The background features a stylized illustration of biological molecules. It includes several blue, Y-shaped structures representing antibodies, some with orange cylindrical components attached. Interspersed among these are large, semi-transparent pink circles representing antigens or other particles. The overall aesthetic is clean and scientific, with a light, airy feel.

Inmunodetección de pequeños analitos con nanopeptámeros

Gabriel Lassabe

Tesis de Doctorado

Director de Tesis: Dr. Gualberto González-Sapienza

Co-Director de Tesis: Dr. Andrés González-Techera

Facultad de Química

Universidad de la República

Junio, 2018

RESUMEN

La utilización de péptidos anti-inmunocomplejos para la detección no competitiva de pequeñas moléculas ha mostrado ser una alternativa ventajosa respecto a los formatos competitivos, dado que comúnmente aumentan la sensibilidad y especificidad, y generan una señal proporcional y por tanto intuitiva. Inicialmente, este principio fue demostrado en formato PHAIA (*Phage anti-immunocomplex assay*) utilizando péptidos expresados en la superficie de partículas virales. Posteriormente, con el fin de generar reactivos más atractivos para la industria de inmunoensayos, se montaron ensayos de igual desempeño, pero sustituyendo los fagos por péptidos anti-inmunocomplejos biotinilados unidos a la estreptavidina, que llamamos nanopeptámeros.

Este trabajo de tesis transcurrió dentro de este marco de antecedentes, teniendo como principales objetivos simplificar la producción de los reactivos utilizados en los ensayos no competitivos y explorar variantes de estos ensayos para potenciar aún más su desempeño como herramientas para monitoreo de analitos pequeños.

La primera parte de esta tesis se centró en la producción de nanopeptámeros en forma recombinante, realizando la expresión en *E. coli* de péptidos fusionados a proteínas multiméricas, como estreptavidina y la verotoxina. Todos los nanopeptámeros producidos fueron funcionales y permitieron la detección de los analitos modelo, clomazone y molinato, alcanzando límites de detección equivalentes a los obtenidos con PHAIA, y con el potencial de ser aplicados en formatos de tiras de diagnóstico para detección rápida e in-situ.

Como resultado de lo anterior se estableció una plataforma tecnológica dedicada a la detección de pequeñas moléculas y que consiste en una instancia de selección de péptidos anti-inmunocomplejos con evaluación de su desempeño en PHAIA, seguido de la generación de nanopeptámeros, y finalmente montaje y validación de los inmunoensayos al analizar muestras reales. Dicha plataforma fue transferida como tal a la industria, para lo cual, en la segunda etapa de esta tesis se realizó una prueba de concepto que no se describe aquí debido a acuerdos de confidencialidad.

Como alternativa al formato heterogéneo en placa de ELISA, la tercera parte de este trabajo consistió en el montaje de los ensayos no competitivos en formatos homogéneos (*mix-and-read*). La tecnología de ensayos homogéneos, AlphaLisa, basada en la generación de luminiscencia mediante canalización de oxígeno (LOCI), fue la elegida para ser acoplada a los ensayos no competitivos. Con el herbicida atrazina como modelo se montó el inmunoensayo NanoAlphaLisa. En este sistema, el analito es reconocido por el anticuerpo inmovilizado en las microesferas (*beads*) aceptoras, y el inmunocomplejo así formado estabiliza su unión a las *beads* dadoras cubiertas con los correspondientes nanopeptámeros anti-inmunocomplejo. De esta forma al irradiar las *beads* dadoras el oxígeno singlete liberado induce la generación de luminiscencia en las *beads* aceptoras dando lugar a un ensayo con señal proporcional a la concentración del analito, que fue validado con muestras de aguas superficiales.

En la última instancia de esta tesis se apuntó a complementar la tecnología de nanopeptámeros utilizando fragmentos de anticuerpos recombinantes, como alternativa a los anticuerpos convencionales aplicados en los ensayos anteriores. Utilizando cocaína como analito modelo, se realizaron construcciones de bibliotecas de Fab quiméricos pollo/humano y se aisló un Fab anti-cocaína. La reactividad de este Fab se caracterizó en un formato competitivo, alcanzando un límite de detección inferior a los valores guía para el control de consumo, y con reactividad despreciable por su metabolito principal, benzoilecgonina, lo cual tiene relevancia para detectar consumo reciente. Además de su potencial para el desarrollo de un test de detección de cocaína en muestras de saliva, este Fab podrá utilizarse para la selección de péptidos anti-inmunocomplejos y la consecuente generación de los nanopeptámeros respectivos. Generar ensayos no competitivos con fragmentos de anticuerpos abriría nuevas oportunidades de innovación, como por ejemplo el desarrollo de ensayos homogéneos FRET como una alternativa de menor costo del NanoAlphaLisa.

ARTÍCULOS PRESENTADOS

Artículo I. Carlomagno M, Lassabe G, Rossotti M, Gonzalez-Techera A, Vanrell L, Gonzalez Sapienza G.

Recombinant streptavidin nanopeptamer anti-immunocomplex assay for noncompetitive detection of small analytes.

Analytical chemistry 2014, **86**(20):10467-10473.

Artículo II. Lassabe G, Rossotti M, Gonzalez-Techera A, Gonzalez-Sapienza G.

Shiga-like toxin B subunit of Escherichia coli as scaffold for high-avidity display of anti-immunocomplex peptides.

Analytical chemistry 2014, **86**(11):5541-5546

Artículo III. Lassabe G, Kramer K, Hammock D.B, Gonzalez-Sapienza G, Gonzalez-Techera A.

Noncompetitive Homogeneous detection of small molecules using synthetic nanopeptamer based Luminescent Oxygen Channeling.

Analytical chemistry 2018, **90**(10), pp 6187–6192

ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo Monoclonal
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AlphaLisa	<i>Amplified luminescent proximity homogeneous assay</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
BSA	Seroalbúmina Bovina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fab	Fragmento de anticuerpo recombinante
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
HRP	Peroxidasa de Rábano
IC ₅₀	Inhibición del 50 % de la señal
kDa	KiloDaltons
KLH	Hemocianina de lapa californiana
Ni-NTA	Niquel-Ácido Nitrilotriacético
nm	Nanómetros
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PHAIA	<i>Phage anti-immunocomplex assay</i>
scFv	Fragmento de anticuerpo variable de simple cadena
SC ₅₀	Saturación del 50 % de la señal
VHH	Dominio variable de cadena pesada de camélidos
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS

ÍNDICE

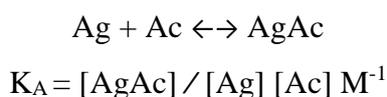
ARTÍCULOS PRESENTADOS	i
ABREVIATURAS	ii
INTRODUCCIÓN	1
1- Introducción a los inmunoensayos	1
<i>Inmunoensayos no competitivos y competitivos</i>	<i>4</i>
<i>Inmunoensayos Heterogéneos y Homogéneos</i>	<i>7</i>
<i>Técnicas de ensayos de detección in-situ: Flujo Lateral</i>	<i>9</i>
2- Anticuerpos, la herramienta principal de los inmunoensayos.....	12
<i>Estructura de los anticuerpos.....</i>	<i>12</i>
<i>Anticuerpos Policlonales y Monoclonales.....</i>	<i>14</i>
<i>Anticuerpos recombinantes.....</i>	<i>16</i>
3- Monitoreo de compuestos químicos de bajo peso molecular	20
<i>Inmunoensayos no competitivos para detección de pequeñas moléculas</i>	<i>20</i>
<i>PHAIA - “Phage anti-immunocomplex assay” para detección no competitiva de pequeñas moléculas</i>	<i>22</i>
<i>Nanopeptámeros: asociación de los péptidos anti-inmunocomplejo a proteínas multiméricas.....</i>	<i>23</i>
<i>Tetrámero de estreptavidina.....</i>	<i>25</i>
<i>Subunidad B pentamérica de la proteína verotoxina.....</i>	<i>25</i>
4- Bibliotecas combinatorias basadas en bacteriófagos. Técnica phage display	26
<i>Bibliotecas de péptidos en fagos y selección de péptidos anti-inmunocomplejos para el desarrollo de PHAIA.....</i>	<i>28</i>
<i>Bibliotecas de fragmentos de anticuerpos en fagos y selección por panning ..</i>	<i>31</i>
OBJETIVOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Capítulo I- Desarrollo de nanopeptámeros recombinantes utilizados para la detección no competitiva de dos herbicidas	43
<i>Clonado y expresión del nanopeptámero recombinante péptido pA- estreptavidina.....</i>	<i>44</i>

<i>Inmunoensayo para la detección no competitiva de molinato con el nanopeptámero recombinante pA-estreptavidina.....</i>	<i>48</i>
<i>Clonado y expresión del nanopeptámeros recombinantes de la subunidad B de verotoxina.....</i>	<i>51</i>
<i>Inmunoensayos para la detección de los herbicidas molinato y clomazone con los nanopeptámeros de verotoxina.....</i>	<i>53</i>
<i>Utilización de bibliotecas de mutagénesis para la mejora de la afinidad de los péptidos anti- clomazone-AcMo5.6.....</i>	<i>54</i>
<i>Validación del inmunoensayo para la detección de clomazone.....</i>	<i>55</i>
<i>Aplicación de los nanopeptámeros de verotoxina para establecer ensayos rápidos de flujo lateral y con lectura positiva para diagnóstico</i>	<i>56</i>
Capítulo II Confidencial - Transferencia de tecnología	
PHAIA/nanopeptámeros	58
Capítulo III- Detección no competitiva de pequeñas moléculas usando nanopeptámeros sintéticos en inmunoensayo luminiscente mediante canalización de oxígeno (LOCI).....	58
<i>Desarrollo y optimización del inmunoensayo NanoAlphaLisa para atrazina .</i>	<i>58</i>
<i>Validación del ensayo NanoAlphaLisa.....</i>	<i>61</i>
Capítulo IV- Obtención de un anticuerpo Fab anti-cocaína para el desarrollo de inmunoensayos como herramientas para monitoreo de consumo de cocaína	63
<i>Construcción de bibliotecas de Fab a partir de pollo (Gallus gallus) inmunizado con hapteno de cocaína.....</i>	<i>64</i>
<i>Selección por panning de un Fab anti-cocaína</i>	<i>68</i>
<i>Optimización de la producción de Fab recombinantes</i>	<i>69</i>
<i>Inmunoensayos competitivos con coc12 para detección de cocaína</i>	<i>71</i>
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

INTRODUCCIÓN

1- Introducción a los inmunoensayos

Los inmunoensayos son métodos bioanalíticos que permiten la detección y cuantificación de analitos mediante el uso de anticuerpos y la formación de inmunocomplejos con sus antígenos. Los anticuerpos son una característica común de todos los sistemas de inmunoensayos y, acorde a su función en el sistema inmune, son usados como herramientas biotecnológicas por su capacidad de reconocer y unirse a áreas específicas (epítopes) de los antígenos (toda molécula que desencadena formación de anticuerpos en el sistema inmune es conocida como antígeno). Su reconocimiento por el antígeno sucede de forma tan específica que se asemeja al concepto de “llave/cerradura” debido a su alta especificidad y su potencial de detectar un único compuesto entre miles de variantes posibles. La unión específica de los anticuerpos por sus antígenos (Ag-Ac) se genera a través de numerosas interacciones químicas no covalentes, que cooperan entre sí para estabilizar la interacción Ag-Ac. La fuerza de unión resultante se conoce como la afinidad del anticuerpo por su antígeno, y suele caracterizarse por la constante de disociación (K_D) de la reacción Ag-Ac. Por tratarse de interacciones no covalentes, la reacción Ag-Ac es una reacción reversible que está controlada por la ley de acción de masas. En la misma, el estado de equilibrio depende de una constante de afinidad K_A que se define como:



Por su parte $K_D = 1/K_A$ se expresa en molaridad y típicamente oscila entre 10^8 - 10^{10} M. El desarrollo de inmunoensayos depende directamente de las características de esta reacción, y las sensibilidades de detección obtenidas son fruto de sus constantes de afinidad y de las concentraciones de los reactivos adicionados [1].

En los inmunoensayos, la reacción Ag-Ac se encuentra acoplada a un sistema de generación de señal que traduce esta interacción en una lectura cuantitativa. Para medir las reacciones generadas, los anticuerpos suelen conjugarse (marcarse) con distintas

moléculas que permiten detectarlos a través de mediciones de radiactividad, fluorescencia, luminiscencia, fosforescencia o productos de color generados por reacciones enzimáticas. En 1960, Yallow y Berson describieron el primer inmunoensayo basado en radiomarcaje, conocido como radioinmunoensayo (RIA) y por el cual recibieron el premio Nobel en Medicina de 1977 [2]. El RIA lo aplicaron para el monitoreo de insulina en plasma de pacientes con *diabetes mellitus* y consistía en un formato de inmunoensayo competitivo en el cual la insulina presente en la muestra problema competía con insulina marcada con Iodo 131 por unirse a anticuerpos específicos que provenían de un suero policlonal obtenido de un cobayo inmunizado. Luego de un período de incubación con el pool de anticuerpos, se realizaba separación de la insulina libre de la insulina unida a los anticuerpos por cromatografía en papel, y finalmente se registraba la señal emitida por la radiactividad del Iodo 131.

Los radioinmunoensayos son considerados los inmunoensayos más precisos y sensibles, sin embargo, a medida que fue aumentando su uso también fue creciendo la preocupación acerca de la salud del personal que manejaba el material radiactivo rutinariamente, así como también la necesidad de generar áreas especializadas para su manipulación, equipamientos de medición y de complejos protocolos para el desecho del material radiactivo. Por estas desventajas se desarrollaron otros conjugados de anticuerpos y antígenos como aplicaciones alternativas. Los fluoroinmunoensayos (FIA) con marcaje fluorescente y los inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA) demostraron ser buenas alternativas al RIA debido a que ofrecen bajos límites de detección, buena precisión y son fácilmente automatizables [3, 4]. Por otra parte, los inmunoensayos enzimáticos (EIA) que utilizan anticuerpos o antígenos conjugados a una enzima, dependiendo del sustrato, pueden generar señales de color visible, fluorescente o luminiscente. En los inicios del desarrollo de inmunoensayos era difícil de creer que las conjugaciones de las enzimas no afectarían por impedimento estérico el sitio de unión. Afortunadamente, las primeras conjugaciones funcionales de antígenos y anticuerpos con enzimas de marcaje como la fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa resultaron exitosas. Las moléculas conjugadas en estos trabajos demostraron mantener su funcionalidad luego de la conjugación y pudieron ser aplicadas como herramientas de detección inmunofluorescente en ensayos de histopatología [5], lo que abrió las puertas al desarrollo de ensayos tipo EIA con aplicación de conjugados enzimáticos. La alternativa de EIA más popular que haya sido propuesta y quizás el formato de inmunoensayo más comúnmente utilizado es el

denominado ensayo de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), desarrollado por primera vez por Engvall y Perlmann en 1971[6]. En este método, una superficie sólida (generalmente poliestireno) en formato de placas de 96 pocillos se utiliza para adsorber uno de los reactantes, lo que posibilita realizar sucesivas etapas de incubación con otros reactantes e involucrar lavados intermedios que ayuden a eliminar los componentes no reactantes. Mediante un ELISA competitivo, estos autores fueron capaces de cuantificar IgG de suero de conejo utilizando como reactivo un estándar de inmunoglobulina IgG purificada de conejo y conjugada a la enzima reportera fosfatasa alcalina, que competía con los anticuerpos del suero por unirse a anticuerpos anti-conejo IgG inmovilizados sobre la superficie adsorbente.

Además del tipo de marcaje y el tipo de señal producida (sea colorimétrica, radiactiva, etc), los inmunoensayos pueden clasificarse según variadas características, lo que abre una larga lista de posibles formatos de inmunoensayos que uno puede elegir para desarrollar y detectar la molécula de interés. Dentro de esta lista hay cuatro puntos de clasificación muy importantes que se tuvieron en cuenta para el desarrollo de inmunoensayos en esta tesis:

- 1- Inmunoensayos de tipo competitivo vs no competitivos. Lo cual muchas veces queda definido por el tamaño del analito (si es una macromolécula o una pequeña molécula).
- 2- Inmunoensayos con pasos de separación o no de los reactivos, heterogéneos vs. homogéneos, respectivamente.
- 3- Ensayos que pueden ser utilizados in-situ (también llamados *point of care tests*) vs. los que requieren procesar las muestras en el laboratorio.
- 4- El tipo de plataforma analítica utilizada ya sea ELISA (microplacas), dispositivos de flujo lateral (inmunocromatografía), ensayos basados en microesferas (*beads*) magnéticos o luminiscentes (AlphaLisa), biosensores, etc.

Muchos de los desarrollos de esta tesis se realizaron utilizando la plataforma de ELISA, pero algunos de ellos se adaptaron posteriormente en formatos de flujo lateral que permiten el análisis in situ, o en sistemas homogéneos (*mix-and-read*) que permiten acortar el tiempo de análisis de los ensayos.

Inmunoensayos no competitivos y competitivos

Los inmunoensayos no competitivos también conocidos como ensayos tipo “sandwich” permiten la detección del antígeno utilizando dos anticuerpos diferentes capaces de reconocer epítopes distintos del mismo. En estos ensayos, generalmente uno de los dos anticuerpos es inmovilizado en un soporte sólido utilizado para realizar la captura del antígeno y el segundo anticuerpo lleva consigo el marcaje enzimático capaz de dar lugar a la generación de señal luego de quedar retenido por la presencia del antígeno [7] (**Figura 1**). Ambos reactivos se adicionan en exceso con el fin de favorecer las interacciones antígeno-anticuerpo y alcanzar la mayor sensibilidad posible, mientras que las cantidades residuales de los reactivos pueden ser eliminadas en las etapas de lavado. La generación de señal por parte del segundo anticuerpo es directamente proporcional a la cantidad de analito en muestra, donde la ausencia de analito se corresponde a señal 0, mientras que exceso de concentraciones se corresponden con la señal máxima.

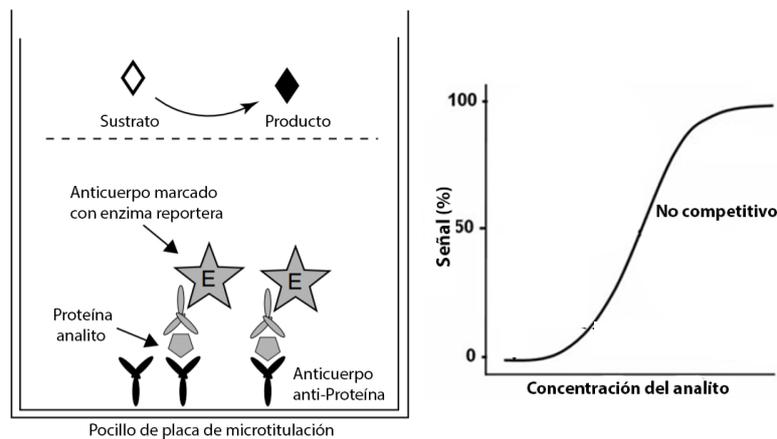


Figura 1. Esquema de un inmunoensayo no competitivo (inmunoensayo sandwich). En la imagen de la izquierda se representa un pocillo de ELISA donde un anticuerpo de captura (en color negro) es adsorbido pasivamente sobre la fase sólida. La macromolécula (pentágono), presente en la muestra problema, y el anticuerpo (gris), conjugado a una enzima reportera (E), son agregados en sucesivas etapas. Tanto el anticuerpo de captura y el conjugado a enzima se unen a la macromolécula en diferentes sitios y permiten la formación del *sandwich*. Finalmente, el sustrato de la enzima es adicionado para generar el producto de color. La cantidad de producto es directamente proporcional a la cantidad de analito capturado y se representa en la imagen de la derecha.

En el caso de los ensayos competitivos, solo un anticuerpo es utilizado para el reconocimiento, y el antígeno presente en la muestra debe competir con antígeno estándar o un análogo químico del antígeno por los sitios de unión del anticuerpo. Son formatos bien adaptados para la detección de moléculas de bajo peso molecular (también conocidas como haptenos), que, por su tamaño, no presentan más de un epítopo y no pueden ser

reconocidas por dos anticuerpos en simultaneo. Las señales generadas por este formato corresponden a valores que son inversamente proporcionales a la cantidad de analito en la muestra, donde la ausencia de analito se corresponde con la señal máxima del ensayo (**Figura 2**). A diferencia de los no competitivos, en estos casos las concentraciones de los reactivos no pueden agregarse en exceso, sino que por el contrario deben ser ajustadas a valores limitados para promover la máxima eficiencia posible de competencia entre el analito y su análogo por los sitios del anticuerpo. Existen dos grandes tipos de formatos competitivos que se detallan en la **Figura 2** como ensayos montados en placas de ELISA. El primero se basa en la inmovilización del hapteno referencia sobre la superficie adsorbente. Para hacer posible su inmovilización el hapteno debe ser conjugado a una proteína portadora (*carrier*) capaz de brindar residuos que interactúen y reaccionen con la superficie. Luego se realiza una incubación con la muestra y el anticuerpo anti-analito, en la que el analito de la muestra compite con el de referencia (adsorbido) por unirse a las cantidades limitadas de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo que no se unen al antígeno inmovilizado pueden ser eliminadas por etapas de lavado y la señal del ensayo es generada por el agregado de un segundo anticuerpo anti-anticuerpo primario. Generalmente estos anticuerpos se obtienen de forma comercial y están conjugadas a enzimas como la peroxidasa de rábano (HRP), encargadas de generar la señal del ensayo [7]. El segundo formato consiste en inmovilizar el anticuerpo anti-analito al fondo del pocillo y luego el analito de las muestras compite por los sitios de unión del anticuerpo con una cantidad fija de hapteno en solución conjugado a una enzima marcadora (por ej. HRP) [7].

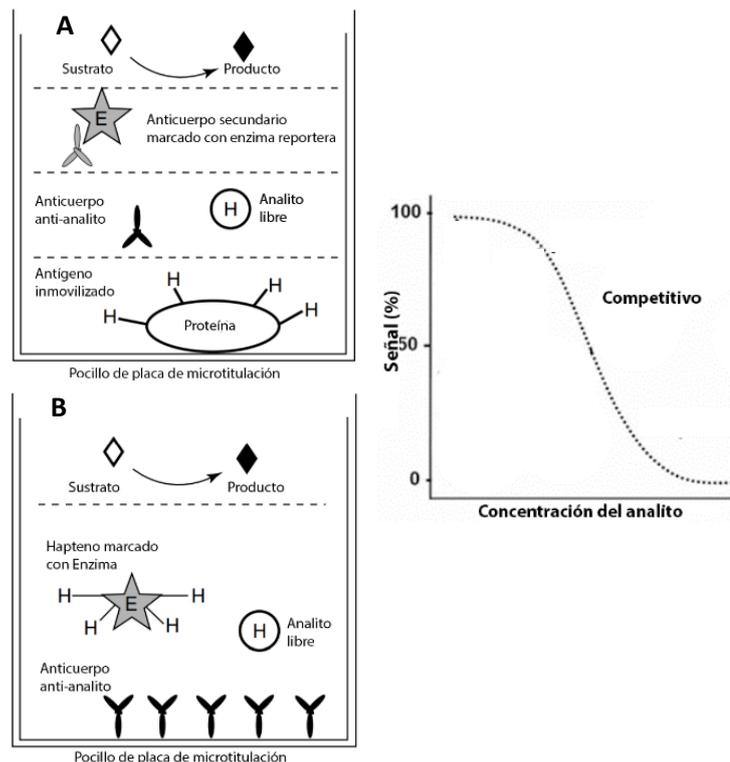


Figura 2. Esquema de un inmunoensayo competitivo. En las imágenes de la izquierda se representan los dos posibles ensayos competitivos que se pueden montar para detección de analitos. En el ensayo **A** el hapteno (H) conjugado a su proteína portadora es adsorbido pasivamente sobre la fase sólida. El analito presente en la muestra problema y el anticuerpo anti-analito (negro) son agregados en simultaneo para promover la competencia entre el analito y H por unirse al anticuerpo. El anticuerpo retenido sobre H en el fondo de la placa es detectado con anti-anticuerpo (gris) conjugado a enzima (E). En el ensayo **B** el anticuerpo anti-analito es adsorbido, mientras que el analito y el hapteno conjugado a una enzima reportera se agregan en simultáneo para competir por los sitios del anticuerpo. En ambos ensayos la señal es generada cuando el sustrato de la enzima es adicionado para generar el producto de color. La cantidad de producto es inversamente proporcional a la cantidad de analito en muestra y se representa en la imagen de la derecha.

Los ensayos competitivos son catalogados como ensayos menos eficientes que los formatos no competitivos en el área de inmunodiagnóstico. Esto se ha demostrado a partir de modelos matemáticos que evidencian la inferioridad de los ensayos competitivos en términos del límite de detección (sensibilidad), rango de trabajo y precisión [8], pero existen también consideraciones prácticas que permiten entender de manera intuitiva sus limitaciones. Un ejemplo de esto radica en la optimización de las concentraciones del anticuerpo y el antígeno de competencia, que deben minimizarse para generar una señal baja pero medible en ausencia de analito, de forma de favorecer la competencia cuando este está presente. Pese a que esto permite optimizar la competencia, el uso de concentraciones bajas de anticuerpo no favorece la formación del inmunocomplejo, lo cual dificulta el alcanzar bajos límites de detección. Contrariamente, como se ha mencionado, los ensayos no competitivos sí permiten el uso de un exceso del anticuerpo, y como la reacción antígeno-anticuerpo está guiada por la ley de acción de masas, el

exceso de anticuerpo inclina el equilibrio hacia la formación del complejo, aumentando la sensibilidad de los ensayos. Otro claro ejemplo de las limitaciones de los ensayos competitivos se vincula al hecho de aplicar un solo anticuerpo en el ensayo. Esto implica reconocimiento de un único epítope del antígeno, mientras que en los ensayos no competitivos se reconocen simultáneamente dos epítopes, lo cual aumenta la especificidad, es decir, disminuye la posibilidad de reacciones cruzadas inespecíficas aumentando la selectividad del ensayo [9].

Inmunoensayos Heterogéneos y Homogéneos

Los inmunoensayos también pueden clasificarse como heterogéneos u homogéneos, y su diferencia radica en la necesidad de separar o no los compuestos del ensayo que reaccionaron de los que no reaccionaron. Los inmunoensayos heterogéneos se realizan sobre superficies sólidas como el poliestireno, donde alguno de los componentes de la reacción, el antígeno o el anticuerpo, pueden ser inmovilizados en forma pasiva por adsorción física, mediante una combinación de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. [10]. La muestra con el analito y los reactivos restantes pueden ser luego agregados en etapas de incubación independientes y ser separadas entre sí por etapas de lavados reiterados. Las etapas de lavado permiten remover los reactivos no unidos y disminuir las adherencias inespecíficas no deseadas que, de estar presentes, pueden aumentar la señal ruido de fondo y afectar los límites de detección de los ensayos. Actualmente existe una gran disponibilidad de soportes comerciales que van más allá de las microplacas convencionales de poliestireno, incluyendo microesferas magnéticas, colorimétricas, químicas, así como membranas y semiconductores. En todos estos casos, las superficies se pueden modificar químicamente para lograr una inmovilización más controlada y orientada de los anticuerpos o antígenos [11, 12].

Los ensayos homogéneos son formatos en los que la reacción antígeno-anticuerpo puede traducirse directamente en una señal sin necesidad de separar los reactivos intervinientes. Por la incubación de todos los reactivos en un solo paso, resultan en formatos simples y fácilmente automatizables. Son conocidos como ensayos de “mezclar y medir” (*mix-and-read*) y su desarrollo implica el diseño de ingeniosas estrategias de detección que permitan discriminar la señal generada por los reactivos unidos al analito de los excedentes no unidos [13]. El uso de fluoróforos es especialmente interesante en esta área, debido a que sus propiedades lumínicas pueden variar cuando se asocian a otras moléculas

o cuando interactúan entre sí. Un ejemplo de esto son los ensayos FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), una herramienta que ha sido utilizada para el estudio de interacciones proteína-proteína [14], receptor-ligando [15], hibridación de ADN [16], e interacciones antígeno-anticuerpo en inmunoensayos. En estos ensayos se generan las señales de fluorescencia como causa de la interacción que ocurre entre los estados de energía de dos fluoróforos, donde uno denominado dador es capaz de transferir energía al siguiente denominado aceptor. La mayor limitante de este formato radica en que la eficiencia de transferencia disminuye notablemente a medida que la distancia entre fluoróforos se hace mayor. El valor radio de Fröster (R_0) establecido para cada fluoróforo determina la distancia a la cual se pierde un 50 % de la eficiencia de señal FRET [17]. Generalmente los R_0 no superan los 10 nm, por lo que a partir de estas distancias la transferencia de energía es ineficiente, y los ensayos que implican más reactivos que implican más de un anticuerpo (cuya longitud es de 10 nm) o proteínas de gran tamaño no son bien adaptados a los formatos FRET [17].

Como alternativa a los ensayos FRET, en 2008 Perkin Elmer comenzó a comercializar el ensayo homogéneo de luminiscencia conocido como AlphaLisa (*Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay*), y el cual genera la señal mediante química de canalización de oxígeno (*luminescent oxygen-channeling*) [18, 19]. En estos ensayos, microesferas (*beads*)ceptoras y dadoras son conjugadas a los reactivos de los inmunoensayos, como por ejemplo a dos anticuerpos capaces de reconocer diferentes epítopes del analito (típicamente una macromolécula). El reconocimiento del antígeno por los reactivos del inmunoensayo promueve la aproximación de ambas *beads*. La excitación con un haz de luz láser a 680 nm provoca la excitación de pigmentos en la *bead* dadora que comienza a emitir oxígeno molecular singlete, una forma energéticamente excitada de oxígeno molecular. Estas moléculas pueden difundir hasta 200 nm de diámetro, rango en el cual, en caso de alcanzar las *bead*ceptoras, pueden iniciar una cascada de reacciones químicas en las mismas promoviendo la emisión de luz a 615 nm (**Figura 3**). La cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de *beads*ceptoras y dadoras que se aproximan y por lo tanto a la cantidad de analito reconocido. Este formato ha sido ampliamente usado para la detección de macromoléculas que no pueden ser monitoreadas mediante FRET [20-28], sin embargo hay escasa bibliografía acerca del uso de AlphaLisa para detección de pequeñas

moléculas y estos se han limitado a la aplicación de las *beads* para desarrollar formatos de inmunoensayos competitivos [29].

La tecnología AlphaLisa fue utilizada en el capítulo III de esta tesis para montar un inmunoensayo homogéneo que permitió la detección no competitiva de un analito de pequeño tamaño (hapteno).

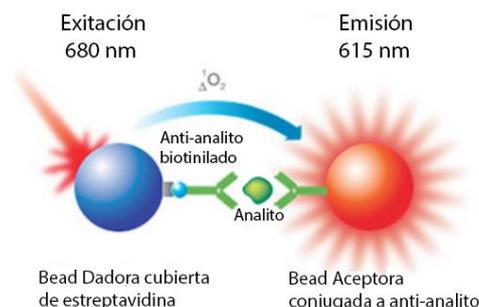


Figura 3. Tecnología AlphaLisa para el desarrollo de inmunoensayos homogéneos. Se representa un inmunoensayo *sandwich* con dos anticuerpos anti-analito. Un anticuerpo biotinilado se une a *beads* dadoras acopladas a estreptavidina (esfera azul) y el segundo anticuerpo es conjugado directamente a las *beads* aceptoras del AlphaLisa (esfera roja). Cuando el analito está presente en la muestra, las *beads* se aproximan entre sí. La excitación de la *bead* dadora a 680 nm genera moléculas oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) que disparan reacciones químicas sobre la *bead* aceptora y desencadenan la emisión de un pico de luz a 615 nm. La señal AlphaLisa generada es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. (Imagen adaptada de Beaudet et al. [19])

Técnicas de ensayos de detección in-situ: Flujo Lateral

Las técnicas de ensayo de detección *in-situ* conocidas como *point of care tests* (POC) se caracterizan por dar el resultado de forma inmediata, pudiendo ser utilizados en el sitio donde se toma la muestra. El formato de flujo lateral en tiras de diagnóstico corresponde a los inmunoensayos POC más populares y comúnmente utilizados desde su introducción a en el año 1980 [30, 31]. Consisten en tiras prefabricadas de nitrocelulosa que contienen los reactivos del inmunoensayo adsorbidos sobre la propia tira o en almohadillas que se instalan en contacto con la misma, y son activados cuando entran en contacto con el flujo capilar generado por la aplicación de una muestra líquida. Han sido ampliamente utilizados como alternativa a los ELISA ya que son muy fáciles de usar y pueden ser aplicados directamente por el operador (por ejemplo el propio paciente para ciertos diagnósticos clínicos), su costo relativo es bajo y generan los resultados en tiempos que varían entre 2 y 30 minutos, dependiendo el ensayo [32-34]. La aplicación más conocida

es la prueba de embarazo que permite la detección de la hormona HCG en orina, sin embargo, los ensayos de flujo lateral son también importantes para diagnóstico en distintas áreas, desde la clínica, como detección de infecciones, fallas de órganos, intoxicaciones [35], hasta ensayos de tipo no clínico como el control de aguas, suelos, vegetales y alimentos, entre otros [36].

Cada tira se divide en 4 zonas funcionales que se detallan en la **figura 4** [35]. El diagnóstico en estos dispositivos ocurre en forma similar a los ELISA, aunque consisten en un solo paso de incubación. En cada prueba ocurre un proceso cromatográfico que comienza con la deposición de la muestra y un flujo constante que viaja a través de la tira por fuerza de capilaridad. Durante su transcurso, el flujo arrastra a uno de los reactivos marcados con nanopartículas (como oro coloidal, latex o carbón [37]), que son inicialmente depositados en “almohadillas”, y la reacción entre estos y el analito es posible de apreciar en un punto de interrogación de la tira, que presenta a otro de los reactivos del ensayo inmovilizado. Estos ensayos generalmente dan resultados cualitativos mediante la aparición o desaparición de una línea de color en la tira, sin embargo también se han desarrollado alternativas capaces de generar resultados semi-cuantitativos utilizando por ejemplo curvas estándares como referencia [38], o incluso resultados cuantitativos cuando la lectura se asociaba a equipos con lectores especiales [39]. Cada ensayo de diagnóstico consta de al menos una línea de prueba y una línea de control. En la línea de prueba se ve reflejada la presencia de analito en la muestra con la aparición o no de la señal reportera, mientras que la línea de control captura directamente el conjugado de detección y de esta forma permite confirmar que el flujo dinámico ocurre a través de la tira acorde a lo esperado y que las condiciones del ensayo son las correctas. Además, las tiras de diagnósticos ofrecen la posibilidad de contener más de una línea de prueba con el fin de permitir detección de múltiples analitos en una sola corrida [40].

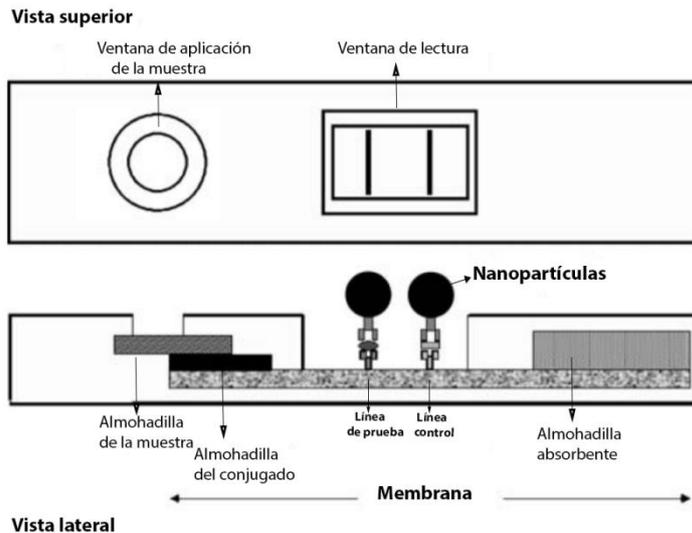


Figura 4. Inmunoensayo de flujo lateral. Sobre la membrana de nitrocelulosa se representa una línea de prueba que consiste en un anticuerpo anti-analito inmovilizado que formará el inmunoensayo *sandwich* y una línea de control (anticuerpo anti-conjugado de detección) que confirma el correcto funcionamiento del ensayo. El conjugado de detección (un segundo anticuerpo anti-analito conjugado a una nanopartícula) es originalmente depositado en la almohadilla del conjugado, mientras que el anticuerpo de captura es depositado sobre la línea de prueba y un anticuerpo anti-inmunoglobulinas es depositado en la línea de control. La muestra, depositada en la almohadilla de la muestra, comienza a subir por capilaridad a través de la tira pasando por la almohadilla del conjugado y por las líneas de detección. En los ensayos comerciales las tiras se montan en dispositivos que las protegen y facilitan su manipulación. **(Imagen adaptada de Posthuma-Trumpie et al [35])**

Los dispositivos de flujo lateral también pueden formularse sobre la base de ensayos no competitivos (*sandwich*) y competitivos (**Figura 5**) [35]. Al igual que lo que ocurre en el ELISA, los ensayos competitivos resultan inferiores a los no competitivos en términos de sensibilidad y especificidad. Sumado a esto, en los formatos de tiras de diagnóstico, el ensayo no competitivo adquiere un valor práctico extra respecto a la lectura de los resultados a simple vista. En estos casos, el ojo humano debe determinar si una muestra contiene trazas de analito al visualizar aparición de señal, lo cual resulta mucho más perceptible que detectar disminuciones de señal respecto a un valor máximo generado por la ausencia de analito en los ensayos competitivos. En la **figura 5** se puede notar que la aparición de un 20 % señal respecto a un blanco en los no competitivos resulta más apreciable que la disminución de un 20 % de señal en los ensayos competitivos.

Los ensayos desarrollados en el capítulo I de esta tesis para la detección no competitiva de analitos de pequeño tamaño también fueron adaptados en formatos de flujo lateral, teniendo en cuenta que estos presentarían ventajas de apreciación visual y señal más intuitiva que los ensayos competitivos.

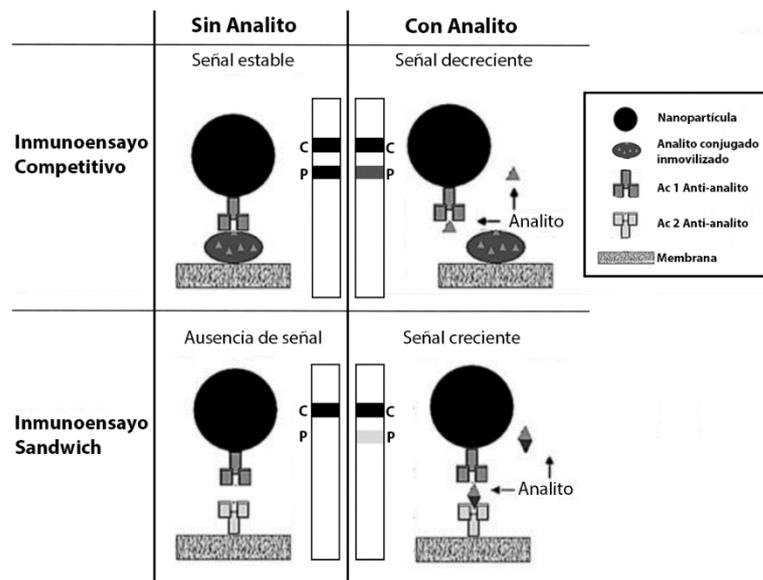


Figura 5. Inmunoensayos de flujo lateral competitivos y tipo *sandwich*. Se muestran las diferencias en el marcaje y la generación de señal de ambos formatos. En el competitivo la respuesta se correlaciona negativamente con la cantidad de analito en la muestra. Como ejemplo se muestra un decaimiento del 20 % de la señal en la línea de prueba (P) del ensayo con presencia de analito, respecto a la señal máxima generada en el ensayo sin analito. En el inmunoensayo *sandwich* la respuesta es directamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra. Como ejemplo se muestra la aparición de un 20 % de señal en la línea de prueba del ensayo con presencia de analito. En estas dos situaciones comparables se puede notar que la aparición de señal es visualmente más “amigable” que la disminución de señal. En cada ensayo se representan las líneas de control (C), siempre necesarias para confirmar el correcto funcionamiento de los materiales (**Imagen adaptada de Posthuma-Trumpie et al [35]**)

2- Anticuerpos, la herramienta principal de los inmunosayos

Estructura de los anticuerpos

Por su reconocimiento específico, su alta afinidad y por las distintas funciones efectoras que pueden llevar a cabo en el sistema inmune de los organismos, los anticuerpos son herramientas biotecnológicas de amplio uso. Su aplicación es de gran importancia en el área de la medicina para el tratamiento, imagenología y diagnóstico de muchas enfermedades. También tiene importantes aplicaciones en el monitoreo de drogas, contaminación ambiental, seguridad alimentaria etc. y son herramientas indispensables en incontables actividades de investigación.

