite reproducibility from its known sequence, they provide an improvement in the robustness and lower test costs [18,20]. Previously, our group described a high-throughput methodology for the selection of pairs of nanobodies that allowed the development of sensitive sandwich immunoassays [21]. This permitted us to generate a highly sensitive, low-cost sandwich Nb-ELISA for the specific detection of ZVNS1 as an early marker for the diagnosis of Zika acute infection.

#### 2. Materials and Methods

#### 2.1. Materials

Flaviviruses' nonstructural protein 1 and mouse anti-ZVNS1 monoclonal antibody were purchased from The Native Antigen Company (Oxford, OX, UK). Anticoagulant citrate dextrose solution (ACD), histopaque-1077, Tween 20, polyethylene glycol 8000 (PEG), bovine serum albumin (BSA), IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), D-biotin, trypsin from bovine pancreas, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), and other common chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Mississauga, MO, USA). TRIZOL reagent was from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). M-MuLV Reverse Transcriptase, random primer mix, Taq polymerase, helper phage M13KO7, and all restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). The pComb3X vector was a kind gift from Dr. Carlos Barbas, The Scripps Research Institute (La Jolla, CA, USA). *E. coli* ER2738 electrocompetent cells and recovery medium were purchased from Lucigen Corporation (Middleton, WI, USA). The primers used for library construction were from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Plasmid extraction, PCR clean up, and gel extraction kits

3 of 14

were acquired from Qiagen (Germantown, MD, USA). Bacterial protein extraction reagent (BPER), NHS (*N*-Hydroxysuccinimide)-biotin, and streptavidin peroxidase were purchased from Thermo Fisher (Rockford, IL, USA). ELISA strips and plates were from Greiner Bio-One (Monroe, NC, USA). Anti-hemagglutinin mAb (3F10) peroxidase conjugate was from Roche (Madison, WI, USA). His-Pur Ni-NTA chromatography columns were from GE Health Care (Pittsburgh, USA).

# 2.2. Llama Immunization and Library Construction

The use of a three-year-old female llama (Lama glama) for this study was approved by the authorities of the Zoológico Parque Lecocq, Montevideo, Uruguay. All the procedures were carried out by the veterinarians of the zoo following the protocol approved by the Comisión de Etica en el Uso de Animales del Parque Lecocq (CEUA), protocol number CEUA-1-141107. The animal was immunized by subcutaneous injection with 150 µg of ZVNS1 in incomplete Freund adjuvant, as described previously [22–24]. Three additional boosters were performed every 3 weeks in the same conditions. Fifteen days after the final booster, 150 mL of blood were collected in bags containing sodium citrate as the anticoagulant. Peripheral mononuclear cells were obtained by centrifugation on histopaque-1077 gradients according to the manufacturer's recommendations. Total RNA from  $10^{7}$  cells was extracted using TRIZOL, and 10 µg of it was reverse-transcribed using the M-MuLV Reverse Transcriptase enzyme and a random primer mix. Then, the genes encoding the variable domain of the heavy chain of conventional antibodies (VH) and heavy-chain-only antibodies (VHH) were PCR-amplified using VH1, VH3, and VH4 as forwards primers and JH as the reverse primer, as previously described [23]. Sfi sites were introduced during amplification, permitting to clone the fragments into the phagemid plasmid pComb3X. VHH/VH-digested fragments were separated in 1% agarose, purified by gel extraction, and 1.2 µg were ligated overnight at 16 °C with 1.0 µg of SfiI-digested pComb3X. Then, the ligation mix was concentrated and desalted by ethanol precipitation, resuspended in 25 µL of water, and electroporated in *E. coli* ER2738. Cells were allowed to recover 1 h in recovery medium and were then inoculated to 10 mL of LB (Luria-Bertani) broth containing 100 µg of ampicillin and incubated for 2 h with agitation at 37 °C. E. coli cells were superinfected with M13KO7 helper phage for 30 min without agitation, and then, kanamycin was added at a concentration of  $50 \ \mu g/mL$ and cultured overnight (ON) with shaking in the same conditions. Next day, the supernatant was harvested by centrifugation, and phages were precipitated twice with 0.2 volume of 20% polyethylene glycol 8000 in 2.5-M NaCl and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 3% BSA, 0.3% Tween 20, 10%, glycerol, and 150-mM L-arginine. The VH/VHH phage library was titrated by infection of *E. coli* and stored at –80 °C.

# 2.3. Purification of Immune Llama Immunoglobulins

The total fraction of immunoglobulins were obtained from the serum of the immune llama using a protein A column from GE healthcare (Piscataway, NJ, USA), as described in [17]. After dialysis against PBS, the immune llama IgG (ill-IgG) were stored at -20 °C.

# 2.4. Panning Strategies for the Selection of ZVNS1-Specific Antibodies

For panning, ZVNS1 was immobilized on high-binding ELISA strips using three different strategies: (A) wells coated with 100  $\mu$ L of ZVNS1 (1  $\mu$ g/mL) in PBS, (B) wells coated with 100  $\mu$ L of streptavidin (1  $\mu$ g/mL) in PBS, followed by incubation with 100  $\mu$ L of biotinylated ZVNS1 (1  $\mu$ g/mL) in PBS, and (C) wells coated with 100  $\mu$ L of ill-IgG (10  $\mu$ g/mL) in PBS, followed by incubation with 100  $\mu$ L of ZVNS1 (1  $\mu$ g/mL) in PBS-0.1% Tween 20 (PBST). After each coating step (ON, 4 °C), the strips were blocked with PBS-1% BSA for 1 h at room temperature (RT) and then washed with PBST. For panning, wells were loaded with 100  $\mu$ L of the 1/100 diluted antibody library (1 × 1011 colony-forming units, cfu) and incubated for 2 h with agitation at 4 °C. Unspecific phages were eliminated by 10 times washing with PBST, and the bound phages were eluted by incubation for 30 min at 37 °C with 100  $\mu$ L/well of 10-mg/mL trypsin. Finally, the phages were collected and used for titration and subsequent

amplification in ER2738 *E. coli* for an additional round of selection. Three rounds were performed in total.

#### 2.5. Nanobody Expression

A culture 96-deep-well plate from Greiner Bio-One (Monroe, NC, USA) was prepared to produce supernatants from 24 clones randomly picked from the outcome of each of the three immobilization strategies used for panning (A, B, and C). To this end, 72 individual colonies were inoculated into 0.5 mL of Super Broth (SB)-ampicillin in a 96-deep well block, grown at 37 °C until an optical density (OD) of 1.0 AU, and then, the expression of the secreted Nb was induced by the addition of IPTG at 1-mM final concentration. The 96-well culture plate was incubated ON at 37 °C. The next day, the block was centrifuged at  $1200 \times g$  for 20 min, and the supernatants were collected in a fresh 96-deep-well plate ("master plate"), which was a source of Nb clones throughout the study.

#### 2.6. ELISA Method for Selection of Capturing Nanobodies

The ELISA plates were coated as described in panning coating. After blocking PBS-1% BSA and washing, the plates were incubated with 100  $\mu$ L of the Nb supernatant. The binding of Nbs was detected using anti-HA monoclonal antibody conjugate to peroxidase (3 ng/mL). After washing, the peroxidase activity was developed by the addition of 100  $\mu$ L/well of substrate solution (0.4 mL of 6 mg of TMB in 1 mL of DMSO + 0.1 mL of 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in water, in a total of 25 mL of 0.1-M acetate buffer, pH 5.5) and incubated at RT for 15 min. The enzyme reaction was stopped by the addition of 50  $\mu$ L of 2-N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the absorbance was read at 450 nm on a Fluostar Optima Reader (BMG, Ortenberg, Germany).

#### 2.7. Large-Scale Production of Biotinylated and HA-Tagged Nbs

The Nb genes were cloned into a pINQ-BtH6 vector and transformed into BL21(DE3) overexpressing the BirA biotin ligase of *E. coli*, as described previously [21,25]. Individual colonies were then used to inoculate 200 mL of LB containing 50-µg/mL kanamycin, 35-µg/mL chloramphenicol, and 0.04% of L-arabinose in shaking flasks. When the optical density at 600nm (OD<sub>600</sub> nm)  $\approx$  0.6 AU, the expression of Nbs was induced with IPTG at 10 µM and grown ON at 37 °C. The next day, the bacteria was harvested, and the pellet was resuspended in 10 mL of PBS supplemented with 100 µM of D-biotin, lysed by sonication at 50% amplitude during 15 min on ice, and finally, subjected to post-biotinylation by incubation for 2 h at 37 °C [24]. After centrifugation (18,000× *g*), the soluble fractions were PBS-dialyzed, and the biotinylated Nbs (BtNbs) were spectrophotometrically quantified (Abs 280 nm) and kept at -20 °C until use.

HA-tagged nanobodies were produced in a similar fashion after cloning in the pINQ-H6HA vector and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells. Individual colonies were used to inoculate 500 mL of LB containing 50-µg/mL kanamycin in shaking flasks. When  $OD_{600}$  nm  $\approx$  0.6 AU, the expression of the HA-Nbs was induced as described above. The cell pellet was then resuspended in 10 mL of PBS, lysed by sonication, and purified on Ni-NTA columns. The eluted fraction was PBS-dialyzed, quantified at 280 nm, and stored at -20 °C.