La molécula del anticuerpo consiste en una glucoproteína con distintas regiones funcionales formada por cuatro cadenas aminoacídicas, dos cadenas pesadas y dos livianas (**Figura 6**). Dos de estas regiones son conocidas como los fragmentos de unión al antígeno (Fab), son idénticas y actúan como los “brazos del anticuerpo” al estar

encargadas del reconocimiento antigénico. La tercera región es conocida como fragmento cristizable (región Fc) y está involucrada en las funciones efectoras de los anticuerpos [41]. Las cadenas pesadas son idénticas y pueden presentar 4 o 5 dominios, un dominio variable y 3 o 4 dominios constantes (este número varía según de qué clase sea el anticuerpo). El dominio variable VH y el primer dominio constante CH1 integran la estructura de los brazos Fab del anticuerpo, mientras que los dominios CH2, CH3 (y CH4 si corresponde) forman la región Fc. Ambas cadenas pesadas se asocian entre sí mediante puentes disulfuro que se encuentran en una región flexible (bisagra) que conecta las regiones Fc y Fab. Las dos cadenas livianas, también idénticas, son más pequeñas que las pesadas y están formadas por un dominio variable VL y solo uno constante CL. Ambas se asocian con los dominios VH y CH1 de las cadenas pesadas, y dan lugar a la formación de los Fab [41].

La asociación de los dominios VH y VL en el Fab da lugar a la formación del sitio de unión al antígeno (parátipe) [41]. La especificidad de este sitio de unión se debe a tres regiones hipervariables llamadas CDR1, CDR2, CDR3 que están presentes en cada uno de los dominios variables y que son altamente aleatorias entre los distintos anticuerpos producidos por el sistema inmune de un individuo. Esta variabilidad se genera a nivel del genoma durante el desarrollo de los linfocitos B mediante el proceso de recombinación somática y durante la etapa de maduración de la afinidad y cambio de clase de los BCRs de los linfocitos mediante el proceso de hipermutación somática [41]. Por su parte, la región Fc no aporta a la especificidad de los anticuerpos, pero es fundamental para determinar la clase y las funciones efectoras de los mismos. En cada organismo existen al menos cinco clases de anticuerpos que se diferencian por sus cadenas pesadas y se identifican como Inmunoglobulina G (IgG), M (IgM), A (IgA), D (IgD) y E (IgE) [41]. Las diferentes clases de anticuerpos determinan su tropismo en el organismo y sus funciones efectoras que pueden consistir en activación del complemento, opsonización y citotoxicidad mediada por anticuerpos [41]

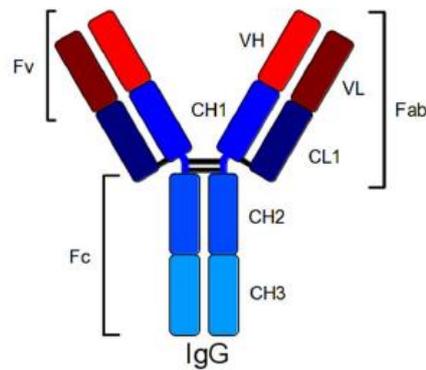


Figura 6. Estructura modelo de un anticuerpo. Como ejemplo se muestra un anticuerpo de clase IgG, en donde se denota la composición de las subunidades y la distribución de los dominios a lo largo de las cadenas polipeptídicas

Anticuerpos Policlonales y Monoclonales

Esencialmente cualquier vertebrado podría ser una fuente válida de anticuerpos para el desarrollo de inmunoensayos. Por ejemplo, los conejos, cabras y ovejas, entre otros, son fuentes muy utilizadas en biotecnología debido a su tamaño, fácil acceso vascular y por la naturaleza y robustez de su respuesta inmune, a partir de la cual generan altos títulos de anticuerpo por mililitro de suero. Los anticuerpos derivados de un suero consisten en una población heterogénea de anticuerpos capaces de reconocer variedad de determinantes antigénicos con varios grados de afinidad y especificidad, y son por esta razón denominados anticuerpos policlonales [42]. Los anticuerpos policlonales son fácilmente producidos a partir de procesos de inmunización animal que involucran administraciones reiteradas del antígeno en soluciones que contienen adyuvantes (utilizados para reforzar la respuesta inmune del animal). Durante este proceso se promueve el desarrollo de respuestas adaptativas que dan lugar a la proliferación de linfocitos B con secreción de anticuerpos específicos por el antígeno y que han pasado por eventos de cambio de clase y maduración de la afinidad. Si los tiempos de inmunización son respetados, es esperable que al final del proceso se obtengan sueros con anticuerpos de alta afinidad por el antígeno y en el que predominen anticuerpos de clase IgG por sobre los anticuerpos IgM [43]. Los bajos costos y la rapidez de producción combinado con las buenas especificidades y sensibilidad alcanzada hacen que los anticuerpos policlonales jueguen un rol importante como herramientas de diagnóstico en la industria y comercialización de inmunoensayos y de anticuerpos como reactivos en sí mismo. Sin embargo, los lotes de anticuerpos policlonales son finitos y se limitan a la

cantidad de suero extraído del animal. Esto de por sí es una gran desventaja ya que la “calidad” de los anticuerpos puede variar entre lotes diferentes, aunque incluso provengan de un mismo animal. El cambio de lote obliga a realizar reiteradas puestas a punto de los inmunoensayos, las cuales no siempre son sencillas de transitar, y muchas veces se ven afectadas por la presencia de anticuerpos no específicos capaces de generar altos ruidos de fondo en el inmunoensayo [1].

Los ratones y ratas son más bien utilizados para la obtención de anticuerpos monoclonales desde que Köhler y Milstein describieron la tecnología de hibridomas en 1975 y por la cual recibieron un premio Nobel de medicina [44]. Esta técnica permite la obtención de líneas celulares inmortalizadas derivados de linfocitos B, denominadas hibridomas que tienen la capacidad de proliferar incesantemente y producir cantidades ilimitadas del anticuerpo monoclonal. Básicamente, consiste en inmortalizar los linfocitos B de un bazo de ratón (previamente inmunizado con el antígeno de interés) al fusionarlos con una línea celular de mieloma de ratón. Las células cuya fusión es viable (híbridas) continúan creciendo y duplicándose en medios de cultivo que presentan componentes que permiten su crecimiento selectivo. Aquellos hibridomas que secretan anticuerpos con la especificidad deseada son identificadas mediante rastreo (*screening*) de clones por ensayos de ELISA y aisladas como hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales mediante procedimientos de dilución límite [45]. La obtención de hibridomas productores de anticuerpos suelen ser tareas costosas y laboriosas, sobre todo cuando se trata de conseguir anticuerpos que permitan el desarrollo de inmunoensayos con altas exigencias analíticas. En estos casos, las afinidades de los anticuerpos obtenidos pueden no ser suficientes como para generar inmunoensayos de sensibilidades aceptables, mientras que las especificidades pueden ser bajas resultando en altas reactividades cruzadas por otras moléculas irrelevantes [46]. A la hora de montar la tecnología de hibridomas, se deben valorar los esfuerzos que requieren la obtención de anticuerpos monoclonales en conjunto con las exigencias y el propósito analítico, y considerando que en muchos casos la obtención de sueros policlonales puede llegar a ser más redituable. A pesar de esto, los hibridomas sobresalen como fuente casi infinita de anticuerpos, y cuya especificidad y afinidad por el antígeno puede ser precisamente caracterizada [42].

Anticuerpos recombinantes

Los avances en el campo de la biología molecular, las técnicas de manipulación y mutagénesis de ADN y el entendimiento de las estructuras y función de los anticuerpos han potenciado el desarrollo de sistemas de expresión *in vitro* de anticuerpos recombinantes. Como cualquier expresión recombinante de proteínas, los anticuerpos recombinantes se expresan en sistemas *in vitro*, utilizando como huéspedes distintas líneas celulares simples. Los huéspedes que se utilizan en biotecnología se caracterizan por ser fáciles de cultivar, tener alta tasa de duplicación y ser de bajo presupuesto, considerándose como claros ejemplos las bacterias, levaduras, líneas celulares de mamíferos o células de insectos. Las bacterias *E. coli* son las más utilizadas en los protocolos de expresión de proteínas y anticuerpos recombinantes [47].

La tecnología de anticuerpos recombinantes involucra recuperar los genes de los anticuerpos a partir de la retro-transcripción de los ARN codificantes, seguido de una amplificación de los ADN copia por PCR y clonarlos en vectores apropiados para luego expresar la proteína en el nuevo huésped [48, 49]. Los anticuerpos recombinantes pueden ser clonados desde cualquier especie de animal productora de anticuerpos, siempre y cuando estén determinadas las secuencias génicas de sus cadenas de inmunoglobulinas pesadas y livianas para que se puedan diseñar los oligonucleótidos cebadores consenso y utilizarlos en la amplificación de los genes [50]. La habilidad de manipular los genes de los anticuerpos abre posibilidades de generar modificaciones genéticas y químicas de forma controlada y dirigida y, además, muy importante, posibilita trabajar específicamente con las regiones más relevantes de los anticuerpos. Por ejemplo los fragmentos de anticuerpos correspondientes a las regiones Fab o Fv pueden ser expresadas en sistemas simples procariotas, mientras que la molécula completa del anticuerpo requiere la expresión en sistemas eucariotas más complejos [47]. Además, poder prescindir de regiones menos relevantes como las Fc, es muy importante en casos donde las funciones efectoras de estas regiones puedan interferir con las aplicaciones del anticuerpo. Por ejemplo la unión del Fc no específica a receptores celulares FcR puede dar falsos positivos en ensayos de citometría de flujo e inmunodetección de poblaciones celulares, mientras que anticuerpos aplicados en la inmunoterapia pueden generar efectos adversos por las funciones efectoras desencadenadas por el Fc [51].

La generación de anticuerpos recombinantes se ha visto beneficiada con el avance de las tecnologías que permiten la selección *in vitro* de anticuerpos a partir de bibliotecas combinatorias con altas diversidades. Particularmente, las bibliotecas combinatorias de anticuerpos presentados en superficie de fagos son las más utilizadas y de las cuales se seleccionan clones específicos mediante la tecnología *phage display* [52]. La misma, que será explicada más adelante (en la sección 4), permite la selección de los anticuerpos en fagos de acuerdo con su funcionalidad luego de ser expresados junto a las proteínas de la cápside en las células huésped, *E. coli*. Las bibliotecas más comúnmente utilizadas son las que representan sobre la superficie de fagos fragmentos de anticuerpos de tipo Fab con doble cadena y de tipo scFv de simple cadena (*single-chain variable region fragment*) [53, 54]. Ambos tipos de anticuerpos recombinantes se describen a continuación.

El Fab, formado por el ensamblaje de los dominios VH-CH1 de las cadenas pesadas y VL-CL de las cadenas livianas, presenta un tamaño de aproximadamente 50 kDa y corresponde a la tercera parte del tamaño del anticuerpo. Desde las primeras expresiones recombinantes de los Fab [55] se ha demostrado que estas moléculas reconocen al antígeno con la misma afinidad que lo hace la molécula entera y son capaces de mantener sus estructuras estables siempre y cuando se promueva la formación de un puente disulfuro inter-catenario entre dos cisteínas presentes en los dominios constantes de ambas cadenas [56]. No solo por la funcionalidad demostrada, los Fab son muy buenas alternativas para ser aplicados en inmunoensayos de detección ya que conservan ciertas regiones antigénicas originales que pueden ser detectadas por anticuerpos anti-Fab comerciales (comúnmente utilizados en inmunoensayos para detección de anticuerpos convencionales) [57]. Como contrapartida, el rendimiento de la expresión recombinante de los Fab no se caracteriza por ser muy alto debido a que su síntesis requiere el plegamiento de dos cadenas en paralelo y la asociación covalente de las mismas mediante el puente disulfuro. El plegamiento y el ensamblaje de estas moléculas debe realizarse en sitios como el periplasma bacteriano, el cual representa un espacio oxidativo capaz de promover la formación de los enlaces covalentes de cisteína y el correcto plegamiento de la proteína, sin embargo este es un sitio que presenta menor capacidad de reservorio de proteínas que el citosol bacteriano [58].

Los scFv son la estructura más pequeña y simple que se puede obtener manteniendo las propiedades de unión originales de los anticuerpos convencionales y presenta un tamaño

aproximado de 25 kDa. Se forman como una estructura monocatenaria constituida por los dominios variables de las cadenas pesadas y livianas que se enlazan entre sí por secuencias unificadoras (*linker* inter-dominios) (**Figura 7**). La expresión de estos fragmentos *a priori* parece ser más eficiente que los Fab heterodiméricos, ya que es codificada por un solo segmento génico y los sistemas de expresión no necesitan coordinar la expresión de dos cadenas en simultaneo [57]. Sin embargo, muchas veces estas estructuras presentan mayor tendencia a formar agregados en el interior de las bacterias, generar fragmentos de muy poca estabilidad debido a la carencia del puente disulfuro inter-catenario (presente en los Fab). Además, debido a que es una construcción artificial que involucra un *linker*, la afinidad de los mismos se ha visto en varios casos alterada respecto a la afinidad del anticuerpo convencional [59].

La manipulación y la ingeniería genética de anticuerpos recombinantes scFv y Fab permite también la generación de variantes por mutagénesis dirigida para aumentar las fuerzas de unión de los anticuerpos y poder desarrollar inmunoensayos más sensibles [60]. También, se han modificado las cadenas de los anticuerpos para generar nuevas estructuras. Por ejemplo, la combinación de fragmentos de anticuerpos mediante la fusión de sus secuencias génicas ha permitido la generación de moléculas bivalentes [61] e incluso multivalentes [62] lo que ha promovido mejoras en las afinidades funcionales (**Figura 7**).

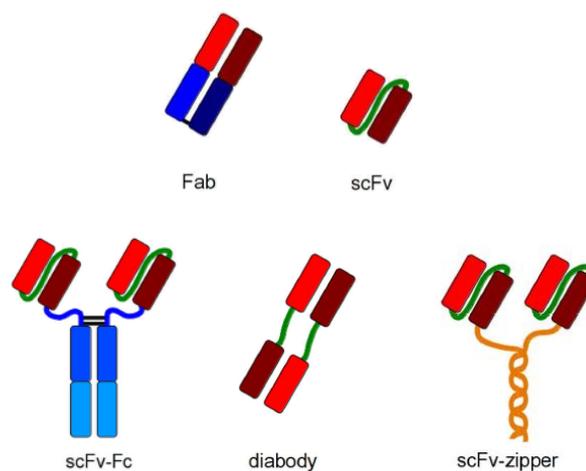


Figura 7. Formatos de anticuerpos recombinantes con diferentes aplicaciones. A partir de los anticuerpos scFv y Fab recombinantes se pueden realizar variantes que permitan potenciar sus aplicaciones como moléculas de reconocimiento. Generación de dímeros (diabody y scFv-zipper) y funcionalización con Fc (scFv-Fc) son ejemplos de alternativas que se pueden construir gracias a la manipulación genética de los anticuerpos. En rojo se representan las regiones variables y en azul las regiones constantes de los anticuerpos. (Imagen adaptada de Frenzel et al. [47])

Una interesante alternativa a los fragmentos convencionales mencionados, son los fragmentos recombinantes derivados de los anticuerpos provenientes de animales camélidos como la Llama (*Llama glama*) o el camello (*Camelus sp*). El sistema inmune de estos animales es capaz de producir anticuerpos homodiméricos formados únicamente por dos cadenas pesadas, carentes de cadenas livianas. Se los conoce como anticuerpos de cadena pesada (HCAb) y su cadena pesada carece del dominio constante CH1, por lo que sus brazos encargados del reconocimiento antigénico (Fab en los convencionales) están únicamente formados por el dominio variable VH y se los diferencia de los convencionales con la sigla VHH (**Figura 8**). Como monodominios de pequeño tamaño (aproximadamente 15 kDa), los VHH presentan paratopes más simples y son casi tres veces más pequeños que la región Fab de los anticuerpos. A pesar de ser más sencillos que los convencionales, se presentan en los camélidos con un amplio repertorio de reconocimiento antigénico, lo que sugiere un rol trascendente de los HCAb en su sistema inmune [63]. La proteína recombinante derivada del dominio VHH se denomina *nanobody* y tiene un gran potencial en el área de ingeniería de anticuerpos, debido principalmente a su tamaño y fácil manipulación. A diferencia de los Fab y los scFv, la estructura monodominio de los *nanobodies* es codificada por un único gen que puede ser fácilmente amplificado por una reacción de PCR lo que facilita la construcción de bibliotecas para su selección.

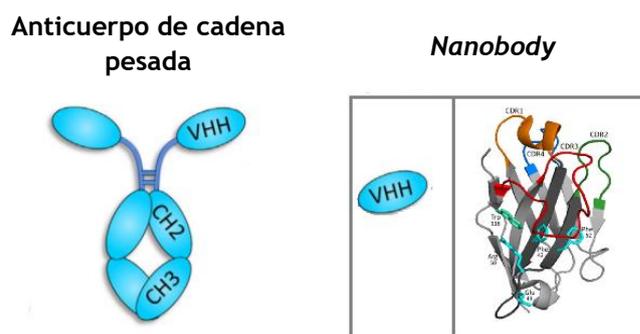


Figura 8. Representación esquemática de la estructura de los anticuerpos de cadena pesada. Esta clase de anticuerpos es producida por los animales camélidos y algunas especies de tiburones. Consisten en la asociación de dos cadenas pesadas idénticas que contienen un único dominio variable encargado del reconocimiento antigénico (imagen de la izquierda). El dominio variable puede ser expresado de forma recombinante (*nanobody*) y su capacidad de reconocimiento se genera por la presencia de 4 regiones variables (CDRs) que se pliegan y dan lugar a la estructura del parátipe (imagen de la derecha). **(Imagen adaptada de González-Sapienza et al. [64])**

En el capítulo VI de esta tesis se promovió la producción de anticuerpos recombinantes Fab y *nanobodies* para ser aplicados como herramientas alternativas a los anticuerpos monoclonales en el desarrollo de inmunoensayos para detección de pequeños analitos.

3- Monitoreo de compuestos químicos de bajo peso molecular

Muchos de los compuestos que han sido introducidos por la evolución de nuestra sociedad, deben ser monitoreados cuando generan riesgos colaterales para la misma. La mayoría son compuestos químicos de bajo peso molecular (tamaños menores a 1000 Da), como pesticidas, toxinas, drogas, hormonas, explosivos, etc. Diversas técnicas han sido desarrolladas y perfeccionadas para la detección e identificación de estos compuestos, incluyendo una variedad de métodos analíticos instrumentales, mayormente basados en sistemas cromatográficos como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) o GC (cromatografía gaseosa), acoplados a distintos sistemas de detección. Estos suelen ser los métodos de referencia, pero requieren procedimientos extensos de preparación y limpieza de la muestra, costosos equipamientos y mantenimiento, y la necesidad de técnicos experimentados, que operan como una importante limitante de la capacidad analítica. Si bien no alcanzan la precisión de los métodos instrumentales, los inmunoensayos son muy bien valorados como técnicas de monitoreo de pequeños analitos debido a que son más simples, de bajo costo y pueden ser muy sensibles y robustos [65]. Además, permiten el análisis de múltiples muestras en simultáneo (*high throughput*) por lo que son muy aceptados como técnicas de rastreo primario (*screening*) con posibilidad de complementar la capacidad analítica de los métodos instrumentales [66-70].

Inmunoensayos no competitivos para detección de pequeñas moléculas

Debido al pequeño tamaño y a la carencia de más de un epítotope, la inmunodetección de los analitos de bajo peso molecular se debe realizar con los inmunoensayos de competición descritos previamente. Sin embargo, desde que las sensibilidades y especificidades de estos ensayos son generalmente desfavorables frente a la de los ensayos no competitivos, una de las subáreas dedicadas al desarrollo de inmunoensayos apunta a la implementación de formas de detección no competitivas para estas moléculas.

Uno de los primeros esfuerzos en generar ensayos no competitivos estuvieron dirigidos a la detección de inmunocomplejos analito-anticuerpo y a desarrollar inmunoensayos tipo *sandwich* basados en el uso de un segundo anticuerpo anti-inmunocomplejo,

denominados anticuerpos anti-idiotipos por su especificidad por el parátipe uniendo al analito [71-73]. Sin embargo, la obtención de anticuerpos anti-idiotipos se ha limitado a casos específicos y las probabilidades de seleccionarlos exitosamente de forma general contra cualquier idiotipo tienden a ser bajas. Esto se atribuye a que el sitio de unión del anticuerpo que involucra del idiotipo consiste en una superficie extensa mientras que la región del analito expuesta al solvente es una mínima proporción de la misma. Dado el pequeño tamaño del analito, la diferencia entre el parátipe original del anticuerpo y el parátipe unido al analito es mínima, lo que hace difícil de encontrar anticuerpos que distingan eficientemente entre ambas estructuras. Más aún si se tiene en cuenta que, generalmente, hasta el 85% de la estructura de pequeñas moléculas puede llegar a estar “enterrada” en el anticuerpo anti-analito [74, 75]. Una alternativa elegante propuesta son los inmunoensayos denominados “Open Sandwich”. Estos han sido implementado para la detección de pequeñas moléculas [76], péptidos cortos [77] y lípidos [78]. La base para la detección no competitiva de estos inmunoensayos consiste en la asociación de los dominios variables de los anticuerpos VH y VL causada por la presencia del antígeno. La expresión independiente de cada dominio permite asociarlos independientemente a moléculas complementarias que al aproximarse tras la presencia del analito generan la señal del ensayo. Así se ha utilizado la asociación de fragmentos de la β -galactosidasa, [79], fluoróforos en FRET [80] o marcadores luminiscentes en BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) [81] para la generación de señal. Otro ejemplo interesante es el de los inmunoensayos denominados “*quenchbodies*”. Estos utilizan anticuerpos recombinantes scFv o Fab marcados con un fluoróforo en su extremo N-terminal, el cual genera una señal que puede verse disminuida por el efecto *quenching* que provoca la presencia cercana de residuos triptófanos en el sitio de unión del anticuerpo. La unión del antígeno interrumpe el *quenching* que provocan aquellos triptófanos y provoca un aumento de la emisión de fluorescencia. Estos cambios de señal le permiten a los *quenchbodies* detectar pequeñas moléculas en solución y con sensibilidades de igual o mayor magnitud que las obtenidas con ELISA competitivos [82, 83].

Como se mencionó más arriba, la mayoría de los intentos de búsqueda de anticuerpos anti-inmunocomplejos se ven fracasados por la elevada afinidad residual del anticuerpo anti-idiotipo en ausencia del analito. En 2005 nuestro grupo reportó el uso de péptidos aislados de bibliotecas de expresión en fagos que permitían enfocar el reconocimiento del idiotipo a la región que resultaba modificada por la unión del pequeño analito [84]. Los

ensayos desarrollados con esta metodología, denominados PHAIA, son un punto trascendente de mi tesis de doctorado y se detallan a continuación.

PHAIA - “Phage anti-immunocomplex assay” para detección no competitiva de pequeñas moléculas

El fundamento del inmunoensayo PHAIA para la detección no competitiva de pequeñas moléculas radica en la selección de péptidos cortos (entre 8 y 11 aminoácidos) y cíclicos (cerrados por un puente disulfuro formado por dos cisteínas que flanquean el péptido de secuencia aleatoria) capaces de reaccionar específicamente con la región del idiotipo del anticuerpo específico, modificada por la unión del analito de interés. Como todo formato no competitivo (tipo *sandwich*), el ensayo genera señales de detección proporcional al incremento de analito y ha demostrado sensibilidades al menos 10 veces mejores que la contraparte competitiva realizada con el mismo anticuerpo [84-87] y mayores especificidades generadas por el doble reconocimiento del analito [88].

El procedimiento de la técnica consiste en un formato de ELISA heterogéneo en el cual el anticuerpo se inmoviliza en la fase sólida y el analito y los péptidos anti-inmunocomplejo expresados en fagos filamentosos se unen simultáneamente formando el complejo terciario anticuerpo-analito-péptido. Estos péptidos anti-inmunocomplejos son seleccionados de bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos por *phage display*, como se describe en la sección 4. En el formato PHAIA, las partículas virales (fagos) que expresan el péptido son usadas directamente como reactivos del ensayo, y los fagos unidos al inmunocomplejo se detectan con un anticuerpo anti-fago conjugado a una enzima reportera (**Figura 9**). Debido al control que puede ser ejercido sobre el proceso de selección con *phage display*, péptidos específicos por diferentes inmunocomplejos pueden ser aislados de las bibliotecas de péptidos y de forma mucho más simple y sistemática que el proceso de obtención de anticuerpos anti-inmunocomplejos. Esto hace que los ensayos PHAIA sean técnicas versátiles con potencial de ser desarrolladas rápidamente contra cualquier inmunocomplejo de interés. De hecho, no solo se ha demostrado su aplicación para distintos inmunocomplejos formados por anticuerpos monoclonales (AcMo), sino que también han podido ser aplicados con éxito en ensayos con formación de inmunocomplejos con anticuerpos de naturaleza policlonal [85]. Por otra parte, como alternativa a los formatos de ELISA convencionales, las partículas virales también han podido ser aplicadas a otros formatos de detección en biosensores

electroquímicos [89], ensayos de detección con Inmuno-PCR [90] y ensayos rápidos de detección visual [88].

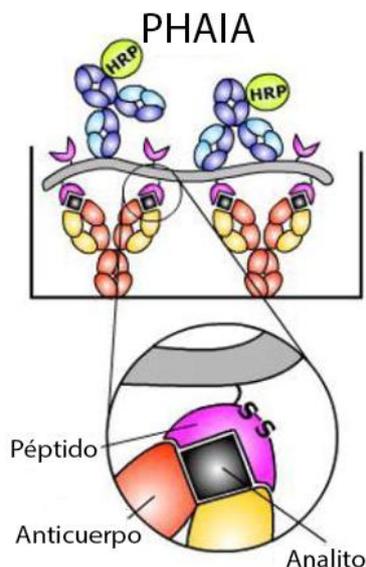


Figura 9. Representación del ensayo PHAIA (*Phage anti-immune complex assay*). En este ensayo la formación del inmunocomplejo es detectado por su reacción con las partículas virales que expresan péptidos en su superficie y que a su vez son reconocidas por un anticuerpo que es conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) y específico por proteínas de la cápside viral. Un posible esquema de la triple interacción anticuerpo-analito-péptido del PHAIA se muestra dentro del enfoque. (Imagen adaptada de González-Techera et al. [84])

Nanopeptámeros: asociación de los péptidos anti-inmunocomplejo a proteínas multiméricas

El principio PHAIA ha mostrado su potencial en la detección de diversos analitos (como herbicidas, drogas, metabolitos, hormonas), pero las partículas virales son material biológico, y como tales, son reactivos no convencionales difícilmente admitidos en compañías dedicadas a la producción y suministro de inmunoensayos. Por su capacidad de infectar cepas de *E. coli*, los fagos pueden generar dificultades al momento de cumplir con las normas de seguridad de muchos laboratorios, así como con el transporte de los mismos entre fronteras. En consecuencia, uno de los desarrollos críticos que apuntó el grupo fue desarrollar alternativas al uso de fagos, generando nuevos reactivos en los que el péptido anti-inmunocomplejo no estuviera expresado en los fagos, y que a su vez pudieran ser asociados a una actividad enzimática que generase la señal del ensayo. Al mismo tiempo, debía considerarse que la estructura sustituta del fago requería presentar el péptido de manera multivalente para reproducir la avidéz del reactivo anti-inmunocomplejo que era inherente a los fagos y los niveles de sensibilidad obtenidos en

PHAIA. Los primeros intentos de desarrollo de ensayos tipo PHAIA libres de fagos consistieron en usar péptidos anti-inmunocomplejos sintéticos y biotinilados (suministrados por compañías especializadas en síntesis) y acomplejados con un conjugado comercial de estreptavidina-HRP en ELISA (**Figura 10**). En este trabajo, los complejos péptidos anti-inmunocomplejos unidos a estreptavidina comercial fueron denominados nanopeptámeros, y su aplicación como sustitutos de los fagos permitieron inmunoensayos de detección de pequeños analitos tan sensibles como los ensayos PHAIA [91]. Además, a diferencia de los fagos, estos reactivos pudieron ser adaptados en formatos de flujo lateral para detección no competitiva de pequeños analitos, con señal visual positiva, cuyas ventajas fueron denotadas en la **figura 5**.

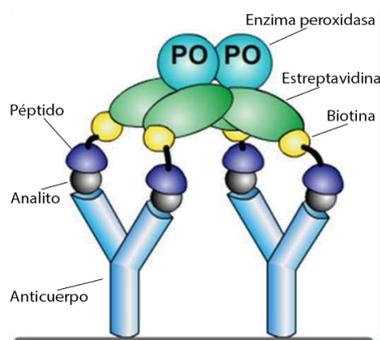


Figura 10. Representación del ensayo no competitivo con nanopeptámeros. Este ensayo consiste en aplicar nanopeptámeros como sustitutos de las partículas virales del PHAIA. El nanopeptámero se forma por asociación de estreptavidina comercial con cuatro moléculas de péptido sintético biotinilado. La unión de nanopeptámero al inmunocomplejo analito-anticuerpo es detectado con la enzima HRP conjugada a la estreptavidina. (Imagen adaptada de Vanrell et al. [91])

Siguiendo en esta línea, el capítulo I de esta tesis consistió en producir los nanopeptámeros de forma recombinante. Esto implicó expresar proteínas homomultiméricas como proteínas base (*scaffold*) fusionadas en sus extremos a las secuencias de los péptidos anti-inmunocomplejos. Las proteínas usadas como *scaffold* debían ser de fácil producción recombinante, tener baja o nula toxicidad en sus nuevas células huésped (*E. coli*), presentar buena estabilidad y exponer sus extremos N-terminal (Nt), C-terminal (Ct) o ambos hacia el solvente para lograr una adecuada presentación de los péptidos fusionados. Las proteínas utilizadas en este trabajo para el desarrollo de nanopeptámeros recombinantes fueron estreptavidina y la subunidad B de verotoxina. Ambas se describen a continuación.

Tetrámero de estreptavidina

Esta proteína es producida naturalmente por la bacteria *Streptomyces avidinii* y posee una estructura tetramérica con 4 subunidades idénticas cuyos extremos Nt y Ct están expuestos al solvente (**Figura 11**) [92]. Cada subunidad consiste en una estructura terciaria correspondiente a un barril de hojas β antiparalelas y posee un sitio de unión para la biotina, que al formar el tetrámero aumenta enormemente su afinidad [93], lo que ha sido explotado en el desarrollo de distintas aplicaciones en inmunoensayos, utilizando reactivos biotinilados en conjunción con conjugados de esta proteína [94]. Debido a esto y a que ha sido producida y purificada con alto rendimiento a partir de células *E. coli* en diversos trabajos [95, 96], la estreptavidina fue una de las proteínas seleccionadas para su producción y su aplicación en los inmunoensayos alternativos al PHAIA.

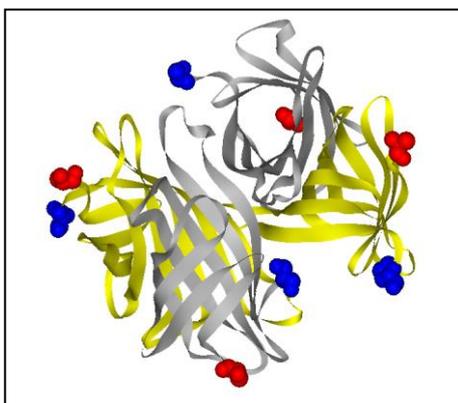


Figura 11: Estructura Homo-tetrámero de estreptavidina. Cuatro dominios de estreptavidina con los extremos N-terminal (extremo azul) y C-terminal (extremo rojo) ubicados hacia el exterior del tetrámero formado.

Subunidad B pentamérica de la proteína verotoxina

La verotoxina es una toxina expresada naturalmente por algunas cepas de *E. coli*. Consta de dos subunidades, A y B, siendo su subunidad A la fracción toxica de la proteína mientras que la subunidad B media la unión de la toxina con las membranas celulares del huésped. Dicha subunidad B consiste en un pentámero de 38.5 kDa y formado por 5 monómeros idénticos de 7.7 kDa [97]. Debido a su pequeño tamaño y a que su origen natural es *E. coli*, la subunidad B de la verotoxina es una alternativa elegante para su aplicación en los nanopeptámeros. A su vez, el pentámero resulta ideal para expresarlo como proteína de fusión a otras moléculas, ya que se presenta como una estructura en forma de anillo donde todos sus extremos N-t y C-t se encuentran expuestos en la periferia del mismo. Debido a estas características la verotoxina ya ha sido usada como proteína de fusión a diversas moléculas con el fin de aumentar la avidéz de los reactivos en los

respectivos ensayos [97, 98] (**Figura 12**). Su expresión ha resultado eficaz en bacterias *E. coli*, obteniéndose grandes cantidades de proteína a partir de la fracción soluble de la célula y en su correcto estado pentamérico [97, 98]. Si bien carece de la ventaja de unión a biotina que es característico de la estreptavidina (tan importante en los inmunoensayos), la verotoxina, como cualquier otra proteína estable, puede ser conjugada químicamente a cualquier enzima reportera para su aplicación en inmunoensayos.

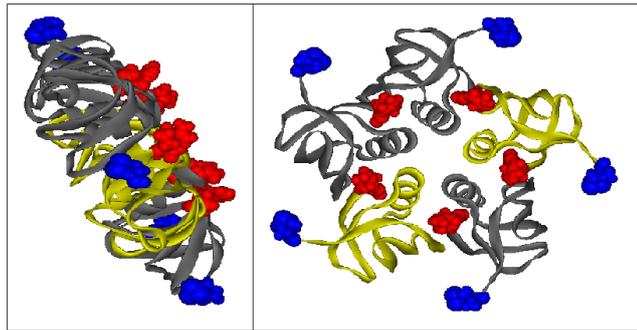


Figura 12: Estructura Homo-pentámero de verotoxina. Anillo de cinco dominios idénticos formando el pentámero de verotoxina con los extremos N-terminal (extremo azul) y C-terminal (extremo rojo) ubicados hacia el exterior del mismo.

4- Bibliotecas combinatorias basadas en bacteriófagos. Técnica *phage display*

La tecnología de las bibliotecas combinatorias representa una herramienta *in vitro* muy poderosa para selección de ligandos que se unan a la molécula selectora de interés. Sus orígenes se fundamentan en los conceptos de la evolución natural, que, mediante ciclos iterativos de selección, diversificación y amplificación, promueve la generación de individuos con determinadas características que garantizan su éxito y supervivencia. De la misma forma, la construcción de bibliotecas combinatorias biológicas apunta a generar colecciones muy diversas de péptidos o proteínas, a las cuales se les pueda aplicar determinadas presiones de selección para favorecer el enriquecimiento de aquellas que se unan a la molécula utilizada en la selección. Los tipos de bibliotecas biológicas pueden ser construidas sobre virus, bacterias [99], levaduras [100], o sobre sistemas *in vitro* como *ribosome display* [101], *DNA display* [102] o *mRNA display* [103]. Entre estas, la tecnología de *phage display* basada en el uso de bacteriófagos es la más utilizada, y fue introducida por George Smith en 1985 [104]. Esta fue aplicada para la creación de las primeras bibliotecas de péptidos expresados en fagos en 1990 [105-107] y fueron seguidas por las primeras bibliotecas de fragmentos de anticuerpos [108, 109].

La tecnología de *phage display* utiliza bacteriófagos filamentosos de tipo Ff (generalmente conocido como bacteriófago M13) para llevar a cabo la construcción de las bibliotecas. Estos son un tipo de virus que utilizan un *pili* de conjugación F como receptor para iniciar el proceso de infección y son específicos para células *E. coli* que portan el plásmido codificante del *pili* F. Se trata de partículas virales filamentosas de aproximadamente 900 nm de largo y 7 nm de diámetro con un peso molecular de 1.6×10^7 Da. Su estructura consiste de ADN de simple hebra circular rodeado por una cápside cilíndrica mayormente compuesta por la proteína pVIII y cerrada en los extremos por las proteínas pIII y pVI, y pVII y pIX (**Figura 13**) [110]. La proteína pIII está formada por tres dominios, y media el proceso de infección a través del contacto de sus dos dominios terminales con proteínas del *pili* de la bacteria [111]. Una vez infectada la bacteria, el fago lleva adelante su ciclo de replicación en el interior y las partículas virales comienzan a ensamblarse sobre la superficie de la membrana bacteriana. Durante este proceso, la molécula de ADN que codifica para las proteínas del fago es encapsulada dentro de la cápside, estableciéndose el vínculo físico entre genotipo y fenotipo. En la construcción de bibliotecas de fagos se pueden generar modificaciones genéticas para promover la expresión de proteínas de cápside fusionadas en sus extremos (generalmente el N-terminal) a moléculas como anticuerpos o péptidos que determinarán el fenotipo de cada clon. De las proteínas de la cápside, la pIII, que se presenta de a 5 copias, es ampliamente utilizada como proteína de fusión para la construcción de bibliotecas de anticuerpos y péptidos recombinantes [112]. Por otra parte, la proteína pVIII, que es la proteína mayoritaria de la cápside con 2700 copias por partícula, es también ampliamente utilizada como proteína de fusión. Sin embargo, las bibliotecas en pVIII no toleran secuencias peptídicas largas (mayores a 15 aminoácidos) [112], por lo que pVIII es utilizada solamente para la construcción de bibliotecas de péptidos. La fusión péptido o anticuerpo a la proteína puede estar codificada en el propio genoma del fago o en un vector separado (denominado fagémido) que puede ser encapsulado (tal como lo hace el genoma de fago) con la ayuda de un fago “*helper*”. Los vectores fagémidos son plásmidos que codifican la fusión del péptido/anticuerpo a la proteína del fago (pIII/pVIII) y que contienen un origen de replicación “*f1 ori*” para promover que el vector pueda ser empaquetado como ADN simple hebra dentro de la partícula viral y un gen de resistencia a antibiótico para favorecer su selección. El resto de las proteínas que dan lugar a la replicación y empaquetamiento del fagémido son provistas a través de la sobre infección con el fago *helper*. Este fago contiene mutaciones que hacen que su propia replicación y su

empaquetamiento sean poco eficientes, lo que promueve un empaquetamiento preferencial por parte del fagémido durante el proceso de infección [113]. En esta tesis se trabajó con bibliotecas de fagos sobre la base de fagémidos y con presentación de anticuerpos recombinantes fusionados sobre las proteínas pIII y de péptidos de 8 y 9 aminoácidos representados sobre las proteínas pVIII de la cápside.

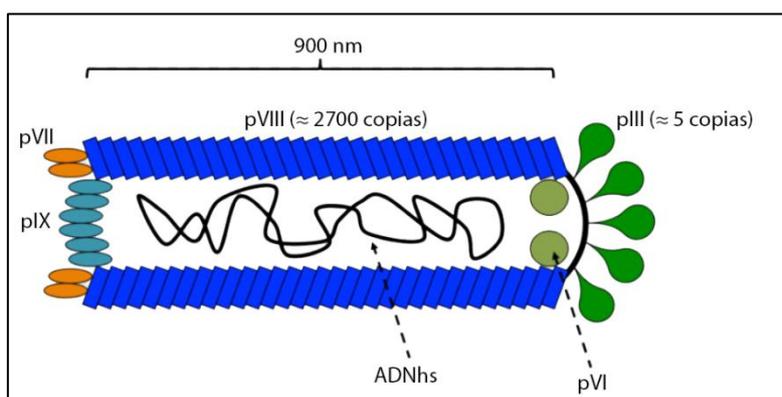


Figura 13: Representación esquemática del bacteriófago M13. Estos fagos son ampliamente usados por la tecnología *Phage display*. Presentan su información genética en ADN simple hebra (ADNsh) encapsulada por envolturas proteicas (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX). Tanto la proteína pIII como la pVIII son muy utilizadas para la presentación de péptidos y anticuerpos y la construcción de bibliotecas.

Bibliotecas de péptidos en fagos y selección de péptidos anti-inmunocomplejos para el desarrollo de PHAIA

La construcción de las bibliotecas de péptidos se realiza mediante la ligación y clonado de oligonucleótidos aleatorios que codifican los péptidos en un plásmido derivado del genoma del fago, o más comúnmente en vectores fagémidos que por su menor tamaño permiten generar bibliotecas de mayor diversidad [114]. En los oligonucleótidos los residuos aleatorios están codificados por codones degenerados NNK, siendo N cualquiera de los cuatro nucleótidos y K cualquiera de los nucleótidos G o T, de esta forma se generan 32 codones que codifican los 20 aminoácidos y un solo codón *STOP*. Cualquiera de los 20 aminoácidos tiene la posibilidad de ser insertado en cada posición, por lo que las complejidades teóricas de bibliotecas de péptidos que tienen 6, 7, u 8 aminoácidos podrían alcanzar 64×10^6 , 1×10^9 y 25×10^9 variantes, respectivamente. El producto de ligación de los oligonucleótidos y el vector fagémido es luego electroporado en bacterias para generar el ADN propio de la biblioteca. La eficiencia de esta electroporación es la que determina la diversidad final de la biblioteca. Posteriormente, las células se cultivan en medios con el antibiótico correspondiente y, mediante adición de un fago *helper* e

induciendo la expresión de las proteínas de la cápside y la proteína fusionada al péptido, los fagémidos son empacados en partículas virales que conforman la biblioteca.

Ambas proteínas pIII y pVIII son comúnmente utilizadas para la expresión de péptidos en fagos. Al utilizar un vector fagémido de expresión en pVIII aproximadamente 200 copias de las 2700 copias del pVIII expresarán el péptido [115]. La alta expresión del péptido a lo largo de la cápside promueve que el reconocimiento del ligando sea favorecido por la fuerza de avidéz generada por la multiplicidad de unión. De esta forma, la expresión sobre pVIII puede permitir la selección de péptidos con baja afinidad de unión que podrían no ser seleccionados si su expresión fuera en bibliotecas de pIII. Otro aspecto importante para seleccionar la biblioteca a utilizar radica en el uso de péptidos lineales o flanqueados por cisteínas que forman péptidos cíclicos. Estos últimos tienen una menor libertad conformacional y por tanto un menor cambio entrópico al unirse a su objetivo, lo que puede desembocar en una mayor afinidad de unión [116, 117].

Básicamente la selección de ligandos peptídicos a partir de estas bibliotecas se realiza mediante el proceso denominado “*panning*”. La selección por *panning* permite aislar aquellos clones específicos por la molécula de interés del resto de los clones presentes (la mayoría). Para esto la molécula selectora se inmoviliza sobre una fase sólida (ej. placa de ELISA) y se incuba con la biblioteca. Para evitar el enriquecimiento de clones inespecíficos, se utilizan sucesivos y repetidos lavados en condiciones exigentes (uso de detergentes, tiempos prolongados, etc.). Los clones específicos retenidos a través de su unión a la molécula selectora son entonces eluidos ya sea por competición con un ligando conocido de la molécula selectora, por disminución de pH, o por digestión con proteasas en condiciones controladas. Los fagos liberados son utilizados para infectar una cepa de *E. coli* y ser amplificados en número para nuevamente ser sometidos a otra ronda de selección. Luego de un número determinado de rondas de *panning* (generalmente 3-5), se ensaya la especificidad de los clones individuales mediante ELISA. La secuencia aminoacídica de los péptidos de los clones positivos se obtiene fácilmente secuenciando el ADN. Las secuencias consenso (aminoácidos compartidos entre los distintos anticuerpos) pueden ser deducidas comparando las secuencias de un vasto número de clones. Dichas secuencias consenso son importantes ya que a menudo están compuestas de los aminoácidos que son esenciales para la unión.

Para la selección de péptidos anti-inmunocomplejos en el desarrollo de inmunoensayos PHAIA y de nanopéptámeros (descritos anteriormente) las bibliotecas que han dado los mejores resultados son las de péptidos cíclicos expresados en pVIII [84, 85]. Las moléculas selectoras son en este caso inmunocomplejos formados por el anticuerpo y el analito en cuestión. En muchos casos resulta beneficioso incluir una etapa de pre-adsorción en la cual la biblioteca se incuba previamente con el anticuerpo para descartar aquellos péptidos que se unen al mismo en ausencia del analito. Luego de realizar las etapas de lavado, los clones unidos al inmunocomplejo son eluidos utilizando soluciones con pH bajo que permitan romper las interacciones péptido-inmunocomplejo. Luego de varios ciclos de *panning*, muchos clones individuales se analizan y se seleccionan aquellos que reaccionan intensamente con el inmunocomplejo, pero que no reaccionan con el anticuerpo en ausencia del analito (**Figura 14**)

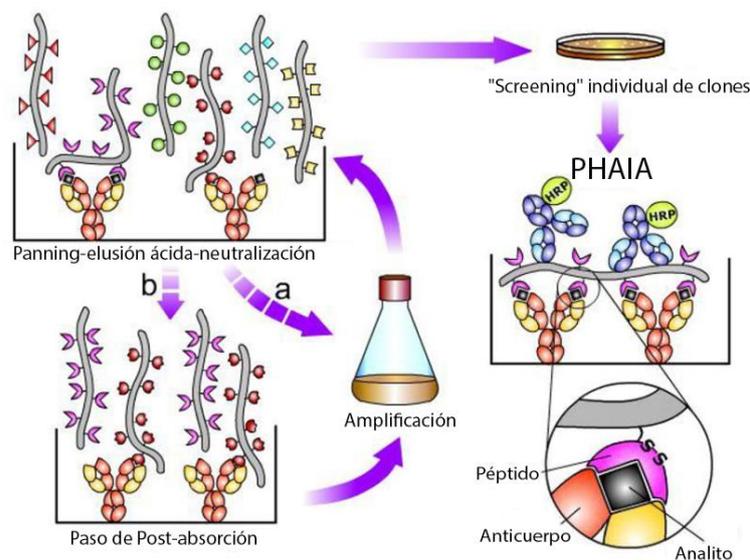


Figura 14. Esquema del procedimiento de selección de fagos anti-inmunocomplejos para desarrollo de ensayo PHAIA. La selección por *panning* se realiza en pocillos de ELISA, donde los clones específicos de una biblioteca de péptidos en fagos son seleccionados por el reconocimiento del inmunocomplejo anticuerpo-analito. Los *panning* involucran etapas de incubación de la solución de fagos con el inmunocomplejo, seguido rigurosos lavados y elución de los clones específicos con soluciones a pH ácido, que luego son neutralizadas. La población de fagos seleccionados durante la ronda puede ser usada para infectar *E. coli* y amplificarla (a) o ser sometida a un paso de post-adsorción para eliminar clones que tengan buena afinidad por el anticuerpo libre (b). Luego de varias rondas de selección, los clones son analizados individualmente mediante un ELISA de “*screening*”, en el cual se evalúa la reactividad diferencial por el anticuerpo-analito y por el anticuerpo libre de analito. El ELISA desarrollado con estos clones consiste en el PHAIA descrito previamente. (**Imagen adaptada de González-Tejera et al. [84]**)

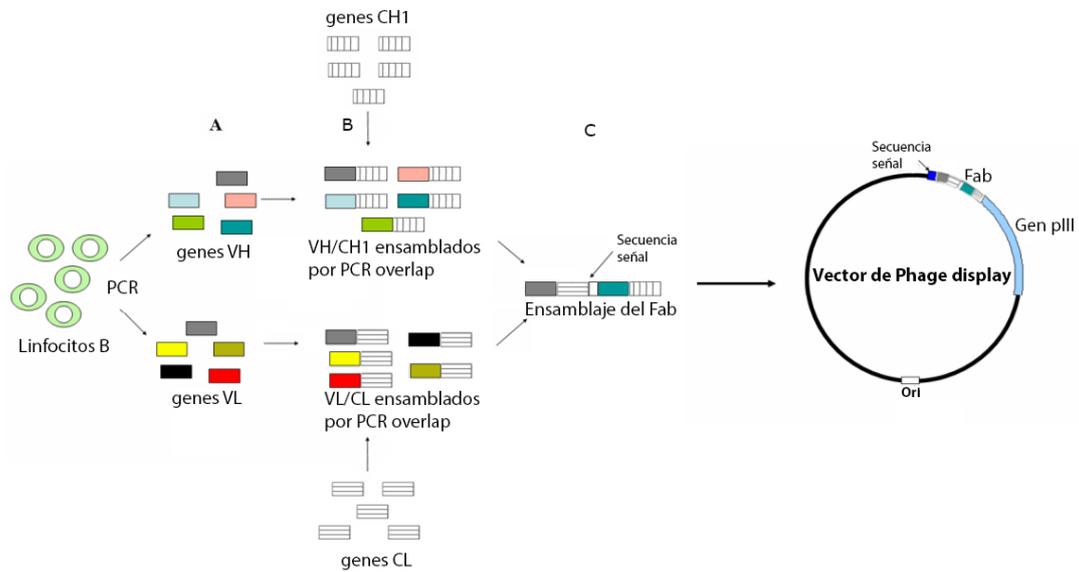
Bibliotecas de fragmentos de anticuerpos en fagos y selección por panning

Como ya se mencionó las bibliotecas de anticuerpos pueden ser construidas sobre la base de los fragmentos recombinantes de anticuerpos scFv o Fab en el caso de anticuerpos convencionales o del dominio VHH (*nanobodies*) en el caso de anticuerpos de camélidos. La construcción de las bibliotecas de anticuerpos convencionales implica un primer paso de retro-transcripción para generar ADN copia a partir del ARN extraído de linfocitos y a continuación se amplifican por PCR las regiones que codifican los dominios VH y VL de los anticuerpos. Dependiendo del tipo de biblioteca puede ser necesario incorporar dominios adicionales, por ejemplo al preparar bibliotecas de Fab [118]. Los genes amplificados se clonan en un vector fagémido fusionados a la proteína pIII, y con estos se generan las bibliotecas de expresión en fagos, **figura 15**. En esta figura se ejemplifica la generación de una biblioteca de Fab utilizando el vector pComb3x desarrollado por el Dr. Carlos Barbas, The Scripps Research Institute [113].

La dificultad para el clonado de las regiones VH y VL varía dependiendo de la especie animal utilizada. Por ejemplo, en el caso del ratón es necesario realizar 128 combinaciones de cebadores para poder cubrir las variaciones de los distintos segmentos génicos V de las cadenas pesadas y livianas (kappa y lambda) así como las variaciones en la región J de las mismas [113]. Otras especies como el pollo, que carecen de cadena kappa y que generan su diversidad por conversión génica a partir de un único segmento génico VH y un único VL, requieren de un único par de cebadores para la cadena liviana y otro para la pesada [118]. Debido a que los genes VH y VL se amplifican separadamente y son recombinados al azar, para aumentar la probabilidad de recomponer el sitio de unión original del anticuerpo es necesario generar bibliotecas de alta diversidad [113]. Esto es diferente en el caso de bibliotecas de anticuerpos de camélidos, dado que el sitio de unión al antígeno depende exclusivamente de un único dominio (VHH) y la especificidad original es siempre conservada, por lo que la diversidad final de las bibliotecas de *nanobodies* puede ser varios órdenes inferior al de las bibliotecas de fragmentos de anticuerpos convencionales [113].

La selección de los clones de interés se realiza mediante *panning* en forma similar al proceso utilizado en la selección de péptidos mediante *phage display*. La molécula selectora en este caso es el antígeno de interés.

I



II

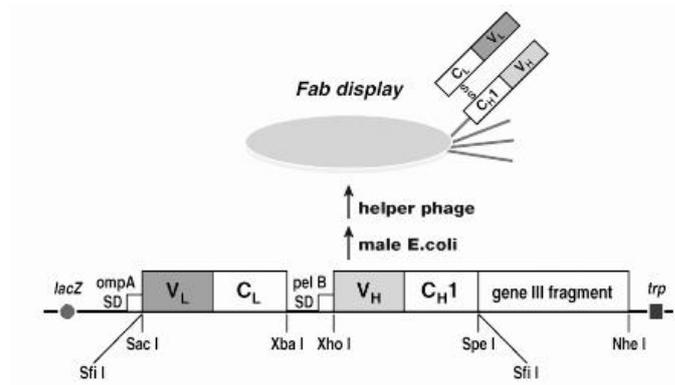


Figura 15: Etapas involucradas en la construcción de una biblioteca de anticuerpos Fab en fagos. I) Amplificación y ensamblado de los genes para la expresión del Fab: A, Amplificación y ensamblaje de los genes V_H y V_L ; B, PCR de solapamiento (*overlap*) para formar los genes V_H - C_{H1} y V_L - C_L ; C, PCR de *overlap* para generar el casete que se clonará en el vector pComb3x. II) Esquema de la construcción del casete utilizado para la expresión policistronica de las cadenas del Fab en el vector pComb3x. Los dos sitios asimétricos SfiI permiten el clonado del casete en el vector. De esta forma los genes V_H - C_{H1} resultan fusionados a una versión truncada del gen de la proteína pIII del fago, y las secuencias líderes ompA y pelB, precedidas de las respectivas regiones Shine-Dalgarno (SD), dirigirán la síntesis de ambas cadenas al periplasma. Las cisteínas C-terminales de C_{H1} y C_L son allí oxidadas formando un puente disulfuro entre ambas cadenas [113].

OBJETIVOS

Objetivo general:

Potenciar la tecnología de inmunoensayos no competitivos con nanopeptámeros como herramienta para monitoreo de pequeñas moléculas, intentando simplificar la producción de los reactivos implicados (anticuerpos y nanopeptámeros) y explorar la aplicación de formatos alternativos a los comúnmente realizados en placas de ELISA.

Objetivos específicos:

- 1- Expresión recombinante de los nanopeptámeros en *E. coli*, utilizando construcciones génicas que codifican la expresión de los péptidos fusionados a monómeros de proteínas oligoméricas.
- 2- Prueba de concepto de la tecnología para transferencia a la industria.
- 3- Transferencia a formatos de inmunoensayos homogéneos, que por su característica de *mix-and-read* les da la ventaja de ser fácilmente automatizables, algo que es muy valorado en la industria de inmunoensayos.
- 4- Establecer en nuestro laboratorio la tecnología para la generación de bibliotecas de Fab en fagos filamentosos. Selección y producción de Fab recombinantes como herramientas biotecnológicas alternativas a los nanobodies provenientes de camélidos (cuya producción ya está establecida en nuestro laboratorio).
- 5- Aplicación de Fab seleccionados para montar inmunoensayos competitivos para detección de pequeños analitos como paso preliminar a la búsqueda de péptidos anti-inmunocomplejos formados por el Fab y su analito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo I- Desarrollo de nanopeptámeros recombinantes utilizados para la detección no competitiva de dos herbicidas

Los materiales y metodologías utilizadas en este capítulo se describen en los artículos I y II adjuntos en esta tesis.

Capítulo II Confidencial- Transferencia de tecnología PHAIA/nanopeptámeros

Capítulo III- Detección no competitiva de pequeñas moléculas usando nanopeptámeros sintéticos en inmunoensayo luminiscente mediante canalización de oxígeno (LOCI)

Los materiales y las metodologías utilizadas en este capítulo se describen en el artículo III adjunto en esta tesis.

Capítulo IV- Obtención de un anticuerpo Fab anti-cocaína para el desarrollo de inmunoensayos como herramientas para monitoreo de consumo de cocaína

Inmunización de pollo (*Gallus gallus*) con succinyl norcocaine (SNC) conjugado al *carrier* BSA. El antígeno SNC derivado de la estructura de cocaína y conjugado a través de un grupo carboxilo a la proteína BSA, obsequiado por el grupo de Frank Orson, Baylor College of Medicine, Houston, USA [119], fue utilizado para la inmunización del pollo. Se realizaron 3 administraciones de 200 µg del antígeno en intervalos de 15 días. Como adyuvantes de la inmunización se utilizó adyuvante completo de Freund (ACF) en la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund (AIF) en las siguientes. La sangre del animal fue tomada una semana después de cada inmunización y titulada por ELISA para determinar respuesta inmune antígeno-específica. Las titulaciones se realizaron en placas de ELISA sensibilizadas con 0.1 µg por pocillo de hapteno SNC conjugado a KLH (hemocianina de lapa californiana).

Construcción de biblioteca de anticuerpos Fab.

Generación de fragmentos Fab quiméricos pollo/humano. Para la construcción de bibliotecas de Fab se realizaron etapas de amplificación por PCR siguiendo el protocolo reportado por el trabajo de Andris-Widhopf et al. 2000 [118] y se detalla a continuación.

Una semana después de la última inmunización se realizó la eutanasia del animal, a partir del cual se cosecharon los bazo y médula ósea. Las células de estos órganos se combinaron y se resuspendieron en TRIzol Reagent (Invitrogen) para extraer el ARN, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN fue determinada mediante medidas de la absorbancia a 260 nm y 280 nm con NanoDrop 1000 (ThermoFisher). La solución de ARN fue almacenada a -80 °C.

Se generó ADN copia (ADNc) realizando retrotranscripción con enzima transcriptasa reversa (RT) (Fermentas) y utilizando 5 µg de ARN molde. La reacción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el ADNc se prosiguió a la construcción del casete para clonar en el vector pComb3x tal como se describe en la **figura 15**. Esto requirió tres etapas de amplificación por PCR utilizando los pares de cebadores que se muestran en la **figura 16**.

En la primera etapa de PCR, los genes variables V_H y V_λ (uno de los tipos de genes VL) fueron amplificados desde el ADNc por dos reacciones independientes y utilizando los pares de cebadores CHybVH (5'-3')/CHybIg-B (3'-5') y CSVK (5'-3')/CHHybL-B (3'-5'), respectivamente. Por otro lado, los genes constantes derivados de un anticuerpo humano anti-toxina tetánica, C_{H1} y C_κ (como C_L), fueron amplificados, utilizando los pares de cebadores HIgCH1-F (5'-3')/dpseq (3'-5') y HKC-F (5'-3')/lead-B (3'-5'), respectivamente. El diseño de los cebadores permitió la adición de secuencias nucleotídicas hacia los extremos 5' y/o 3' de los amplicones que posibilitaron realizar las reacciones de PCR de solapamiento (*overlap*) de la siguiente etapa. Para cada reacción de PCR se utilizó 1 µL de ADN molde (ADNc o los genes C_{H1} o C_κ se utilizaron como molde) en una mezcla que contenía 25 pmoles de cada cebador, 5 µL de *buffer* de reacción 10x conteniendo 20 mM $MgSO_4$ (suplementado con la enzima), 1 µL 40 mM dNTPs (Fermentas), 0.5 µL de enzima *pfu* ADN polimerasa (Fermentas) y H_2O libre de DNAsas cantidad suficiente para (c.s.p.) el volumen final de 50 µL. Se realizaron 8 reacciones por

cada gen en termociclador LifeEco (Bioer) y el procedimiento de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 5 min. a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos (seg.), apareamiento a 56 °C por 30 seg. y elongación a 72 °C por 2 min. Al concluir el ciclado se realizó un paso de elongación final de 10 min. a 72 °C. Los amplicones (con tamaños de 350-400 pb) fueron recuperados y purificados desde geles de agarosa 1 %, usando kit de purificación Qiaquick gel extraction kit (Qiagen).

En la segunda etapa de PCR, los fragmentos pesados fueron formados por una PCR *overlap*, combinando 100 ng de V_H con 100 ng de C_{H1} en presencia del par de cebadores lead-VH (5´-3´)/dpseq (3´-5´), mientras que los fragmentos livianos fueron combinados en otra PCR con 100 ng de cada fragmento, V_λ y C_κ, en presencia de cebadores CSC-F (5´-3´)/lead-B (3´-5´). Los cebadores lead-VH y lead-B contenían secuencias complementarias que permitieron realizar la tercera etapa de PCR *overlap*. Las reacciones de PCR se realizaron con las mismas proporciones de reactivos que las primeras, mientras que las condiciones establecidas en termociclador fueron similares, con la diferencia que el segundo paso se redujo de 30 a 25 ciclos. Los amplicones (con tamaños de 750 pb) fueron purificados a partir de geles de agarosa 1 %.

En la tercera etapa de PCR, 100 ng de los fragmentos pesados se combinaron con 100 ng de fragmentos livianos utilizando el par de cebadores CSC-F (5´-3´)/dpEx (3´-5´). El producto de 1500 pb presentó sitios de restricción SfiI en sus extremos 5´ y 3´ que fueron usados para el clonado de los fragmentos en el vector fagémido pComb3x. Las condiciones de las reacciones fueron similares a las de arriba, con la diferencia que el tiempo destinado para la elongación de los fragmentos en cada ciclo fue de 4.30 min a 72 °C. Los amplicones (con tamaños de 1500 pb) fueron purificados a partir de geles de agarosa 1 % y digeridos con la enzima SfiI. Los fragmentos fueron ligados con 10 µg de vector fagémido, respetando una relación molar inserto:vector, 3 : 1 y mediante incubación con enzima ligasa T4 (Fermentas) a T.A. durante 60 min. La mezcla de ligación se precipitó con acetato de sodio 3 M y se lavó con etanol 70 %. Una parte del producto final fue usado para ser directamente transformado en células supercompetentes *E. coli* ER2738 (Lucigen) y construir la primera biblioteca, mientras que otra parte fue utilizada para realizar una nueva etapa de amplificación con polimerasa Phi29, descripta a continuación.

Iniciadores para amplificación de VH

CHybVH (sense)
5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG TCC 3'
CHybL-B (antisense)
5' CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CCC 3'

Iniciadores para amplificación de Vλ

CSCVK (sense)
5' GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC 3'
CHHyL-B (antisense)
5' AGA TGG TGC AGC CAC AGT TCG TAG GAC GGT CAG GGT TGT CCC GGC 3'

Iniciadores usados para amplificación de CH1

HlgCH1-F (sense)
5' GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC 3'
dpseq (antisense)
5' AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3'

Iniciadores usados para amplificación de Cκ

HKC-F (sense)
5' CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'
lead-B (antisense)
5' GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC 3'

Iniciadores usados para amplificación de VH-CH1

leadVH (sense)
5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC 3'
dpseq (antisense)
5' AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3'

Iniciadores usados para amplificación de Vλ-Cκ

CSC-F (sense)
5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'
lead-B (antisense)
5' GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC 3'

Iniciadores usados para amplificación de Fab completo

CSC-F (sense)
5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'
dp-EX (antisense)
5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC 3'

Figura 16. Secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores para la construcción de la biblioteca de Fab quiméricos pollo/humano. Se muestran de a pares los cebadores involucrados en las distintas PCR realizadas para la construcción de la biblioteca. Las secuencias se muestran en sentido 5'-3' y la orientación de cada cebador para la amplificación por PCR se indica entre paréntesis (*sense* o *antisense*)

Proceso de amplificación por Phi29 para aumentar diversidad de la biblioteca. Para la construcción de biblioteca con mayor diversidad, parte del ADN se sometió a un proceso de A- amplificación con polimerasa Phi29 y formación de concatémeros, B- digestión de concatémeros con enzima de restricción NotI y C- ligación y ciclado de los productos para transformar en células supercompetentes. El protocolo que se comenta a continuación se siguió según lo reportado en el trabajo de Christ et. al 2006 [120] y se esquematiza en la **figura 17**.

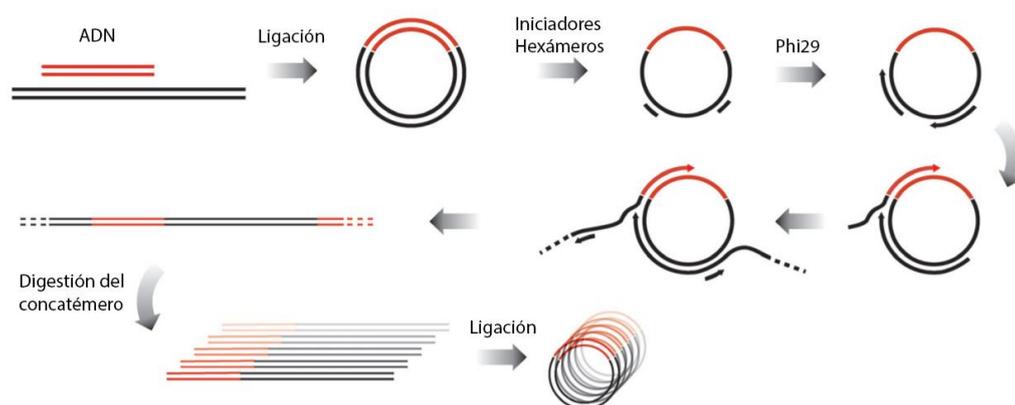


Figura 17. Amplificación in-vitro de las reacciones de ligación. Los fragmentos lineales de ADN son unidos y circularizados por tratamiento con ADN ligasa. Cebadores aleatorios de 6 nucleótidos (hexámeros) se hibridan con el ADN circular y marcan el inicio de las reacciones de amplificación con la polimerasa Phi29. La alta procesividad de esta enzima causa amplificaciones extensas de especies circulares y genera largos concatémeros lineales. Los concatémeros se clivan por enzimas de digestión y se re-circularizan usando ADN ligasa. Este producto de ligación es usado para la nueva transformación y construcción de bibliotecas. (Imagen adaptada de Christ et al. [120])

Una cantidad aproximada de 150 ng del producto de ligación fueron amplificados con la enzima Phi29 DNA polymerase (NEB, 250U). Para esto se preparó un mix de reacción de volumen final 8 mL, que incluyó 800 μ L de *buffer* de reacción 10x (suplementada con la enzima), 400 nmoles de cebadores hexámeros aleatorios (*random hexamers non phosphothioated*, 10 mM, IDT), 80 μ L BSA 100x (suplementada con la enzima), 400 μ L 10 mM dNTPs (AB, Amersham bioscience) y H₂O libre de nucleasas c.s.p. 8 mL. El ADN molde se mezcló con una alícuota del mix de reacción hasta alcanzar un volumen final de 500 μ L y se incubaron a 70 °C durante 5 min. A continuación, se agregó a la solución 1.25 μ L de la enzima Phi29 y la reacción de amplificación se incubó a 30 °C. A las 3 horas de reacción se duplicó el volumen de reacción con agregado de 500 μ L de mix y 1.25 μ L de Phi29 y se incubó por 3 horas más a la misma temperatura. Este paso de duplicación de volumen y agregado de Phi29 se repitió hasta alcanzar los 8 mL de reacción. Finalizada la incubación se detuvo la reacción con calentamiento a 70 °C durante 20 min. El ADN generado se concentró con filtros Ultra-15 centrifugal Filter 10-100 K (Amicon) en 1 mL de volumen final. En este paso, parte del ADN se precipitó y fue inmediatamente resuspendido en 1 mL de *buffer* cutsmart 1x (NEB) y mediante calentamiento a 70°C.

Del producto de amplificación, 25 μ g del ADN se digirieron en 400 μ L de una solución que contenía 40 μ L de *buffer* cutsmart 10x, 125 U de enzima NotI-HF (NEB) y H₂O. Se incubó la digestión por 3 horas a 37 °C y se finalizó la reacción con inactivación de la enzima a 65 °C durante 20 min.

Los productos de digestión se ligaron y, para lo cual el ADN fue diluido a concentraciones menores de 3 ng/mL de forma de favorecer ligación intra-plásmido y no inter-plásmidos. Para esto, los 400 μ L de reacción se diluyeron en 11 mL de reacción que incluía 1.1 mL de *buffer* de ligasa 10x (suplementado con la enzima), 7700 U de ligasa T4 (NEB, 20000 U) y H₂O. La reacción transcurrió durante 2 horas a T.A. Finalmente se inactivó la ligasa con 1 volumen de fenol-cloroformo y se aisló el producto de ligación con centrifugación a 4000 g durante 5 min. La fase acuosa (superior) se recuperó y se mezcló con 1 volumen de cloroformo seguido de una nueva centrifugación y recuperación de la fase acuosa. El producto fue reiteradas veces concentrado en filtros Ultra-15 centrifugal filter 10-100 K (Amicon) y diluido en H₂O para disminuir al mínimo posible las sales y las moléculas dATP involucradas en la ligación. El producto de ligación final se concentró en un

volumen de 40 μ L utilizando Ultra-0.5 mL centrifugal filters (Amicon) y en él se midió la concentración total de ADN en NanoDrop 1000 antes de ser usado en la transformación.

Transformación de células supercompetentes y preparación de fagos de la biblioteca.

Para la transformación de los productos de ligación (previos y posteriores a amplificación por Phi29) en las células ER2738, 4 μ g de ADN en un volumen máximo de 20 μ L se electroporaron en 350 μ L de células fraccionadas en 7 celdas de electroporación. Las células transformadas fueron inmediatamente resuspendidas en medio SOC (suplementado con las células) alcanzando un volumen final de 10 mL, y se incubaron a 37 °C con agitación. Al cabo de 1 hora se tomó una alícuota de las células transformadas para titular el número de colonias transformadas y evaluar la diversidad de la biblioteca. El resto del cultivo se expandió a 2 frascos con 40 mL de medio SB (*superbrowth*), glucosa 4 %, como represor del promotor LacZ para inhibir expresión de Fab-pIII, y ampicilina 0.5 mg/mL, como antibiótico de selección, y se incubaron a 37 °C con agitación. Luego de una de una hora se adicionó más ampicilina, hasta completar concentración de 0.1 mg/mL, y se cultivó durante una hora más. El cultivo de células se centrifugó a baja velocidad y en esterilidad para sustituir el medio con glucosa con 400 mL de medio SB (precalentado a 37 °C) libre de glucosa y con ampicilina 0.1 mg/mL y fago *helper* (1×10^{12} partículas). Luego de dos horas de agitación a 37 °C, se agregó antibiótico kanamicina en concentración final 0.04 mg/mL y se dejó creciendo *o.n.* en las mismas condiciones. Los fagos producidos fueron recuperados en el sobrenadante del cultivo y se precipitaron con 0.2 volúmenes de solución de polyethylene glycol 8,000 (PEG-8000) 20% y NaCl 2.5 M durante 1 hora y en hielo y se centrifugaron a $12.000 \times g$ por 20 min. El precipitado se resuspendió en 100 mL de PBS, se repitió el proceso de precipitación y se obtuvo el producto final en 20 mL de PBS-BSA 1%.

Selección por *panning* de clones de fagos con Fab anti-cocaína. Los fundamentos y las etapas de la selección por *panning* de fagos con Fab fueron casi iguales a las implicadas en la selección de fagos con péptidos, descrito en el capítulo II. El *panning* se realizó sobre placas de ELISA sensibilizadas con 0.1 μ g/pocillo de hapteno SNC conjugado al *carrier* KLH (SNC-KLH) y bloqueadas con PBS-BSA 1%. La biblioteca se incubó en los pocillos de ELISA por 2 horas a T.A y, luego de las etapas de lavado, los fagos reactivos por el antígeno fueron eluidos por competición mediante incubación con 100 μ L de

solución de analito cocaína en cada pocillo. Las cantidades de cocaína en la solución de competición fueron disminuyendo en cada ronda de *panning* para aumentar las exigencias de selección conforme se enriquecían los clones reactivos. Se realizaron tres rondas de *panning* y las concentraciones de cocaína usadas fueron de 50, 20 y 5 ng/mL. Las amplificaciones se realizaron mediante infección de cada elución (*output*) en células ER2738 y se crecieron *o.n.* en 10 mL de medio SB con ampicilina, fago *helper* y kanamicina a 37 °C y con agitación. El agregado de los reactivos fue secuencial, el cultivo inició con 0.05 mg/mL de ampicilina, a la hora se adicionó el resto hasta alcanzar 0.01 mg/mL, el *helper* (1×10^{11} partículas) fue adicionado una hora más tarde y el antibiótico kanamicina (concentración final 0.04 mg/mL) se adicionó a las dos horas. Cada amplificado se precipitó una vez con solución PEG/NaCl como se describe arriba y los fagos finalmente se resuspendieron en 1 mL de PBS-BSA 1%. Todos los *outputs* y amplificados se titularon en células ER2738 siguiendo el mismo protocolo de titulación descrito en capítulo II.

Para el *screening*, se realizaron cultivos de colonias individuales y se indujo la expresión de los Fab. En estas construcciones con vector pComb3x, la transcripción bicistrónica de los genes clonados es regulada por el promotor lacZ (**Figura 15**), y la expresión génica bajo este promotor puede ser inducida agregando agente inductor IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). Cultivos de 2 mL de cada clon en ampicilina fueron crecidos a 37 °C con agitación y al alcanzar una D.O. = 0.5 se adicionó al medio IPTG a una concentración final de 1 mM. La expresión de proteínas transcurrió durante 4 horas con agitación, y para finalizar se centrifugaron las células a 5000 g por 5 min. para recuperar el sobrenadante y evaluar, mediante ELISA, la reactividad de los Fab secretados al medio por las células. En los ELISA (descritos de forma general al final de este capítulo) los sobrenadantes se incubaron diluidos al medio en cada pocillo y se dejaron reaccionar con el antígeno inmovilizado, SNC-KLH, en presencia de exceso de cocaína (concentración final, 100 ng/mL) y en ausencia. Como control negativo cada sobrenadante también se incubó con antígeno KLH inmovilizado en placa. Los clones que mostraron reactividad contra SNC-KLH y cocaína fueron secuenciados por MacroGen Inc. (Seoul, Korea).

Clonado del casete codificante de Fab en vector pINQ-H6HA y optimización de la expresión en células *E. coli* B121 (DE3). La clones Fab identificados como positivos en *screening* fueron transferidos al vector de expresión pINQ-H6HA mediante digestión con

SfiI de los fragmentos y ligación con vector lineal, también digerido con SfiI. La digestión, ligación y transformación en bacterias de expresión *E. coli* B121 (DE3) se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que el clonado y expresión de los nanopeptámeros, reportados en el artículo I y II.

Para la optimización de la expresión se realizaron cultivos de 2 mL de medio LB con antibiótico kanamicina (0.04 mg/mL) y se indujo la expresión de proteínas con diferentes concentraciones de IPTG (0 – 1000 μ M) y en temperaturas que variaron entre 24 °C, 30 °C (con incubación *o.n.*) y 37 °C (con incubación de 4 horas). Todos los cultivos inducidos se centrifugaron a 5000 g durante 5 min. Por un lado, cada sobrenadante se utilizó directamente para ser analizado en ensayos de ELISA, y por otro lado cada *pellet* de células fue resuspendido en 200 μ L de solución B-PER (detergentes no iónicos, Thermo Scientific) y se incubaron durante 10 min. a T.A para promover lisis celular. Cada lisado se centrifugó a 15000 g durante 10 min. para separar la fracción soluble de proteínas (sobrenadante) de la fracción insoluble (cuerpos de inclusión), la cual fue resuspendida en 200 μ L de solución desnaturalizante, Urea 8 M. Ambas fracciones fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 15 %, con previo tratamiento de las muestras con agente reductor DTT y calentamiento a 100 °C.

Producción a mayor escala y purificación de Fab. El Fab coc12 se produjo a mayor escala a partir de 1 L de cultivo en medio LB suplementado con kanamicina. Cuando las células alcanzaron una D.O. de 0.5 se agregó IPTG con concentración final 30 μ M y se indujo la expresión de proteína *o.n.* con agitación y a 30 °C. Al otro día las células se centrifugaron a 6500 g por 20 min. y se recuperó el sobrenadante para purificar el Fab secretado. Para esto se realizó una precipitación de proteínas por “*salting out*” agregando 60 % (v/v) de una solución saturada de sulfato de amonio. La mezcla se incubó a 4 °C con agitación *o.n.* y luego se centrifugó a máxima velocidad durante 40 min. El precipitado se resuspendió en 20 mL de PBS, se centrifugó a 25000 g durante 20 min. para eliminar restos celulares y finalmente se pasó por columnas de Ni/NTA para la purificación.

Ensayo de ELISA para detección de cocaína. Los ELISA realizados con Fab anti-cocaína consistieron en un primer paso de sensibilización con 100 μ L de SNC-KLH en concentraciones que variaron entre 0.2 - 2 μ g/mL seguidos de una etapa de bloqueo con

PBS-BSA1%. Luego de 4 lavados con PBST en la siguiente etapa se incubaron, durante 1 hora, 100 μ L de solución con Fab diluido en PBS-BSA1% en condiciones de presencia o ausencia del analito en solución. Finalmente, se realizaron nuevos lavados y para revelar la unión de Fab por el antígeno, las placas se incubaron con 100 μ L de anti-HA conjugado a HRP (Roche) diluido 1/5000 en PBST (tal como sugiere el fabricante). La reacción de HRP con el sustrato H_2O_2 y reactivo TMB dio lugar a la señal del ensayo.

Las curvas de detección de cocaína se realizaron con Fab purificado y para lo cual se establecieron las concentraciones óptimas de Fab y de antígeno inmovilizado mediante curvas titulación *checkerboard*. Las reactividades del Fab (diluido de forma serial a lo largo de la placa) contra variadas concentraciones de antígeno KLH-SNC (entre 0.1 y 2 μ g/mL) fueron evaluadas en ausencia de cocaína. Se seleccionaron las concentraciones de los reactivos que generaban señal de absorbancia máxima (Abs 450nm) igual a 1 U.A. Con la optimización realizada se montaron los ensayos de detección de cocaína, que involucraron la incubación Fab con soluciones estándares de analito y con los resultados de las medidas por triplicado se construyeron las curvas de detección Abs. 450 nm vs. [cocaína]. Las curvas de reactividad cruzada con benzoilecgonina se realizaron de la misma forma, utilizando estándares de este analito y las concentraciones preestablecidas de los reactivos. Las sensibilidades se definieron por el IC_{50} (concentración de analito a la cual se disminuye el 50% de la señal máxima del ensayo) y el LOD (definido como la concentración de analito que causa una disminución de absorbancia igual a 3 desviaciones estándares respecto al blanco de la curva)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo I- Desarrollo de nanopeptámeros recombinantes utilizados para la detección no competitiva de dos herbicidas

El punto de partida de esta tesis surgió en el marco de antecedentes del grupo con respecto al desarrollo de inmunoensayos basado en la tecnología PHAIA para la detección de pequeños analitos. En una adaptación que permitió la eliminación de la partícula viral se había introducido el concepto de nanopeptámeros basados en el uso de estreptavidina comercial con presentación tetravalente de péptidos (péptidos sintéticos asociados por una biotina al reactivo estreptavidina-HRP). En este contexto, esta primera etapa de la tesis apuntó a la producción recombinante de los nanopeptámeros, debido a las ventajas que esto tiene desde el punto de vista biotecnológico, en relación a los bajos costos relativos y a la posibilidad de generar altos rendimientos de producción.

La expresión de estreptavidina fue la primera en ser explorada como proteína base (*scaffold*) para la construcción de nanopeptámeros recombinantes debido a su funcionalidad demostrada en los ensayos con estreptavidina comercial, y porque además consistía en un tetrámero de cuatro dominios idénticos capaz de auto-ensamblarse a partir de la expresión de un único gen codificante. Como alternativa, se exploró además la subunidad B de la verotoxina, que como se ha mencionado consiste en una estructura homo-pentamérica, lo cual permitiría demostrar que la funcionalidad de los nanopeptámeros dependía de alcanzar multivalencias peptídicas sin importar que proteína *scaffold* era utilizada.

Los nanopeptámeros recombinantes expresados en este trabajo fueron construidos con secuencias de péptidos que habían sido previamente seleccionados para desarrollos de ensayos PHAIA y detección de dos herbicidas de relevancia ambiental, molinato y clomazone [84, 88]. Todos los péptidos anti-inmunocomplejos consistían en secuencias de 8 aminoácidos cicladas por dos cisteínas ubicadas hacia los extremos del péptido. La primera parte de este capítulo consistió en la generación y puesta a punto de condiciones para la expresión y renaturalización de nanopeptámeros de estreptavidina con presentación del péptido pA, el cual reacciona específicamente con el inmunocomplejo

molinato-anticuerpo monoclonal (AcMo) 14D7. Con los nanopeptámeros así generados se demostró que era posible montar ensayos de ELISA no competitivos para detección del herbicida. Esto sirvió de base para la construcción de nanopeptámeros con péptidos aplicados en la detección de clomazone y realizar los estudios de campo correspondientes, lo que dio lugar a la publicación del artículo I de esta tesis.

Clonado y expresión del nanopeptámero recombinante péptido pA-estreptavidina

La producción recombinante de los nanopeptámeros requirió, como primer paso, la construcción del gen para su expresión, el cual consistió en el gen del monómero de estreptavidina fusionado en su extremo 5´ a la secuencia codificante del péptido pA (CSLWDTTGWC) a través de una secuencia separadora. En ambos extremos de este gen se incorporaron sitios de restricción para la enzima SfiI para su clonado en el vector pINQ-H6HA. Este vector ha sido desarrollado en nuestro laboratorio a partir de la modificación del vector comercial de alta expresión, denominado pET-28a(+) (Novagen), el cual permite la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor específico para la T7 ARN polimerasa y es regulado por el operador Lac. El pINQ-H6HA mantiene estas características y además presenta una secuencia ompA (ubicado en 5´ del gen insertado) para promover la secreción de la proteína expresada al periplasma de la bacteria, mientras que hacia el 3´ del gen insertado el vector presenta las secuencias codificantes para 6 histidinas (utilizadas para purificación) y para el epítipo HA (utilizado como marcador) (**Figura 18**).