#### 2.8. Pairwise Selection of Nanobodies

ELISA plates were coated ON with 100  $\mu$ L/well of 1- $\mu$ g/mL streptavidin, blocked with PBS-1% BSA for 1 h at RT, and then dispensed with 100  $\mu$ L/well of 1- $\mu$ g/mL purified capturing BtNb. After washing, the plates were incubated with 100  $\mu$ L of different concentrations of ZVNS1 in PBS (0, 2.0, and 20 ng/mL) for 1 h at RT. After washing, each plate was incubated with a 1/10 dilution in PBS of the "master plate" Nbs supernatants. Binding of the secondary antibody was detected by the addition of 100  $\mu$ L of 3-ng/mL anti-HA monoclonal antibody conjugate to peroxidase.

#### 2.9. Nanobody Sandwich ELISA for the Detection of ZVNS1 in Serum Samples

Deidentified normal serum samples available in our laboratory from previous research work were spiked with two different known concentrations of ZVNS1 (1.5 and 4.5 ng/mL) and subjected to quantification with the nanobody sandwich ELISA. To this end, streptavidin-coated plates (0.2 ng/well) were blocked as described above and then dispensed with 100  $\mu$ L of capturing BtNb (2  $\mu$ g/mL). After washing, 100  $\mu$ L of ZVNS1 standards or spiked samples were loaded and incubated for 1 h at RT. After washing, the purified detecting Nb was added (100  $\mu$ L, 1  $\mu$ g/mL) and incubated for 1 h at RT. The binding of the Nb was detected by the addition of 100  $\mu$ L of 3-ng/mL anti-HA peroxidase conjugate. After washing, the peroxidase activity was developed as described above.

#### 3. Results and Discussion

# 3.1. To Promote a Broad Representation of the NS1 Epitopes, Different Antigen Immobilization Strategies Were Used to Pan the Nb Library

A llama was immunized four times with 150  $\mu$ g of ZVNS1, and the antibody response was followed by serum titration. The antibody titer rose rapidly after the primer and first booster and did not change significantly afterwards (Figure S1). After the fourth immunization, a VHH/VH library of  $3 \times 10^8$  transformants was generated from  $10^7$  blood mononuclear cells. In order to maximize the recovery of Nbs defining different epitopes on the ZVNS1 antigen, the library was panned on microtiter wells with the antigen immobilized in different ways. Condition A: ZVNS1 passively absorbed into ELISA wells, condition B: biotinylated ZVNS1 immobilized on streptavidin-coated wells, and condition C: ZVNS1 captured on ill-IgG-coated wells. After three rounds of selection, a 96 deep-well culture master plate was prepared using 72 individual clones obtained from each of the three panning conditions. We next tested the reactivity of 24 Nb clones from each panning strategy with ZVNS1 immobilized using the conditions A, B, and C (Figure 1). Most of them reacted in a similar fashion with ZVNS1, regardless of the condition used for its immobilization, but a few showed differential reactivity (e.g., 4, 18, 30, etc.), providing a first evidence of the diversity of the selected clones. Based on the intensity of their readouts and the effect of the ZVNS1 immobilization method on their reactivity, an initial panel of 34 clones were submitted for sequencing, resulting in 22 (65%) unique sequences (Figure S3). The fact that 65% of the sequences were unique and most of them unrelated suggests that a large number of epitopes were represented in this initial nanobody panel. Curiously, among these 22 clones, seven (32%) corresponded to VH domains with the characteristic GLEW motif in framework 2 and the frequent Trp to Arg substitution in framework 4 found in the VH of heavy-chain-only antibodies that bear this variable domain. The significance of this finding is unknown, but this is indeed a larger-than-usual frequency of soluble VH, since they only account for up to 10% of heavy-chain-only antibodies in llamas [26].

Considering that serum is the main matrix for the detection of circulating ZVNS1, we next tested the ability of these 22 unique Nbs to recognize ZVNS1 in the presence of a human pool of Zika-negative sera (50% in PBS) (Figure S2). Although all the clones performed better in the absence of the serum, a considerable number of them maintained high reactivity in the presence of this matrix. We also tested their capacity to react with limited amounts of ZVNS1 (Figure 2). In this case, differences between tested Nbs were notorious. This provides a simple but useful criterion to limit their selection, because highly reactive clones are those that possess high levels of expression and/or high affinity, which are both advantageous features.



**Figure 1.** Reactivity of clones selected by different strategies. The supernatant of 24 Nb clones selected using the A, B, and C panning conditions—clones 1–24, 25–48, and 49–72, respectively—were tested by ELISA on plates coated with Zika virus NS1 (ZVNS1) immobilized using the A (dark gray), B (light gray), or C (gray) strategies. ill-IgG: immune llama immunoglobulin G and BtNS1: biotinylated NS1. Optical density at 450nm (OD450nm) was measured.



**Figure 2.** Reactivity of 22 Nb clones against different concentrations of ZVNS1. The supernatant of each clone was exposed to three different concentrations of ZVNS1 (0.5 ng/mL, 5.0 ng/mL, and 100 ng/mL) passively absorbed in the ELISA wells. Measurements were done by duplicates.

After this initial screening using crude supernatants, we narrowed the selection to nine of the most promising Nbs and cloned them into the pINQ-BtH6 vector for further characterization. This vector allows the high-yield expression of soluble nanobodies, as well as their enzymatically site-specific biotinylation in a 15-mer biotin-acceptor-peptide (BtAP) tag [24]. Every selected clone was produced in large scale and purified, and identical concentrations were then titrated against a fixed amount of ZVNS1 (100 ng/well) to rank their relative affinities. The Nb concentration values causing 50% of signal saturation (SC<sub>50</sub>) were then used as an estimator of their relative affinity for the antigen (Figure 3). All nanobodies reacted with ZVNS1 at a low concentration, with similar SC<sub>50</sub> in the 1.5–8.2 ng/mL range.



**Figure 3.** Titration curves of the selected capture nanobodies. Decreasing concentrations of each nanobody were exposed to a fixed concentration of ZVNS1 (100 ng/well) directly adsorbed on the ELISA well. Measurements were done by triplicates.  $SC_{50}$ : 50% signal saturation and BtNb: biotinylated nanobodies.

#### 3.2. Most Capture Nbs Had Negligible Cross-Reactivity with Other Flavivirus NS1 Proteins

Due to high-sequence conservation among flavivirus NS1 proteins (47–57% identity [27]), the undesired cross-reactivity of the Nbs might give a place to the false-positive diagnostic results, which is evident from the high degree of cross-reactivity of the sera from flavivirus-infected patients when NS1 is used as the antigen for serology. Therefore, we assayed the reactivity of the Nbs against the NS1 protein of Yellow fever, Dengue type 1, West Nile, and Saint Louis viruses (Figure 4). With the exception of Nb38 that showed a small degree of cross-reactivity with the NS1 from Yellow Fever, Dengue, and West Nile viruses, the OD signals obtained for the rest of the Nbs were negligible and similar to that obtained against BSA. The fact that most Nbs define highly Zika virus-specific epitopes is of high diagnostic relevance, since many countries are endemic for more than one flavivirus infection.



**Figure 4.** Evaluation of the cross-reactivity of the capture nanobody candidates against different flavivirus NS1 proteins. A fixed concentration of antibody was loaded into wells coated with 100 ng of NS1 from Zika virus (ZV), Yellow Fever virus (YFV), Dengue type 1 virus (DV), West Nile virus (WNV), Saint Louis Encephalitis virus (SLV), and bovine serum albumin (BSA) as a negative control. Measurements were done by triplicates.

#### 3.3. Selection of Best Nanobody Pair for the Detection of ZVNS1

A high-throughput approach was applied for the identification of the detection antibodies. First, based on their relative affinity, its performance in the serum, and yields of expression, we selected four capture-Nb candidates (BtNB22, BtNb246, BtNb278, and BtNb32) to screen for the best detection antibodies. These four BtNb were individually immobilized on four streptavidin-coated microtiter plates, which, in turn, were used to capture a limited amount of ZVNS1 (2 ng/well). Then, the captured ZVNS1 was detected using the 72 Nb supernatants from the master plate, prepared as described above (Figure 5). Except for a few exceptions, the working pairs were essentially the same for the four capture Nbs, suggesting that they may target overlapping epitopes on ZVNS1. Interestingly, the Nbs panned on the ZVNS1 directly adsorbed on the wells (condition A) were less efficient at forming pairs, suggesting that some of them react to denatured epitopes. In general, Nb32Bt formed a larger number of productive pairs and outperformed the others in terms of higher readouts. For that reason, Nb32 was chosen as the capture antibody, and sixteen of the detection Nbs producing the highest signals were selected to optimize the assay.



**Figure 5.** Pairwise screening of detection Nbs. The four capture Nb candidates (BtNB22, BtNb246, BtNb278, and BtNb32) were used to capture ZVNS1 (2 ng/well) and were assayed against the 72 master plate Nb supernatants. Black, gray, and white are used to denote detection Nbs selected with the A, B, and C panning strategies, respectively. The horizontal lines represent the mean OD values.

Sixteen of the detecting Nb clones that produced the highest readouts in combination with BtNb32 were sequenced, and 10 unique sequences were obtained (Figure S4), three of which (E1, A7, and B8) also appeared in the capture Nb panel shown in Figure S3 (38, 224, and 210). The Nb genes of these 10 clones were transferred to the pINQ-H6HA vector for high-yield expression of the soluble nanobody fused to a HA tag (HANb). The purified HA-tagged Nbs were tested for cross-reactivity with other flavivirus NS1, as described above (Figure 6). Except for clone A7, neither of the Nbs displayed significant reactivity with any unspecific NS1 proteins. Considering that, the catching Nb is also devoid of cross-reactivity with these proteins; this result provides an additional layer of safety to warrant the specificity of the sandwich assay.



**Figure 6.** Evaluation of the cross-reactivity of the detection-nanobody candidates against different flavivirus NS1 proteins. Nanobodies were exposed to wells sensitized with 1.0 µg of NS1 from Zika Virus (ZV), Dengue Virus (DV), Yellow Fever Virus (YFV), West Nile Virus (WNV). Bovine serum albumin (BSA) was used as the negative control.

To further select the Nb partner to be used with Bt32 as the capture Nb, individual calibration curves were done for each of the selected secondary antibodies.  $SC_{50}$  values were used as indicators of assay sensitivity (Figure 7). Based on these results, the HANbD6 was chosen as the detection Nb.



**Figure 7.** Calibration curves of the best-performing pairs. The sandwich ELISA was performed using BtNb32 as the capture antibody in combination with ten detection clones. The NbB9 with specificity for human hemoglobin was used as a negative control. The concentration corresponding to 50% of the maximum readout, SC<sub>50</sub> (ng/mL), for each different pair is shown. Measurements were done by triplicates.

#### 3.4. Development of a Nano-Sandwich ELISA for Quantification of ZVNS1

Based on the overall results of the pairwise screening, the pair BtNb32/HANbD6 (32/D6) was chosen to develop the ZVNS1 32/D6 assay (Figure 8). The analytical parameters of the sandwich ELISA in saline buffer were determined. The extended range of the calibration curve was 0.20–200 ng/mL, with a linear range of 0.20–6.25 ng/mL, showing the high sensitivity achieved. Despite the fact that Nb32 and NbD6 did not show cross-reactivity with other NS1 proteins, we tested the specificity of the assay in solution against the panel flavivirus NS1 proteins (Figure S5). As expected, no cross-reactivity was observed.



**Figure 8.** ZVNS1-32/D6 nanobody sandwich ELISA for the detection of ZVNS1. Extended (left) and linear (right)-range calibration curves performed in phosphate-buffered saline (PBS) or serum dilutions. The results are the average values of triplicate measurements, and the error bars represent the standard deviation.

To evaluate the possible interference of the matrix, identical calibration curves were also run using 1/10 and 1/2 dilutions of a pool of healthy serum samples. As expected, considering that human sera was used during the selection of the nanobodies, no significant interference of this matrix was noticed, even using a high serum concentration. To further analyze this point, individual serum samples from healthy donors were enriched with known concentrations of ZVNS1. There is scarce information of the occurrence of ZVNS1 in the blood of Zika-infected patients. Nevertheless, while the mean levels of circulating Dengue1 NS1 antigen were found to be about 120 ng/mL, the mean value reported for the Zika virus was at least four times lower (30 ng/mL), consistent with a lower viremia level [28,29]. Based on these values, and in order to validate the use of the assay to detect trace amounts of the antigen, the ZVNS1-32/D6 test accuracy was established by analyzing the recovery of the antigen from 27 healthy donors' sera spiked with 1.5 or 4.5 ng/mL of ZVNS1 (Table 1). The recoveries for all the samples were within the recommended range by the SANTE guidance document for method validation of the European Union [30]. This showed that the ZVNS1-32/D6 ELISA accurately detects ZVNS1 in different serum samples in the low-ng/mL range. The precision of the method was also assessed by spiking the serum with 0.80, 1.6, and 3.1 ng/mL of ZVNS1. The sample was analyzed five times in the same day (intraday precision) (Table 2) or five times on five different days (interday precision) (Table 3). In both cases, the percent coefficient of variation (CV%) was lower than the acceptance criteria (CV < 20%) recommended by the SANTE guidelines.

	Unspiked	Spiked ZVNS	1 1.50 ng/mL	Spiked ZVNS	1 4.50 ng/mL			
Sample	ZVNS1 ng/mL	ZVNS1 ng/mL	% Recovery	ZVNS1 ng/mL	% Recovery			
1	<loq< td=""><td><math display="block">1.18\pm0.10</math></td><td>78</td><td><math>4.62 \pm 0.13</math></td><td>103</td></loq<>	$1.18\pm0.10$	78	$4.62 \pm 0.13$	103			
2	<loq< td=""><td><math>1.35 \pm 0.03</math></td><td>90</td><td><math>3.54 \pm 0.04</math></td><td>79</td></loq<>	$1.35 \pm 0.03$	90	$3.54 \pm 0.04$	79			
3	<loq< td=""><td><math>1.55 \pm 0.01</math></td><td>103</td><td><math>4.35 \pm 0.09</math></td><td>97</td></loq<>	$1.55 \pm 0.01$	103	$4.35 \pm 0.09$	97			
4	<loq< td=""><td><math>1.43 \pm 0.19</math></td><td>95</td><td><math>3.97 \pm 0.12</math></td><td>88</td></loq<>	$1.43 \pm 0.19$	95	$3.97 \pm 0.12$	88			
5	<loq< td=""><td><math>1.36 \pm 0.01</math></td><td>90</td><td><math>4.20 \pm 0.01</math></td><td>93</td></loq<>	$1.36 \pm 0.01$	90	$4.20 \pm 0.01$	93			
6	<loq< td=""><td><math>1.32 \pm 0.20</math></td><td>88</td><td><math>3.68 \pm 0.23</math></td><td>82</td></loq<>	$1.32 \pm 0.20$	88	$3.68 \pm 0.23$	82			
7	<loq< td=""><td><math>1.33 \pm 0.16</math></td><td>89</td><td><math display="block">4.14\pm0.05</math></td><td>92</td></loq<>	$1.33 \pm 0.16$	89	$4.14\pm0.05$	92			
8	<loq< td=""><td><math>1.66 \pm 0.09</math></td><td>110</td><td><math>5.26 \pm 0.07</math></td><td>117</td></loq<>	$1.66 \pm 0.09$	110	$5.26 \pm 0.07$	117			
9	<loq< td=""><td><math>1.57 \pm 0.12</math></td><td>105</td><td><math>4.96 \pm 0.13</math></td><td>110</td></loq<>	$1.57 \pm 0.12$	105	$4.96 \pm 0.13$	110			
10	<loq< td=""><td><math>1.08 \pm 0.05</math></td><td>72</td><td><math>4.02 \pm 0.15</math></td><td>89</td></loq<>	$1.08 \pm 0.05$	72	$4.02 \pm 0.15$	89			
11	<loq< td=""><td><math>1.27 \pm 0.10</math></td><td>84</td><td><math>3.91 \pm 0.01</math></td><td>87</td></loq<>	$1.27 \pm 0.10$	84	$3.91 \pm 0.01$	87			
12	<loq< td=""><td><math>1.77 \pm 0.09</math></td><td>118</td><td><math display="block">4.10\pm0.10</math></td><td>91</td></loq<>	$1.77 \pm 0.09$	118	$4.10\pm0.10$	91			
13	<loq< td=""><td><math>1.17 \pm 0.21</math></td><td>78</td><td><math>3.96 \pm 0.02</math></td><td>88</td></loq<>	$1.17 \pm 0.21$	78	$3.96 \pm 0.02$	88			
14	<loq< td=""><td><math>1.53 \pm 0.14</math></td><td>102</td><td><math>3.46 \pm 0.15</math></td><td>77</td></loq<>	$1.53 \pm 0.14$	102	$3.46 \pm 0.15$	77			
15	<loq< td=""><td><math>1.29 \pm 0.18</math></td><td>86</td><td><math display="block">4.58\pm0.10</math></td><td>102</td></loq<>	$1.29 \pm 0.18$	86	$4.58\pm0.10$	102			
16	<loq< td=""><td><math>1.30 \pm 0.06</math></td><td>87</td><td><math>4.20 \pm 0.03</math></td><td>93</td></loq<>	$1.30 \pm 0.06$	87	$4.20 \pm 0.03$	93			
17	<loq< td=""><td><math>1.30 \pm 0.30</math></td><td>86</td><td><math>4.17 \pm 0.21</math></td><td>93</td></loq<>	$1.30 \pm 0.30$	86	$4.17 \pm 0.21$	93			
18	<loq< td=""><td><math>1.54 \pm 0.11</math></td><td>102</td><td><math display="block">4.77\pm0.04</math></td><td>106</td></loq<>	$1.54 \pm 0.11$	102	$4.77\pm0.04$	106			
19	<loq< td=""><td><math>1.31 \pm 0.02</math></td><td>87</td><td><math>4.49 \pm 0.13</math></td><td>100</td></loq<>	$1.31 \pm 0.02$	87	$4.49 \pm 0.13$	100			
20	<loq< td=""><td><math>1.82 \pm 0.09</math></td><td>121</td><td><math>4.22 \pm 0.20</math></td><td>94</td></loq<>	$1.82 \pm 0.09$	121	$4.22 \pm 0.20$	94			
21	<loq< td=""><td><math display="block">1.60\pm0.14</math></td><td>107</td><td><math display="block">4.19\pm0.05</math></td><td>93</td></loq<>	$1.60\pm0.14$	107	$4.19\pm0.05$	93			
22	<loq< td=""><td><math>1.38 \pm 0.25</math></td><td>92</td><td><math display="block">4.47\pm0.19</math></td><td>99</td></loq<>	$1.38 \pm 0.25$	92	$4.47\pm0.19$	99			
23	<loq< td=""><td><math>1.48 \pm 0.06</math></td><td>99</td><td><math display="block">4.62\pm0.01</math></td><td>103</td></loq<>	$1.48 \pm 0.06$	99	$4.62\pm0.01$	103			
24	<loq< td=""><td><math>1.14 \pm 0.10</math></td><td>76</td><td><math display="block">4.19\pm0.10</math></td><td>93</td></loq<>	$1.14 \pm 0.10$	76	$4.19\pm0.10$	93			
25	<loq< td=""><td><math>1.34 \pm 0.19</math></td><td>89</td><td><math>3.88 \pm 0.31</math></td><td>86</td></loq<>	$1.34 \pm 0.19$	89	$3.88 \pm 0.31$	86			
26	<loq< td=""><td><math>1.30 \pm 0.01</math></td><td>86</td><td><math>3.14 \pm 0.04</math></td><td>70</td></loq<>	$1.30 \pm 0.01$	86	$3.14 \pm 0.04$	70			
27	<loq< td=""><td><math>1.54 \pm 0.27</math></td><td>103</td><td><math>3.89 \pm 0.11</math></td><td>86</td></loq<>	$1.54 \pm 0.27$	103	$3.89 \pm 0.11$	86			