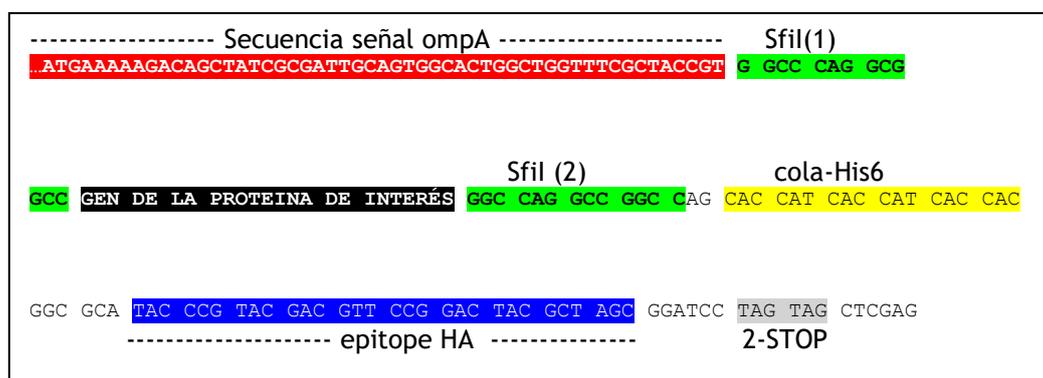


Figura 18. Características más importantes del vector de expresión pINQ-H6HA. Los genes de interés (secuencias en negro) a expresar como proteína en bacterias *E. coli* pueden ser clonados en este vector utilizando el doble sitio de reconocimiento de la enzima SfiI (secuencias en verde). Este vector es un derivado del vector comercial pET28a(+) e incluye la secuencia señal ompA para secreción al periplasma de la bacteria (rojo), la cola de 6 histidinas (amarillo), el epítipo HA (azul) y dos codones de finalización de traducción (gris).

Inicialmente, se realizaron experimentos preliminares en los que se evaluó la eficiencia de expresión recombinante de los nanopeptámeros pA-estreptavidina en *E. coli* BL21 (DE3). En estos se demostró que con distintas concentraciones del agente inductor (IPTG), las células mostraban una buena expresión del nanopeptámero. Analizados los cultivos celulares por geles de SDS-PAGE, se identificó una banda cercana al tamaño de 18 kDa, correspondiente al tamaño teórico estimado del monómero de pA-estreptavidina (18.202 kDa). Sin embargo, la proteína apareció sólo en las fracciones insolubles de los cultivos sin poder detectarse la proteína en la fracción soluble, lo que indicaba su acumulación total en los cuerpos de inclusión de la bacteria (**Figura 19**).

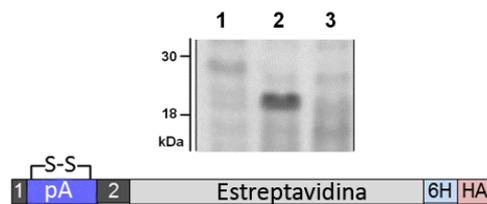


Figura 19: Expresión recombinante del nanopeptámero pA-estreptavidina. Análisis por SDS-PAGE de la expresión del nanopeptámero en la fracción insoluble (carril 2) y soluble (carril 3) de las bacterias *E. coli* BL21 (DE3). En la fracción insoluble se puede identificar una banda de aproximadamente 18 kDa que no está presente en el carril control (carril 1), en el cual se corrió extracto de bacterias no transformadas con vector. Dicha banda se corresponde con el tamaño esperado de 18.202 kDa del monómero pA-estreptavidina con la cola en C-terminal de 6 histidinas (6H) y el epítipo HA (YPYDVPDYA).

Pese a variados intentos de encontrar las condiciones para la expresión de proteína soluble analizando factores como temperaturas de inducción, tiempos de inducción y concentraciones de IPTG, fue inevitable proceder a producir la proteína desde la fracción insoluble de las bacterias. Esto implicó realizar protocolos de solubilización de toda la fracción insoluble con agentes desnaturalizantes (Urea 8M), seguido de sucesivos lavados hasta generar material proteico y finalmente realizar procesos de renaturalización de la proteína de interés. El último paso es el más complejo ya que las condiciones de renaturalización varían de proteína a proteína.

De modo de aumentar las posibilidades de renaturalización, se optimizó un sistema de rastreo de condiciones en formato de alto rendimiento (*high-throughput screening*) que permitió analizar variadas soluciones en simultáneo. El *screening* se realizó en placas de microtitulación en las que se analizaron las distintas soluciones que presentaban distintos

pH (5-10), concentraciones salinas (soluciones de tris, fosfato o carbonato) y agentes “solubilizantes” agregados (glicerol, sacarosa, arginina y PEG). En cada pocillo de la placa se promovió la renaturalización por dilución de la proteína, agregando un volumen de la solución de proteína desnaturalizada a 9 volúmenes de la solución de renaturalización. La presencia de proteína renaturalizada activa en cada pocillo fue analizada por dos tipos de ensayos de ELISA, por un lado, se evaluó la formación del tetrámero y la capacidad de unión de estreptavidina a las moléculas de biotina a través de sus 4 sitios de unión característicos (**Figura 20**), y por otro, se evaluó si el nanopeptámero era capaz de reconocer, a través de sus péptidos, el inmunocomplejo molinato-AcMo14D7 (**Figura 21**). Los resultados mostrados en los ensayos de biotina indicaron que la mayoría de las soluciones generaban estreptavidina con funcional (capaz de unirse a biotina), sin embargo, debido a que muchas señales eran indistintamente altas, no era posible determinar cuál solución era la indicada para producir el mayor nivel de proteína activa. Por el contrario, en los ensayos con el inmunocomplejo, se pudo observar que los mayores niveles de nanopeptámero funcional (con alta reactividad contra el inmunocomplejo y baja reactividad residual contra AcMo14D7 sin analito) se obtenían utilizando los azúcares como aditivos, sacarosa y glicerol. De esto se concluyó que la solución fosfato pH7 con glicerol 40% fue utilizada para la producción de los nanopeptámeros en mayor escala.

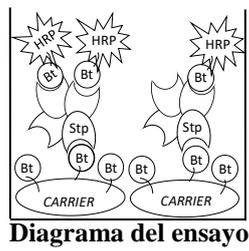


Diagrama del ensayo

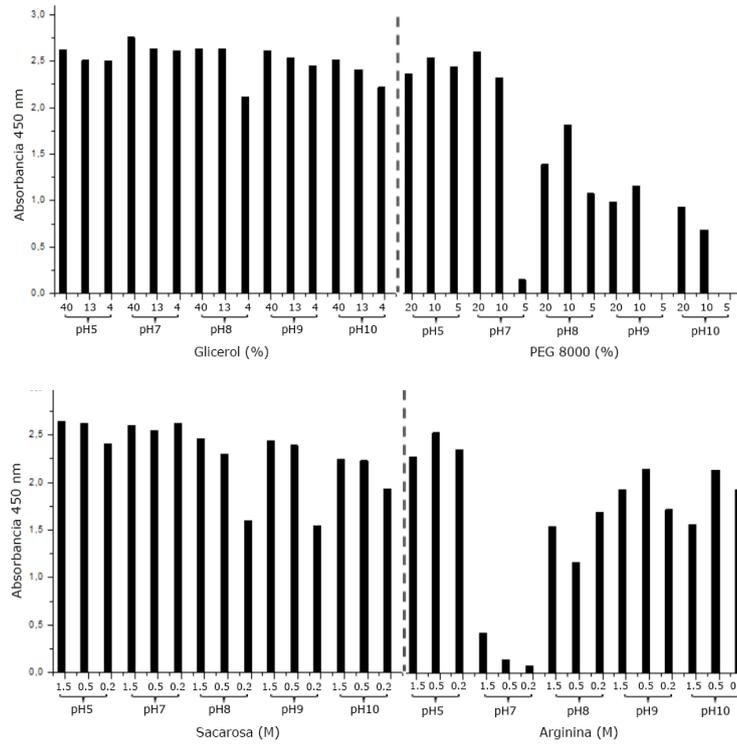


Figura 20. Análisis de la unión a biotina de los nanopeptámeros renaturalizados. Las soluciones con nanopeptámeros de estreptavidina (Stp) renaturalizadas fueron dispensadas en pocillos de ELISA sensibilizados con la proteína portadora BSA (*carrier*) conjugada a biotina (Bt) y luego reveladas con adición de enzima HRP-biotina, la cual generó la señal del ensayo al reaccionar con el sustrato (H_2O_2 y TMB). En los gráficos se observan las absorbancias generadas para cada solución de renaturalización utilizada, cuyas características de pH y concentración de aditivo se detallan en el eje de las x.

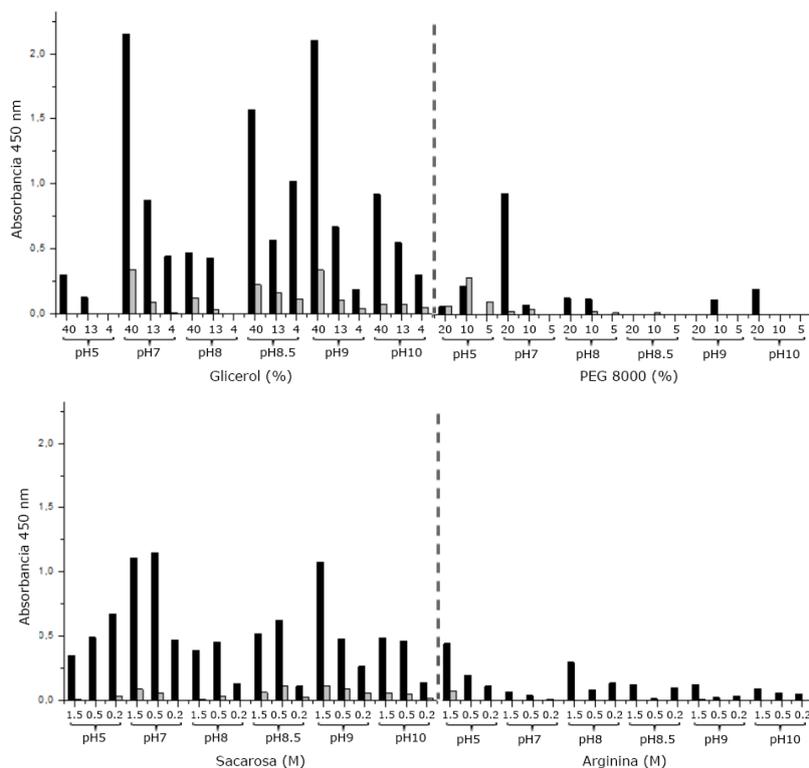


Figura 21. Reconocimiento específico del inmunocomplejo molinato-AcMo14D7 por los nanopeptámeros renaturalizados. La reactividad de los péptidos de los nanopeptámeros por el inmunocomplejo fue ensayada en pocillos de ELISA con AcMo14D7 inmovilizado y en presencia (barras negras) y ausencia (barras grises) del analito molinato. La unión de los nanopeptámeros fue revelada con HRP-biotina y posterior agregado de sustrato (H_2O_2 y TMB). Las concentraciones de aditivos y pH se denotan en el gráfico para cada solución de renaturalización analizada en el ELISA.

Inmunoensayo para la detección no competitiva de molinato con el nanopeptámero recombinante pA-estreptavidina

El nanopeptámero pA-estreptavidina fue expresado en mayor escala y luego de la renaturalización la proteína nativa fue purificada por columnas de Niquel/NTA. Como resultado final del proceso de expresión y purificación se obtuvieron rendimientos de aproximadamente 10 mg de proteína nativa por litro de cultivo. La estructura tetramérica (72.808 kDa) pudo ser corroborada mediante electroforesis SDS-PAGE, aprovechando que el tetrámero de estreptavidina es capaz de mantenerse estable en estas corridas siempre que no se realiza calentamiento desnaturante (a $100^\circ C$) de la muestra (La **figura 4** del artículo I muestra el patrón de corrida de un nanopeptámero de estreptavidina en este tipo de electroforesis).

A continuación, se realizó la puesta a punto del inmunoensayo no competitivo (**Figura 22**), donde se establecieron las concentraciones óptimas del nanopeptámero purificado y de AcMo14D7 inmovilizado, mediante curvas de titulación en formato de damero (*checkerboard*) realizadas en presencia de exceso de analito y en ausencia de analito. Encontrándose que los ensayos con mayor potencial, capaces de generar buena señal por el reconocimiento del inmunocomplejo y señal nula por el reconocimiento del anticuerpo libre de analito, eran alcanzados con las más altas concentraciones de AcMo14D7 inmovilizado (sensibilización con 100 μ L a 10 μ g/mL) y con concentraciones intermedias del reactivo de nanopeptámeros (\sim 0.15 - 0.30 μ g/mL). Con estos valores se montaron los ensayos no competitivos para detección de molinato, y se obtuvieron curvas que mostraron sensibilidades de 4.21 ± 0.3 ng/mL de detección de molinato en solución, definidas por el SC_{50} de la curva (concentración de analito a la cual se alcanza el 50% de la señal de saturación del ensayo) (**Figura 23**). Estos valores de SC_{50} resultaron en igual magnitud que los valores SC_{50} alcanzados por PHAIA [84], lo que confirmaba lo visto en el trabajo de nanopeptámeros con péptidos sintéticos [91], respecto a que la presentación tetramérica de péptidos provee suficiente avidéz para lograr ensayos de alta sensibilidad. Además, quedó demostrado que los nanopeptámeros recombinantes podían ser producidos de forma masiva como reactivos alternativos a los nanopeptámeros ensamblados con péptidos sintéticos y estreptavidina-HRP comercial. A modo de ejemplo, la cantidad de nanopeptámero obtenida de un litro de cultivo en frascos de fermentación (10 mg) sería suficiente para realizar ensayos en 3000 placas de ELISA, o 300 000 determinaciones.

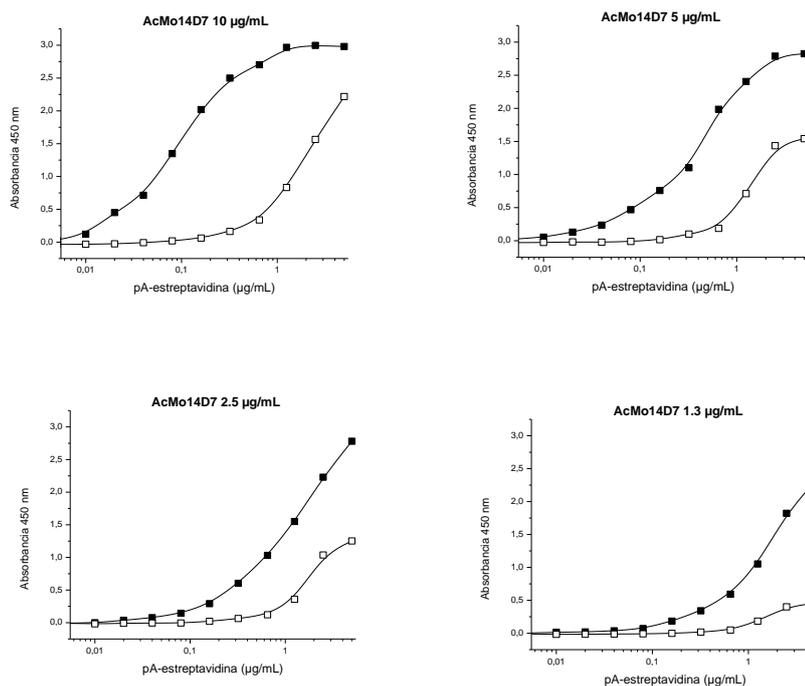


Figura 22. Curvas de titulación *checkerboard* para definir concentraciones del nanopeptámero pA-estreptavidina y el AcMo14D7. En estos ensayos se estudia como ocurre el reconocimiento del nanopeptámero por el AcMo14D7 inmobilizado, en presencia de exceso de molinato (200 ng/mL) (curvas con cuadros oscuros) y en ausencia de molinato (curvas con cuadros transparentes). Para identificar las condiciones que permiten una mayor diferencia entre la reactividad contra el inmunocomplejo y el anticuerpo libre, se analizó un rango variable de concentraciones de nanopeptámero (0.002 - 5 µg/mL) y de AcMo14D7 (1.3-10 µg/mL).

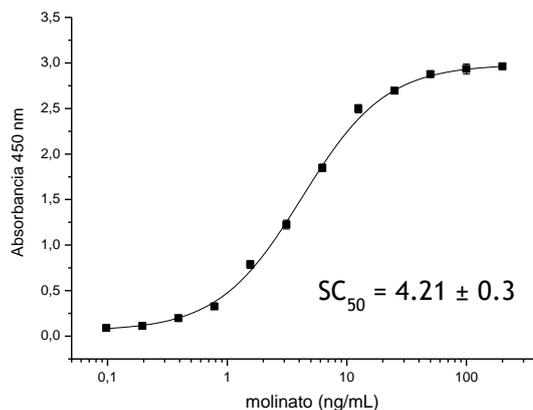


Figura 23. Ensayo de ELISA no competitivo con nanopeptámero pA-estreptavidina para la detección de molinato. En placas con AcMo14D7 (10 µg/ml) inmobilizado se realizaron curvas de detección por triplicado del analito molinato agregando a la solución una concentración fija de nanopeptámero pA-estreptavidina y cantidades crecientes de molinato. La biotina-HRP fue utilizada para generar la señal de detección del ensayo obteniéndose un $SC_{50} = 4.21 \pm 0.3$ ng/mL.

La prueba de concepto llevada adelante utilizando fusiones péptido-estreptavidina expresadas en bacterias fue uno de los mayores aportes de esta tesis para el trabajo del

grupo con nanopeptámeros recombinantes. La experiencia generada permitió aplicar este concepto al desarrollo de nanopeptámeros de estreptavidina para la detección no-competitiva de clomazone (**artículo I**) y al desarrollo del trabajo con nanopeptámeros alternativos basados en la proteína pentavalente, verotoxina, descrita a continuación.

Clonado y expresión del nanopeptámeros recombinantes de la subunidad B de verotoxina

Se utilizó verotoxina para la generación de nanopeptámeros recombinantes utilizando los mismos péptidos que con estreptavidina, y los resultados se resumen en el **artículo II** de esta tesis. Al igual que en el caso de la estreptavidina, las secuencias codificantes de los péptidos se fusionaron a través de una secuencia espaciadora al gen del monómero de verotoxina, y la construcción se insertó en el vector pINQ-H6HA entre los sitios SfiI. La expresión de estos nanopeptámeros resultó más favorable que los de estreptavidina, ya que para cada uno de los nanopeptámeros construidos se pudo notar por SDS-PAGE la presencia de proteína en la fracción soluble de las bacterias (tamaño esperado 12.841 kDa) (**Figura 24A**). Si bien las cantidades de nanopeptámero soluble eran notoriamente menores que las acumuladas en la fracción insoluble, por razones de simplicidad se prosiguió con el aislamiento y purificación de la proteína soluble. La proteína se purificó del extracto periplasmático de la bacteria en columnas de Ni/NTA, obteniendo rendimientos de producción que variaron entre 5 y 20 mg por litro de cultivo, entre diferentes producciones. El estado nativo de las proteínas purificadas correspondiente a la formación del pentámero de los nanopeptámeros fue corroborado mediante cromatografía de exclusión molecular por tamaño acoplada a dispersión multiangular de la luz (SEC-MALLS), estimándose un tamaño de 64.0 kDa que está de acuerdo con el valor de 64.205 kDa predicho para el pentámero (**Figura 24B/C**). Los nanopeptámeros purificados fueron conjugados de forma covalente a la enzima HRP previa activación de los grupos carboxilo de la enzima con carbodimidas en combinación con N-hidroxisuccinimida, y fueron aplicados directamente para la detección de los inmunocomplejos herbicida-AcMo (**Figura 25**).

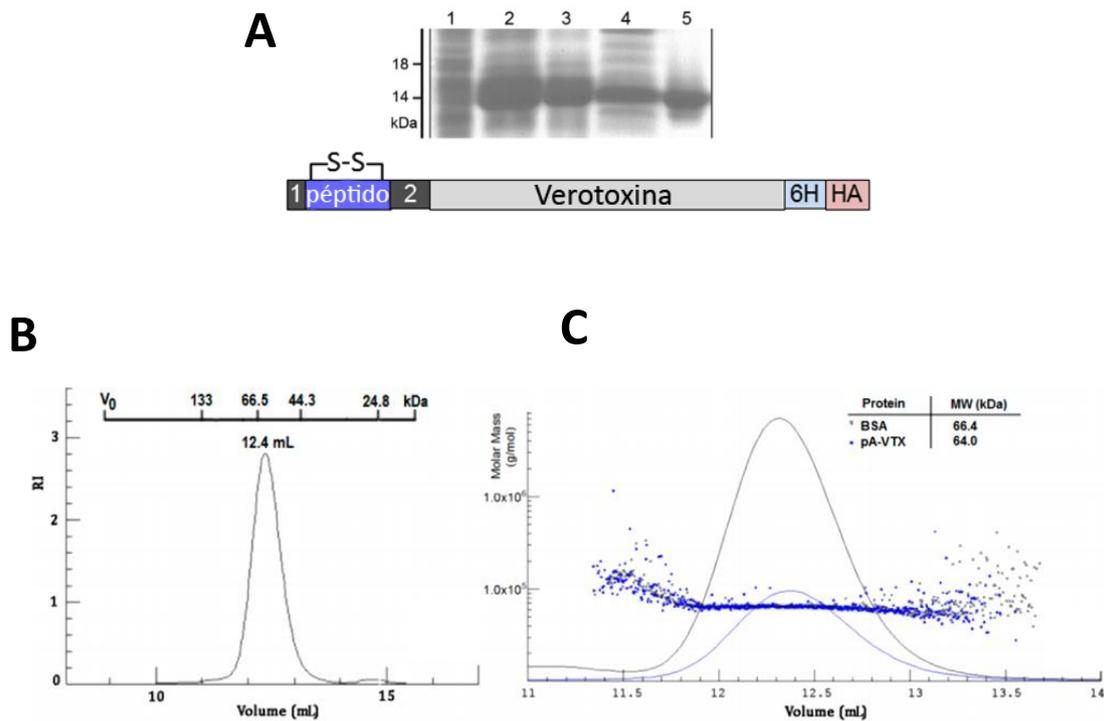


Figura 24. Expresión recombinante de los nanopeptámeros de verotoxina, purificación y caracterización del tamaño de proteína nativa. A-Análisis por SDS-PAGE de la expresión del nanopeptámero. En este gel se analizó un extracto de bacterias *E. coli* B121 (DE3) sin inducir, como control negativo (carril 1), un extracto de bacterias inducidas con IPTG (carril 2), la fracción insoluble (carril 3) y soluble (carril 4) de las bacterias inducidas y el producto de elución obtenido de la purificación por columnas de Ni/NTA (carril 5). La banda correspondiente al tamaño del monómero péptido-verotoxina asociado a las colas de histidinas (6H) y epítipo HA (tamaño teórico de 12.841 kDa) fue identificado en los últimos 4 carriles con un patrón de corrida similar a la proteína de 14 kDa del marcador de peso molecular. B- Cromatograma de exclusión molecular del nanopeptámero en columna Superose 12. El volumen de elución con máximo valor de RI (Índice de refracción) correspondió a 12.4 mL y, al comparar con los estándares, correspondía a elución de proteínas de tamaño molecular aparente de 64 kDa. C- Las curvas obtenidas con SEC-MALLS representan un perfil RI de elución del nanopeptámero (azul) y la del estándar BSA (negro) superpuestos con el gráfico de dispersión de la luz que estima el peso molecular conforme la elución. **Corresponde a la figura 2 y 3 del artículo II.**

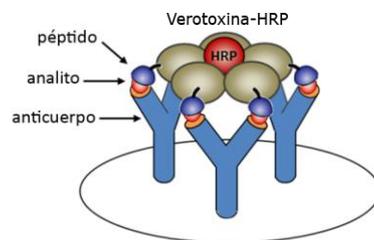


Figura 25. Inmunoensayo con nanopeptámeros recombinante basado en el homo-pentámero de verotoxina. El nanopeptámero recombinante de verotoxina con presentación de 5 péptidos fue conjugado a HRP y permitió detectar la formación del inmunocomplejo analito-anticuerpo y generar la señal del ensayo mediante reacción de HRP con sustrato. **Corresponde a la figura 1 del artículo II.**

Inmunoensayos para la detección de los herbicidas molinato y clomazone con los nanopeptámeros de verotoxina

En forma similar a lo realizado con los nanopeptámeros de estreptavidina, se optimizaron las condiciones para formular inmunoensayos para los herbicidas molinato y clomazone con los nanopeptámeros de verotoxina asociada a los péptidos pA (CSLWDTTGWC) y pICX11 (CLEAPNIEGC), respectivamente. El comportamiento de este tipo de nanopeptámeros fue muy similar al de los nanopeptámeros de estreptavidina. El reconocimiento de pA-verotoxina por el inmunocomplejo molinato-AcMo14D7 generó ensayos con valores $SC_{50} = 5.4 \pm 0.3$ ng/mL (**Figura 26**). Por otro lado, los ensayos de detección de clomazone utilizando pICX11-verotoxina permitieron valores de detección de $SC_{50} = 2.9 \pm 0.1$ ng/mL (**Figura 27**), comparables con los reportados en el trabajo con el nanopeptámero pICX11-estreptavidina del artículo I. Por la importancia que tiene el control de clomazone en aguas de ríos, lagos y aguas potables en nuestro país, el resto de los desarrollos se realizó con el ensayo para clomazone.

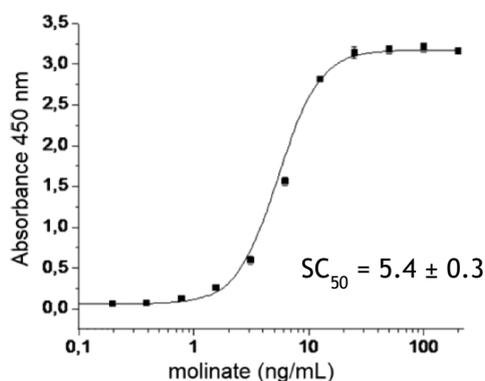


Figura 26: Ensayo de ELISA no competitivo con nanopeptámero pA-verotoxina. En placas sensibilizadas con 100 μ L de AcMo14D7, 10 μ g/ml, se realizaron curvas de detección por triplicado del analito molinato al incubar una concentración fija de nanopeptámero pA-verotoxina con soluciones estándares de molinato. El SC_{50} obtenido fue 5.4 ± 0.3 ng/mL. **Corresponde a la figura 4 del artículo II.**

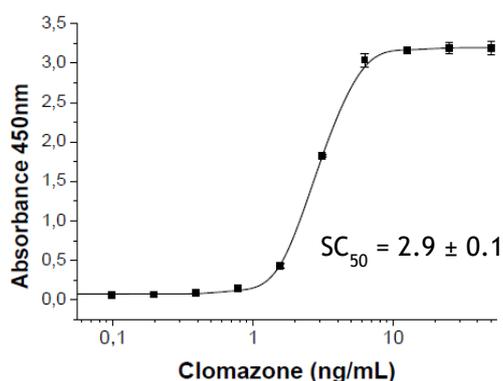


Figura 27: Ensayo de ELISA no competitivo con nanopeptámero pICX11-verotoxina. En placas sensibilizadas con 100 μ L de AcMoK4E7, 10 μ g/ml, se realizaron curvas de detección por triplicado del analito clomazone al incubar una concentración fija de nanopeptámero pICX11-verotoxina con soluciones estándares de clomazone. El SC_{50} obtenido fue 2.9 ± 0.1 ng/mL.

Utilización de bibliotecas de mutagénesis para la mejora de la afinidad de los péptidos anti- clomazone-AcMo5.6

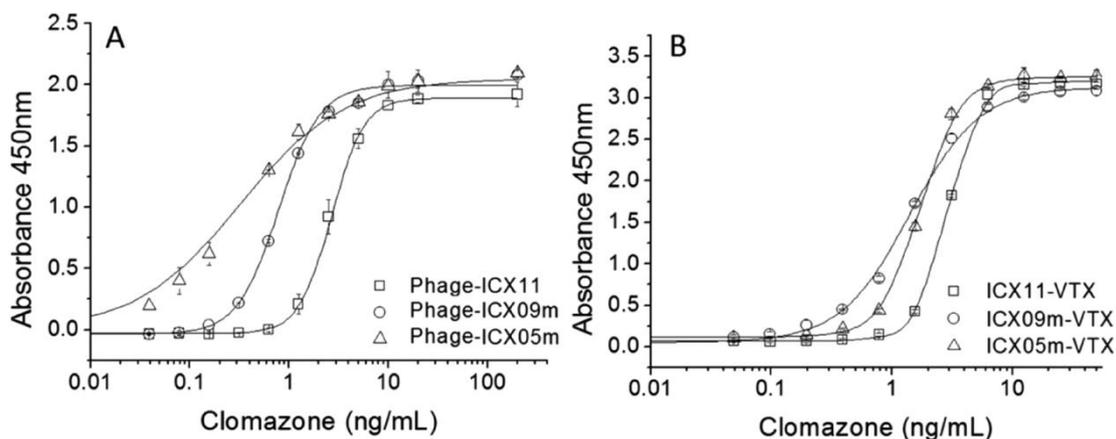
En el caso de clomazone, se realizó un esfuerzo adicional para intentar aumentar la sensibilidad del ensayo, se generó una biblioteca de mutagénesis de saturación sobre la base de la secuencias consenso de cuatro péptidos anti-clomazone-AcMo5.6 (entre ellos el pICX11), que fueron previamente aislados en nuestro grupo (**Tabla 1**) [88]. La estructura de la nueva biblioteca fue CxxxPNxExC en la cual x correspondía a posiciones ocupadas por aminoácidos en forma aleatoria. De esta forma se apuntó a seleccionar nuevos péptidos que mantuvieran los residuos de la secuencia consenso, pero que tuvieran optimizadas las posiciones restantes. Para esto se promovió la selección utilizando estrategias de *panning* con cantidades limitantes de clomazone y del AcMo5.6 y bajo rigurosas condiciones, incluyendo etapas de lavado prolongado (durante 5 días). Se aislaron así, 14 clones de los cuales dos nuevos péptidos, pICX09m (secuencia: CLEAPNVEAC) y pICX05m (secuencia: CATAPNVEAC), fueron identificados por su capacidad de generar ensayos PHAIA más sensibles que los del fago con pICX11 (**Figura 28A**). Conocidas las secuencias de los péptidos, se realizaron las construcciones de los nanopeptámeros respectivos, pICX09m-verotoxina y pICX05m-verotoxina, y se analizaron sus desempeños en los nuevos inmunoensayos no competitivos. Ambos nanopeptámeros mostraron sensibilidades similares en la detección de clomazone ($SC_{50_pICX09m} = 1.4 \pm 0.07$ y $SC_{50_pICX05m} = 1.7 \pm 0.06$) (**Figura 28B**). Si bien la mejora de sensibilidad respecto al péptido pICX11 no fue muy significativa, la estrategia

utilizada sí produjo resultados, que quizá en otros sistemas podría dar lugar a mejoras más relevantes.

Tabla 1. Secuencias de péptidos previamente aislados contra el inmunocomplejo clomazone-AcMo5.6.

Clones	Péptido
ICX05	CISAP PN MEAC
ICX07	CTQ FPN PEAC
ICX09	CALAP NQ EAC
ICX11	CLEAP NI EGC

Con letra **negrita** se marcan las secuencias consenso de aminoácidos. **Corresponde a la Tabla 1 del artículo II**



peptide ID	SC ₅₀ phage	SC ₅₀ nanopeptamer
ICX11	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.03
ICX09m	0.82 ± 0.01	1.4 ± 0.07
ICX05m	0.43 ± 0.2	1.7 ± 0.06

Figura 28: Ensayos de ELISA no competitivos para detección de clomazone. A-Inmunoensayos PHAIA desarrollados con los péptidos pICX11, pICX09m y pICX05m anti-inmunocomplejo clomazone-AcMo5.6. B- Inmunoensayos desarrollados con los nanopeptámeros de verotoxina y péptidos anti-inmunocomplejo clomazone-AcMo5.6. Los ensayos fueron realizados por triplicado y las sensibilidades de cada ensayo se comparan utilizando el valor de referencia SC₅₀. **Corresponde a la figura 5 y tabla 2 del artículo II.**

Validación del inmunoensayo para la detección de clomazone

Debido a su mayor sensibilidad se continuó trabajando con el nanopeptámero pICX09m-verotoxina y se validó su desempeño para el análisis de muestras reales de agua

fortificadas con variadas concentraciones de clomazone. En las condiciones de optimización del ensayo, todas las muestras de agua pudieron ser analizadas sin necesidad de realizar diluciones que disminuyeran el efecto matriz, y se obtuvieron valores excelentes de recuperación entre el 80 y 120 %, incluso para aquellas muestras que presentaban cantidades de analito extremadamente bajas (**Tabla 2**).

Tabla 2: Porcentaje de recuperación de muestras de agua fortificadas aplicando inmunoensayo con el nanopeptámero pICX09m-verotoxina.

clomazone (ng/mL)	Milli-Q water	tap water1	tap water 2	mineral water 1	mineral water 2	dam water 1	dam water 2	dam water 3	dam water 4
0.5	120 ± 10	85 ± 11	100 ± 5.0	130 ± 1.0	95 ± 10	129 ± 15	87 ± 13	110 ± 25	157 ± 5.0
1.0	112 ± 5.0	73 ± 9.3	128 ± 4.0	110 ± 10	103 ± 5.0	121 ± 5.0	91 ± 1.5	110 ± 10	119 ± 5.0
2.0	102 ± 5.0	87 ± 9.2	89 ± 10	110 ± 7.0	78 ± 5.0	83 ± 3.5	90 ± 18	102 ± 10	101 ± 10
2.5	93 ± 8.0	95 ± 2.9	100 ± 5.0	109 ± 4.0	78 ± 5.0	113 ± 5.0	115 ± 10	112 ± 10	94 ± 4.0
5.0	85 ± 3.0	93 ± 4.1	98 ± 20	124 ± 3.0	120 ± 20	114 ± 15	112 ± 6.0	96 ± 8.0	104 ± 5.0

Corresponde a la **Tabla 3** del artículo II.

Aplicación de los nanopeptámeros de verotoxina para establecer ensayos rápidos de flujo lateral y con lectura positiva para diagnóstico

Las tiras de flujo lateral son herramientas *point of care* destacadas por su simplicidad, rapidez de detección y bajo costo. La aplicación de los nanopeptámeros como reactivo de las tiras les daría a estos formatos la característica saliente de generar lecturas positivas frente a la detección de pequeñas moléculas que, como se comentó en la introducción, hace que los ensayos de inspección visual sean más intuitivos que los formatos basados en ensayos competitivos, cuyas lecturas dependen de la desaparición de la señal.

El inmunoensayo de detección de clomazone con el nanopeptámero pICX09m-verotoxina fue montado en el formato de tiras diagnósticas de flujo lateral, utilizando material de nitrocelulosa con el AcMo5.6 inmovilizado en la zona de reacción y el reactivo de nanopeptámeros marcado con partículas de carbón para la detección. Luego de la optimización de concentraciones, cada tira se puso en contacto con pequeños volúmenes de soluciones que contenían el nanopeptámero marcado y cantidades diferentes de clomazone. La interacción de los nanopeptámeros con el inmunocomplejo pudo apreciarse por aparición de una línea de color al cabo de 20 minutos de flujo en los casos que la muestra contenía al menos 2.5 ng/mL de analito. La detección visual de cada banda y las diferencias de intensidades observadas fueron cuantificadas por densitometría, utilizando el programa computacional IMAGEJ (**Figura 29**).

Los límites de detección alcanzados por el formato de tiras resultaron ser del orden de los mostrados por el ensayo de ELISA, potenciando a los ensayos con nanopeptámeros como herramientas aplicables a los formatos de diagnóstico rápido. Por otra parte, la introducción de nanopeptámeros en la detección de pequeñas moléculas adquiriría un nuevo valor, dado que los fagos presentadores de péptidos no habían tenido éxito en los formatos de tiras, probablemente debido al tamaño de las partículas virales y a la formación de agregados luego de conjugar a las partículas de carbón, como ya se ha visto en otros trabajos con marcajes de oro coloidal [121].

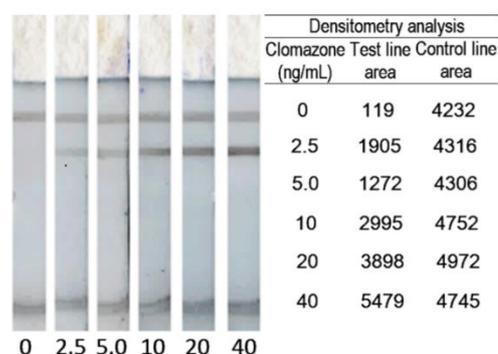


Figura 29: Ensayo no competitivo con nanopeptámero pICX09m-verotoxina en tiras de flujo lateral para detección de clomazone. Las tiras de nitrocelulosa fueron utilizadas para analizar soluciones estándares con distintas concentraciones de clomazone (0, 2.5, 5.0, 10, 20, 40 ng/mL). La línea más baja de reacción corresponde a la línea de prueba y es donde ocurre la interacción entre pICX09m-verotoxina conjugada a carbón y el complejo clomazone-AcMo5.6 inmovilizado en la tira. Mientras que la línea más alta corresponde al control y es donde ocurre una interacción entre un anticuerpo anti-HA inmovilizado y una proteína irrelevante conjugada a carbón y con epítipo HA. **Corresponde a la figura 6 del artículo II.**

Capítulo II Confidencial - Transferencia de tecnología PHAIA/nanopeptámeros

Capítulo III- Detección no competitiva de pequeñas moléculas usando nanopeptámeros sintéticos en inmunoensayo luminiscente mediante canalización de oxígeno (LOCI)

El objetivo principal de este capítulo consistió en montar la tecnología de ensayos no competitivos para detección de pequeñas moléculas en formatos homogéneos. Como se mencionó en la introducción, los ensayos homogéneos transcurren en un solo paso de incubación, sin etapas intermedias de lavados y donde todos los reactivos involucrados son incubados en simultáneo con la muestra problema. Esta característica de mezclar y medir les da el potencial de ser fácilmente automatizables y más rápidos que cualquier ensayo heterogéneo.

Para la implementación de formatos homogéneos se eligió la tecnología AlphaLisa, la cual es basada en la generación de luminiscencia mediante canalización de oxígeno (luminescent oxygen-channeling, LOCI) [122]. Como se ha comentado, esta metodología utiliza dos tipos de *beads*, que pueden ser derivatizadas con los reactivos del ensayo. La interacción del analito con estos reactivos produce el acercamiento del par de *beads*, lo cual permite generar la señal del ensayo. En nuestro caso, se utilizaron las *beads* dadoras (*beads* que generan el oxígeno molecular singlete al ser irradiadas a con luz a 680nm) que estaban recubiertas con estreptavidina como plataforma para desarrollar los nanopeptámeros al combinarlas con un péptido anti-inmunocomplejo. Por otro lado, la *bead* aceptora tenía el anticuerpo que forma el inmunocomplejo al agregar el analito. El ensayo así constituido se denominó NanoAlphaLisa. Los principales resultados de este trabajo se muestran a continuación y fueron publicados en el **artículo III**.

Desarrollo y optimización del inmunoensayo NanoAlphaLisa para atrazina

Como analito modelo para este desarrollo se seleccionó la atrazina (216 Da), uno de los herbicidas de mayor utilización a nivel mundial, y por tanto un contaminante frecuente de aguas superficiales y subterráneas [123]. Existe preocupación respecto a los efectos sobre la salud humana desde que se le conocen riesgos potenciales como disruptor endocrino y como sustancia cancerígena [124, 125]. Para este ensayo se utilizó el anticuerpo monoclonal AcMoK4E7 anti-atrazina que fue previamente reportado para el montaje de un ensayo competitivo de alta sensibilidad [126]. Este anticuerpo se asoció a

*beads*ceptoras, que previamente habían sido conjugadas a una proteína de unión a anticuerpos, la proteína A. Por su parte los nanopeptámeros se formaron sobre las *beads* dadoras derivatizadas con estreptavidina incubándolas con el péptido sintético biotinilado, 13A. Este péptido fue aislado de bibliotecas de fagos por nuestro grupo y utilizado inicialmente para la detección, mediante PHAIA, del inmunocomplejo atrazina-AcMoK4E7 [84].

Inicialmente se optimizaron las cantidades de cada *bead* utilizada en el ensayo y la cantidad de anticuerpo AcMoK4E7 a inmovilizar en la *bead* aceptora en un volumen de reacción de 50 μ L (40 μ L de muestra/estándar + 10 μ L de reactivos). Cada optimización consistió en variar las concentraciones de cada uno de los reactivos mientras se mantenían fijas las concentraciones de los otros. Para cada condición se realizaron curvas de detección de atrazina en un rango de 0-12 ng/mL del herbicida. Todas las curvas mostraron que la señal solo se producía en presencia de atrazina y que, en su ausencia, la interacción residual entre el péptido anti-inmunocomplejo y el anticuerpo libre, que en algunas condiciones puede dar lugar a una señal indeseada en PHAIA, no producía ninguna señal significativa en el formato NanoAlphaLisa. En todas las curvas se tomaron en cuenta el valor SC_{50} , como indicador de la sensibilidad de los ensayos (**Figura 30**). En base a este parámetro se eligieron las condiciones que daban lugar a la detección más sensible de atrazina, esto era utilizando una concentración final de AcMoK4E7 0.3 μ g/mL, 10 μ g/mL de *bead* aceptora, y 7.5 μ g/mL de *bead* dadora con el nanopeptámero preformado en su superficie.

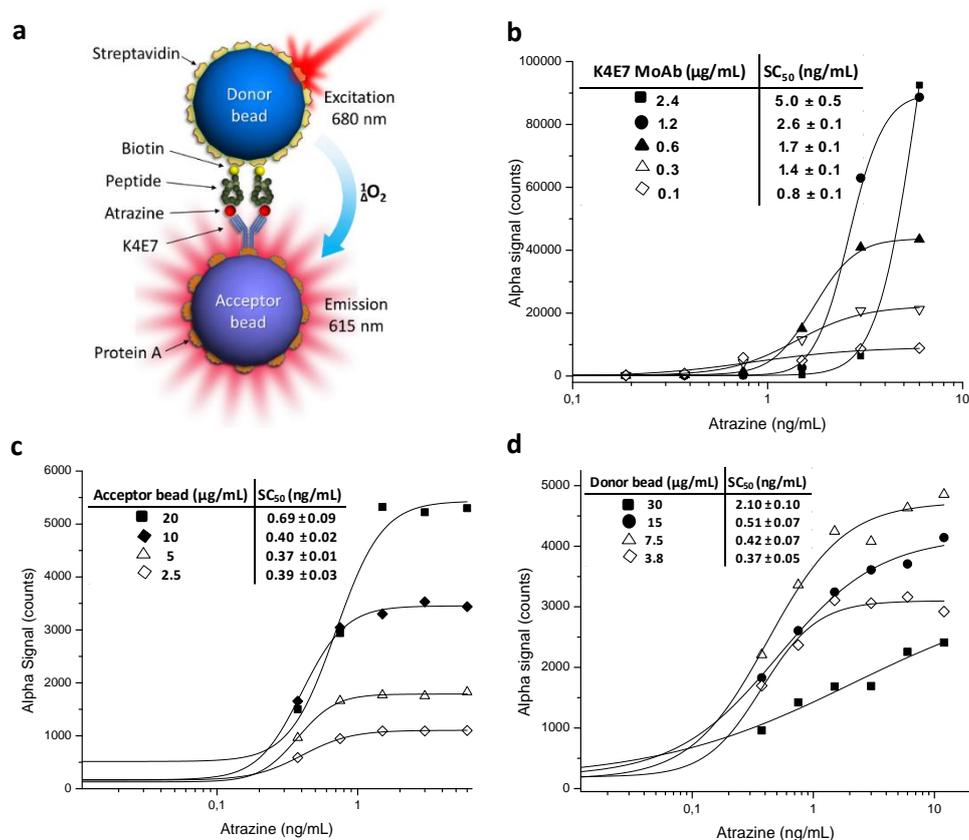


Figura 30. Optimización de condiciones para el desarrollo NanoAlphaLisa. (a) Esquema de ensayo NanoAlphaLisa para atrazina. Tanto las concentraciones de AcMoK4E7 (b), como las de las *beads* aceptoras (c) y dadoras (d) fueron optimizadas en inmunoensayos primarios, donde cada condición fue evaluada en función del SC_{50} obtenido en la curva correspondiente. **Corresponde a la figura 1 del artículo III.**

El ensayo final de NanoAlphaLisa permitió la detección de atrazina con un $SC_{50} = 0.50 \pm 0.02$ ng/mL (**Figura 31**), una sensibilidad que resultaba inferior a la alcanzada con el ensayo PHAIA realizado con péptido 13A y el mismo anticuerpo ($SC_{50} = 0.05$ ng/mL) [84]. Si bien no hay una evidencia directa, esta diferencia podría ser consecuencia de los distintos modos de generación de señal en ambos ensayos. Mientras que en AlphaLisa la señal se produce en forma instantánea al irradiar las *beads* dadoras, en PHAIA la señal es amplificada por la acumulación del producto de reacción de la enzima HRP unida al fago.

La reactividad cruzada del ensayo se exploró utilizando un panel de triazinas, (**Tabla 2 del artículo III**). Como era de esperar el perfil de reactividad cruzada fue esencialmente el mismo que el obtenido en PHAIA, observándose una marcada reactividad contra la propazina [84].

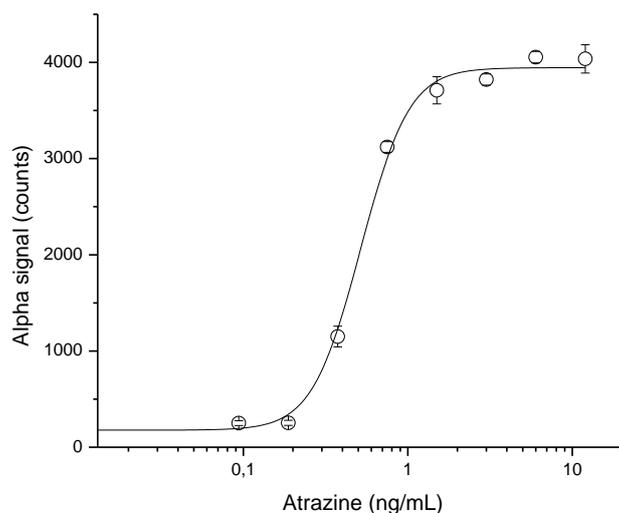


Figura 31. Ensayo NanoAlphaLisa para detección no competitiva y homogénea de atrazina. El ensayo se desarrolló en 50 μ L de reacción conteniendo 0.3 μ g/mL de AcMoK4E7, 10 μ g/mL de *bead* aceptora/proteínaA y 7.5 μ g/mL de *bead* dadora/nanopeptámeros con soluciones estándares de atrazina (que variaron en el rango de 0 - 12 ng/mL). Luego de 1 hora de incubación, las mezclas de reacción fueron irradiadas a 680 nm y se registró la señal generada a 615 nm. Las curvas finales realizadas por triplicado presentaron un $SC_{50} = 0.50 \pm 0.02$ ng/mL. **Corresponde a figura 2 del artículo III.**

A los efectos de limitar el tiempo de análisis, se estudiaron distintos tiempos de incubación. Los resultados obtenidos (mostrados en la **figura S-3** del artículo III) demostraron que en 15 minutos de reacción se obtenían iguales resultados que en 1 hora. Sin embargo, cuando se aplicó el ensayo a muestras reales, se observó que a tiempos de incubación inferiores a 1 hora los resultados presentaban una mayor dispersión, por lo que con este tiempo de incubación se continuaron los siguientes ensayos.

Validación del ensayo NanoAlphaLisa

Para la validación se fortificaron distintas muestras de aguas minerales y de ríos con variadas concentraciones de atrazina (0.3, 0.5, 0.75 y 1 ng/mL) y se midieron por triplicado. Los valores de recuperación fueron muy buenos al variar entre $79 \pm 2 \%$ y $124 \pm 7 \%$ (**Tabla 3**), demostrándose que la composición (matriz) de las distintas aguas no alteraba significativamente las medidas del ensayo. Además, el inmunoensayo demostró ser preciso desde que las replicas de medida de cada muestra dentro de un mismo ensayo (repetibilidad) y de la misma muestra en ensayos diferentes (precisión intermedia) presentaron dispersiones que fueron analíticamente aceptables (**Tabla 1b del artículo III**).

Tabla 3. Recuperación (% , n=3) de atrazina en muestras de aguas fortificadas y analizadas mediante NanoAlphaLisa. Corresponde a tabla 1a del artículo III

Spiked atrazine (ng/ mL)	River 1	River 2	River 3	Mineral Water
1	79 ± 2			
0.75	95 ± 2			
0.5	102 ± 4	124 ± 7	117 ± 4	113 ± 6
0.3	105 ± 6			

Este trabajo mostró por primera vez que era posible generar ensayos basados en la tecnología LOCI para pequeñas moléculas en formatos no competitivos, que por tanto generan una señal directamente proporcional a la cantidad de analito. Si bien el NanoAlphaLisa para atrazina resultó menos sensible que el PHAIA al comparar los SC_{50} , el límite de detección del nuevo método (LOD), aun definido en forma conservadora como la concentración del herbicida correspondiente al 20% de la señal máxima, permite medir concentraciones que están por debajo de los límites sugeridos por organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA). Para esta última, el nivel meta de contaminación máxima (MCLG) para atrazina es <3 ng/mL [127, 128].

Capítulo IV- Obtención de un anticuerpo Fab anti-cocaína para el desarrollo de inmunoensayos como herramientas para monitoreo de consumo de cocaína

En este capítulo se describe la generación de un anticuerpo recombinante contra una molécula pequeña, la cocaína (303 Da). Esta actividad es la primera etapa de una meta futura del grupo, que es comenzar a desarrollar ensayos basados en nanopeptámeros pero que utilicen anticuerpos recombinantes para formar el inmunocomplejo, dado que el trabajar con fragmentos recombinantes de anticuerpos abriría nuevas oportunidades de innovación.

La cocaína es un alcaloide obtenido de la planta *Erythroxylon coca*, conocida por ser la droga de abuso más consumida a nivel mundial después del cannabis [129]. Luego de su consumo la cocaína genera sus efectos psicoactivos mientras que comienza rápidamente a metabolizarse por el organismo a diferentes compuestos que son inactivos, entre ellos la benzoilecgonina. Por sus altos niveles séricos alcanzados, tanto la cocaína como benzoilecgonina son las moléculas monitoreadas para determinar el estado toxicológico de los individuos [130]. De hecho, entidades internacionales dedicadas al control de drogas como SAMSHA (agencia de salud de EEUU) y el proyecto DRUID (dedicado al control vial de consumo en Europa) han establecido guías para la detección de todas las drogas, en las que se destaca la necesidad de detección de las moléculas cocaína y benzoilecgonina por igual, proponiendo valores límites aceptados (*cut-off*) en saliva de 15 y 10 ng/mL, respectivamente [131, 132]. Sin embargo, a pesar de ser muchas veces consideradas indistintamente, es bien sabido que las ventanas de detección de cocaína y sus metabolitos son muy diferentes, y la detección de cada una de ellas por separado, pueden dar indicios de situaciones toxicológicas diferentes [133]. La cocaína es muy importante para determinar la fase de intoxicación aguda al ser de vida media corta (1 hora) y porque solo puede ser detectada en una ventana de tiempo de 6 horas en consumidores ocasionales [134-136]. Mientras que la benzoilecgonina, con vida media más prolongada y con ventanas de tiempo de entre 12 y 48 horas en consumidores ocasionales, permite controlar el consumo no reciente de cocaína, incluso cuando los efectos de la droga ya no existen [134-136].

En los primeros intentos de obtención de anticuerpos recombinantes anti-cocaína en nuestro grupo, se apuntó a la selección de *nano-bodies*, provenientes de camélidos debido a las ventajas que estos presentan relacionadas a su tamaño, estabilidad y fácil producción

frente al resto de los anticuerpos recombinantes. Además, el grupo contaba con amplia experiencia en la construcción de bibliotecas de *nanobodies* y desarrollo de inmunoensayos con los mismos [137-141]. Sin embargo, cuando, como parte de esta tesis, se construyó una biblioteca de *nanobodies* a partir de una llama inmunizada con un hapteno de cocaína conjugado, se obtuvieron *nanobodies* contra el hapteno, pero no tenían reactividad cruzada con la cocaína en solución. Este fracaso, que fue atribuido a la disminuida habilidad de los *nanobodies* de reconocer pequeñas moléculas, parece estar debido a la carencia de cadenas livianas, que en caso de los anticuerpos convencionales, forman la interfase VH-VL, sitio donde típicamente se unen las pequeñas moléculas [142].

Como alternativa a los *nanobodies*, en esta tesis se decidió trabajar con fragmentos Fab quiméricos derivados de los dominios variables de anticuerpos de pollo (*Gallus gallus*) y regiones constantes de anticuerpos humanos. Gracias a la identificación de su secuencia génica, los Fab obtenidos podrían ser expresados de forma ilimitada, en cualquier lugar que se necesitaran y con la posibilidad de realizarles modificaciones direccionadas para conjugarlos a cualquier tipo de molécula marcadora de forma más eficiente. Esto último favorecería el desarrollo de inmunoensayos alternativos al ELISA, como los de flujo lateral, fluoro-inmunoensayos FRET, biosensores electroquímicos, de inmunoprecipitación con esferas magnéticas, etc.

La elección del pollo para la construcción de bibliotecas de expresión en fagos, como se comentó en la Introducción, se debió a que las etapas de amplificación por PCR de los VH y VL son mucho más sencillas que en otras especies.

Construcción de bibliotecas de Fab a partir de pollo (Gallus gallus) inmunizado con hapteno de cocaína

Como primer paso se inmunizó un pollo con el antígeno succinyl norcocaine (SNC) conjugado al *carrier* BSA. El SNC es un derivado de la molécula cocaína (**Figura 32**) que tiene un grupo carboxilo disponible para conjugación, resultante de la reacción de ácido succínico con el nitrógeno de la cocaína [119]. También se contó con un conjugado a la proteína *carrier* KLH (*hemocianina* de lapa californiana) que fue utilizado en la sensibilización de placas utilizadas en los *panning*.

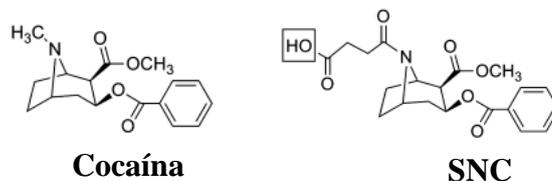


Figura 32: Estructura de cocaína y la molécula, SNC, utilizada como hapteno para inmunizar el animal. La molécula SNC es un derivado de la molécula cocaína y presenta un ácido carboxílico mediante el cual se realizan las conjugaciones a las proteínas *carrier*.

La respuesta inmune del animal se controló midiendo el título de anticuerpos (dilución del suero a la cual disminuye al 50 % la señal máxima) por ensayo de ELISA contra SNC-KLH. En la **figura 33** se muestra la titulación del suero extraído 7 días después de la última inmunización. Se pudo observar una buena respuesta, obteniéndose títulos de anticuerpos anti-SNC-KLH de 1/13600, mientras que la respuesta contra el control de KLH sin conjugar correspondía a un título de 1/400, por lo que se decidió proceder con la construcción de la biblioteca.

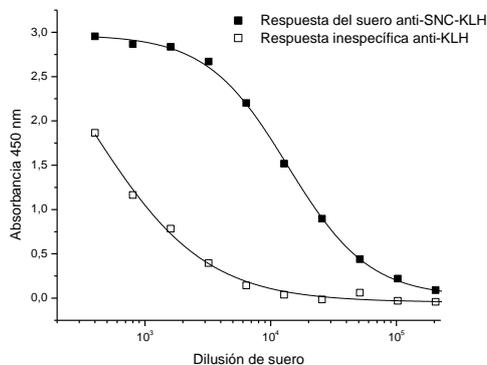


Figura 33: Respuesta de anticuerpos del pollo anti-SNC. Se realizó un sangrado del pollo 7 días después de la última inmunización, y se realizó la titulación de anticuerpos anti-SNC-KLH y de respuesta inespecífica anti-KLH en placa de ELISA. Los resultados demostraron una notoria respuesta de anticuerpos anti-SNC-KLH con títulos de 1/13600 y títulos bajos, igual a 1/400, de anticuerpos anti-KLH.

El bazo y la médula del animal se disgregaron, y de una porción equivalente a 10^8 leucocitos se obtuvo el ARN, este se retro-transcribió para generar el cDNA, el cual se utilizó para amplificar los genes V_H (400 pb) y V_λ (350 pb) por PCR (**Figura 34A**). Los amplicones V_H y V_λ se purificaron y fueron fusionados mediante una PCR de *overlap* con los genes de las regiones constantes humanas, C_{H1} (350 pb) y C_κ (400 pb), respectivamente. Los *pools* de ambos fragmentos, V_H-C_{H1} y $V_\lambda-C_\kappa$, presentaron tamaños

aproximados a 750 pb (**Figura 34B**). Una tercera etapa de PCR de *overlap* permitió la asociación aleatoria de los amplicones, formándose los casetes que incluían los genes V_{λ} - C_{κ} asociados a los genes V_H - C_{H1} a través de una secuencia espaciadora (*linker*) que contiene un sitio Shine-Dalgarno y un péptido líder adicional para lograr la expresión policistrónica de ambas cadenas (como se diagrama en la **figura 15** de la introducción). Como se esperaba, los amplicones correspondieron a tamaños aproximados de 1500 pb (**Figura 34C**).

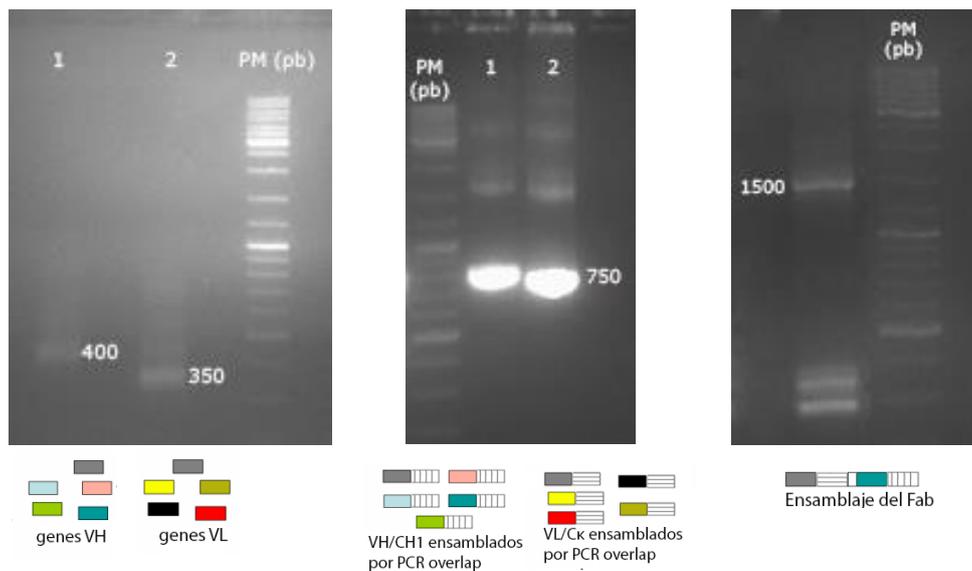


Figura 34: Geles de agarosa de ADN para evaluar ampliaciones por PCR realizadas para la construcción de la biblioteca de Fab. A-Los genes de las cadenas variables V_H (400 pb, carril 1) y V_L (350 pb, carril 2) de los anticuerpos fueron aislados mediante dos RT-PCR desde el material ribonucleico proveniente de células del bazo y médula del pollo. B-Los productos de amplificación V_H y V_{λ} se asociaron a los genes de las regiones constantes C_{H1} (350 pb) y C_{κ} (400 pb) humanas, mediante dos PCR *overlap*. Los productos formados correspondieron a 750 pb como resultado de la asociación V_H - C_{H1} (carril 1) y V_{λ} - C_{κ} (carril 2). C-Finalmente se realizó una tercera ronda de PCR *overlap* que permitió la asociación aleatoria de los genes de las cadenas V_H - C_{H1} y V_{λ} - C_{κ} . Los amplicones formados por esta última PCR correspondieron a fragmentos de 1500 pb. PM, marcador de peso molecular de ADN (1kb GeneRuler DNA Ladder, Thermo Scientific).

Los productos de PCR codificantes para los Fab se digirieron con la enzima de restricción *SfiI*, cuyos sitios se encontraban a ambos extremos del casete, y se insertaron en el vector pComb3x (previamente digerido con la enzima) mediante reacción con ligasa T4. Como se muestra en la **figura 15**, el producto de ligación permitiría la transcripción de un ARN policistrónico, codificante de las proteínas V_H - C_{H1} -pIII y V_{λ} - C_{κ} y cuya expresión sería dirigida al periplasma bacteriano por la presencia de las secuencias señal *ompA* y *pelB*, ubicadas hacia los extremos 5' de cada gen.

Se obtuvieron aprox. 10 µg de producto de ligación vector-inserto que presentaba una eficiencia de transformación en células *E. coli* ER2738 supercompetentes de 1.2×10^8 ufc/µg de ADN. Cuatro µg fueron transformados en estas células para generar la primera biblioteca de anticuerpos en fagos, que finalmente resultó alcanzar una diversidad de hasta 3×10^8 clones diferentes. Este valor de diversidad generalmente es aceptable. Sin embargo, teniendo en cuenta que las cadenas livianas y pesadas resultan apareadas al azar y que la probabilidad de recomponer la especificidad original de cada anticuerpo aumenta con la diversidad de la biblioteca, se exploró la posibilidad de generar una biblioteca de mayor diversidad usando la polimerasa Phi29. Esta enzima tiene como propiedades salientes catalizar la síntesis de ADN con desplazamiento de la hebra complementaria, con alta procesividad y baja tasa de error [143, 144]. La amplificación se basa en el mecanismo de “rolling-circle” que genera concatémeros de ADN a partir de ADN circular y pequeños cebadores de secuencia aleatoria. Estos concatémeros pueden ser fragmentados por enzimas de restricción que corten en un solo sitio de reconocimiento, y luego de su ligación, el ADN generado puede alcanzar eficiencias de transformación muy altas [120]. En nuestro caso se amplificó el producto de ligación vector-inserto con Phi29 y luego se eligió la enzima de restricción NotI, para la digestión de los concatémeros. Esta enzima era capaz de reconocer un único sitio de corte dentro del vector pComb3x, y presentaba poca probabilidad de reconocer sitios en las regiones variables de los Fab, ya que su secuencia de corte (GCGGCCGC) no había sido identificada en ninguna de las secuencias Fab analizadas en la base de datos, Genbank. Para confirmar esto, se realizaron digestiones a pequeña escala de los concatémeros. Como era de esperar, la digestión generó fragmentos de 5000 pb correspondientes al tamaño de pComb3x (3500 pb) ligado a la secuencia de Fab (1500 pb), mientras que no se observaron productos de menor tamaño que podrían originarse por eventuales cortes de NotI en un segundo sitio presente en alguna región variable de los Fab (**Figura 35**).

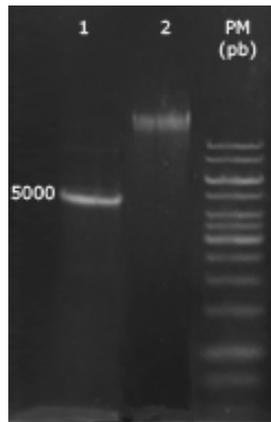


Figura 35: Gel de agarosa de ADN para evaluar la digestión de concatémeros con enzima NotI. Los concatémeros formados por amplificación con Phi29 de los productos de ligación fueron digeridos con NotI. Previo a su utilización en la construcción de la segunda biblioteca, los fragmentos generados por la digestión se evaluaron en geles de agarosa. En estos se puede observar la diferencia de tamaño entre los concatémeros digeridos con NotI (carril 1) y los concatémeros sin digerir (carril 2). La digestión permitió generar fragmentos lineales de 5000 pb correspondientes al tamaño vector-inserto, lo cual era razonable desde que se esperaba un único corte de NotI por fragmento. PM, corresponde al marcador de peso molecular de ADN (1kb GeneRuler DNA Ladder, Thermo Scientific)

Finalmente, con el proceso de Phi29, a partir de 150 ng de productos de ligación vector-inserto se obtuvieron más de 10 μ g de ADN con una eficiencia de transformación de 8×10^9 ufc/ μ g. Al igual que la primera biblioteca, 4 μ g de ADN se utilizaron para la nueva construcción y con los cuales se alcanzó una diversidad de hasta 1×10^{10} clones diferentes. Este valor representaba una diversidad 30 veces que la obtenida para la biblioteca con ADN no amplificado, por lo que se eligió seguir trabajando y realizar la selección de Fab por *panning* con la biblioteca construida luego de la amplificación con Phi29.

Selección por panning de un Fab anti-cocaína

La selección de Fab anti-cocaína se realizó mediante 3 rondas iterativas de selección por *panning* en placas de ELISA con SNC-KLH inmovilizado. Los clones de fagos con Fab anti-SNC-KLH adheridos al fondo del pocillo fueron eluidos mediante la estrategia de elución competitiva, agregando al pocillo una solución con cocaína soluble en exceso. Finalizadas las tres rondas de selección, se realizó el *screening* analizando el sobrenadante de los cultivos (Fab secretado) de clones mediante ELISA al incubarlos con SNC-KLH inmovilizado y en condiciones de ausencia o presencia de cocaína en solución. De 30 clones analizados, aunque con señales bajas, más del 50 % de ellos fueron positivos contra SNC-KLH (**Figura 36**). Sin embargo, solo los clones 3, 12, 18 y 28 mostraron reactividad cruzada con la cocaína, dado que fueron inhibidos parcialmente por su presencia. Una vez secuenciados el conjunto de clones positivos, se obtuvieron solamente 3 secuencias

distintas (**Figura 37**), y los cuatro clones con mayor reactividad aparente por cocaína correspondían a la misma secuencia y se denominaron Fab coc12. Las otras dos secuencias, muy similares entre sí, correspondieron a dos Fab (coc11 y coc21) sin reactividad contra la cocaína libre.

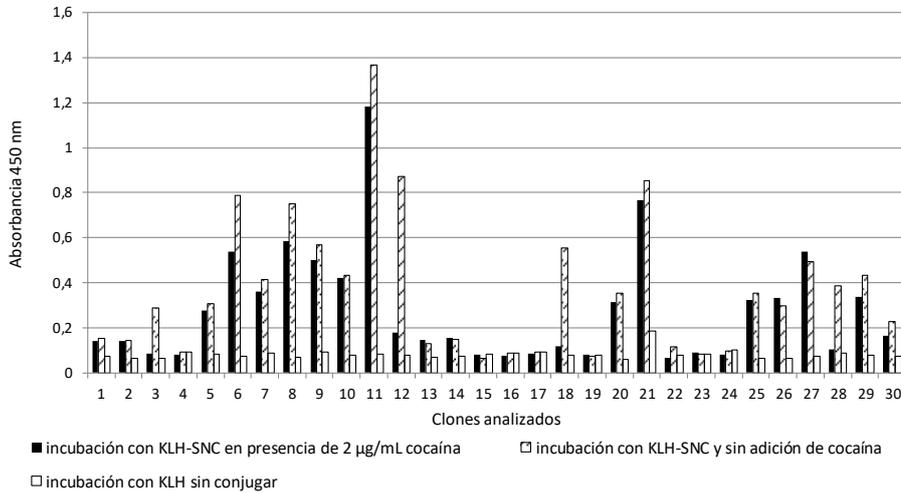


Figura 36. Selección e identificación de clones Fab anti-cocaína. Se identificaron mediante *screening* los clones productores de Fab capaces de reconocer el antígeno SNC-KLH inmovilizado en la placa y se compararon sus reactividades en condiciones de presencia (concentración exceso) y ausencia de cocaína en solución. Como control negativo se evaluó la reactividad de cada sobrenadante contra KLH sin antígeno inmovilizado.

Región variable V λ de pollo							
FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	
Coc12	ALTQPSVSVNLGGTITKICSGGGYSRYSGWFFQKSPGSAFVTVIYTNQRPSENI	PSRFSGSTSGSMGTLTITGVQAEDEAVYFCGGYDSS--STAVFGAGTTLTVL					
Coc11	AKP.E.....G.S.-..H.....D.TK.....K...T.....D.....Y..S.EDRTY.PGA						
Coc21	A.P.E.I.....-..Y.....D.TN...D.....A...TA...A...D.....F..D--..AI						

Región constante C κ humano							
Coc12	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLLNNFYPREARVQWVNDALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNRGEC						
Coc11							
Coc21							

Región variable V H de pollo							
FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	
Coc12	MAAVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFISSSYNMGWVRQAPGKGLFVAGIDYSGRYTGYGAAVKGRATISRDNQSTVRLQLNLLKSEDTAIYYCTKV-GSPYCYSCAT-GSIDVWGHGTEIVSS						
Coc11	A.....A.....S..G.....PTT-W.....RA...GT...A.TA..GG.R.GGCS...A.....						
Coc21	A.....T.....P.T-W.....RA...GT...A.TA..GG.R.GGCS...A.....						

Región constante C $H1$ humano							
Coc12	ASTKGPSVFLAPFSKSTSGGTAALGCLVRDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTRVDRKRVKPKSCDK						
Coc11							
Coc21							

Figura 37. Secuencias de aminoácidos de los Fab identificados en el *screening* por su reactividad contra cocaína. Tres secuencias diferentes de Fab fueron identificadas. Para cada una de ellas se muestran las cadenas livianas y pesadas compuestas por los dominios constantes humanos, C κ y C $H1$, y los dominios variables de pollo V λ y V H , respectivamente. En las cadenas variables se marcan las regiones hipervariables (CDR1, CDR2 y CDR3) y las regiones flanqueantes (FR1, FR2, FR3 y FR4). La secuencia coc12 con mayor divergencia respecto a coc11 y coc21 se obtuvo de los clones que mostraron mayor reactividad contra cocaína en el *screening*. Los puntos representan aminoácidos idénticos a la primera secuencia (coc12) y los gaps (-) representan falta del aminoácido en la posición.

Optimización de la producción de Fab recombinantes

Como las señales de los ensayos de ELISA resultaron bajas al utilizar los cultivos de Fab expresados a partir del vector pComb3x, la puesta a punto de los ensayos competitivos

con estos rendimientos no era posible. Por dicha razón se apuntó, como siguiente paso, a aumentar la producción de los Fab, para lo cual se transfirieron los genes desde pComb3x al vector de alta expresión pINQ-H6HA, el cual ya había sido utilizado exitosamente para la expresión con alto rendimiento de VHHs en otros trabajos y de nanopeptámeros descritos en el capítulo I (**Figura 18**). Una vez clonados los genes en este vector, se realizó un rastreo de diferentes condiciones que permitieran maximizar la producción de Fab soluble y funcional en *E. coli* B121 (DE3). Las pruebas más importantes consistieron en realizar cultivos a pequeña escala (en volúmenes de 2 mL) a los cuales se les indujo la expresión proteica con variadas concentraciones de IPTG (de 0 a 1mM) y a diferentes temperaturas (24, 30 y 37 °C). La expresión de Fab en cada cultivo se analizó en corridas de geles de acrilamida SDS-PAGE, donde se analizaron los extractos solubles e insolubles de las bacterias. En la **figura 38A** se muestran solo los resultados para el Fab coc12 ya que fueron muy similares para los otros dos Fab. En ninguna de las condiciones ensayadas se pudo identificar Fab en la fracción soluble de las bacterias, aunque sí aparecía en la fracción insoluble, como bandas correspondientes al tamaño esperado de la cadena liviana (23 kDa) y pesada (26 kDa). Esta tendencia de los Fab a formar cuerpos de inclusión no pudo ser revertida en ninguna de las condiciones analizadas y lo observado a 30 °C (mostrado en la figura) fue un reflejo de lo sucedido en las otras dos temperaturas ensayadas, 24 y 37 °C. A pesar de esto, la expresión de Fab soluble no resultó del todo nula al analizar, mediante ensayo de ELISA, la secreción de Fab al medio de cultivo (**Figura 38B**). Estos ELISA demostraron la presencia de Fab soluble anti-SNC (inmovilizado en la placa) en varias de las condiciones de inducción ensayadas. Las mayores expresiones se observaron en los cultivos inducidos con IPTG a 24 y 30 °C, siendo la inducción con 30 μ M de IPTG y a 30°C la elegida para producir los Fab.

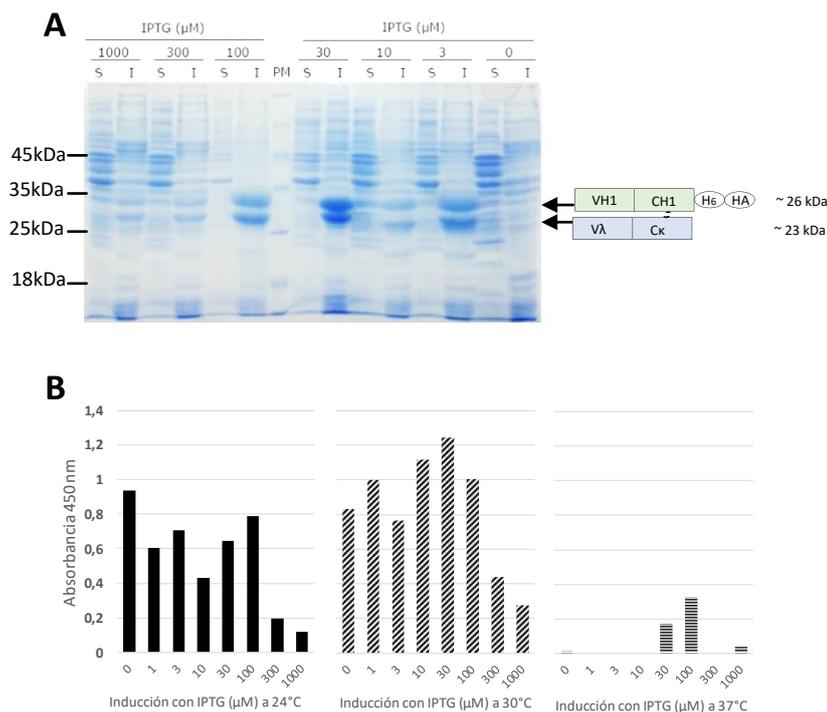


Figura 38. Análisis de la expresión de Fab clonados en vector pINQ-H6HA. **A.** Se muestra uno de los geles de acrilamida 15 % SDS-PAGE PAGE realizado para determinar la presencia de Fab en la fracción soluble (S) e insoluble (I) de las células obtenidas en cultivos inducidos por variadas concentraciones de IPTG (0 - 1000 μM) y a 30 °C. Los fragmentos del Fab fueron identificados claramente en algunas de las fracciones insolubles bacterianas, y con una migración acorde a su tamaño esperado (V_H-C_{H1} ~ 26 kDa y V_λ-C_κ ~ 23kDa). PM, corresponde al marcador de peso molecular de proteínas (14-116 kDa, Thermo Scientific) y los valores de las bandas más relevantes (kDa) se marcan a la izquierda de la figura. **B.** Ensayo de ELISA con SNC-KLH inmobilizado para determinar la presencia de Fab activo en los sobrenadantes de los cultivos inducidos con las mismas concentraciones de IPTG y a las temperaturas 24 °C, 30 °C y 37 °C. Según las medidas de absorbancia del ELISA obtenidas por la actividad del anticuerpo anti-HA conjugado a HRP, las inducciones a 24 °C y 30 °C dieron el mayor índice de Fab activo.

Inmunoensayos competitivos con coc12 para detección de cocaína

Una vez optimizada la expresión, se expresaron los tres Fab y se exploraron distintas concentraciones de Fab y SNC-KLH que permitieran montar ensayos de ELISA de inhibición (o competitivos) para la detección de cocaína. Los clones coc11 y coc21 no mostraron inhibición de señal por la presencia de cocaína en ninguna de las condiciones ensayadas, mientras que solo el coc12 demostró ser reactivo contra el analito en solución, y por tanto se continuó trabajando solamente con este último. A continuación, fue producido en escala mayor a partir de 1 litro de cultivo de bacterias. El anticuerpo secretado al medio de cultivo se concentró mediante precipitación por “salting out” agregando 60 % (v/v) de solución sulfato de amonio saturada [145]. El precipitado se resuspendió en PBS y se pasó por columnas de Ni/NTA para realizar la purificación por afinidad. Se logró obtener 0.92 mg de proteína purificada. En la **figura 39** se muestra el

análisis por SDS-PAGE del purificado, observándose las dos bandas correspondientes a las cadenas pesadas de 26 kDa y livianas de 23 kDa en condiciones de reducción, y una banda correspondiente al fragmento total de aproximadamente 50 kDa en condiciones de no reducción.

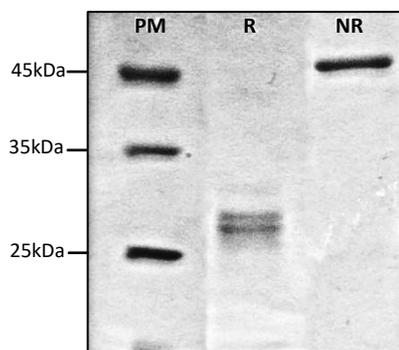


Figura 39. Análisis por SDS-PAGE del Fab coc12 purificado. Se realizó una corrida electroforética en geles de acrilamida SDS-PAGE 12 %. El Fab purificado se analizó en condiciones de reducción (R) con agente reductor DTT para identificar las bandas correspondientes a las cadenas livianas (23 kDa) y pesadas (26 kDa), y en condiciones de no reducción (NR) para identificar una banda única correspondiente al tamaño aproximado del Fab de 50 kDa. PM, corresponde al marcador de peso molecular de proteínas (14-116 kDa, Thermo Scientific) y los valores de las bandas más relevantes (kDa) se marcan a la izquierda de la figura.

Con el Fab purificado se realizaron los ensayos de competición para la detección de cocaína. Las concentraciones de los reactivos Fab y antígeno SNC-KLH, con las que se alcanzaron la mayor sensibilidad posible del ensayo final, se habían identificado mediante curvas de titulación *checkerboard*. Así, la detección de cocaína se realizó en pocillos sensibilizados con 50 ng de SNC-KLH que se incubaron con 100 μ L de cada solución estándar de cocaína y Fab coc12 en concentración final de 0.4 μ g/mL. Con estas cantidades, se obtuvo una curva de detección de cocaína con sensibilidad correspondiente a $IC_{50} = 24.0 \pm 4.1$ ng/mL y un límite de detección, definido como la concentración de cocaína que causa una disminución de absorbancia igual a 3 desviaciones estándares respecto al blanco (LOD), de 1.5 ng/mL (**Figura 40**). A continuación, se estudió en un ensayo similar, la reactividad del Fab coc12 contra la benzoilecgonina, el metabolito principal de la cocaína (**Figura 40**). En este caso el valor de IC_{50} fue de 1002 ± 20 ng/mL y un $LOD = 180$ ng/mL, lo cual significaba que el ensayo era entre 40 y 100 veces menos sensible para la detección del metabolito.

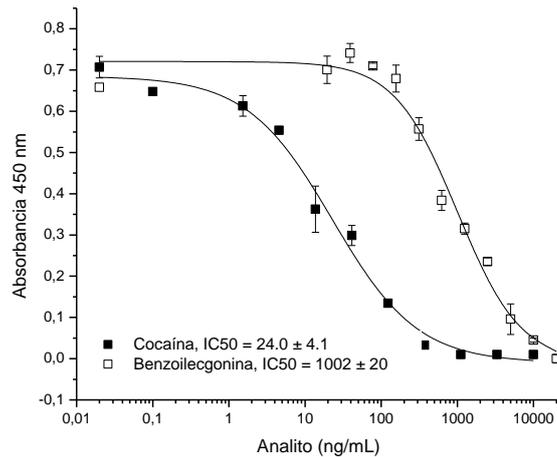


Figura 40. Curvas por triplicado de los ensayos competitivos montados para detección de cocaína y benzoilecgonina, utilizando el Fab coc12.

Según los valores guías máximos establecidos para la concentración de la droga en saliva por entidades como SAMHSA (15 ng/mL) y DRUID (10 ng/mL), el límite de detección alcanzado podría ser suficiente para desarrollar inmunoensayos para el control de la droga y, teniendo en cuenta la baja reactividad cruzada con benzoilecgonina, a su vez permitiría identificar intoxicaciones agudas debidas a consumos recientes. Desafortunadamente, los intentos iniciales de adaptarlo a muestras de saliva mostraron una importante interferencia de la misma. Futuros desarrollos requerirán la optimización de los reactivos del ensayo y eventualmente la incorporación de dispositivos de recolección y pretratamiento de la muestra, lo cual excedió el tiempo de desarrollo de esta tesis.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como se ha mencionado, la mayoría de los analitos de interés en medicina, seguridad alimentaria y medio ambiente son compuestos de bajo peso molecular. Si bien para muchos de estos existen métodos instrumentales de gran sensibilidad y precisión, en muchos casos su detección utilizando inmunoensayos constituye una alternativa ventajosa, ya sea por su rapidez, bajo costo y/o por la necesidad de obtener el resultado *in situ*. Lamentablemente, el formato *sandwich*, típicamente utilizado para macromoléculas, no es aplicable a estos analitos pequeños y los inmunoensayos para su detección se restringen a formatos competitivos que tienen un desempeño inferior. La introducción de los péptidos anti-inmunocomplejos representó un importante avance para cambiar esta situación, y más recientemente su utilización para formar nanopeptámeros permitió formularlos como reactivos más convencionales para la industria.