Table 1. Analysis of recovery in ZVNS1 spiked serum samples.

Samples were measured in triplicates. The mean value ± the standard deviation is shown. Spiked-ZVNS1: Zika virus NS1 and LOQ: limit of quantification.

			.80 ng/mL	Spiking 1	.60 ng/mL	Spiking 3.10 ng/mL		
Assay	Unspiked Serum	Measured (ng/mL)	Recovery %	Measured (ng/mL)	Recovery %	Measured (ng/mL)	Recovery %	
1	<loq< td=""><td>0.81</td><td>102</td><td>1.51</td><td>94</td><td>3.16</td><td>102</td></loq<>	0.81	102	1.51	94	3.16	102	
2	<loq< td=""><td>0.81</td><td>102</td><td>1.52</td><td>95</td><td>3.18</td><td>102</td></loq<>	0.81	102	1.52	95	3.18	102	
3	<loq< td=""><td>0.69</td><td>86</td><td>1.47</td><td>92</td><td>3.21</td><td>104</td></loq<>	0.69	86	1.47	92	3.21	104	
4	<loq< td=""><td>0.77</td><td>96</td><td>1.54</td><td>96</td><td>3.21</td><td>104</td></loq<>	0.77	96	1.54	96	3.21	104	
5	<loq< td=""><td>0.76</td><td>95</td><td>1.51</td><td>94</td><td>3.19</td><td>103</td></loq<>	0.76	95	1.51	94	3.19	103	
Average		0.77	96	1.51	94	3.2	102.8	
CV%		5.1		2.3		2.3		

Table 2. Intraday precision of the test with ZVNS1-spiked serum.

Samples spiked with 0.80, 1.60, or 3.10 of ZVNS1 were diluted 2 times and measured by the 32/D6 ELISA. CV%: percent coefficient of variation.

Table 3. Interday precision of the test with ZVNS1-spiked serum.

		Spiking 0	.80 ng/mL	Spiking 1	.60 ng/mL	Spiking 3.10 ng/mL		
Day	Unspiked Serum	Measured (ng/mL)	Recovery %	Measured (ng/mL)	Recovery %	Measured (ng/mL)	Recovery %	
1	<loq< td=""><td>0.77</td><td>97</td><td>1.56</td><td>104</td><td>3.02</td><td>97</td></loq<>	0.77	97	1.56	104	3.02	97	
2	<loq< td=""><td>0.67</td><td>84</td><td>1.38</td><td>86</td><td>2.84</td><td>92</td></loq<>	0.67	84	1.38	86	2.84	92	
3	<loq< td=""><td>0.65</td><td>82</td><td>1.64</td><td>106</td><td>3.22</td><td>104</td></loq<>	0.65	82	1.64	106	3.22	104	
4	<loq< td=""><td>0.58</td><td>73</td><td>1.48</td><td>92</td><td>2.97</td><td>96</td></loq<>	0.58	73	1.48	92	2.97	96	
5	<loq< td=""><td>0.77</td><td>98</td><td>1.51</td><td>94</td><td>3.19</td><td>103</td></loq<>	0.77	98	1.51	94	3.19	103	
Average		0.69	86.8	1.51	96.4	3.05	98.4	
CV%		8.1		9.8		16.0		

Samples spiked with 0.80, 1.60, or 3.10 of ZVNS1 were diluted 2 times and measured by the 32/D6 ELISA.

#### 4. Conclusions

Owing to its sensitivity and high specificity, the molecular diagnosis of Zika virus infections is key to the management of the disease. Alternatively, the detection of circulating ZVNS1 represents a simpler affordable option for acute diagnosis of the disease, but due to the extended similarity of flavivirus antigens, it requires a highly specific and sensitive antibody pair [16]. In this work, we generated a large library from a hyperimmunized llama and used a two-step high-throughput selection process geared to optimize the final sensitivity of the assay. The limit of quantification of the test in the serum, 0.80 ng/mL, was established experimentally by studying its recovery (accuracy) and reproducibility with a panel of spiked serum samples. This sensitivity compared favorably with other well-established antibody-based assays for NS1, such as the one described by Bosch et al. that was able to detect up to 18 ng/mL [28]. Moreover, Nb32 and NbD6 are fully devoid of cross-reactivity with other flaviviruses, which is of paramount importance for their potential diagnostic applications in countries that are endemic for coexisting flaviviruses. Considering that these Nbs can be fully reproduced at very low costs from their amino acid sequences (provided in this study), the ZVNS1-32/D6 ELISA could be replicated in any laboratory and be the basis for an affordable tool for the early diagnosis of ZIKV. Nevertheless, a validation process with relevant patient serum samples should be conducted locally in order to demonstrate its diagnostic value.

**Supplementary Materials:** The following are available online at http://www.mdpi.com/2218-273X/10/12/1652/s1: Figure S1: Serum titration against ZVNS1 along the immunization process. Figure S2: Performance of 22 Nb clones in the presence of human serum. Figure S3: Capture Nbs to ZVNS1 sequence alignment. Figure S4: Detection Nbs to ZVNS1 sequence alignment. Figure S5: Analysis of the cross-reactivity of the 32/D6 nanobody pair with non-Zika NS1.

Author Contributions: Conceptualization G.G.-S.; methodology, T.D.-R., M.R., and C.L.; validation, T.D.-R.; investigation, T.D.-R. and R.A.-R.; resources, G.G.-S. and C.L.; supervision, M.R. and G.G.-S.; writing—original draft preparation, T.D.-R.; writing—review and editing, G.G.-S.; and funding acquisition, G.G.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported with funds provided by CSIC 2007-348 UdelaR and FMV 2017\_1\_136206 ANII Uruguay. Triana Delfin-Riela was the recipient of a scholarship from ANII-Uruguay.

Acknowledgments: We thank the staff of Parque Lecoq, IMM, Montevideo for their collaboration with the llama immunization.

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

#### References

- Dick, G.W.; Kitchen, S.F.; Haddow, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1952, 46, 509–520. [CrossRef]
- 2. Heukelbach, J.; Alencar, C.H.; Kelvin, A.A.; de Oliveira, W.K.; de Goes Cavalcanti, L.P. Zika virus outbreak in Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2016**, *10*, 116–120. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Faria, N.R.; Azevedo, R.; Kraemer, M.U.G.; Souza, R.; Cunha, M.S.; Hill, S.C.; Theze, J.; Bonsall, M.B.; Bowden, T.A.; Rissanen, I.; et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **2016**, *352*, 345–349. [CrossRef] [PubMed]
- 4. Eppes, C.; Rac, M.; Dunn, J.; Versalovic, J.; Murray, K.O.; Suter, M.A.; Sanz Cortes, M.; Espinoza, J.; Seferovic, M.D.; Lee, W.; et al. Testing for Zika virus infection in pregnancy: Key concepts to deal with an emerging epidemic. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2017**, *216*, 209–225. [CrossRef] [PubMed]
- 5. Brown, W.C.; Akey, D.L.; Konwerski, J.R.; Tarrasch, J.T.; Skiniotis, G.; Kuhn, R.J.; Smith, J.L. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 865–867. [CrossRef]
- 6. Landry, M.L.; St George, K. Laboratory diagnosis of Zika virus infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2017**, 141, 60–67. [CrossRef]

- Rossini, G.; Gaibani, P.; Vocale, C.; Cagarelli, R.; Landini, M.P. Comparison of Zika virus (ZIKV) RNA detection in plasma, whole blood and urine—Case series of travel-associated ZIKV infection imported to Italy, 2016. *J. Infect.* 2017, 75, 242–245. [CrossRef]
- Priyamvada, L.; Quicke, K.M.; Hudson, W.H.; Onlamoon, N.; Sewatanon, J.; Edupuganti, S.; Pattanapanyasat, K.; Chokephaibulkit, K.; Mulligan, M.J.; Wilson, P.C.; et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, *113*, 7852–7857. [CrossRef]
- 9. Zaidi, M.B.; Cedillo-Barron, L.; Gonzalez, Y.A.M.E.; Garcia-Cordero, J.; Campos, F.D.; Namorado-Tonix, K.; Perez, F. Serological tests reveal significant cross-reactive human antibody responses to Zika and Dengue viruses in the Mexican population. *Acta Trop.* **2020**, *201*, 105201. [CrossRef]
- Felix, A.C.; Souza, N.C.S.; Figueiredo, W.M.; Costa, A.A.; Inenami, M.; da Silva, R.M.G.; Levi, J.E.; Pannuti, C.S.; Romano, C.M. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J. Med. Virol.* 2017, *89*, 1477–1479. [CrossRef]
- 11. Muller, D.A.; Young, P.R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antivir. Res.* **2013**, *98*, 192–208. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Gutsche, I.; Coulibaly, F.; Voss, J.E.; Salmon, J.; d'Alayer, J.; Ermonval, M.; Larquet, E.; Charneau, P.; Krey, T.; Megret, F.; et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8003–8008. [CrossRef] [PubMed]
- Alcon, S.; Talarmin, A.; Debruyne, M.; Falconar, A.; Deubel, V.; Flamand, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 376–381. [CrossRef] [PubMed]
- 14. Allonso, D.; Meneses, M.D.; Fernandes, C.A.; Ferreira, D.F.; Mohana-Borges, R. Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from a 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113634. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Russo, F.B.; Jungmann, P.; Beltrao-Braga, P.C.B. Zika infection and the development of neurological defects. *Cell Microbiol.* **2017**, *19*. [CrossRef] [PubMed]
- Andreata-Santos, R.; Pereira, S.S.; Pereira, L.R.; Felix, A.C.; Romano, C.M.; Ferreira, L.C.S. Specificity of NS1-based immunochromatographic tests for dengue virus with regard to the Zika virus protein. *Int. J. Infect. Dis.* 2020, 95, 276–278. [CrossRef]
- Hamers-Casterman, C.; Atarhouch, T.; Muyldermans, S.; Robinson, G.; Hamers, C.; Songa, E.B.; Bendahman, N.; Hamers, R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993, 363, 446–448. [CrossRef]
- 18. Gonzalez-Sapienza, G.; Rossotti, M.A.; Tabares-da Rosa, S. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 977. [CrossRef]
- 19. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 775–797. [CrossRef]
- 20. van der Linden, R.H.; Frenken, L.G.; de Geus, B.; Harmsen, M.M.; Ruuls, R.C.; Stok, W.; de Ron, L.; Wilson, S.; Davis, P.; Verrips, C.T. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1431, 37–46. [CrossRef]
- Rossotti, M.A.; Pirez, M.; Gonzalez-Techera, A.; Cui, Y.; Bever, C.S.; Lee, K.S.; Morisseau, C.; Leizagoyen, C.; Gee, S.; Hammock, B.D.; et al. Method for sorting and pairwise selection of nanobodies for the development of highly sensitive sandwich immunoassays. *Anal. Chem.* 2015, *87*, 11907–11914. [CrossRef]
- 22. Delfin-Riela, T.; Rossotti, M.A.; Echaides, C.; Gonzalez-Sapienza, G. A nanobody-based test for highly sensitive detection of hemoglobin in fecal samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 389–396. [CrossRef]
- 23. Tabares-da Rosa, S.; Rossotti, M.; Carleiza, C.; Carrion, F.; Pritsch, O.; Ahn, K.C.; Last, J.A.; Hammock, B.D.; Gonzalez-Sapienza, G. Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7213–7220. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Rossotti, M.; Tabares, S.; Alfaya, L.; Leizagoyen, C.; Moron, G.; Gonzalez-Sapienza, G. Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1850*, 1397–1404. [CrossRef] [PubMed]

- 25. Chapman-Smith, A.; Turner, D.L.; Cronan, J.E., Jr.; Morris, T.W.; Wallace, J.C. Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of Escherichia coli acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. J.* **1994**, *302*, 881–887. [CrossRef] [PubMed]
- Harmsen, M.M.; Ruuls, R.C.; Nijman, I.J.; Niewold, T.A.; Frenken, L.G.; de Geus, B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol. Immunol.* 2000, 37, 579–590. [CrossRef]
- 27. Song, H.; Qi, J.; Haywood, J.; Shi, Y.; Gao, G.F. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 456–458. [CrossRef] [PubMed]
- 28. Bosch, I.; de Puig, H.; Hiley, M.; Carre-Camps, M.; Perdomo-Celis, F.; Narvaez, C.F.; Salgado, D.M.; Senthoor, D.; O'Grady, M.; Phillips, E.; et al. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*. [CrossRef] [PubMed]
- 29. de la Cruz-Hernandez, S.I.; Flores-Aguilar, H.; Gonzalez-Mateos, S.; Lopez-Martinez, I.; Alpuche-Aranda, C.; Ludert, J.E.; del Angel, R.M. Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *88*, 446–454. [CrossRef]
- 30. SANTE/11813/2017. Available online: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\_mrl\_guidelines\_wrkdoc\_2017-11813.pdf (accessed on 24 November 2020).

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



© 2020 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 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

# 1 Nanobody-based Blocking of Binding ELISA for the detection of anti-NS1 Zika virus

# 2 specific antibodies in convalescent infections.

<sup>1</sup>Delfin-Riela, Triana; <sup>1</sup>Rossotti, Martín. A.; <sup>2</sup>Mattiuzzo Giada.; <sup>3</sup>Echaides César, <sup>1</sup>\*Gonzalez-

4 Sapienza, Gualberto.

# 5

<sup>1</sup>Cátedra de Inmunología, DEPBIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UDELAR,

7 Montevideo, Uruguay. <sup>2</sup>Division of Virology, National Institute for Biological Standards and

8 Control (NIBSC)-MHRA, South-Mimms, UK. <sup>3</sup>Parque Lecoq, IMM, Montevideo Uruguay.

9 \*Corresponding author. Av. A. Navarro 3051, 2nd floor. 11600 Montevideo, Uruguay,

10 ggonzal@fq.edu.uy, (598) 24874334.

11

# 12 Abstract

13 Zika virus was first reported in Uganda in 1947 and within the last five years has spread all over 14 the world at a fast pace. Although its symptoms are mild and unspecific, Zika virus (ZIKV) 15 infections have been associated with *Guillian Barré* syndrome in adults, but its major impact occurs during pregnancy where it is associated with several neurological birth defects, 16 collectively known as congenital Zika syndrome. Serology has a key role in the management of 17 this infection, but its use is limited by the uncertainty caused by cross-reacting antibodies 18 elicited in response to other flavivirus infections. This can be overcome by the development of 19 blocking of binding tests that allow to discriminate between ZIKV-specific and other flavivirus 20 cross-reacting antibodies. Using a panel of single domain antibodies (nanobodies) to the Zika 21 22 non-structural protein (NS1) and anti-ZIKV reference sera, we identified a set of six nanobodies that react specifically with an immunogenic region of NS1 and show a marked inhibition of
binding when NS1 is pre-reacted with ZIKV patient sera, but not with sera from patients with
other flavivirus infections. Considering that these single domain antibodies might be easily
reproduced in a standardize fashion from their sequence, these nanobodies can be use by
laboratories to instrument and validate and to build diagnostic capacity for this disease.