En la primera parte de esta tesis se procuró avanzar en la tecnología de nanopeptámeros, sobre todo explorando la posibilidad de generarlos en forma recombinante, evitando así el uso de reactivos costosos como los péptidos sintéticos o el conjugado estreptavidina-peroxidasa ultrasensible. Por su demostrada funcionalidad, el primer desarrollo se realizó generando quimeras péptido-monómero de estreptavidina expresadas en *E. coli*. Si bien se encontraron dificultades debido a que la totalidad de la proteína se producía en forma de cuerpos de inclusión, analizando simultáneamente múltiples condiciones de repliegamiento, se logró obtener el nanopeptámero recombinante con una funcionalidad equivalente al nanopeptámero sintético. El proceso permitió además obtener rendimientos elevados que podría traducirse en miles de kits diagnósticos a partir de un litro de cultivo producido en matraces de fermentación. El desarrollo realizado con molinato pudo ser reproducido para generar nanopeptámeros contra clomazone, que permitieron monitorear el herbicida en el agua de inundación de cultivos de arroz y sus efluentes en distintas regiones de nuestro país.

Por tratarse de una proteína de *E. coli*, en una segunda etapa se escogió a la verotoxina para aumentar la probabilidad de obtener el nanopeptámero correspondiente en forma soluble. Efectivamente, se logró en este caso obtener el pentámero de la verotoxina en forma soluble y funcional, independientemente del péptido expresado. Nuevamente, el rendimiento fue alto y podría traducirse en un alto número de kits y, dado que en este

caso la enzima se conjuga directamente al nanopeptámero, también se redujeron las etapas del ensayo. Por otro lado, el nanopeptámero de verotoxina pudo ser marcado con carbón coloidal y en forma preliminar se demostró su funcionalidad en ensayos de flujo lateral.

Basado en estos resultados, hemos considerado desarrollos posteriores que impliquen la generación de nanopeptámeros recombinantes con actividad enzimática intrínseca. Para esto hemos planeado utilizar la luciferasa NanoLuc, una luciferasa de 19 kDa de alta estabilidad y luminiscencia que se expresa en forma soluble en *E. coli*, fusionándola a los monómeros de estreptavidina y/o verotoxina.

Como resultado de estos trabajos, ni bien se disponga de péptidos anti-inmunocomplejos para el analito de interés, el grupo dispone de experiencia y de una plataforma flexible que puede ser utilizada directamente para la producción de nanopeptámeros recombinantes y sintéticos. Esto atrajo la atención de la industria diagnóstica, lo que dio lugar a la transferencia de tecnología reportada de forma confidencial en el capítulo II. Como motivo de la transferencia, se realizó una prueba de concepto que permitió reafirmar el potencial del método PHAIA para aislar péptidos anti-inmunocomplejos y su inmediata adaptación para generar nanopeptámeros.

En el capítulo III se exploró una nueva aplicación de los nanopeptámeros generando un ensayo homogéneo para atrazina basado en la tecnología de AlphaLisa que puede ser aplicado a muestras sin diluir, constituyendo el primer reporte de un ensayo no competitivo para pequeños analitos desarrollado con dicha tecnología. La interacción péptido-analito-anticuerpo fue suficiente para estabilizar la aproximación de las *beads* el tiempo suficiente para generar una señal significativa, pero, interesantemente, esto no ocurrió en ausencia del analito, aun a las más altas concentraciones de anticuerpos. Esto fue contrario a lo que ocurre en los formatos PHAIA o de nanopeptámeros donde es necesario ajustar previamente la concentración del anticuerpo y péptido para obtener una señal libre de ruido. Lamentablemente, la sensibilidad se vio disminuida, aunque en este caso el LOD permanece por debajo del valor guía del herbicida. Por lo anterior, y considerando el formato mix-and-read, este ensayo puede resultar una ventajosa alternativa, rápida y automatizable frente a los ensayos de ELISA heterogéneos, cuyos tiempos de duración pueden alcanzar las 4 horas.

La parte final de este trabajo permitió ampliar la capacidad del grupo en relación a la generación y aislamiento de anticuerpos recombinantes, más allá de la tecnología de *nanobodies*, incorporando la metodología para generar y seleccionar Fab. Esto que es importante de por sí, tiene particular relevancia en relación al trabajo del grupo vinculado a la detección de pequeños analitos. Como se mencionó anteriormente, de acuerdo a nuestra experiencia y lo reportado en la literatura [146], la generación de *nanobodies* contra estas moléculas es muy difícil. De hecho, durante el transcurso de esta tesis, no fue posible aislar *nanobodies* de una biblioteca generada a partir de una llama inmunizada con el mismo inmunógeno (SNC-KLH), pero sí fragmentos Fab de la biblioteca quimérica pollo/humano, lo cual está de acuerdo con la observación que en los anticuerpos convencionales las pequeñas moléculas se unen en cavidades formadas en la interfase VH-VL [142]. Con este Fab continuaremos apuntado a desarrollar un método de detección rápida de cocaína, inicialmente en formato competitivo y optimizando las condiciones para disminuir el efecto matriz de la saliva. En una segunda etapa se intentará utilizarlos para seleccionar péptidos anti-inmunocomplejo y con los cuales generar nanopeptámeros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Price CP, Newman DJ: **Principles and practice of immunoassay**: Springer; 1991.
2. Yalow RS, Berson SA: **Immunoassay of endogenous plasma insulin in man**. *The Journal of clinical investigation* 1960, **39**:1157-1175.
3. Baeyens WR, Schulman SG, Calokerinos AC, Zhao Y, Garcia Campana AM, Nakashima K, De Keukeleire D: **Chemiluminescence-based detection: principles and analytical applications in flowing streams and in immunoassays**. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 1998, **17**(6-7):941-953.
4. Wheeler MJ: **Automated immunoassay analysers**. *Annals of clinical biochemistry* 2001, **38**(Pt 3):217-229.
5. Avrameas S, Uriel J: **[Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]**. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences Serie D: Sciences naturelles* 1966, **262**(24):2543-2545.
6. Engvall E, Perlmann P: **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G**. *Immunochemistry* 1971, **8**(9):871-874.
7. Shan G, Lipton C, Gee SJ, Hammock BD: **Immunoassay, biosensors and other nonchromatographic methods**. In: *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*. Lee PW (Ed) edn; 2002: pp 623-679.
8. Jackson T, Ekins R: **Theoretical limitations on immunoassay sensitivity: current practice and potential advantages of fluorescent Eu³⁺ chelates as non-radioisotopic tracers**. *J Immunol Methods* 1986, **87**(1):13-20.
9. Kobayashi N, Goto J: **Noncompetitive immunoassays for small molecules with high sensitivity and specificity**. *Advances in clinical chemistry* 2001, **36**:139-170.
10. Butler JE: **Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays**. *Methods* 2000, **22**(1):4-23.
11. Holford TR, Davis F, Higson SP: **Recent trends in antibody based sensors**. *Biosensors and Bioelectronics* 2012, **34**(1):12-24.
12. Jung Y, Jeong JY, Chung BH: **Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports**. *The Analyst* 2008, **133**(6):697-701.
13. Ullman EF: **Homogeneous immunoassays**. In: *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*. Elsevier; 2013: 67-87.
14. Ma L, Yang F, Zheng J: **Application of fluorescence resonance energy transfer in protein studies**. *Journal of molecular structure* 2014, **1077**:87-100.
15. Harikumar KG, Miller LJ: **Application of fluorescence resonance energy transfer techniques to establish ligand-receptor orientation**. *Methods in molecular biology* 2009, **552**:293-304.
16. Didenko VV: **DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications**. *Biotechniques* 2001, **31**(5):1106.
17. Piston DW, Kremers GJ: **Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly**. *Trends in biochemical sciences* 2007, **32**(9):407-414.
18. Ullman EF, Kirakossian H, Switchenko A, Ishkanian J, Ericson M, Wartchow C, Pirio M, Pease J, Irvin B, Singh S: **Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method**. *Clin Chem* 1996, **42**(9):1518-1526.
19. Beaudet L, Rodriguez-Suarez R, Venne M-H, Caron M, Bédard J, Brechler V, Parent S, Bielefeld-Sévigny M: **AlphaLISA immunoassays: the no-wash alternative to ELISAs for research and drug discovery**. *Nature Methods* 2008, **5**(12).

20. Zhao H, Lin G, Liu T, Liang J, Ren Z, Liang R, Chen B, Huang W, Wu Y: **Rapid quantitation of human epididymis protein 4 in human serum by amplified luminescent proximity homogeneous immunoassay (AlphaLISA).** *J Immunol Methods* 2016, **437**:64-69.
21. Bracht T, Molleken C, Ahrens M, Poschmann G, Schlosser A, Eisenacher M, Stuhler K, Meyer HE, Schmiegel WH, Holmskov U *et al*: **Evaluation of the biomarker candidate MFAP4 for non-invasive assessment of hepatic fibrosis in hepatitis C patients.** *Journal of translational medicine* 2016, **14**(1):201.
22. Wang H, Nefzi A, Fields GB, Lakshmana MK, Minond D: **AlphaLISA-based high-throughput screening assay to measure levels of soluble amyloid precursor protein alpha.** *Analytical biochemistry* 2014, **459**:24-30.
23. Steinsbo O, Dorum S, Lundin KE, Sollid LM: **Serologic assay for diagnosis of celiac disease based on a patient-derived monoclonal anti gliadin antibody.** *Gastroenterology* 2015, **149**(6):1530-1540 e1533.
24. Burlein C, Bahnck C, Bhatt T, Murphy D, Lemaire P, Carroll S, Miller MD, Lai MT: **Development of a sensitive amplified luminescent proximity homogeneous assay to monitor the interactions between pTEFb and Tat.** *Analytical biochemistry* 2014, **465**:164-171.
25. Liu TC, Huang H, Dong ZN, He A, Li M, Wu YS, Xu WW: **Development of an amplified luminescent proximity homogeneous assay for quantitative determination of hepatitis B surface antigen in human serum.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2013, **426**:139-144.
26. He A, Liu TC, Dong ZN, Ren ZQ, Hou JY, Li M, Wu YS: **A novel immunoassay for the quantization of CYFRA 21-1 in human serum.** *Journal of clinical laboratory analysis* 2013, **27**(4):277-283.
27. Zou LP, Liu TC, Lin GF, Dong ZN, Hou JY, Li M, Wu YS: **AlphaLISA for the determination of median levels of the free beta subunit of human chorionic gonadotropin in the serum of pregnant women.** *Journal of immunoassay & immunochemistry* 2013, **34**(2):134-148.
28. Chau DM, Shum D, Radu C, Bhinder B, Gin D, Gilchrist ML, Djaballah H, Li YM: **A novel high throughput 1536-well Notch1 gamma -secretase AlphaLISA assay.** *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 2013, **16**(6):415-424.
29. Zhang Y, Huang B, Zhang J, Wang K, Jin J: **Development of a homogeneous immunoassay based on the AlphaLISA method for the detection of chloramphenicol in milk, honey and eggs.** *Journal of the science of food and agriculture* 2012, **92**(9):1944-1947.
30. Leuvering JH, Thal PJ, van der Waart M, Schuurs AH: **Sol particle immunoassay (SPIA).** *Journal of immunoassay* 1980, **1**(1):77-91.
31. Päckilä H, Soukka T: **Simple and inexpensive immunoassay-based diagnostic tests,** vol. 3; 2011.
32. Nielsen K, Yu WL, Kelly L, Bermudez R, Renteria T, Dajer A, Gutierrez E, Williams J, Algire J, de Eschaide ST: **Development of a lateral flow assay for rapid detection of bovine antibody to Anaplasma marginale.** *Journal of immunoassay & immunochemistry* 2008, **29**(1):10-18.
33. Koets M, Sander I, Bogdanovic J, Doekes G, van Amerongen A: **A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal alpha-amylase at the workplace.** *Journal of environmental monitoring : JEM* 2006, **8**(9):942-946.
34. Wang S, Quan Y, Lee N, Kennedy IR: **Rapid determination of fumonisin B1 in food samples by enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2006, **54**(7):2491-2495.

35. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A: **Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey.** *Analytical and bioanalytical chemistry* 2009, **393**(2):569-582.
36. Raeisossadati MJ, Danesh NM, Borna F, Gholamzad M, Ramezani M, Abnous K, Taghdisi SM: **Lateral flow based immunobiosensors for detection of food contaminants.** *Biosensors & bioelectronics* 2016, **86**:235-246.
37. Bahadır EB, Sezgintürk MK: **Lateral flow assays: Principles, designs and labels.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2016, **82**:286-306.
38. Cho JH, Paek SH: **Semiquantitative, bar code version of immunochromatographic assay system for human serum albumin as model analyte.** *Biotechnology and bioengineering* 2001, **75**(6):725-732.
39. Corstjens PL, Zuiderwijk M, Nilsson M, Feindt H, Sam Niedbala R, Tanke HJ: **Lateral-flow and up-converting phosphor reporters to detect single-stranded nucleic acids in a sandwich-hybridization assay.** *Analytical biochemistry* 2003, **312**(2):191-200.
40. Zhang C, Zhang Y, Wang S: **Development of multianalyte flow-through and lateral-flow assays using gold particles and horseradish peroxidase as tracers for the rapid determination of carbaryl and endosulfan in agricultural products.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2006, **54**(7):2502-2507.
41. Murphy K, Weaver C: **Janeway's immunobiology:** Garland Science; 2016.
42. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F: **Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources.** *ILAR journal* 2005, **46**(3):258-268.
43. Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT: **Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry.** *ILAR journal* 1995, **37**(3):93-118.
44. Kohler G, Milstein C: **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature* 1975, **256**(5517):495-497.
45. Greenfield EA: **Generating monoclonal antibodies.** *Antibodies: a laboratory manual, 2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* 2014:201-221.
46. Chappey ON, Sandouk P, Scherrmann JM: **Monoclonal antibodies in hapten immunoassays.** *Pharmaceutical research* 1992, **9**(11):1375-1379.
47. Frenzel A, Hust M, Schirrmann T: **Expression of recombinant antibodies.** *Frontiers in immunology* 2013, **4**:217.
48. Karu AE BC, Chin TE: **Recombinant antibody technology.** *ILAR Journal* 1995, **37**(3).
49. Brundiers R KA: **Recombinant Antibody Expression and Purification:** The Protein Protocols Handbook. Humana Press: Totowa, NJ. 2009. pp. 1929-1943.
50. Ma H, O'Kennedy R: **Recombinant antibody fragment production.** *Methods* 2017, **116**:23-33.
51. Kriangkum J, Xu B, Nagata LP, Fulton RE, Suresh MR: **Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies.** *Biomolecular engineering* 2001, **18**(2):31-40.
52. Schirrmann T, Meyer T, Schutte M, Frenzel A, Hust M: **Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy.** *Molecules* 2011, **16**(1):412-426.
53. Finlay WJ, Bloom L, Grant J, Franklin E, Shúilleabháin DN, Cunningham O: **Phage Display: A Powerful Technology for the Generation of High-Specificity Affinity Reagents from Alternative Immune Sources.** *Protein Chromatography: Methods and Protocols* 2017:85-99.
54. Rader C, Barbas CF: **Phage display of combinatorial antibody libraries.** *Current opinion in biotechnology* 1997, **8**(4):503-508.
55. Skerra A, Pluckthun A: **Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli.** *Science* 1988, **240**(4855):1038-1041.
56. Alfthan K, Takkinen K, Sizmann D, Seppala I, Immonen T, Vanne L, Keranen S, Kaartinen M, Knowles JK, Teeri TT: **Efficient secretion of murine Fab fragments by Escherichia**

- coli is determined by the first constant domain of the heavy chain.** *Gene* 1993, **128**(2):203-209.
57. Knappik A, Brundiers R: **Recombinant antibody expression and purification.** In: *The protein protocols handbook.* Springer; 2009: 1929-1943.
 58. Hust M, Jostock T, Menzel C, Voedisch B, Mohr A, Brenneis M, Kirsch MI, Meier D, Dubel S: **Single chain Fab (scFab) fragment.** *BMC biotechnology* 2007, **7**:14.
 59. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NB, Hamid M: **scFv antibody: principles and clinical application.** *Clinical & developmental immunology* 2012, **2012**:980250.
 60. Fujii I: **Antibody affinity maturation by random mutagenesis.** In: *Antibody Engineering.* Springer; 2004: 345-359.
 61. Hudson PJ, Kortt AA: **High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies.** *Journal of immunological methods* 1999, **231**(1-2):177-189.
 62. Pluckthun A, Pack P: **New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments.** *Immunotechnology : an international journal of immunological engineering* 1997, **3**(2):83-105.
 63. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R: **Naturally occurring antibodies devoid of light chains.** *Nature* 1993, **363**(6428):446-448.
 64. Gonzalez-Sapienza G, Rossotti MA, Tabares-da Rosa S: **Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications.** *Frontiers in immunology* 2017, **8**:977.
 65. G. Plaza KU, A. J. Tien: **Immunoassays and Environmental Studies.** *Polish Journal of Environmental Studies* 2000, **9**(4):5.
 66. Chuang JC, Emon JM, Durnford J, Thomas K: **Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for the measurement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in human urine.** *Talanta* 2005, **67**(3):658-666.
 67. Thiphom S, Prapamontol T, Chantara S, Mangklabruks A, Suphavilai C, Ahn KC, Gee SJ, Hammock BD: **Determination of the pyrethroid insecticide metabolite 3-PBA in plasma and urine samples from farmer and consumer groups in northern Thailand.** *Journal of environmental science and health Part B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* 2014, **49**(1):15-22.
 68. Shelver WL, Parrotta CD, Slawewski R, Li QX, Ikonomou MG, Barcelo D, Lacorte S, Rubio FM: **Development of a magnetic particle immunoassay for polybrominated diphenyl ethers and application to environmental and food matrices.** *Chemosphere* 2008, **73**(1 Suppl):S18-23.
 69. Trindade M, Nording M, Nichkova M, Spinnel E, Haglund P, Last MS, Gee S, Hammock B, Last JA, Gonzalez-Sapienza G *et al*: **Enzyme-linked immunosorbent assay for screening dioxin soil contamination by uncontrolled combustion during informal recycling in slums.** *Environmental toxicology and chemistry* 2008, **27**(11):2224-2232.
 70. Darwish IA: **Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances.** *International journal of biomedical science : IJBS* 2006, **2**(3):217-235.
 71. Ullman EF, Milburn G, Jelesko J, Radika K, Pirio M, Kempe T, Skold C: **Anti-immune complex antibodies enhance affinity and specificity of primary antibodies.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(4):1184-1189.
 72. Pulli T, Hoyhtya M, Soderlund H, Takkinen K: **One-step homogeneous immunoassay for small analytes.** *Analytical chemistry* 2005, **77**(8):2637-2642.
 73. Kobayashi N, Shibusawa K, Kubota K, Hasegawa N, Sun P, Niwa T, Goto J: **Monoclonal anti-idiotypic antibodies recognizing the variable region of a high-affinity antibody against 11-deoxycortisol. Production, characterization and application to a sensitive**

- noncompetitive immunoassay.** *Journal of immunological methods* 2003, **274**(1-2):63-75.
74. Lamminmaki U, Kankare JA: **Crystal structure of a recombinant anti-estradiol Fab fragment in complex with 17beta -estradiol.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(39):36687-36694.
75. Monnet C, Bettsworth F, Stura EA, Le Du MH, Menez R, Derrien L, Zinn-Justin S, Gilquin B, Sibai G, Battail-Poirot N *et al*: **Highly specific anti-estradiol antibodies: structural characterisation and binding diversity.** *Journal of molecular biology* 2002, **315**(4):699-712.
76. Islam KN, Ihara M, Dong J, Kasagi N, Mori T, Ueda H: **Micro open-sandwich ELISA to rapidly evaluate thyroid hormone concentration from serum samples.** *Bioanalysis* 2010, **2**(10):1683-1687.
77. Lim SL, Ichinose H, Shinoda T, Ueda H: **Noncompetitive detection of low molecular weight peptides by open sandwich immunoassay.** *Analytical chemistry* 2007, **79**(16):6193-6200.
78. Dong J, Shichiri M, Chung CI, Shibata T, Uchida K, Hagihara Y, Yoshida Y, Ueda H: **An open sandwich immunoassay for detection of 13(R,S)-hydroxy-9(E),11(E)-octadecadienoic acid.** *The Analyst* 2017, **142**(5):787-793.
79. Yokozeki T, Ueda H, Arai R, Mahoney W, Nagamune T: **A homogeneous noncompetitive immunoassay for the detection of small haptens.** *Analytical chemistry* 2002, **74**(11):2500-2504.
80. Arai R, Ueda H, Tsumoto K, Mahoney WC, Kumagai I, Nagamune T: **Fluorolabeling of antibody variable domains with green fluorescent protein variants: application to an energy transfer-based homogeneous immunoassay.** *Protein engineering* 2000, **13**(5):369-376.
81. Arai R, Nakagawa H, Tsumoto K, Mahoney W, Kumagai I, Ueda H, Nagamune T: **Demonstration of a homogeneous noncompetitive immunoassay based on bioluminescence resonance energy transfer.** *Analytical biochemistry* 2001, **289**(1):77-81.
82. Abe R, Ohashi H, Iijima I, Ihara M, Takagi H, Hoshaka T, Ueda H: **"Quenchbodies": quench-based antibody probes that show antigen-dependent fluorescence.** *Journal of the American Chemical Society* 2011, **133**(43):17386-17394.
83. Abe R, Jeong H-J, Arakawa D, Dong J, Ohashi H, Kaigome R, Saiki F, Yamane K, Takagi H, Ueda H: **Ultra Q-bodies: quench-based antibody probes that utilize dye-dye interactions with enhanced antigen-dependent fluorescence.** *Scientific reports* 2014, **4**:4640.
84. Gonzalez-Techera A, Vanrell L, Last JA, Hammock BD, Gonzalez-Sapienza G: **Phage anti-immune complex assay: general strategy for noncompetitive immunodetection of small molecules.** *Analytical chemistry* 2007, **79**(20):7799-7806.
85. Gonzalez-Techera A, Kim HJ, Gee SJ, Last JA, Hammock BD, Gonzalez-Sapienza G: **Polyclonal antibody-based noncompetitive immunoassay for small analytes developed with short peptide loops isolated from phage libraries.** *Analytical chemistry* 2007, **79**(23):9191-9196.
86. Inaba J, Nakamura S, Shimizu K, Asami T, Suzuki Y: **Anti-metatype peptides, a molecular tool with high sensitivity and specificity to monitor small ligands.** *Analytical biochemistry* 2009, **388**(1):63-70.
87. Tanaka F, Hu Y, Sutton J, Asawapornmongkol L, Fuller R, Olson AJ, Barbas CF, 3rd, Lerner RA: **Selection of phage-displayed peptides that bind to a particular ligand-bound antibody.** *Bioorganic & medicinal chemistry* 2008, **16**(11):5926-5931.
88. Rossotti MA, Carlomagno M, Gonzalez-Techera A, Hammock BD, Last J, Gonzalez-Sapienza G: **Phage anti-immunocomplex assay for clomazone: two-site recognition**

- increasing assay specificity and facilitating adaptation into an on-site format.** *Analytical chemistry* 2010, **82**(21):8838-8843.
89. Gonzalez-Techera A, Zon MA, Molina PG, Fernandez H, Gonzalez-Sapienza G, Arevalo FJ: **Development of a highly sensitive noncompetitive electrochemical immunosensor for the detection of atrazine by phage anti-immunocomplex assay.** *Biosensors & bioelectronics* 2015, **64**:650-656.
 90. Kim HJ, McCoy M, Gee SJ, Gonzalez-Sapienza GG, Hammock BD: **Noncompetitive phage anti-immunocomplex real-time polymerase chain reaction for sensitive detection of small molecules.** *Analytical chemistry* 2011, **83**(1):246-253.
 91. Vanrell L, Gonzalez-Techera A, Hammock BD, Gonzalez-Sapienza G: **Nanopeptamers for the development of small-analyte lateral flow tests with a positive readout.** *Analytical chemistry* 2013, **85**(2):1177-1182.
 92. Pahler A, Hendrickson, W. A., Kolks, M. A. G. Argarana, C. E., and Cantor, C. R.: **Characterization and crystallization of core streptavidin.** *J BiolChem* 1987, **262**(29):13,933-913,937.
 93. Sano T, Cantor CR: **Intersubunit contacts made by tryptophan 120 with biotin are essential for both strong biotin binding and biotin-induced tighter subunit association of streptavidin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(8):3180-3184.
 94. Wild D: **The immunoassay handbook:** Gulf Professional Publishing; 2005.
 95. Gallizia A, de Lalla C, Nardone E, Santambrogio P, Brandazza A, Sidoli A, Arosio P: **Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in Escherichia coli.** *Protein expression and purification* 1998, **14**(2):192-196.
 96. Humbert N, Schurmann P, Zocchi A, Neuhaus JM, Ward TR: **High-yield production and purification of recombinant T7-tag mature streptavidin in glucose-stressed E. coli.** *Methods in molecular biology* 2008, **418**:101-110.
 97. Zhang J, Tanha J, Hiramata T, Khieu NH, To R, Tong-Sevinc H, Stone E, Brisson JR, MacKenzie CR: **Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents.** *Journal of molecular biology* 2004, **335**(1):49-56.
 98. Stone E, Hiramata T, Tanha J, Tong-Sevinc H, Li S, MacKenzie CR, Zhang J: **The assembly of single domain antibodies into bispecific decavalent molecules.** *Journal of immunological methods* 2007, **318**(1-2):88-94.
 99. Becker S, Theile S, Heppeler N, Michalczyk A, Wentzel A, Wilhelm S, Jaeger KE, Kolmar H: **A generic system for the Escherichia coli cell-surface display of lipolytic enzymes.** *FEBS letters* 2005, **579**(5):1177-1182.
 100. Fields S, Song O: **A novel genetic system to detect protein-protein interactions.** *Nature* 1989, **340**(6230):245-246.
 101. Hanes J, Pluckthun A: **In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(10):4937-4942.
 102. Yonezawa M, Doi N, Kawahashi Y, Higashinakagawa T, Yanagawa H: **DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries.** *Nucleic acids research* 2003, **31**(19):e118.
 103. Wilson DS, Keefe AD, Szostak JW: **The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(7):3750-3755.
 104. Smith GP: **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.** *Science* 1985, **228**(4705):1315-1317.
 105. Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ: **Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, **87**(16):6378-6382.

106. Devlin JJ, Panganiban LC, Devlin PE: **Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules.** *Science* 1990, **249**(4967):404-406.
107. Scott JK, Smith GP: **Searching for peptide ligands with an epitope library.** *Science* 1990, **249**(4967):386-390.
108. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ: **Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains.** *Nature* 1990, **348**(6301):552-554.
109. Barbas CF, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ: **Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991, **88**(18):7978-7982.
110. Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M: **Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications.** *Current issues in molecular biology* 2011, **13**(2):51-76.
111. Stengele I, Bross P, Garces X, Giray J, Rasched I: **Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites.** *Journal of molecular biology* 1990, **212**(1):143-149.
112. Carmen S, Jermutus L: **Concepts in antibody phage display.** *Briefings in functional genomics & proteomics* 2002, **1**(2):189-203.
113. Barbas CF: **Phage Display: A Laboratory Manual:** Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
114. Nemudraya AA, Richter VA, Kuligina EV: **Phage Peptide Libraries As a Source of Targeted Ligands.** *Acta Naturae* 2016, **8**(1):48-57.
115. Martens CL, Cwirla SE, Lee RY, Whitehorn E, Chen EY, Bakker A, Martin EL, Wagstrom C, Gopalan P, Smith CW *et al*: **Peptides which bind to E-selectin and block neutrophil adhesion.** *J Biol Chem* 1995, **270**(36):21129-21136.
116. Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E: **Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins.** *Bio/technology* 1995, **13**(3):265-270.
117. Heinis C, Rutherford T, Freund S, Winter G: **Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides.** *Nature chemical biology* 2009, **5**(7):502-507.
118. Andris-Widhopf J, Rader C, Steinberger P, Fuller R, Barbas CF, 3rd: **Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display.** *Journal of immunological methods* 2000, **242**(1-2):159-181.
119. Ramakrishnan M, Kinsey BM, Singh RA, Kosten TR, Orson FM: **Hapten optimization for cocaine vaccine with improved cocaine recognition.** *Chemical biology & drug design* 2014, **84**(3):354-363.
120. Christ D, Famm K, Winter G: **Tapping diversity lost in transformations--in vitro amplification of ligation reactions.** *Nucleic acids research* 2006, **34**(16):e108.
121. Souza GR, Christianson DR, Staquicini FI, Ozawa MG, Snyder EY, Sidman RL, Miller JH, Arap W, Pasqualini R: **Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, **103**(5):1215-1220.
122. Ullman EF, Kirakossian H, Switchenko A, Ishkanian J, Ericson M, Wartchow C, Pirio M, Pease J, Irvin B, Singh S: **Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method.** *Clinical chemistry* 1996, **42**(9):1518-1526.
123. Solomon KR, Giesy JP, LaPoint TW, Giddings JM, Richards RP: **Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters.** *Environmental toxicology and chemistry* 2013, **32**(1):10-11.
124. Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi K, Hayes TB, Takayanagi R *et al*: **Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans.** *Environ Health Perspect* 2007, **115**(5):720-727.

125. Kettles MK, Browning SR, Prince TS, Horstman SW: **Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties.** *Environ Health Perspect* 1997, **105**(11):1222-1227.
126. Giersch T: **A new monoclonal antibody for the sensitive detection of atrazine with immunoassay in microtiter plate and dipstick format.** *Journal of agricultural and food chemistry* 1993, **41**(6):1006-1011.
127. **Guidelines for drinking-water quality, Fourth Edition [Internet]. Retrieved May 29, 2017**
128. **Environment Protection Agency. What are EPA's drinking water regulations for atrazine? Retrieved May 29, 2017**
129. Karila L, Zarndini R, Petit A, Lafaye G, Lowenstein W, Reynaud M: **Cocaine addiction: Current data for the clinician.** *Presse medicale (Paris, France: 1983)* 2014, **43**(1):9-17.
130. Schramm W, Craig PA, Smith RH, Berger GE: **Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum, and urine.** *Clinical chemistry* 1993, **39**(3):481-487.
131. DHHS: **Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs.** In: *Federal Register.* vol. 80; 2015: 49.
132. Pil K RE, Neste TVd, Verstraete A: **Toxicological analyses in the DRUID epidemiological studies: Analytical methods, target analytes and analytical cutoffs.** In: *The International Association of Forensic Toxicology annual meeting August 27-30; Seattle.* 2007.
133. Cone EJ, Huestis MA: **Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007, **1098**(1):51-103.
134. Ellefsen KN, Concheiro M, Pirard S, Gorelick DA, Huestis MA: **Oral fluid cocaine and benzoylecgonine concentrations following controlled intravenous cocaine administration.** *Forensic science international* 2016, **260**:95-101.
135. Jufer R, Walsh SL, Cone EJ, Sampson-Cone A: **Effect of repeated cocaine administration on detection times in oral fluid and urine.** *Journal of analytical toxicology* 2006, **30**(7):458-462.
136. Scheidweiler KB, Spargo EAK, Kelly TL, Cone EJ, Barnes AJ, Huestis MA: **Pharmacokinetics of cocaine and metabolites in human oral fluid and correlation with plasma concentrations following controlled administration.** *Therapeutic drug monitoring* 2010, **32**(5):628.
137. 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.** *Analytical chemistry* 2017, **89**(12):6800-6806.
138. 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.** *Biochimica et biophysica acta* 2015, **1850**(7):1397-1404.
139. Rossotti MA, Gonzalez-Techera A, Guarnaschelli J, Yim L, Camacho X, Fernandez M, Cabral P, Leizagoyen C, Chabalgoity JA, Gonzalez-Sapienza G: **Increasing the potency of neutralizing single-domain antibodies by functionalization with a CD11b/CD18 binding domain.** *mAbs* 2015, **7**(5):820-828.
140. Rossotti MA, Pirez M, Gonzalez-Techera A, Cui Y, Bever CS, Lee KS, Morisseau C, Leizagoyen C, Gee S, Hammock BD *et al*: **Method for Sorting and Pairwise Selection of Nanobodies for the Development of Highly Sensitive Sandwich Immunoassays.** *Analytical chemistry* 2015, **87**(23):11907-11914.
141. Tabares-da Rosa S, Rossotti M, Carleiza C, Carrion F, Pritsch O, Ahn KC, Last JA, Hammock BD, 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.** *Analytical chemistry* 2011, **83**(18):7213-7220.
142. Fanning SW, Horn JR: **An anti-hapten camelid antibody reveals a cryptic binding site with significant energetic contributions from a nonhypervariable loop.** *Protein Sci* 2011, **20**(7):1196-1207.
143. Esteban JA, Salas M, Blanco L: **Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization.** *The Journal of biological chemistry* 1993, **268**(4):2719-2726.
144. Blanco L, Salas M: **Replication of phage phi 29 DNA with purified terminal protein and DNA polymerase: synthesis of full-length phi 29 DNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, **82**(19):6404-6408.
145. Tammer A, Coia G, Cappai R, Fuller S, Masters C, Hudson P, Underwood J: **Generation of a recombinant Fab antibody reactive with the Alzheimer's disease-related A β peptide.** *Clinical & Experimental Immunology* 2002, **129**(3):453-463.
146. Bever CS, Dong JX, Vasylieva N, Barnych B, Cui Y, Xu ZL, Hammock BD, Gee SJ: **VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals.** *Analytical and bioanalytical chemistry* 2016, **408**(22):5985-6002.

ARTÍCULO I

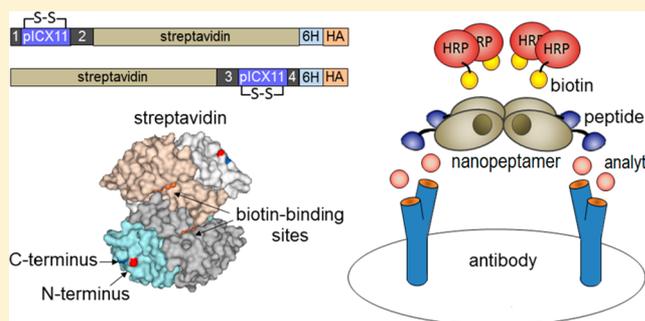
Recombinant Streptavidin Nanopeptamer Anti-Immunocomplex Assay for Noncompetitive Detection of Small Analytes

Mariana Carlomagno, Gabriel Lassabe, Martín Rossotti, Andrés González-Techera, Lucía Vanrell, and Gualberto González-Sapienza*

Cátedra de Inmunología, DEPBIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UDELAR, Avinguda A. Navarro 3051, piso 2, Montevideo 11600, Uruguay

Supporting Information

ABSTRACT: Short peptide loops selected from phage libraries can specifically recognize the formation of hapten-antibody immunocomplexes and can thus be used to develop phage anti-immunocomplex assays (PHAIA) for noncompetitive detection of small molecules. In this study, we generated recombinant chimeras by fusing anti-immunocomplex peptides selected from phage libraries to the N- or C-termini of core streptavidin and used them to setup phage-free non-competitive assays for the herbicide clomazone (MW 240 Da). The best conditions for refolding were optimized by a high throughput screening allowing to obtain tens of mg of purified protein per liter of culture. The noncompetitive assay developed with these chimeras performed with a 50% saturating concentration (SC_{50}) of 2.2 ± 0.3 ng/mL and limit of detection (LOD) of 0.48 ng/mL. Values that are 13- and 8-fold better than those obtained for the SC_{50} and LOD of the competitive assay setup with the same antibody. Apart from the first demonstration that recombinant peptide-streptavidin chimeras can be used for sensitive immunodetection of small molecules with a positive readout, this new assay component is a highly standardized reagent with a defined stoichiometry, which can be used in combination with the broad option of existing biotinylated reagents offering a great versatility for the development of conventional immunoassay and biosensors. The utility of the test was demonstrated analyzing the clomazone runoff during the rice growing season in northern Uruguay.



While macromolecular analytes are relevant targets in clinical diagnosis, small-molecules constitute the vast majority of the analytes of interest in environmental studies, toxicology, drug monitoring, biosecurity, etc. The classical two-antibody sandwich assay used for immunodetection of macromolecules cannot be applied to small-analytes, because of their small size that impedes the simultaneous binding of two antibodies. With few exceptions, such as the use of poly dentate ligands,¹ antimetatype antibodies,² or the open sandwich assay,³ the immunodetection of these analytes has been restricted to the use of competitive assays which use a competitor hapten either labeled with a tracer molecule or conjugated to a carrier protein for coating. Unfortunately, this competitive assay performs with inferior sensitivity, precision and kinetics range than the two-site noncompetitive format,⁴ and their adaptation into lateral-flow tests or biosensors is more difficult. In 2007, we introduced the use of small peptide loops that, upon binding of the hapten, specifically recognize the modifications of the antigen-binding site on the antibody, and therefore can be used to detect the formation of the immunocomplex (IC). These peptide loops are selected on the immobilized IC, from phage display libraries expressing 7–11 random residue peptides flanked by two cysteines that form a disulfide bridge and constrain the peptide structure. The initial application of these

anti-IC peptides for noncompetitive detection of small molecules was first described for the herbicides molinate and atrazine, and the drugs digoxin and cyclosporine,⁵ and later for the flame-retardant brominated diphenyl ether⁶ and the pyrethroid metabolite phenoxybenzoic acid.⁷ In this method, termed PHAIA (phage anti-immunocomplex assay), the IC was detected by the formation of a tertiary complex with the phage particle, which was subsequently revealed with an anti-M13 peroxidase conjugate, or by amplification of the phage DNA by real time PCR.⁷ In addition to a proportional signal, PHAIA also provides an increased sensitivity. Typically, using the same monoclonal antibody, the adaptation of any competitive assay into PHAIA is accompanied by a 10–20 fold increase in sensitivity, and this can be even higher in the case of polyclonal antibodies.⁸ Additionally, the formation of the antibody-analyte-peptide complex provides a double recognition of the analyte, which also contributes to a higher assay specificity.⁹ The phage particles are particularly robust and when the peptide is fused to the major phage coat protein, their filamentous nature provides a multivalent scaffold that allows

Received: August 20, 2014

Accepted: September 26, 2014

Published: September 26, 2014

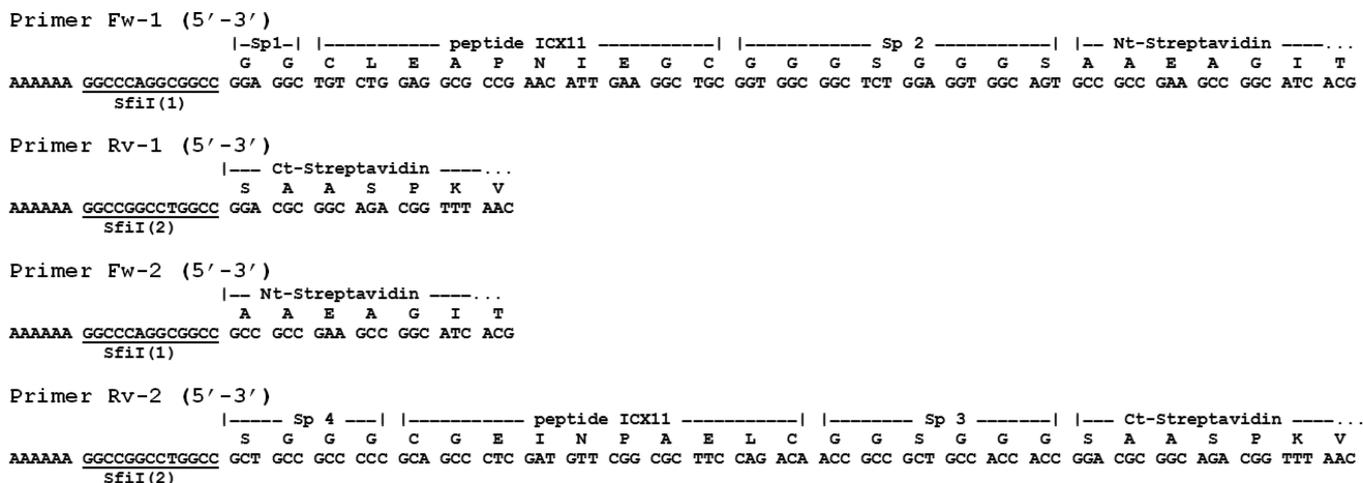


Figure 1. Primers used to assemble the anticlomazone IC cassettes. The regions coding for the peptide, spacers (Sp), and the annealing to the streptavidin gene are denoted on top of the nucleotide sequence. The SfiI sites further used for cloning are underlined.

the display of hundred copies of the peptide providing high avidity for the IC.¹⁰ However, the phage particles are “unconventional” reagents for the immunoassay industry, and they can confer antibiotic resistance to *Escherichia coli* laboratory strains, which can be a safety concern in molecular biology laboratories. To work-around these limitations, we recently demonstrated that the phage particles can be substituted by commercial conjugates of streptavidin or avidin loaded with synthetic anti-IC peptides that contain a biotinylated lysine in their N-terminus.¹¹ These complexes, that we termed nanopeptamers, could be used to develop two-site noncompetitive assays for small molecules, which performed with similar sensitivity and specificity than their parent anti-IC phage particles.