28 Keywords

29 Serology, Flavivirus, Immunoassay, Phage Display, Single domain antibody.

30 Abbreviations

ZV-NS1: Zika virus NS1; HRP- horseradish peroxidase; Nb- Nanobody; Stp- streptavidin
 32

# 33 **1. Introduction**

Zika virus (ZIKV) was reported for the first time in Uganda in 1947 and remained almost 34 unnoticed until two major outbreaks took place in French Polynesia and Brazil in 2013 and 2015, 35 36 respectively (Cao-Lormeau et al., 2014; Dick et al., 1952; Faria et al., 2016; Heukelbach et al., 37 2016). Short after that, ZIKV rapidly disseminated and accordingly to the World Health Organization (WHO), nowadays it affects more than 80 countries around the globe 38 39 (https://www.who.int/health-topics/zika-virus-disease#tab=tab\_1). ZIKV is an arbovirus from 40 Flaviviridae family and its main route of transmission is by infected Aedes spp. mosquitoes' bites. 41 However, it can also spread by sexual contact and is vertically transmitted (Mlakar et al., 2016; 42 Musso et al., 2015). As a neurotropic virus, it has been associated with Guillian Barré Syndrome in adults and during pregnancy with neurological birth defects, collectively known as Congenital 43

Zika Syndrome (CZS) (Moore et al., 2017). The method of choice for the diagnosis of acute ZIKV 44 infection is the detection of viral RNA, present in the blood by real time polymerase chain 45 46 reaction (RT PCR) (Bingham et al., 2016). As the viraemia in blood is short-lived (5-7 days), the detection of IgM and IgG antibodies is the most suitable method for diagnosis in the 47 convalescent phase. Due to the high level of similarity among flaviviruses, considerable 48 immunological cross-reactivity has been observed between them (Song et al., 2016). Thus, false-49 positive anti-ZIKV reactions might be common in regions where Flavivirus infections overlap 50 51 (Dejnirattisai et al., 2016; Priyamvada et al., 2016). Flavivirus serology assays are generally based 52 on the detection of antibodies against structural antigens, mostly the envelope protein (E). However, structural proteins are highly conserved, hence antibodies against them cross-react to 53 54 a great extent providing a poor diagnostic value (Priyamvada et al., 2016; Rockstroh et al., 2019). It is essential to count on dependable serological tests for ZIKV infection diagnosis in order to 55 56 evaluate the general population seroprevalence, especially in pregnant women. Moreover, it is relevant to measure the incidence of CZS among this particular population as well as to identify 57 other possible neurological complications associated to this infection (Liang et al., 2019). 58 Therefore, the development of serology methods that could unequivocally diagnose ZIKV in 59 Flavivirus endemic settings is of extreme importance. The Non Structural 1 (NS1) protein is less 60 61 conserved among flaviviruses, thus, it has been proposed as a more reliable diagnostic 62 biomarker. NS1 induces a strong IgG response and seroconversion occurs as early as 5-8 days after initial symptoms (Huang et al., 1999; Shu et al., 2004). However, despite its lower identity 63 with other viral NS1, several studies have shown that current anti-ZIKV antibody assays using 64 65 this antigen, while highly sensitive, do not reliably distinguish among flavivirus infections, mostly

due to the great extent of cross reactivity observed with serum samples from DENV infected 66 67 patients (Felix et al., 2017; Zaidi et al., 2020). To overcome this, Balmaseda et al. used a human monoclonal antibody, previously shown to define a specific NS1 ZIKV epitope, to develop an 68 inhibition of binding assay, and they could efficiently distinguish ZIKV from other flaviviruses. 69 70 This ELISA works by comparing the binding of the selective antibody to the immobilized ZV-NS1 71 in the presence or absence of infected patient's sera, as illustrated in **figure 1** (Balmaseda et al., 2017). While this represents a great progress in the serodiagnosis of Zika infection, a limitation 72 73 of this assay is the use of a specific anti-ZV antibody. Availability of antibodies with similar specificity, and known published sequence, will make this method reproducible in any laboratory 74 to facilitate and extend the use of this diagnostic format. 75



76

Figure 1. Scheme of the blocking of binding assay with Nbs. The NS1 from Zika and other flaviviruses (OFV)
 have some unique epitopes (A, B and A', B', respectively), and share others (represented by C). For the development of a blocking of binding assay, the Nbs need to fulfill two conditions: they must react with a ZIKV NS1 specific epitope, and that epitope has to be immunogenic in human infections with the virus. In the scheme,
 NbA and NbB do react with unique epitopes, but NbB recognizes an epitope that is not immunogenic in humans, and therefore, there are no blocking antibodies in the serum of the infected patients. Hence, only NbA is suited to developed a blocking of binding assay.

79

The recombinant fragment (nanobodies) derived from the variable domain (VHH) of heavy 80 81 chain only antibodies, found in camelids, have salient biotechnological properties and can be 82 readily reproduced from their sequences (Hamers-Casterman et al., 1993). These antibodies possess numerous advantages for immunoassay development compared to conventional 83 84 antibodies, such as high soluble expression levels, small size, excellent thermal stability, simple genetic manipulation, among others (Gonzalez-Sapienza et al., 2017; Muyldermans, 2013; van 85 86 der Linden et al., 1999). In the past, we have developed high throughput methods for the 87 generation and selection of nanobodies (Nbs) for sensitive detection of biomarkers in complex matrixes (Delfin-Riela et al., 2020b; Rossotti et al., 2015). Recently, we developed a large panel of 88 Nbs to ZIKV NS1 and selected pairs of Nbs that allow the sensitive detection of the antigen in 89 90 serum samples (Delfin-Riela et al., 2020a). In the present study, this panel was further used to select Nbs defining ZIKV NS1 specific epitopes that can be used in inhibition assays to 91 92 differentiate ZIKV infections. Considering that this Nbs can be recombinant produced from their sequence, they can be used to develop highly specific, low cost in house blocking of binding 93 ELISAs for reliable detection of ZIKV infections. 94

95 2. Materials and Methods

# 96 2.1 Materials

ZIKV NS1 protein as well as NS1 form other flaviviruses including Dengue 1 (DV1), Yellow Fever
(YFV) and Saint Louis (SLV) were purchased from The Native Antigen Company, Inc. (Oxford, OX
UK). ELISA strips and plates (Greiner Bio- One, Monroe, NC, USA). Peroxidase conjugated
streptavidin (Thermofisher, Rockford, IL, USA). Other conjugated-antibodies were acquired from
Abcam (Cambridge, MA, USA). 3,3',5,5'-D-biotin (Amresco, Wayne, PA, USA).

102 Tetramethylbenzidine (TMB) and other common chemicals were purchased from Sigma-Aldrich103 (Mississauga, CA, USA).

104 The WHO 1<sup>st</sup> international standard for anti-Asian linage ZIKV antibody (IS 16 352), the Standard Reagents for anti-ZIKV antibody IS 16 320 and sample16 328, convalescent serum pool from 105 recovered ZIKV-infected patients were obtained from the National Institute for Biological 106 107 Standards and Control, UK. RT-PCR and serology confirmed serum samples from patients infected with different flaviviruses, including ZIKV (n=3), Dengue (DV, n=11), Yellow Fever (YFV, 108 109 n=8) and Saint Louis (SLV, n=5) were remnant diagnostic samples provided by the Uruguayan 110 Ministry of Health. Samples from healthy donors from a non-endemic flaviviruses zone were available from previous studies. All samples were de-identified and processed following the 111 112 recommendations of the Comisión de Ética en la Investigación con Seres Humanos of the Facultad de Química, UDELAR. 113

# 114 **2.2 Evaluation of direct ELISA for antibodies detection of Flavivirus immune sera**

ELISA plates were coated with 100µL (0.2 µg/mL) of ZIKV NS1 over night (ON) at 4°C. Plates 115 were washed with PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) and blocked with PBS-1% bovine serum albumin 116 (BSA) for 1h at room temperature (RT). After washing, each plate was incubated for 1h with the 117 118 Flavivirus immune sera, 1/500 diluted, immune serum. A set of naïve sera was also included as a negative control. After washing, 100µL of a mix of anti-IgG:HRP and anti-IgM:HRP at 119 manufacturer's recommended concentration were loaded and incubated for 1h, RT. Finally, 120 plates were washed with PBS-T, and TMB substrate was added for 10 minutes. The enzyme 121 reaction was stopped by addition of 50  $\mu$ L of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the optical density (OD) was then 122 measured at 450 nm with a Fluostar Optima Reader (BMG, Ortenberg, Germany). 123

124

## 2.3 Election of Nbs: binding Inhibition and cross reactivity evaluation

High binding polystyrene plates were coated with 0.20 µg/mL of ZIKV NS1 in PBS, ON at 4°C. 125 Plates were blocked with PBS-1% BSA for 1h at RT, and then washed with PBS-T. Dilutions of 126 anti-ZIKV antibodies standard (for 16-352, 1/20, 1/40 and 1/80 dilutions and for 16-320 and 16-127 328 1/80 dilution), were added and incubated for 1h at RT. After washed with PBS-T the plates 128 129 were loaded with 100µL of 10 biotinylated anti-NS1 Nbs for 1h at RT. The Nbs' concentrations (5.0 to 12ng/mL) were previously selected as the quantity of Nb capable of generate an OD 130 131 450nm of 1UA, when exposed to ZIKV NS1. Plates were washed with PBS-T, and peroxidase 132 conjugated Streptavidin (HRP:Stp) was added and incubated for 1h at RT. Finally, plates were washed with PBS-T and TMB substrate was added for 10 minutes. The enzyme reaction was 133 134 stopped by addition of 50 µL of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and OD 450nm was then measured. The percentage of Binding Inhibition (%BI) was calculated as follows: %BI = [1- (OD sample/OD PBS)] ×100 135 For the cross reactivity study, the procedure was identical to the described above but using 136 137 Flavivirus immune serum pools instead of the anti-ZIKV antibodies standard. The %BI were compared to that obtained with IS 16 352 standard. Finally, a working pool of Nbs (pNb) was 138 constituted with the selected ones.

#### 140 2.4 Optimization of the ELISA

139

High binding polystyrene plates were coated with 0.20  $\mu$ g/mL of ZIKV NS1 in PBS, ON at 4°C. 141 Plates were blocked with PBS-1% BSA for 1h at RT, and then washed with PBS-T. Hundred µL of 142 143 serial dilutions, starting from 1/20 of the three standard sera were incubated 1 hour at RT. After 144 washing with PBS-T the pool of Nbs was added and incubated for an additional hour at RT.

Plates were washed with PBS-T, and HRP-Stp was added and incubated for 1h at RT. Finally, the reaction was developed as mention above. The working dilution was defined as the one that produces a high %BI (over 50%) and does not show any inhibition with negative samples. Using a fix dilution (1/40) of standards 16-328 and 16-352 a variant of the assay was performed. In this case, the incubation of the pool of sera and the Nbs were done in simultaneous. The rest of the steps were equally performed.

The cut-off point of the assay was estimated as the mean %BI obtained when 98 ZIKV-negative
samples were performed in the Nb-BI ELISA, plus 3 standard deviations.

153 Cross-reactivity of the Inhibition ELISA was determined using individual Flavivirus immune serum

samples from patients infected with DV, SLV and YFV. Individual samples from ZIKV positive

patients and anti-ZIKV standard sera were also performed in same the conditions as mentioned

above. The %BI achieved by ZIKV-positive and ZIKV-negative samples were compared to cut-offvalue.

# 158 **2.5 Study of intra-assay and inter-assay reproducibility**

Precision of the method was evaluated by the coefficient of variation (CV) using IS 16\_352 standard, processed at a dilution of 1/40. Intra-assay variation was calculated by making five replicates of the standard in the same day. The inter-assay variability was calculated by testing the standard in quintuplicates, during five consecutive days.

# 163 **3. Results and discussion**

# 164 **3.1 Election of Nbs: binding Inhibition and cross reactivity evaluation**

In spite of the fact that the NS1 proteins are less conserved among flaviviruses as compared to their structural proteins, as shown in **figure S1** there is a large extent of cross-reactivity when other flavivirus patient sera are tested against ZIKV NS1. This is particularly relevant in regions of the world where other flaviviruses coexist.

One possibility to overcome this drawback is to devise a test that only detects the patient's 169 antibodies that react against ZIKV NS1 specific epitopes. As shown by Balmaseda et al. 170 (Balmaseda et al., 2017), this can be done by studying the binding inhibition of monoclonal 171 172 antibodies that selectively target these epitopes, in the presence or absence of patient serum. We recently generated a large panel of nanobodies against native ZIKV NS1 (Delfin-Riela et al., 173 2020a). Eleven of these Nbs (22, 212, 246, 278, 32, 38, 326, 340, 345, D6 and H3) with negligible 174 175 reactivity for DV1, SLV, YFV, and West Nile virus were chosen for this purpose (Delfin-Riela et al., 176 2020a). The Nbs were further selected according to their capability of being inhibited by human anti-ZIKV antibodies, using the WHO anti-ZIKV antibodies IS 16\_352. Previously, the Nbs were 177 titrated against ZIKV NS1 and a working concentrations corresponding to an optical density 178 (OD) of 1.0 UA was selected for each of them (data not shown). The degree of binding inhibition 179 180 caused by the IS 16\_352 standard in these conditions is shown in figure 2. The Nbs 38, D6, 326 181 and 345 were not inhibited by the WHO IS. Considering that this standard consists of a pool of 182 different human sera, it may indicate that these Nbs define epitopes that are not immunogenic 183 in human ZIKV infections, and therefore were not considered. Conversely, the rest of the Nbs showed a relevant degree of inhibition, up to 80% at the highest serum concentration (1/20). To 184 test if this response is affected by the particular immune response of the patients, two additional 185

serum pools were assayed in a similar experiment, and no significant difference was found,



## 187 **figure S2**.

188

Figure 2. Inhibition achieved over different Nbs by anti-ZIKV standard serum. Nbs were challenged to three
 dilutions of IS 16\_352 standard and to a pool of naïve sera (1/20 diluted). The percentage of binding inhibition for
 each Nb is shown. Measurements are the average of duplicates.

192

193 Next, we tested whether the antibodies present in the serum of patients infected with other flaviviruses were able to inhibit the binding of the Nbs. To this end, ZIKV NS1 was incubated 194 195 with various flavivirus immune serum pools, including DV, YFV and SLV, and the %BI for each Nb 196 was compared to those obtained with the IS 16\_352 standard, figure 3. As observed, NbH3 showed a moderately cross reactivity with other flaviviruses serum pools, hence it was discarded. 197 Next, we studied whether the remaining Nbs, 22, 246, 278, 32, 340 and 212, defined unique or 198 199 overlapping epitopes. No complementarity was found for any of their all-against-all pairwise 200 combinations in two-site ELISA, (data not shown). Considering that there are considerable

201 differences in their complementary-determining regions (CDRs) sequences, most probably they 202 react with largely overlapping but not identical epitopes. For that reason, we decided to set up 203 our inhibition test using a pool of these nanobodies.





205

Figure 3. Cross reactive Nb-inhibition by Flavivirus immune sera. Percentages of inhibition achieved for each Nb
 by immune serum pools of: DV, YFV and SLV, compared to those generated by IS 16\_352 standard. Dotted lines
 correspond to 10% and 70% of binding inhibition. Measurements are the average of duplicates.

209

# 210 3.2 Optimization of Inhibition ELISA

To determine the appropriate dilution of the samples, inhibition curves were performed using the three pool of sera from convalescent individuals, **figure 4.** As observed, even with a 1/1280 dilution there was detectable inhibition. Nonetheless, considering that no significant inhibition was observed for the pool of negative sera, we selected 1/40 as working dilution. We also
analyzed the effect of the order in which the reagents were added to maximize the inhibition
effect. As expected, pre-incubation of the immobilized antigen with the patient serum achieved
a significant improvement in the percentage of inhibition compared to the simultaneous
incubation of the patient serum and competing nanobodies, **figure S3**.

219



220

Figure 4. Election of sample dilution by standard curves. Dilutions from 1/20 to 1/2560 of standards as well as a
 pool of naïve sera were analyzed. Measurements were done in duplicates

223 Once the conditions to perform the test were established, the available panel of sera was used

to evaluate its diagnostic potential, **figure 5**. Unfortunately, at the moment of performing this

225 experiment, and in the context of the COVID-19 pandemic, we only have access to a limited 226 number of ZIKV positive sera. For that reason, the cut-off of value of the test could not be established using Receiver Operator Characteristic (ROC) curves. Therefore, it was calculated as 227 the average inhibition percentage of the 98 negative sera plus three standard deviations, 32%. 228 229 By using this cut-off value, all (n=24) non-Zika samples and 97/98 true negative sera were classified as negatives, and the six ZIKV true positive sera were also correctly classified as 230 positive. Among these, it is interesting to highlight that one of the ZIKV positive samples, which 231 232 was collected 10 days after symptoms onset, when antibodies are starting to appear, was also the above the cut-off value. 233



234

235 Figure 5. Inhibition achieved by Flavivirus immune-sera. Immune samples of YFV, DV, SLV and ZIKV as well as

arive sera were performed in duplicates.

### 237 **3.3 Study of the intra-assay and inter-assay reproducibility**

The precision of the method was evaluated by testing the IS 16\_352 NIBSC standard in quintuplicates in the same day (intra-day precision) and in five different days (inter-day precision), **table 1**. In both cases, the coefficient of variation in percentage (CV%) was in accordance with the acceptance criteria (CV < 20%) recommended for clinical assays .

Table 1. Precision parameters	
IS 16_352 Standard	Dilution 1/40
Intra-day precision	
Replicates	5
Mean Value (% inhibition)	68.0
CV%	2.7
Inter-day precision	
Days	5
Mean Value (% inhibition)	65.0
CV%	7.7
CV% coefficient of variation in percentage	

242

# **4. Conclusions**

Blocking of binding tests represent a major progress in the diagnosis of this disease because it overcomes the limitation caused by the presence of cross-reactive antibodies in patients living in regions that are endemic for other flaviviruses. The aim of this study was to identify nanobodies to ZIKV specific epitopes that could be used to produce a similar inhibition test to the one described by Balmaseda et al. As starting point, we used a panel of 10 ZIKV NS1 specific Nbs {Delfin-Riela, 2020 #234}, but interestingly, not all them turned up to be useful for the task.

Indeed, the binding of four of these clones was not blocked by the antibodies present in ZIKV 250 251 patient sera, which demonstrates that the antibodies used as probes for diagnostic inhibition 252 test should address epitopes that are immunogenic in ZIKV infections. An additional clone (H3) had to be discarded because despite lacking reactivity against DV1, WNV, YFV and SLV NS1, it 253 254 seems to define an epitope that partially overlaps with the region of ZIKV NS1 recognized by antibodies present in patients affected by other flavivirus infections. Finally, the remaining six 255 nanobodies that differ strongly in their CDR sequences appear to target a region of ZIKV NS1 256 257 that was highly immunogenic, both in the immunized llama and ZIKV patients, but does not lead 258 to the generation of cross-reactive antibodies in infections with other flaviviruses. In spite of the fact that we did not have access to a large serum panel, using these nanobodies it was possible 259 260 to set up a sensitive test and showed its potential to specifically discriminate ZIKV from other 261 flavivirus infections. Given that nanobodies are perpetuated in silico, laboratories can reproduce 262 them from their sequence in an affordable and standardize fashion, open the opportunity for local developments that after further validation will help to build diagnostic capacity for this 263 264 infection, even in low-resource settings.