In this work, we present a further development of the streptavidin nanopeptamer technology optimizing their production as recombinant peptide-streptavidin chimeras. This not only dramatically reduces the production costs, but it also frees the biotin binding sites allowing the use of the full arrange of biotinylated reagents, including tracer enzymes, fluorophores, colloidal gold, magnetic beads, etc. which will facilitate the development of all sort of immunoassays, including optical, electrochemical and magnetic biosensors. Streptavidin (STR) is a homotetrameric protein naturally secreted by the actinobacterium *Streptomyces avidinii*, which has an exceptionally high affinity (K_d of 10^{-13} – 10^{-16} M) for biotin.¹² The monomers are synthesized as full-length proteins of 159 amino acid that are further processed to remove 12 and 20 amino acids from the N- and C-termini, respectively, yielding core streptavidin. There is one biotin binding site per monomer, but the binding of biotin by an isolated monomer has a K_d of 10^{-7} M, and only after assembling of the tetramer the affinity becomes dramatically higher.¹³ The protein has been expressed in *E. coli* either as a fusion protein or alone at good yields, though normally as an insoluble protein.^{14–17} As a model small analyte to develop the recombinant nanopeptamers we choose the herbicide clomazone (2-[(2-chlorophenyl)methyl]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone, MW 240 Da), one of the main herbicides used in rice culture, and the peptide CLEAPNIEGC which is specific for the IC formed by the herbicide and the monoclonal antibody MAb5.6.⁹ After assay optimization, the recombinant nanopeptamer was used to study the runoff of the herbicide during the rice growing season in Uruguay.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Monoclonal antibody 5.6 (MAb5.6), a mouse IgG against clomazone, was prepared as described before (Rossotti 2010). Clomazone was purchased from Riedel-de Haën, Seelze, Germany. The BCA Protein Assay Kit for the quantification of purified antibody and protein G affinity columns for IgG purification, were purchased from Pierce (Rockford, IL). BSA, Tween 20, IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), polyethylene glycol 8000 (PEG), and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), other common chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Assembling of the Anticlomazone IC Nanopeptamer Construct. The STR gene (amino acids 14–139) was optimized for expression in *E. coli* and synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA). To assemble the anticlomazone IC cassettes, the streptavidin-gene template was amplified by PCR employing the primers shown in Figure 1. The primers Fw-1 in combination with Rv-1, and Fw-2 with Rv-2 were used to amplify the nanopeptamer genes with the peptide CLEAPNIEGC (pICX11) at the N-terminus (pICX11-STR), or C-terminus (STR-pICX11), respectively. The cassettes carried two noncomplementary SfiI sites that were used to clone them into a modified pET28a+ vector (Novagen), between the OmpA signal peptide and the 6 x His and HA (hemagglutinin) tags. The ligated vectors were electroporated in competent BL21(DE3) *E. coli* cells (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Expression and Partial Purification of the Recombinant STR Nanopeptamers. Selected colonies of BL21(DE3) transformed with either the pICX11-STR or STR-pICX11 constructions, whose sequence were verified by DNA sequencing, were grown in 500 mL of LB ampicillin (50 μ g/mL) at 37 °C, with shaking at 250 rpm, with an absorbance of 0.4 AU at 600 nm. The cultures were then induced with 1 mM IPTG, incubated for 3 h and centrifuged at 5000 g for 15 min at 4 °C. The cells were sonicated in PBS (phosphate buffer saline) on ice and the inclusion bodies were purified by a detergent-washing protocol as described.¹⁸ The recombinant chimeras were dissolved in 10 mL of buffer 100 mM Tris-phosphate, 8 M urea, pH 9, by overnight rocking at 4 °C, the solution was clarified by centrifugation at 30 000g for 30 min, and the concentrations of the chimeras was estimated by densitometry from SDS-PAGE gels.

Protein Refolding Screening. A series of buffers covering a wide pH range were prepared: 200 mM acetate, pH 5.0; 100 mM phosphate, pH 6.0; 100 mM phosphate, pH 7.0; 200 mM Tris, pH 8.0; 200 mM Tris, pH 8.5; 200 mM Tris, pH 9.0; and 200 mM carbonate, pH 11. One hundred microliters of these buffers were dispensed into the wells of a 96-well microtiter plate and were combined with 100 μ L of the following additives to create a large arrange of refolding solutions: arginine (2.0 M, 1.0 M, 0.4 M), sucrose (3.0 M, 1.0 M, 0.4 M), glycerol (80%, 26%, 8%), and polyethylene glycol (PEG) 8000 (40%, 20%, 10%). Ten microliters of the urea solubilized chimeras were added into each well, mixed thoroughly and kept a 4 °C for 1 h.

Activity of the Refolded Chimeras. The biotin-binding activity of the refolded proteins was tested by ELISA. Polystyrene high-binding microtiter plates (Greiner, Germany) were coated with 100 μ L/well of 0.3 μ g/mL of biotinylated bovine serum albumin (BSA) in PBS, incubated overnight at 4 °C, blocked by incubation with 5% skimmed milk in PBS, 0.05% Tween 20 (PBS-T) for 1 h, and washed with PBS-T. The plates were then loaded with 95 microliters of 1% BSA in PBS-T and 5 μ L of each of the refolding solutions (about 150 ng of refolded protein), incubated for 1 h and washed. One hundred microliters of biotin conjugated to peroxidase (Pierce, Rockford, IL, USA) diluted 1:2000 in BSA 1%, after 40 min. After thorough washing, 100 μ L of the peroxidase substrate (0.4 mL of 6 mg/mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in DMSO, 0.1 mL of 1% H₂O₂, in 25 mL of 0.1 M citrate acetate buffer, pH 5.5) were dispensed into each well, and the reaction was stopped after 10 min by addition of 50 μ L of 2 N H₂SO₄. Absorbance was read at 450/650 nm in a microtiter plate reader (Multiskan MS, Thermo Labsystems, Waltham, MA). Similarly, the anti-IC specificity of the refolded nanopeptamers was also assessed by ELISA. Plates were coated with 5 μ g/mL of MAb5.6 (100 μ L/well), blocked, washed, and dispensed with 5 μ L of the refolded proteins diluted in PBS-T with or without clomazone (100 ng/mL), after incubation (1 h), the wells were washed and dispensed with an anti-HA antibody coupled to peroxidase (HRP) (Roche, Madison, WI) or alternatively with biotin-HRP (Pierce).

Nanopeptamer ELISA for Clomazone. Optimal concentrations of the coating antibody and detecting nanopeptamer were established by checkerboard titrations. Briefly, a microtiter plate was coated with 100 μ L/well of MAb5.6 in PBS), at concentrations of 10, 5, 2.5, and 0.5 μ g/mL that were dispensed in rows A and B, C and D, E and F, and H and I, respectively. After blocking, every other row was dispensed with 50 μ L of serial dilutions of the refolded protein in PBS-T, plus 50 μ L of PBS-T containing 100 or 0 ng/mL of clomazone, respectively. After they were incubated for 1 h and washed, the binding of the nanopeptamers was revealed using a 1/2000 dilution of the biotinylated HRP conjugate. After they were washed, the plates were incubated with substrate and read as described before. On the basis of the checkerboard titration, appropriate dilutions of coating antibody MAb5.6 and refolded protein were selected, to obtain a maximum difference between the absorbance obtained in the presence and absence of clomazone. The ELISA test was then essentially performed as described above. A 12-point internal standard curve (0–1000 ng/mL range) was performed by triplicates in each experiment. Absolute or normalized values were fitted to a four-parameter logistic equation using Genesis Lite 3.03 (Life Sciences, London) package software. For the analysis of field samples, the reaction mix was supplemented

with 10% of Interference Buffer (1 M Tris, 0.3 M NaCl, 0.3 M EDTA, 1% BSA, pH 7.4).

Metal Affinity Chromatography. The nanopeptamers were purified from the refolded extracts by immobilized metal ion affinity chromatography employing a Ni-NTA column (HisTrap HP 1 mL, GE Health Care, Pittsburgh, USA) equilibrated with buffer 50 mM Tris, 0.3 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7. After the sample was injected, the column was washed with 5 column volumes of 50 mM Tris, 0.3 M NaCl, 40 mM imidazol, pH 7, and the protein eluted (1 mL fractions) by increasing the concentration of imidazole to 500 mM. After dialysis against PBS, the recombinant nanopeptamers were supplemented with Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and sodium azide 0.05%. The preparation was filtered (0.22 μ m) and stored in aliquots at 4 °C for short-term use or kept at –80 °C until used.

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning and Expression of the Recombinant STR Nanopeptamers. We have recently showed that the Shiga like toxin (VTX) can be used as scaffold for the production of recombinant VTX nanopeptamers.¹⁹ However, they need to be conjugated to a tracer enzyme limiting the scope of their applications. The use of core streptavidin as scaffold for the display of recombinant anti-immunocomplex peptides will remove these limitations, because they can be combined with the broad options of biotinylated reagents that could serve as assay tracers. To produce recombinant STR nanopeptamers specific for clomazone we fused the peptide pICX11 (CLEAPNIEGC) to the N-terminus (pICX11-STR), or C-terminus (STR-pICX11), of a synthetic core streptavidin gene using the spacers shown in Figure 2. The coding sequences for these constructs were assembled by PCR using the primers

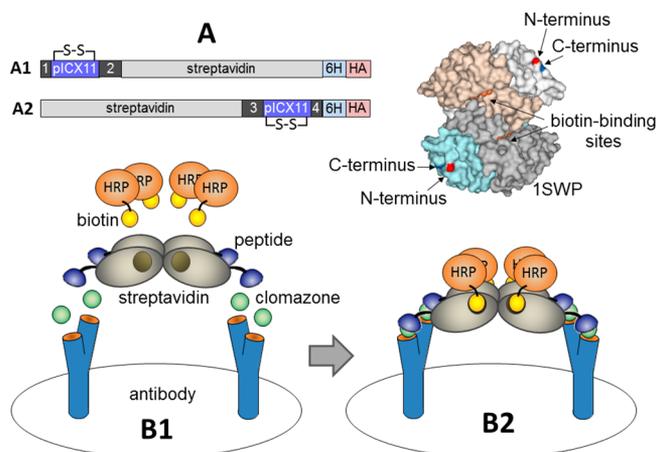


Figure 2. Schematic representation of the noncompetitive STR nanopeptamer assay for clomazone. (A) Outline of the core streptavidin (residues 14–139) nanopeptamer subunits containing the anticlomazone/MAb5.6 IC peptide (pICX11) at the N-terminus (A1 = pICX11-STR, MW 17 438 Da) or C-terminus (A2 = STR-pICX11, MW 17 438 Da). Spacers: (1) GG, (2) GGGSGGG, (3) GGGSGG, and (4) GGGSGQAGQ. Tags: 6H = 6 × His; HA = amino acid sequence YPYDVDPDYA. The N-terminus (red) and C-terminus (blue), as well as the biotin binding sites are shown on the 1SWP (PDB) structure of tetrameric streptavidin. The individual components of the assay are shown on the left (B1), and the antibody-analyte-nanopeptamer ternary complex is represented on the right (B2). HRP: Horseradish peroxidase.

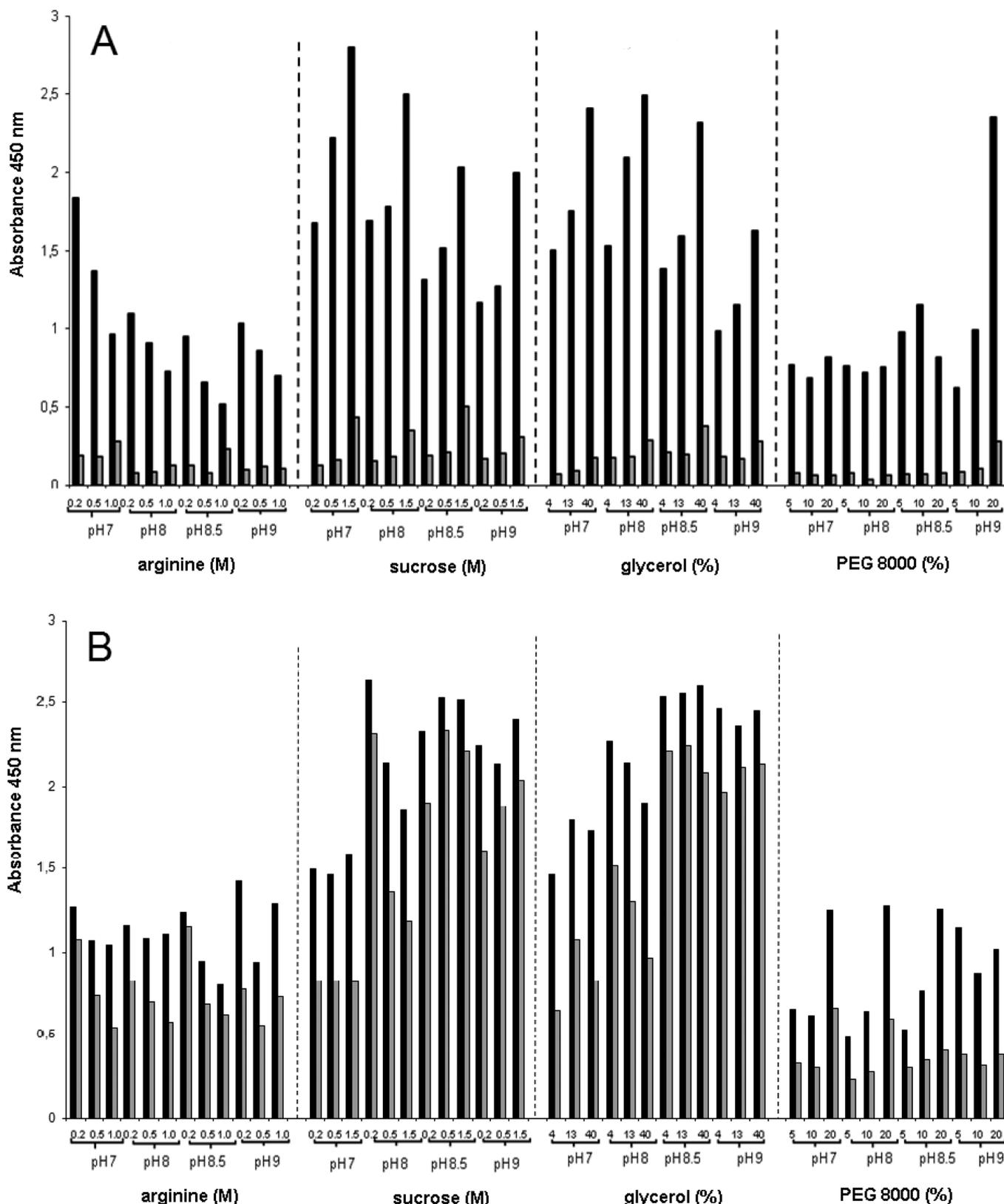


Figure 3. Specific recognition of the clomazone-MAb5.6 IC by the refolded nanopeptamers. The reactivity of the refolded chimeras was assayed on ELISA wells coated with the MAb5.6, in the presence (black) or absence (gray) of clomazone. Binding of the nanopeptamers was revealed with the anti-HA HRP conjugate using TMB as substrate. The concentration of the refolding agent is shown on top of the pH brackets. (A) Nanopeptamer pICX11-STR and (B) Nanopeptamer STR-pICX11.

described above, and were cloned into a modified pET28 vector (Novagen) between two noncomplementary SfiI sites, flanked

by the nucleotide sequences of the OmpA signal peptide and the C-terminal 6× His and HA tags. Initial experiments of

expression in *E. coli* BL21 showed that the streptavidin chimeras were only found in the insoluble fraction, which could not be reverted by modification of the temperature, IPTG concentration, or induction time of the cultures. Consequently, inclusion bodies were solubilized in buffer 100 mM Tris-phosphate, 8 M urea, pH 9.

Renaturation of Solubilized Chimeras. A large screening of refolding conditions was performed in microtiter plates as described above. Initially, the renatured proteins were tested for their binding to biotin using a sandwich ELISA, which showed that, with few exceptions, good activity was recovered in almost all tested conditions (Supporting Information, Figure S-1). Additional selection of the active proteins was performed on the basis of the specific recognition of the clomazone-MAb5.6 IC by the chimeras, using the HA tag for detection, Figure 3.

There was a marked difference between the N- and C-terminal chimeras. In general, all refolded pICX11-STR proteins reacted strongly and specifically with the IC, with little residual reactivity against the uncombined antibody. The difference in the readouts in the presence or absence of clomazone was even higher when the nanopeptamer was detected with the biotin-HRP conjugate (Supporting Information, Figure S-2). The strongest signals, and probably most efficient refolding, were found with the sucrose and glycerol buffers. In general, the C-terminal expression of the peptide gave place to a high background. This was unexpected because in our recent work describing the use of synthetic nanopeptamers, the peptides were tethered to the streptavidin tetramer through their N-terminus, and yet the reactivity with the uncombined antibody was negligible. The difference may arrive from the fact that in the recombinant chimera the peptide is fused to the $6 \times$ His and HA tags, but this issue was not further studied and the STR-pICX11 nanopeptamer was not further used. The performance of the most promising refolded pICX11-STR chimeras (minimal residual reactivity with the unbound antibody) was further studied by checkerboard titration (coating concentration of antibody versus concentration of nanopeptamer) using a fixed amount of analyte. In the development of competitive methods using phage (PHAI A) or synthetic nanopeptamers for detection, we found that the best sensitivity is obtained with the highest concentration of coating antibodies and detecting reagent, providing that they do not compromise the background of the assay.^{5,11} In this case, the recombinant pICX11 refolded in 100 mM phosphate, 1.5 M sucrose, pH 7.0 showed the best signal to background ratio over a long-range of concentrations (Supporting Information, Figure S-3) and this chimera was therefore selected for the development of the noncompetitive assay.

Nanopeptamer Assay for Clomazone. The pICX11 nanopeptamer was purified on Ni-NTA agarose and the formation of the tetramer was analyzed in SDS-gels, Figure 4. Under mild denaturing conditions (SDS at room temperature) streptavidin does not dissociate, and this was also the case for the nanopeptamer that occurred as a ~ 68 kDa band (lanes 1–3), which is in agreement with the theoretical size of 69 752 Da of the tetramer. After it was heated at 95 °C, the oligomeric structure of the complex dissociated and the monomer appeared as a band of ~ 18 kDa. The assay concentration of the purified nanopeptamer pICX11-STR was then optimized by checkerboard titrations and used to develop a noncompetitive test for clomazone, Figure 5. The midpoint of the titration curve, corresponding to the concentration of analyte giving 50% of signal saturation (SC_{50}) was 2.2 ± 0.3 , and the limit of

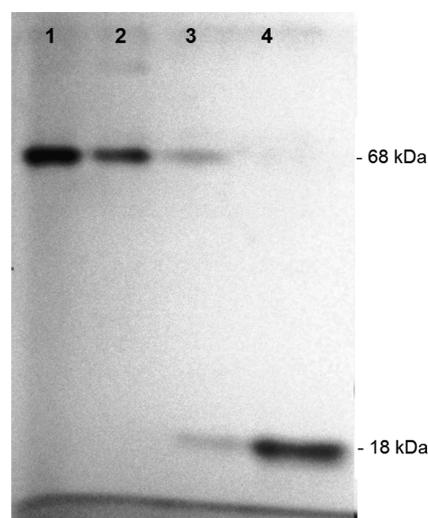


Figure 4. SDS-PAGE Analysis of the Purified Recombinant Nanopeptamer. Nonreducing 12% SDS-gel stained with coomassie blue. Lanes 1–3, fractions 1–3 eluted from the Ni-NTA column. These samples were mixed with sample buffer but were not heated before running. Lane 4, same as lane 1, but heated at 95 °C for 10 min which is necessary for the dissociation of the tetrameric structure of streptavidin.

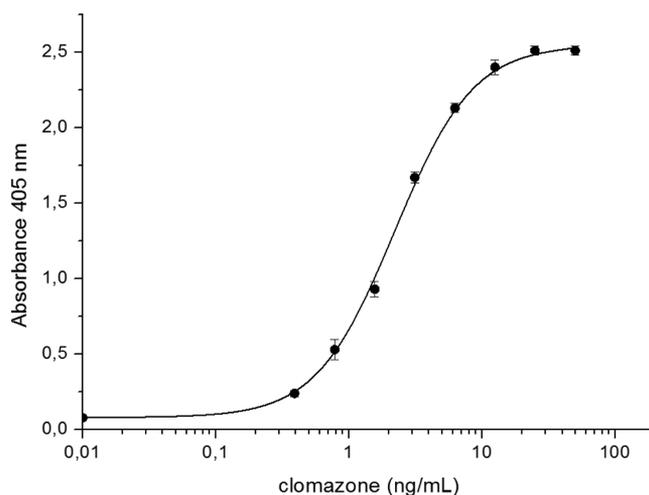


Figure 5. pICX11-STR noncompetitive ELISA for clomazone. The assay was carried out on wells coated with 2 μ g of MAb5.6 and using 1.5 μ g/well of the purified pICX11-STR nanopeptamer. Biotin-HRP was used for detection. The SC_{50} was 2.2 ± 0.3 ng/mL. Measurements were performed in triplicate; error bars correspond to the standard deviations.

detection (LOD = analyte concentration giving a 10% increase over the zero signal) was 0.48 ng/mL. These parameters are essentially the same that were obtained with the nanopeptamers prepared with streptavidin-HRP functionalized with biotinylated peptides,¹¹ showing that the variations in the attachment point to the streptavidin oligomer (Figure 1) do not have a major effect in the overall avidity of the complex for the IC. When these values are compared to the performance of the competitive assay set up with the same antibody, $SC_{50} = 28 \pm 1.1$ ng/mL and LOD = 4.0 ng/mL, it becomes evident that the recombinant nanopeptamer assay performs with increased sensitivity, representing an improvement of about 13 and 8 fold, respectively.

Streptavidin Nanopeptamer Analysis of Clomazone Runoff from Rice Cultivars. To study the potential utility of the test for the analysis of the runoff of pesticides from rice fields, we spiked water samples collected from areas with no record of clomazone application. Three water samples were spiked with various concentrations of the herbicide. To avoid the matrix effect caused by humic acids and other interfering compounds, the interference buffer was included, containing a bulk protein, a chelating agent to sequester metal ions, and high salt content to increase the ionic strength. The recoveries were good, even in the low concentration range, Table 1.

Table 1. Recovery of Clomazone from Spiked Water Samples

clomazone spiked (ng/mL)	mean recovery (% , n = 3)		
	water 1	water 2	water 3
1.0	110 ± 0.5	108 ± 3.8	105.4 ± 2.7
2.0	98 ± 7.0	110 ± 4.0	101 ± 8.1
3.0	89 ± 2.9	107 ± 12	99 ± 0.6
4.0		105 ± 17.5	104 ± 5.5
8.0	105 ± 4.3	73 ± 0.5	85 ± 1.3

The assay was then used to study the occurrence of clomazone in the basin of the Tala creek, a tributary stream of the Arapei river, in Salto, Uruguay. The Tala creek crosses a rice growing area, as well as soybean, sorghum, and raygrass fields. Clomazone is used exclusively in the rice area, being first applied in spring about 1 week before planting (0.86 kg/ha) and then about 15–20 days postemergence (0.38 kg/ha). After this second application, the fields were flooded and remained so for 50 days. The impact of the clomazone runoff was studied in seven sampling points along this basin, point 1 was upstream of the rice fields, points 2–4 and 6 were close to the fields, and point 5 and 7 were downstream of the planting area, as shown in Figure 6. Samples were taken regularly over a 55 day period (two contiguous (1 m) samples per point), and analyzed by triplicates using the nanopeptamer assay, Table 2. Overall, the concentration of the herbicide was very low, and below the LOD in most cases. Samples collected from sampling points 3, 4, 5, and 7 had measurable concentration of the herbicides at the end of the study, probably in connection with some heavy rain episodes. However, all of these samples but one had values that were below the recommended limit or 3 ng/mL for environmental surface water.²⁰

CONCLUSIONS

The substitution of synthetic nanopeptamers by recombinant peptide-streptavidin chimeras represents a significant step forward in the use of nanopeptamers for small analytes. On the one hand, there is a substantial reduction in cost, particularly because the chimeras avoid the use of expensive synthetic peptides, at the same time that can be robustly produced at high yields. Typically, after refolding and purification, about 10 mg/L of the recombinant nanopeptamer are obtained in shake flask cultures, being enough for about 500 × 96 well plate assays. Furthermore, the recombinant nanopeptamers leave the biotin-binding sites free, which are thus available to be used in combination with the broad variety of biotinylated reagents, including tracer enzymes, fluorophores, magnetic beads, etc., making them highly versatile reagents. As demonstrated here these chimeras can be

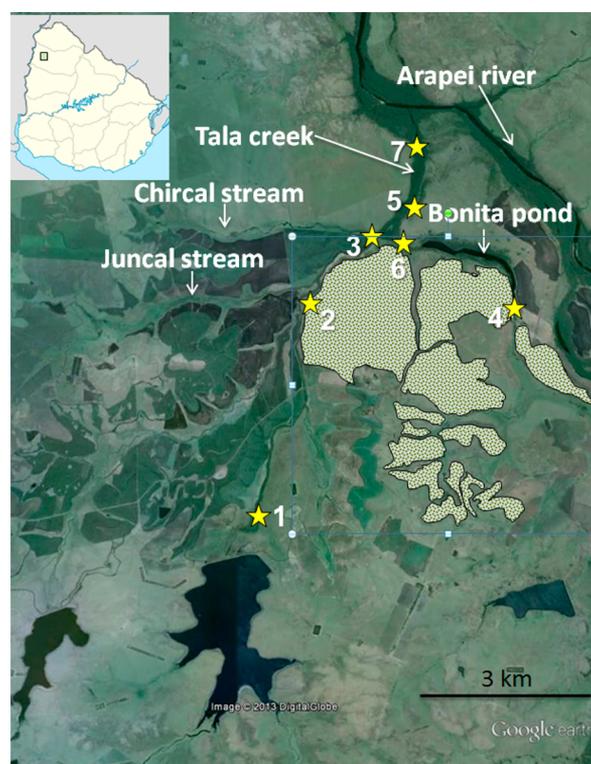


Figure 6. Tala brook basin in the north of Uruguay. The localization of the seven sampling points is denoted by stars, and the rice growing areas are shown in lighter color.

Table 2. Analysis of Water Samples from the Tala Basin^a

sampling point	day	clomazone (ng/mL)	sampling point	day	clomazone (ng/mL)
3	0	<LOD	5	0	ND
	13	<LOD		13	<LOD
	17	<LOD		17	<LOD
	28	<LOD		28	<LOD
	37	<LOD		37	1.3 ± 0.1
4	48	1.4 ± 0.0	7	48	1.4 ± 0.1
	55	1.7 ± 0.1		55	1.5 ± 0.2
	0	3.2 ± 0.0		0	<LOD
	13	1.0 ± 0.0		13	<LOD
	17	1.0 ± 0.0		17	<LOD
4	28	5.1 ± 0.1	7	28	<LOD
	37	1.7 ± 0.2		37	<LOD
	48	2.3 ± 0.2		48	1.1 ± 0.2
	55	1.2 ± 0.2		55	1.1 ± 0.2

^aValues represent the average of contiguous samples analyzed by triplicates ± SD. ND, nondetermined. Samples from sampling points 1, 2, and 6 were all <LOD.

developed into simple, cost-effective, and robust noncompetitive assays for environmental, food safety, or medical applications.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional materials as described in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: ggonzal@fq.edu.uy. Tel.: (598) 24874334.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported with funds provided by grants FMV 3138 ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay) and TW05718 Fogarty Center NIH. M.C., G.L., and M.R. are recipients of scholarship from ANII, Uruguay.

REFERENCES

- (1) Giraudi, G.; Anfossi, L.; Rosso, I.; Baggiani, C.; Giovannoli, C.; Tozzi, C. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4697–4700.
- (2) Kobayashi, N.; Oiwa, H.; Kubota, K.; Sakoda, S.; Goto, J. *J. Immunol. Methods* **2000**, *245*, 95–108.
- (3) Ueda, H.; Tsumoto, K.; Kubota, K.; Suzuki, E.; Nagamune, T.; Nishimura, H.; Schueler, P. A.; Winter, G.; Kumagai, I.; Mohoney, W. C. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1714–1718.
- (4) Jackson, T. M.; Ekins, R. P. *J. Immunol Methods* **1986**, *87*, 13–20.
- (5) Gonzalez-Techera, A.; Vanrell, L.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7799–7806.
- (6) Kim, H. J.; Rossotti, M. A.; Ahn, K. C.; Gonzalez-Sapienza, G. G.; Gee, S. J.; Musker, R.; Hammock, B. D. *Anal. Biochem.* **2010**, *401*, 38–46.
- (7) Kim, H. J.; McCoy, M.; Gee, S. J.; Gonzalez-Sapienza, G. G.; Hammock, B. D. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 246–253.
- (8) Gonzalez-Techera, A.; Kim, H. J.; Gee, S. J.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9191–9196.
- (9) Rossotti, M. A.; Carlomagno, M.; González-Techera, A.; Hammock, B. D.; Last, J.; González-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8838–8843.
- (10) Martens, C. L.; Cwirla, S. E.; Lee, R. Y.; Whitehorn, E.; Chen, E. Y.; Bakker, A.; Martin, E. L.; Wagstrom, C.; Gopalan, P.; Smith, C. W.; et al. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21129–21136.
- (11) Vanrell, L.; Gonzalez-Techera, A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1177–1182.
- (12) Green, N. M. *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 51–67.
- (13) Green, N. M. *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85–133.
- (14) Dubel, S.; Breitling, F.; Kontermann, R.; Schmidt, T.; Skerra, A.; Little, M. *J. Immunol. Methods* **1995**, *178*, 201–209.
- (15) Sano, T.; Cantor, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 142–146.
- (16) Sorensen, H. P.; Sperling-Petersen, H. U.; Mortensen, K. K. *Protein Expr. Purif.* **2003**, *31*, 149–154.
- (17) Sorensen, H. P.; Sperling-Petersen, H. U.; Mortensen, K. K. *Protein Expr. Purif.* **2003**, *32*, 252–259.
- (18) Carrio, M. M.; Villaverde, A. *FEBS Lett.* **2001**, *489*, 29–33.
- (19) Lassabe, G.; Rossotti, M.; Gonzalez-Techera, A.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5541–5546.
- (20) Slobodnik, J.; Louter, A.; Vreuls, J.; Liska, I.; Brinkman, U. A. *J. Chromatogr.* **1997**, *768*, 239–258.

Supporting information

Recombinant streptavidin nanopeptamer anti-immunocomplex assay for noncompetitive detection of the small analytes

Mariana Carlomagno, Gabriel Lassabe, Martín Rossotti, Andrés González-Techera, Lucía Vanrell,

*Gualberto González-Sapienza

Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UDELAR, Montevideo, Uruguay.

CONTENT

Figure S-1. Analysis of the biotin-binding activity of the refolded chimeras.

Figure S-2. Specific recognition of the clomazone-MAb5.6 IC by the refolded pICX11-STR chimera.

Figure S-3. Checkerboard titration of the crude refolded pICX11-STR Nanopeptamer

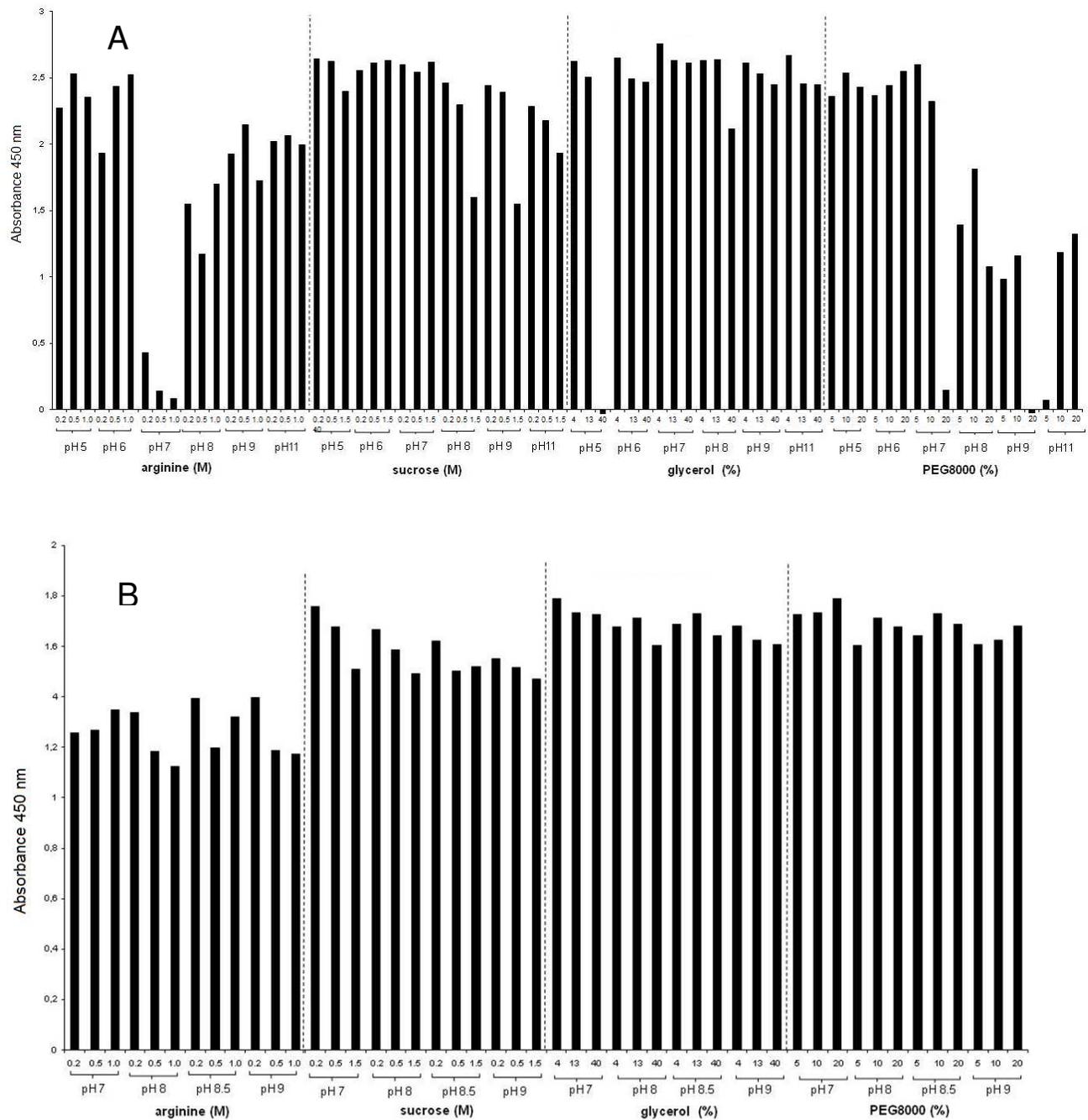


Figure S-1. Analysis of the biotin-binding activity of the refolded chimeras. The refolded proteins were dispensed into ELISA wells coated with biotinylated BSA (5 $\mu\text{g/mL}$) and detected with biotinylated-HRP using TMB as substrate. The concentration of the refolding agent is shown on top of the pH brackets. A) Nanopeptamer picX11-STR, B) Nanopeptamer STR- picX11

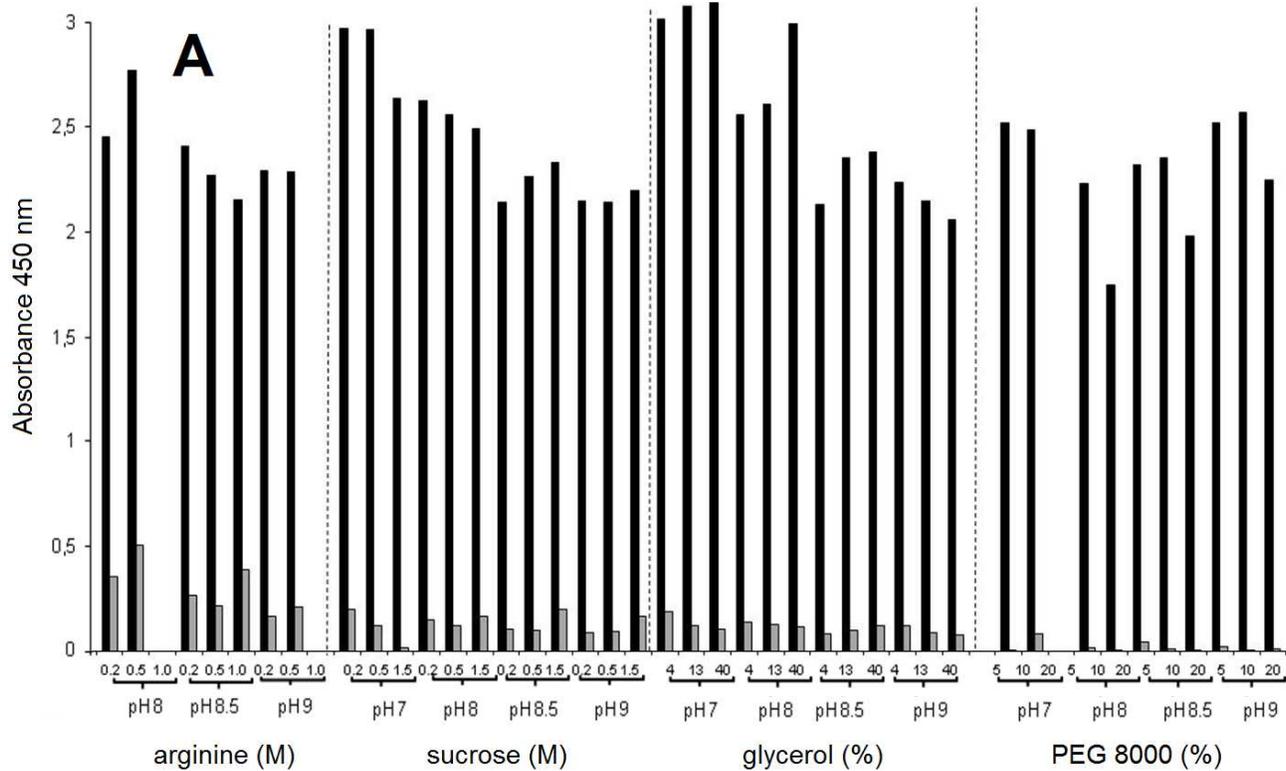


Figure S-2. Specific recognition of the clomazone-MAb5.6 IC by the refolded pICX11-STR chimera. Binding of the Nanopeptamers to the IC was revealed with the biotin-HRP conjugate.