#### 265 Acknowledgements

We thank to the Uruguayan Ministry of Health for providing the serum samples. We thank to
Msc. Noelia Morel for her collaboration with conceptualization and proof reading the articlee.
We thank to funding Institutions.

Funding information This work was supported by CSIC [2007-348] and ANII [FMV 2017\_1\_136206].
Triana Delfin-Riela was the recipient of a scholarship from ANII-Uruguay POS\_NAC\_2018\_1\_151654.

## 271 **References**

- 272 Balmaseda, A., Stettler, K., Medialdea-Carrera, R., Collado, D., Jin, X., Zambrana, J.V., Jaconi, S.,
- 273 Cameroni, E., Saborio, S., Rovida, F., Percivalle, E., Ijaz, S., Dicks, S., Ushiro-Lumb, I., Barzon, L., Siqueira,
- P., Brown, D.W.G., Baldanti, F., Tedder, R., Zambon, M., de Filippis, A.M.B., Harris, E., Corti, D., (2017)
- 275 Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. Proceedings of the
- 276 National Academy of Sciences of the United States of America 114, 8384-8389.
- 277 Bingham, A.M., Cone, M., Mock, V., Heberlein-Larson, L., Stanek, D., Blackmore, C., Likos, A., (2016)
- 278 Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with
- Travel-Associated Zika Virus Disease Florida, 2016. MMWR. Morbidity and mortality weekly report 65,
  475-478.
- 281 Cao-Lormeau, V.M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.L., Mallet, H.P., Sall, A.A., Musso, D., (2014)
- Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. Emerging infectious diseases 20, 1085-1086.
- 283 Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T.,
- 284 Sakuntabhai, A., Cao-Lormeau, V.M., Malasit, P., Rey, F.A., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., (2016)
- 285 Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus.
- 286 Nature immunology 17, 1102-1108.
- 287 Delfin-Riela, T., Rossotti, M., Alvez-Rosado, R., Leizagoyen, C., González-Sapienza, G., (2020a) Highly
- Sensitive Detection of Zika Virus Nonstructural Protein 1 in Serum Samples by a Two-Site Nanobody
   ELISA. Biomolecules 10.
- 290 Delfin-Riela, T., Rossotti, M.A., Echaides, C., Gonzalez-Sapienza, G., (2020b) A nanobody-based test for
- highly sensitive detection of hemoglobin in fecal samples. Anal Bioanal Chem 412, 389-396.
- 292 Dick, G.W., Kitchen, S.F., Haddow, A.J., (1952) Zika virus. I. Isolations and serological specificity.
- 293 Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 46, 509-520.
- 294 Faria, N.R., Azevedo, R., Kraemer, M.U.G., Souza, R., Cunha, M.S., Hill, S.C., Theze, J., Bonsall, M.B.,
- 295 Bowden, T.A., Rissanen, I., Rocco, I.M., Nogueira, J.S., Maeda, A.Y., Vasami, F., Macedo, F.L.L., Suzuki, A.,
- 296 Rodrigues, S.G., Cruz, A.C.R., Nunes, B.T., Medeiros, D.B.A., Rodrigues, D.S.G., Queiroz, A.L.N., da Silva,
- 297 E.V.P., Henriques, D.F., da Rosa, E.S.T., de Oliveira, C.S., Martins, L.C., Vasconcelos, H.B., Casseb, L.M.N.,
- Simith, D.B., Messina, J.P., Abade, L., Lourenco, J., Alcantara, L.C.J., de Lima, M.M., Giovanetti, M., Hay,
- 299 S.I., de Oliveira, R.S., Lemos, P.D.S., de Oliveira, L.F., de Lima, C.P.S., da Silva, S.P., de Vasconcelos, J.M.,
- 300 Franco, L., Cardoso, J.F., Vianez-Junior, J., Mir, D., Bello, G., Delatorre, E., Khan, K., Creatore, M., Coelho,
- 301 G.E., de Oliveira, W.K., Tesh, R., Pybus, O.G., Nunes, M.R.T., Vasconcelos, P.F.C., (2016) Zika virus in the 302 Americas: Early epidemiological and genetic findings. Science 352, 345-349.
- 303 Felix, A.C., Souza, N.C.S., Figueiredo, W.M., Costa, A.A., Inenami, M., da Silva, R.M.G., Levi, J.E., Pannuti,
- 304 C.S., Romano, C.M., (2017) Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with
- 305 acute Zika virus infection. Journal of medical virology 89, 1477-1479.
- 306 Gonzalez-Sapienza, G., Rossotti, M.A., Tabares-da Rosa, S., (2017) Single-Domain Antibodies As Versatile
- 307 Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. Front Immunol 8, 977.
- 308 Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B.,
- Bendahman, N., Hamers, R., (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363,
  446-448.
- Heukelbach, J., Alencar, C.H., Kelvin, A.A., de Oliveira, W.K., Pamplona de Goes Cavalcanti, L., (2016) Zika
- 312 virus outbreak in Brazil. Journal of infection in developing countries 10, 116-120.
- Huang, J.H., Wey, J.J., Sun, Y.C., Chin, C., Chien, L.J., Wu, Y.C., (1999) Antibody responses to an
- 314 immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue
- hemorrhagic fever. Journal of medical virology 57, 1-8.

- Liang, B., Guida, J.P., Costa Do Nascimento, M.L., Mysorekar, I.U., (2019) Host and viral mechanisms of
- 317 congenital Zika syndrome. Virulence 10, 768-775.
- 318 Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popovic, M., Poljsak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K.,
- Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., Vizjak, A., Pizem, J., Petrovec, M., Avsic Zupanc, T., (2016) Zika
   Virus Associated with Microcephaly. N Engl J Med 374, 951-958.
- 321 Moore, C.A., Staples, J.E., Dobyns, W.B., Pessoa, A., Ventura, C.V., Fonseca, E.B., Ribeiro, E.M., Ventura,
- L.O., Neto, N.N., Arena, J.F., Rasmussen, S.A., (2017) Characterizing the Pattern of Anomalies in
- 323 Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. JAMA pediatrics 171, 288-295.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M., (2015) Potential sexual
- transmission of Zika virus. Emerging infectious diseases 21, 359-361.
- 326 Muyldermans, S., (2013) Nanobodies: natural single-domain antibodies. Annu Rev Biochem 82, 775-797.
- 327 Priyamvada, L., Quicke, K.M., Hudson, W.H., Onlamoon, N., Sewatanon, J., Edupuganti, S.,
- 328 Pattanapanyasat, K., Chokephaibulkit, K., Mulligan, M.J., Wilson, P.C., Ahmed, R., Suthar, M.S.,
- 329 Wrammert, J., (2016) Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive
- to Zika virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113,
- 331 7852-7857.
- 332 Rockstroh, A., Barzon, L., Kumbukgolla, W., Su, H.X., Lizarazo, E., Vincenti-Gonzalez, M.F., Tami, A.,
- 333 Ornelas, A.M.M., Aguiar, R.S., Cadar, D., Schmidt-Chanasit, J., Ulbert, S., (2019) Dengue Virus IgM
- Serotyping by ELISA with Recombinant Mutant Envelope Proteins. Emerging infectious diseases 25,1111-1115.
- Rossotti, M.A., Pirez, M., Gonzalez-Techera, A., Cui, Y., Bever, C.S., Lee, K.S., Morisseau, C., Leizagoyen,
- C., Gee, S., Hammock, B.D., Gonzalez-Sapienza, G., (2015) Method for Sorting and Pairwise Selection of
- Nanobodies for the Development of Highly Sensitive Sandwich Immunoassays. Analytical chemistry 87,
   11907-11914.
- 340 Shu, P.Y., Chen, L.K., Chang, S.F., Su, C.L., Chien, L.J., Chin, C., Lin, T.H., Huang, J.H., (2004) Dengue virus
- 341 serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture
- immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. Journal of clinical microbiology 42, 2489-
- 343 2494.
- Song, H., Qi, J., Haywood, J., Shi, Y., Gao, G.F., (2016) Zika virus NS1 structure reveals diversity of
- electrostatic surfaces among flaviviruses. Nature structural & molecular biology 23, 456-458.
- van der Linden, R.H., Frenken, L.G., de Geus, B., Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Stok, W., de Ron, L., Wilson,
- 347 S., Davis, P., Verrips, C.T., (1999) Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody
- fragments and mouse monoclonal antibodies. Biochimica et biophysica acta 1431, 37-46.
- Zaidi, M.B., Cedillo-Barron, L., Gonzalez, Y.A.M.E., Garcia-Cordero, J., Campos, F.D., Namorado-Tonix, K.,
- Perez, F., (2020) Serological tests reveal significant cross-reactive human antibody responses to Zika and
- 351 Dengue viruses in the Mexican population. Acta tropica 201, 105201.

352

353



# B.C. Triana Delfin Riela

Orientador: Dr. Gualberto González-Sapienza Co-orientador: Dr. Martín A. Rossotti