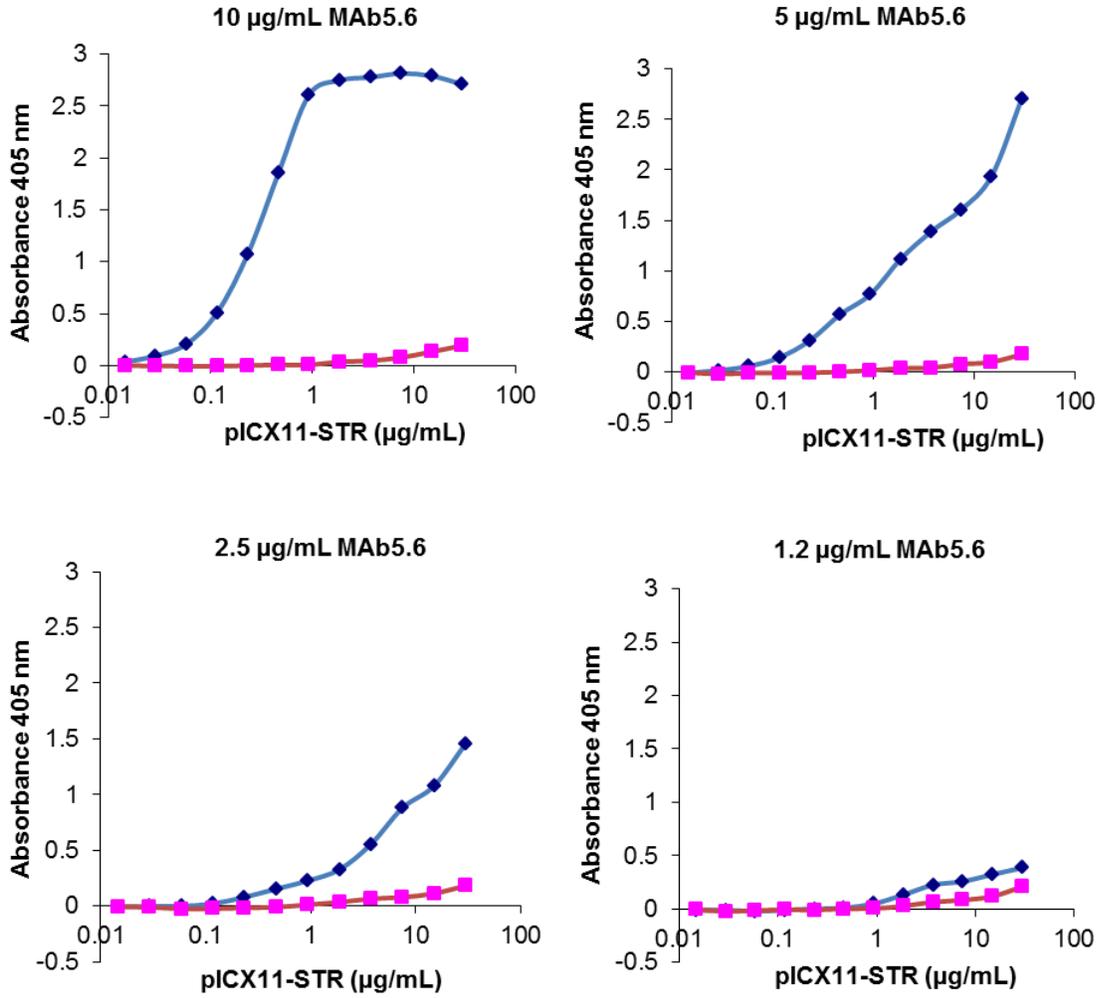


Figure S-3. Checkerboard titration of the crude refolded pICX11-STR Nanopeptamer. The chimera, that had been refolded in buffer 100 mM sodium phosphate, 1.5 M sucrose, pH 7.0, was tested in the 0.015-30 µg/mL range, on wells coated with the indicated amount of antibody, in the presence (blue) or absence (purple) of 100 ng/mL of clomazone.

ARTÍCULO II

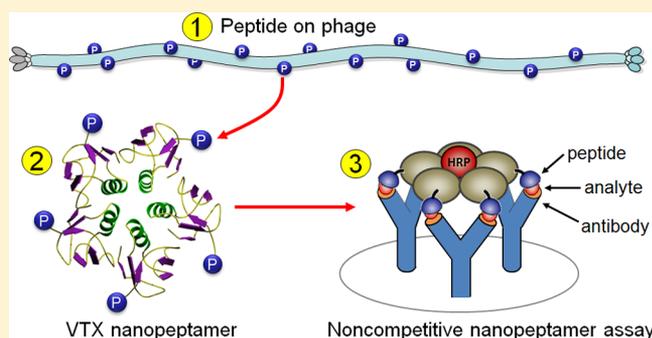
Shiga-Like Toxin B Subunit of *Escherichia coli* as Scaffold for High-Avidity Display of Anti-immunocomplex Peptides

Gabriel Lassabe, Martín Rossotti, Andrés González-Techera, and Gualberto González-Sapienza*

Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UDELAR, Montevideo, Uruguay

Supporting Information

ABSTRACT: Small compounds cannot bind simultaneously to two antibodies, and thus, their immunodetection is limited to competitive formats in which the analyte is indirectly quantitated by measuring the unoccupied antibody binding sites using a competing reporter. This limitation can be circumvented by using phage-borne peptides selected for their ability to specifically react with the analyte–antibody immunocomplex, which allows the detection of these small molecules in a noncompetitive format (PHAIA) with increased sensitivity and a positive readout. In an effort to find substitutes for the phage particles in PHAIA, we explore the use of the B subunit of the Shiga-like toxin of *Escherichia coli*, also known as verotoxin (VTX), as a scaffold for multivalent display of anti-immunocomplex peptides. Using the herbicides molinate and clomazone as model compounds, we built peptide–VTX recombinant chimeras that were produced in the periplasmic space of *E. coli* as soluble pentamers, as confirmed by multiangle light scattering analysis. These multivalent constructs, which we termed nanopeptamers, were conjugated to a tracer enzyme and used to detect the herbicide–antibody complex in an ELISA format. The VTX–nanopeptamer assays performed with over a 10-fold increased sensitivity and excellent recovery from spiked surface and mineral water samples. The carbon black-labeled peptide–VTX nanopeptamers showed great potential for the development of a lateral-flow test for small molecules with a visual positive readout that allowed the detection of up to 2.5 ng/mL of clomazone.



The immunodetection of low molecular mass substances holds great promise for rapid detection of a vast number of small analytes of clinical, toxicological, or environmental interest. Technically, the preferred format would be a two-site noncompetitive assay based on the use of capture and detection antibodies, which is the standard sandwich-type assay used for macromolecular analytes. This format allows the use of an excess amount of antibody driving the antigen–antibody reaction, even in the presence of trace amounts of analyte, thus providing high assay sensitivity.¹ In addition, the two-site recognition “double-checks” that the right target analyte is being detected, maximizing the assay specificity. Unfortunately, high affinity antibodies bind small compounds (immunologically referred to as haptens) in deep pockets that bury most of their surface.^{2,3} Upon formation of the hapten–antibody immunocomplex (IC), there is no room for the binding of a second antibody, and thus, these compounds are almost exclusively detected by using competitive immunoassays. To optimize the competition, limiting amounts of reagents need to be used, curbing the assay sensitivity. Previously, we have shown that by using small peptide loops, it was possible to focus the recognition of the IC to the changes produced at the binding pocket upon binding of the hapten.⁴ These peptides are selected from phage display libraries upon panning with the desired IC, and the phage-borne peptides can then be used to

develop noncompetitive phage anti-immunocomplex assays (PHAIA).

Applied to different small compounds, the PHAIA assay provided and increased sensitivity when compared with the competitive format performed with the same antihapten antibody,^{4–6} and improved specificity.⁷ Behaving as robust and versatile assay components,⁸ the phage particles are unconventional reagents for the immunoassay industry, and their biological nature can become a safety issue. Although synthetic monovalent peptides cannot substitute for the phage-borne peptide, we recently demonstrated that the complexes of commercial streptavidin or avidin with biotinylated anti-immunocomplex synthetic peptides do, showing assay parameters similar to those of the PHAIA.⁹

To explore additional scaffolds for multivalent display of these peptides, we thought of using the Shiga-like toxin, which has a pentameric structure. The Shiga-like toxin B-1 of *Escherichia coli*, also known as verotoxin (VTX) is a highly potent exotoxin that enters host cells and inhibits protein synthesis. It is the smallest of the AB₅ bacterial toxin family, which consists of an active A subunit associated with a

Received: March 12, 2014

Accepted: May 6, 2014

Published: May 6, 2014

pentamer of receptor-binding B subunits.¹⁰ The recombinant B subunit of VTX has been shown to oligomerize in a doughnut-like pentamer¹¹ that is fully capable of host cell binding in the absence of the A subunit.¹² There are two isoforms of the nontoxic subunit, B-1 and B-2 that share 57% identity. The 7.7 kDa B-1 subunit forms more stable oligomers¹³ and has been used to increase the avidity of monodomain antibodies selected from phage libraries.^{14,15} The use of the B subunit as a scaffold for multivalent display is facilitated by the fact that its N-terminus is exposed to the solvent and radiates out from the periphery of the pentamer core (Figure 1), and in addition, recombinant VTX and VTX chimeric proteins are produced in *E. coli* with high yield (tens of milligrams per liter of culture).¹⁴

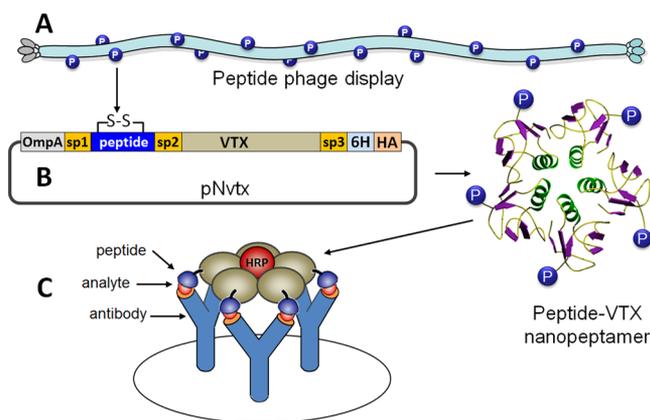


Figure 1. Nanopeptamer assay using verotoxin for multivalent display of anti-immunocomplex peptides isolated by phage display. (A) Once the anti-immunocomplex peptide is selected from phage libraries, (typically displayed on the major capsid protein pVIII), its coding sequence is cloned into the pNvtx vector (B) fused to the VTX gene. The OmpA signal peptide is used for periplasmic expression of the peptide–VTX nanopeptamer monomers, which spontaneously oligomerize, forming the pentavalent nanopeptamer. (C) The high avidity of the recombinant nanopeptamer conjugated to peroxidase (HRP) can then be used to detect the formation of the immunocomplex, in a two-site antibody–nanopeptamer immunoassay.

In this work, we built VTX-based nanopeptamers using anti-immunocomplex peptides selected against the herbicides molinate and clomazone bound to their cognate antibodies. These nanopeptamers were produced at high yields as soluble recombinant proteins and showed assay performances similar to the respective phage-borne peptides.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Mouse IgG monoclonal antibodies (mAb) 14D7 and 5.6 against molinate and clomazone, respectively, were prepared as described before.^{16,17} Molinate was a gift from Stauffer Chemical Co, and clomazone was purchased from Riedel-de Haën, Seelze, Germany. Protein G affinity, BPER (bacterial protein extraction reagent), AminoLink reductant sodium cyanoborohydride and horseradish peroxidase (HRP) were purchased from Pierce (Rockford, IL). NAP-5 columns prepacked with Sephadex G-25, molecular weight markers, and the Superose 12HR 10/30 column were from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Amicon Ultra centrifugal filters and other common filters were purchased from Millipore (Billerica, MS). The anti-HA-peroxidase antibody and Complete Protease Inhibitor Cocktail were from Roche Diagnostics (Indianapolis). High performance pigment carbon black JY-101P was a kind

gift from Hangzhou Juychem Co. (Zhejiang, China). The BCA (Bicinchoninic Acid Kit) for protein determination, bovine serum albumin (BSA), Tween 20, IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), poly(ethylene glycol) 8000 (PEG), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), and other common chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Assembling of the Anti-immunocomplex Nanopeptamer Genes in the pNvtx Vector. To build the pNvtx vector (Figure 1), the peptide pA-VTX cassette shown in (Figure S-1A of the Supporting Information) was synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA). This cassette codes for the peptide pA (CSLWDTTGWGC), which is specific for the molinate–mAb 14D7 immunocomplex,⁴ and the verotoxin-B subunit lacking the signal sequence (amino acid sequence 21–89, EMBL M16625: nt 1349–1555). Peptide pA is flanked by the N-terminal sequence GTASGSA– and is tethered to the N-terminus of the VTX subunit by the –LQGGGSGGGS– spacer. The pNvtx vector was built by digestion of the two noncomplementary SfiI sites of the cassette and its subsequent cloning into a modified pET28a+ vector (Novagen) between the OmpA signal peptide and the 6 \times His and HA (hemeagglutinin) tags (Figure 1). The *KpnI* and *PstI* restriction sites were engineered to allow for the substitution of the anti-immunocomplex peptide in the pNvtx vector. To this end, two complementary oligonucleotides encoding the new peptide sequence are used, which upon annealing produced the DNA insert with the corresponding overhangs for its cloning with these two enzymes. The pairs of oligonucleotides used in this study for cloning of three anti-immunocomplex peptides specific for the clomazone–mAb 5.6 complex are shown in Figure S-2 of the Supporting Information. All vectors were electroporated in competent BL21(DE3) *E. coli* cells (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Expression and Purification of the VTX Nanopeptamers. Small cultures of individual colonies of BL21(DE3) *E. coli* cells, transformed with the peptide-VTX constructions, were grown to check for DNA sequence and expression of the chimera. Selected colonies were used for large-scale production of the nanopeptamers by growing them in 500 mL of LB kanamycin (50 μ g/mL) at 37 $^{\circ}$ C, with shaking at 250 rpm, to an absorbance of 0.5 AU at 600 nm. The cultures were then induced with 1 mM IPTG, incubated for 3 h and centrifuged at 5000g for 15 min at 4 $^{\circ}$ C. The periplasmic extracts were prepared as described by Olichon et al.¹⁸ Briefly, the cell pellets were resuspended in 10 mL of 200 mM Tris, 20% sucrose, 0.5 mM EDTA and pH 8.0 TES buffer and were frozen at –80 $^{\circ}$ C and thawed to room temperature. After that, 5 mL of TES buffer was added, and the resulting solutions were incubated for 30 min on ice and further diluted with 3 mL of TES and 12 mL of H₂O. After 30 min on ice, the extracts were centrifuged at 30 000g for 20 min at 4 $^{\circ}$ C. The supernatants were supplemented with NaCl and imidazole up to 0.3 M and 20 mM, respectively, and directly used for purification. To this end, 30 mL of this periplasmic extract was applied to a Ni-NTA column (HisTrap HP 1 mL, GE Health Care, Pittsburgh, USA) equilibrated with a buffer of 50 mM Na₂HPO₄, 0.3 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 8. The column was then washed with 5 column volumes of the same buffer, and the protein was eluted (1 mL fractions) by increasing the concentration of imidazole to 500 mM. After dialysis against PBS, the recombinant nanopeptamers were supplemented with Complete Protease Inhibitor Cocktail and sodium azide 0.05%. The protein concentration was

determined using the BCA kit, and the preparation was filtered (0.22 μm) and stored in aliquots at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used.

Analysis of the Oligomeric Status of the Nano-peptamers by Size-Exclusion Chromatography (SEC) and Online Multiangle Light-Scattering (MALLS). The MWs of the nanopeptamers were determined by SEC-FPLC coupled with an UV detector (SPD-20A, Shimadzu), a refractive index detector (RID-10A; Shimadzu), and a three-angle SEC-MALLS/RI (size-exclusion multiangle laser light scattering/refractive index) detector (Wyatt Technologies, Goleta, CA) using a Superose 12 HR 10/30 column (GE Health Care, Pittsburgh) run with phosphate buffer saline, pH 7.5 (PBS), at a flow rate of 0.5 mL/min. The VTX nanopeptamer (2 mg/mL) was applied to the column, and the elution was monitored with UV, IR, and MALLS detectors. The MW standard proteins chymotrypsin (2 mg/mL, 24.8 kDa), ovalbumin (OVA 2 mg/mL, 44.3 kDa), and BSA (2 mg/mL, 66.5 kDa) were used to build an elution-time calibration curve using the IR and UV detectors. BSA was also employed as a calibration protein for the MALLS detector system. The absolute MW calculations with MALLS were performed using a refractive index increment, dn/dc , of 0.186 mL/g.¹⁹ All data were collected and processed with ASTRA software (v4.73.04, Wyatt Technology, Goleta, CA).

Nanopeptamer ELISA for Molinate and Clomazone.

Microtiter plates were coated with the appropriate amount of antibody in PBS (optimized by checkerboard titration) for 1 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, blocked with PBS-BSA 1% at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min, and washed three times with PBS 0.05% Tween 20 (PBST). Wells were dispensed with 50 μL of the herbicide standards in PBS or water samples plus 50 μL of the optimized dilution of the nanopeptamer-HRP conjugate (Supporting Information) in PBST. After 1 h of incubation and washing, 100 μL of the peroxidase substrate (0.4 mL of 6 mg/mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in DMSO, 0.1 mL of 1% H_2O_2 , in 25 mL of 0.1 M citrate acetate buffer, pH 5.5) was added to each well, and the reaction was stopped after 10 min by addition of 50 μL of 2 N H_2SO_4 . Absorbance was read at 450/650 nm in a microtiter plate reader (Multiskan MS, Thermo Labsystems, Waltham, MA). For the analysis of field samples, the reaction mix was supplemented with 20% of interference buffer (1 M Tris, 0.3 M NaCl, 0.3 M EDTA, 1% BSA, pH 7.4).

Carbon Black Nanopeptamer Labeling. A 5% solution of carbon black in Milli-Q water was homogenized in a sonication water bath and was then diluted 25-fold with 5 mM boric buffer, pH 8.8. A 120 μg portion of nanopeptamer in 5 mM boric buffer, pH 8.8 (about 100 μL), was combined with 900 μL of the 0.2% carbon black solution and incubated for 3 h at room temperature. The suspension was then centrifuged at 14 000 rpm for 15 min, and the pellet was resuspended in 1 mL of 100 mM boric buffer, pH 8.8 and 0.05% Tween 20 by sonication. After repeating this step three more times, the carbon-labeled nanopeptamer was resuspended in 1 mL of 100 mM boric buffer, pH 8.8; 0.05% Tween 20; and BSA 1% and kept at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used. The same procedure was used for labeling a single domain antibody (VHH) fused to the HA tag that was used as the positive control.

Lateral Flow Immunochromatography. mAb 5.6 and anti-HA tag antibody lines were printed on Hi-Flow Plus 120 nitrocellulose membrane cards at 0.30 $\mu\text{g}/\text{cm}$ using a BioDot AD 1500 liquid dispenser (BioDot, CA). A 50 μL portion of PBS 0.1% Tween 20 supplemented with 1 μL of the carbon black nanopeptamer and control VHH suspensions was

dispensed in microtiter wells and mixed with 50 μL of PBS 0.1% Tween 20 containing different concentrations of clomazone. Strips cut from the printed cards (4 mm) were dipped into the wells and allowed to develop for 20 min.

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning and Expression of Recombinant Verotoxin B Subunit As Fusion Protein.

Figure 1 shows a general scheme of the generation of the VTX nanopeptamers and their use as immunoassay reagents. To assess the functionality of VTX as a scaffold for high-avidity display of anti-immunocomplex peptides, we initially assembled the peptide pA-VTX construct into the pNvtx vector (Figure 1). Peptide pA has been previously isolated from a phage library panned against the immunocomplex (IC) of the herbicide molinate with mAb 14D7. It reacts specifically with the IC but not with the uncombined antibody, allowing the sensitive detection of the herbicide in the PHAIA format.⁴ Preliminary experiments of expression of the pA-VTX chimera in IPTG-induced *E. coli* BL21(DE3) showed that the fusion protein occurred as a single SDS-gel band of ~ 13 kDa, which is in agreement with the estimated MW of the pA-VTX monomer (12 840 Da). A large portion of the fusion protein was found in the insoluble fraction, but still a significant amount was soluble (Figure 2).

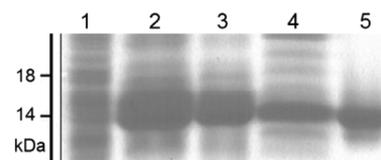


Figure 2. pA-VTX nanopeptamer expression analysis in coomassie-stained SDS-PAGE gels. Total extract of nontransformed (1) and induced (2) cells, insoluble fraction (3), soluble fraction (4), and Ni-NTA purified nanopeptamer (5).

For practical reasons and because of good yields (about 10 mg per liter of culture), we decided to work with this soluble fraction, from which the nanopeptamers were purified by immobilized metal affinity chromatography (Figure 2).

The pA-VTX Nanopeptamer Adopts a Pentameric Structure in Solution. The oligomerization of the recombinant nanopeptamers was studied by size-exclusion chromatography using online light scattering, UV, and refraction index (RI) detectors (SEC-MALLS-RI). pA-VTX eluted as a single symmetric peak at 12.4 mL (Figure 3a), which by comparison with the protein standards corresponds to an apparent MW of 64 kDa, being in good agreement with the calculated MW of 64 205 kDa for the pentameric structure of pA-VTX. This was confirmed, independently of hydrodynamic considerations, by the SEC-MALLS analysis. The molecular mass curve obtained with this method showed a homogeneous distribution of molecular masses along the elution of the pA-VTX peak, with an average value of 64 kDa (Figure 3b). This confirms that in solution, the conformational state of the nanopeptamer is that of a homogeneous pentameric structure, with light dispersion properties corresponding to a monodisperse protein.

The pA-VTX-Nanopeptamer Allowed the Sensitive Detection of Molinate. Once the pentameric nature of the nanopeptamer was established, we confirmed its reactivity against the molinate/mAb 14D7 immunocomplex by ELISA using the HA tag for detection (data not shown). Then, to simplify its use as immunoassay reagent, the purified nano-

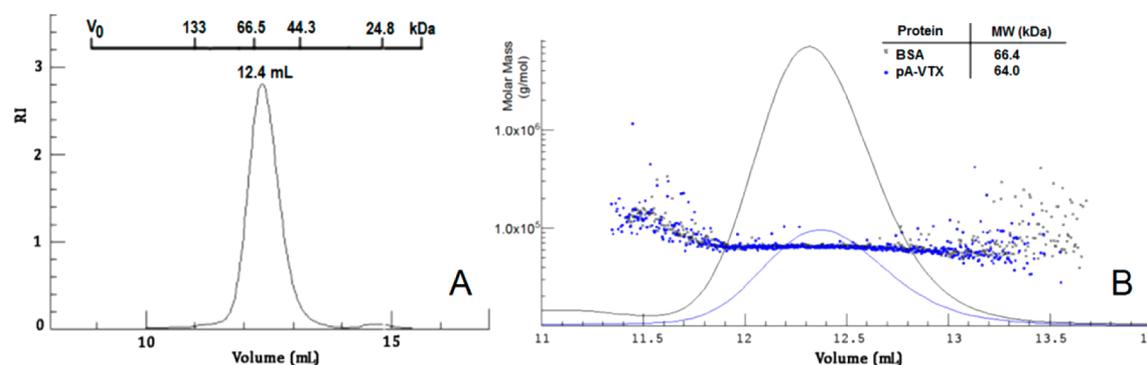


Figure 3. Solution behavior of the pA-VTX nanopeptamer. (A) Size-exclusion chromatogram of the nanopeptamer on a Superose 12 column (RI = refractive index). The elution volume of pA-VTX (12.4 mL) was compared with that of standard proteins corresponding to a size of 64 kDa. (B) SEC-MALLS analysis of pA-VTX. The curves represent the RI elution profile of pA-VTX (blue) and BSA (black) overlaid with the scatter plot of the light-scattering estimated mass along the elution volume.

peptamer was conjugated to HRP using a 1:4 pA-VTX-to-HRP molar ratio (Supporting Information). The assay concentration of coating antibody and pA-VTX peroxidase were optimized by checkerboard titration, as described before,⁹ and were used to develop the VTX-nanopeptamer ELISA for molinate. The dose–response curves had a typical sigmoid shape with signal saturation at a high concentration of analyte (Figure 4).

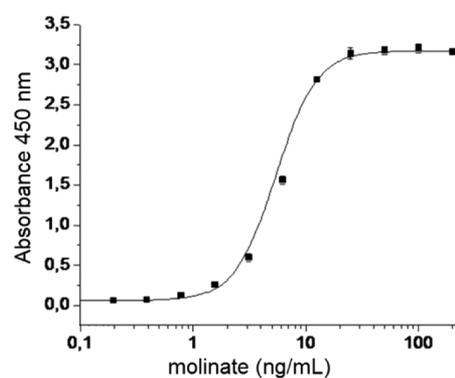


Figure 4. Noncompetitive ELISAs performed with the pA-VTX nanopeptamer. mAb14D7 (10 μ g/mL) was used for coating, and pA-VTX (5 μ g/mL) was added in the presence of increasing molinate concentrations. All measurements were performed in triplicate, and error bars represent the standard deviation.

However, as observed before with other PHAIA assays,^{5,20} the slope was rather steep, limiting the dynamic range of the assay. This may be related to the multivalent nature of the interaction, which would rapidly increase as soon as the density of immunocomplexes on the solid phase increases along with the concentration of the analyte. The midpoint of the titration curve, corresponding to the concentration of analyte giving 50% of signal saturation (SC_{50}) was $SC_{50} = 5.4 \pm 0.3$ ng/mL, and the limit of detection (LOD = analyte concentration giving a 10% increase over the zero signal) was 1.9 ng/mL for molinate.

These parameters were similar to those obtained with the phage-borne peptide, $SC_{50} = 8.5 \pm 0.2$ ng/mL,⁴ or with the streptavidin nanopeptamer prepared with commercial high-sensitivity streptavidin–HRP functionalized with the biotinylated synthetic peptide pA, $SC_{50} = 8.3 \pm 0.2$ ng/mL, and LOD = 1.2 ng/mL.⁹ This indicates that the spatial distribution of the peptides in the VTX nanopeptamer allows attainment of a

similar avidity interaction with the immobilized IC than that achieved with the streptavidin or the phage display. Moreover, using the midpoint of the assay titration curve for comparison, the SC_{50} of the pA-VTX molinate assay was ~ 13 -fold more sensitive than the IC_{50} (analyte concentration causing 50% inhibition) of the competitive ELISA set-up with the same antibody ($IC_{50} 69 \pm 0.5$ ng/mL).¹⁷

Transfer of Different Anti-IC Peptides from the Phage to the VTX-Nanopeptamers Does Not Affect Their Reactivity. To further test the versatility of VTX as a scaffold, we used the herbicide clomazone and its cognate antibody mAb 5.6 as an alternative model system. In a previous study,¹⁶ we selected 18 phage clones against the clomazone/mAb 5.6 IC from a random 8-mer disulfide constrained library, which could be grouped into four peptide sequences (Table 1). Out of these

Table 1. Peptide Sequences Isolated from the Random and the Mutagenesis Libraries^a

–CxxxxxxxxC– library			–CxxxPNxExC– library	
clone	peptide	frequency	clone	peptide
ICX05	CISAPNMEAC	5	ICX12m	CPMAPNVEAC
ICX09	CALAPNQEAC	4	ICX34m	CSFAPNVEAC
ICX07	CTQFPNPEAC	9	ICX05m	CATAPNVEAC
ICX11	CLEAPNIEGC	2	ICX09m	CLEAPNVEAC
			ICX31m	CAEAPNVEGC
			ICX16m	CALAPNVEAC
			ICX03m	CLEAPNAEAC
			ICX07m	CAQAPNAEAC
			ICX23m	CSWAPNAEAC
			ICX20m	CTEAPNIEAC
			ICX24m	CLFAPNIEAC
			ICX30m	CPWAPNLEAC
			ICX29m	CPAAPNLEAC
			ICX18m	CTFAPNFEAC

^aConsensus residues of the panel of peptides isolated from the random library are shown in bold.

sequences, the phage-borne peptide ICX11 produced the most sensitive PHAIA test. On the basis of the consensus sequence of those four peptides, we built a saturation mutagenesis library using the p8 V2 phagemid vector²¹ to evolve peptides with higher affinity for the clomazone IC. The library (2×10^8 independent clones) had the generic sequence CxxxPNxExC, where capital letters represent the invariant consensus residues

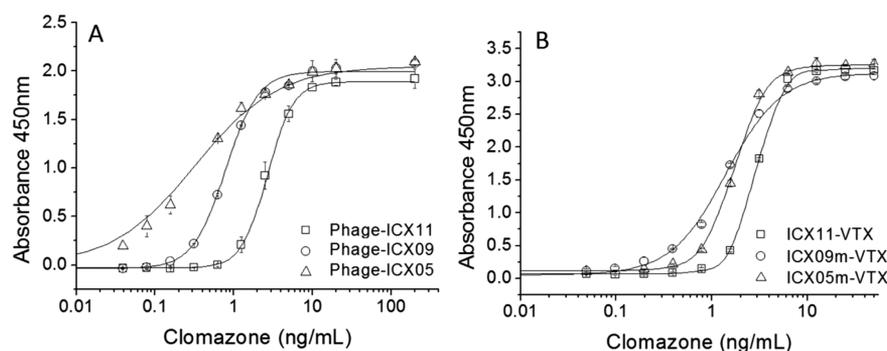


Figure 5. PHAIA and nanopeptamer assay for clomazone developed with the anti-immunocomplex peptides selected from the mutagenesis library. (A) Assay performed with the phage-borne peptides (PHAIA) or (B) with the peptide–VTX nanopeptamers conjugated to HRP. All measurements were performed in triplicate, and error bars represent the standard deviation.

and the “x” represents a fully randomized position. The selection of this library (Supporting Information) was performed against limiting amounts of the clomazone/mAb 5.6 IC, under stringent conditions (including a 5-day prolonged final washing step) to promote the isolation of a second generation of peptides with improved affinity for the IC, which could translate into better assay sensitivities. Fourteen clones were selected and are listed in Table 1.

A more complex consensus sequence emerged, with Ala in third and eighth positions, and a small hydrophobic residue (Val, Ala, Leu, Ile) in the sixth position. After a preliminary screening, two clones were selected that in the PHAIA format exhibited the highest SC_{50} differences (3–4-fold) with the phage-borne peptide ICX11 (Figure 5a, Table 2). Those two

Table 2. Assay Parameters of the PHAIA and Nanopeptamer Formats

peptide ID	SC_{50} phage	SC_{50} nanopeptamer
ICX11	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.03
ICX09m	0.82 ± 0.01	1.4 ± 0.07
ICX05m	0.43 ± 0.2	1.7 ± 0.06

peptides, ICX05m and ICX09m, differed only in positions 1 and 2 and were used together with peptide ICX11 to compare changes in the assay performance when the peptides were moved from the phage to the VTX display. The assay performance of the VTX nanopeptamers built with these peptides is shown in Figure 5b and summarized in Table 2. There were no major differences between the PHAIA and the nanopeptamer assays, and despite the small drop in sensitivity in the case of ICX05m and ICX09m, it can be concluded that the VTX nanopeptamer–HRP conjugate can substitute for the phage particles, representing a convenient option for the development of noncompetitive assays for small molecules.

Good Recoveries Were Obtained When Different Water Samples Were Analyzed with the VTX Nano-

peptamer Assay. Because of its sensitivity, the pICX09m-VTX HRP conjugate was used to assess the assay performance with real water samples spiked with clomazone. These samples comprised surface water samples collected from a region of Uruguay with no record of clomazone use, as well as mineral and tap water. The assay was performed with the addition of an “interference buffer” that contained a bulk protein (BSA), a chelating agent, and high salt concentration to avoid the matrix effect caused by humic acids and other interfering compounds in the samples. Under these conditions, undiluted samples could be directly analyzed with very good recoveries, even for the smallest concentrations tested, as is shown in Table 3.

The VTX Nanopeptamers Can Be Used to Set up Lateral-Flow Test with a Positive Readout. Lateral flow assays are a salient option as point of care tests because they are simple and fast and do not require specialized equipment. In addition, the formation of a colored test line over a white background is easily detected by the naked eye, making the test instrument-free. Unfortunately, competitive assays have to be developed into lateral-flow tests with a “negative” readout, in which the presence of the analyte causes an absence of signal, affecting its sensitivity and making its interpretation more difficult. We recently showed that nanopeptamers formed by the complex of avidin with biotinylated synthetic peptides could be used to develop a sensitive lateral-flow test with a positive readout.⁹ This had not been possible with the use of phage-borne peptides, probably because of the filamentous structure of the M13 phage particles that may form aggregates upon labeling with carbon black, as has been reported when using colloidal gold.²² To test whether the VTX scaffold could also allow the development of lateral flow tests, we labeled the pICX09m-VTX nanopeptamer with carbon black and evaluated the ability of the assay to detect low concentrations of the analyte. Figure 6 shows a typical result. The formation of a reaction line visible to the naked eye, as judged by four independent observers, was evident even for the lowest concentration assayed, 2.5 ng/mL. That was in agreement

Table 3. Recovery (%) from Spiked Samples Using the pICX09m-VTX Nanopeptamer Assay

clomazone (ng/mL)	Milli-Q water	tap water 1	tap water 2	mineral water 1	mineral water 2	dam water 1	dam water 2	dam water 3	dam water 4
0.5	120 ± 10	85 ± 11	100 ± 5.0	130 ± 1.0	95 ± 10	129 ± 15	87 ± 13	110 ± 25	157 ± 5.0
1.0	112 ± 5.0	73 ± 9.3	128 ± 4.0	110 ± 10	103 ± 5.0	121 ± 5.0	91 ± 1.5	110 ± 10	119 ± 5.0
2.0	102 ± 5.0	87 ± 9.2	89 ± 10	110 ± 7.0	78 ± 5.0	83 ± 3.5	90 ± 18	102 ± 10	101 ± 10
2.5	93 ± 8.0	95 ± 2.9	100 ± 5.0	109 ± 4.0	78 ± 5.0	113 ± 5.0	115 ± 10	112 ± 10	94 ± 4.0
5.0	85 ± 3.0	93 ± 4.1	98 ± 20	124 ± 3.0	120 ± 20	114 ± 15	112 ± 6.0	96 ± 8.0	104 ± 5.0

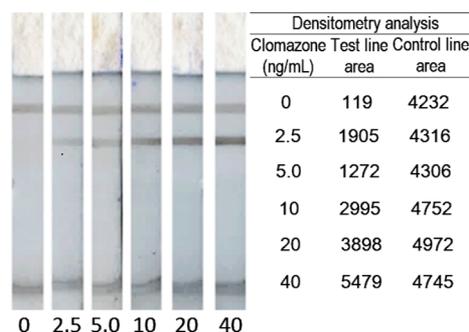


Figure 6. Noncompetitive nanopeptamer pICX09-VTX lateral-flow test for clomazone. The nitrocellulose strips were tested with buffer PBS containing various concentrations of clomazone (40, 20, 10, 5.0, 2.5, and 0 ng/mL) as denoted in the figure. The lower reaction line (test line) corresponds to the formation of the mAb5.6/clomazone/carbon-labeled pICX09-VTX trivalent complex, and the upper one (control line), to the interaction of the anti-HA antibody with carbon-labeled VHH-HA.

with the analysis by densitometry using the IMAGEJ software (NIH, USA).

CONCLUSIONS

The doughnut-like shape of the B1 subunit of the Shiga like toxin of *E. coli* offers a convenient option to multimerize binding domains with increased avidity. That was the case of the four anti-immunocomplex peptides used for noncompetitive detection of molinate and clomazone, in which it allowed the substitution of the phage particle ($900 \times 6-7$ nm, 1.6×10^7 Da) by oligomeric recombinant nanopeptamers of ~65 kDa, which constitute conventional and nonbiological immunoassay components. We recently showed that this was possible using biotinylated synthetic peptides and commercial avidins; however, the use of recombinant chimera that already includes the anti-immunocomplex peptide and self-assemble into a soluble multivalent complex of defined stoichiometry is a substantial step forward to make nanopeptamers simpler more affordable and easier to standardize. The fact that the VTX-nanopeptamers can be easily labeled with carbon black is also a major advantage because it allows the development of a lateral-flow test with a more intuitive positive readout, a feat that is not possible with the competitive format.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Address: Av. A. Navarro 3051, piso 2, 11600 Montevideo, Uruguay. Phone: (598) 24874334. E-mail: ggonzal@fq.edu.uy

Author Contributions

G.L. performed most of the experimental work. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported with funds provided by Grants FMV 3138 ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay) and TW05718 Fogarty Center NIH. G.L. is the recipient of an ANII scholarship.

REFERENCES

- (1) Kobayashi, N.; Oyama, H. *Analyst* **2011**, *136*, 642–651.
- (2) Lamminmaki, U.; Kankare, J. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36687–36694.
- (3) Monnet, C.; Bettsworth, F.; Stura, E. A.; Le Du, M. H.; Menez, R.; Derrien, L.; Zinn-Justin, S.; Gilquin, B.; Sibai, G.; Battail-Poirot, N.; Jolivet, M.; Menez, A.; Arnaud, M.; Ducancel, F.; Charbonnier, J. B. *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 699–712.
- (4) Gonzalez-Techera, A.; Vanrell, L.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7799–7806.
- (5) Gonzalez-Techera, A.; Kim, H. J.; Gee, S. J.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9191–9196.
- (6) Kim, H. J.; Rossotti, M. A.; Ahn, K. C.; Gonzalez-Sapienza, G. G.; Gee, S. J.; Musker, R.; Hammock, B. D. *Anal. Biochem.* **2010**, *401*, 38–46.
- (7) Carlomagno, M.; Mathó, C.; Cantou, G.; Sanborn, J.; Last, J.; Hammock, B.; Roel, A.; González, D.; González-Sapienza, G. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4367–4371.
- (8) Kim, H. J.; McCoy, M.; Gee, S. J.; Gonzalez-Sapienza, G. G.; Hammock, B. D. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 246–253.
- (9) Vanrell, L.; Gonzalez-Techera, A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1177–1182.
- (10) Falnes, P. O.; Sandvig, K. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 407–413.
- (11) Stein, P. E.; Boodhoo, A.; Armstrong, G. D.; Cockle, S. A.; Klein, M. H.; Read, R. J. *Structure* **1994**, *2*, 45–57.
- (12) Lingwood, C. A.; Law, H.; Richardson, S.; Petric, M.; Brunton, J. L.; De Grandis, S.; Karmali, M. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8834–8839.
- (13) Conrady, D. G.; Flagler, M. J.; Friedmann, D. R.; Vander Wielen, B. D.; Kovall, R. A.; Weiss, A. A.; Herr, A. B. *PLoS One* **2010**, *5*, e15153.
- (14) Stone, E.; Hiram, T.; Tanha, J.; Tong-Sevinc, H.; Li, S.; MacKenzie, C. R.; Zhang, J. *J. Immunol. Methods* **2007**, *318*, 88–94.
- (15) Zhang, J.; Tanha, J.; Hiram, T.; Khieu, N. H.; To, R.; Tong-Sevinc, H.; Stone, E.; Brisson, J. R.; MacKenzie, C. R. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 49–56.
- (16) Rossotti, M. A.; Carlomagno, M.; González-Techera, A.; Hammock, B. D.; Last, J.; González-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8838–8843.
- (17) Rufo, C.; Hammock, B. D.; Gee, S. J.; Last, J. A.; Gonzalez-Sapienza, G. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 182–187.
- (18) Olichon, A.; Schweizer, D.; Muyldermans, S.; de Marco, A. *BMC Biotechnol* **2007**, *7*, 7.
- (19) Wen, J.; Arakawa, T.; Philo, J. S. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 155–166.
- (20) Rossotti, M. A.; Carlomagno, M.; Gonzalez-Techera, A.; Hammock, B. D.; Last, J.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8838–8843.
- (21) Cwirla, S. E.; Dower, W. J.; Li, M. *Methods Mol. Biol.* **1999**, *128*, 131–141.
- (22) Souza, G. R.; Christianson, D. R.; Staquicini, F. I.; Ozawa, M. G.; Snyder, E. Y.; Sidman, R. L.; Miller, J. H.; Arap, W.; Pasqualini, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 1215–1220.

Supporting Information

The Shiga-like toxin B subunit of *E. coli* as a scaffold for high-avidity display of anti-immunocomplex peptides

Gabriel Lassabe, Martín Rossotti, #Gualberto González-Sapienza G.

Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UDELAR, Montevideo, Uruguay.

#Corresponding author. Av. A. Navarro 3051, piso 2. 11600 Montevideo, Uruguay, ggonzal@fq.edu.uy, tel (5982) 4874334

S-1. METHODS

Conjugation of HRP to the nanopeptamers. One mg of HRP was diluted in 400 μ L of 1mM sodium acetate buffer, pH 5.5 and was activated by periodate-oxidation by incubation with 100 μ L of 100 mM sodium periodate in the dark for 30 min at room temperature. The unreacted periodate was removed using a NAP 5 desalting column, and the activated HRP was combined with 360 μ g of the nanopeptamers in 100 mM carbonate buffer, pH 9.5 in a total volume of 2 mL. After 2 h at room temperature, the conjugate was stabilized by reaction with 20 μ L of AminoLink Reductant Sodium Cyanoborohydride for 1h. Finally the unreacted aldehyde groups of HRP were blocked by incubation for 30 min with ethanolamine (50 mM, final concentration). The preparation was dialyzed against PBS, concentrated 20x using Amicom centrifugal filters, supplemented with Complete Protease Inhibitor Cocktail, threalose 0.33 M, BSA 1%, and stored in aliquots at -80 °C until used.

Phage display mutagenesis library and biopanning. The mutagenesis library was constructed as described before ¹ using the p8V2 phagemid vector expressing the generic sequence CxxxPNxExC fused to the N-terminus of the coat protein pVIII through the spacer (GGGS)₃. The letter “x” denotes a fully random position encoded by a NNK codon (where N is any of the A, C, G or T bases and K accounts for G or T). For the selection procedure, high binding microtiter plates (Greiner, Solingen, Germany) were coated with MAb5.6 at 20 μ g/mL in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4 °C. After coating, the wells were blocked with 1% BSA at 37 °C for 30 min, then washed three times with PBS, 0.05% Tween 20 (PBST). The peptide library (1×10^{11} transducing units) was mixed with clomazone (2 μ g/mL final concentration) and BSA (1% final concentration) in a final volume of 600 μ L of PBS and then added to six of the antibody coated wells. After incubation for 2 h at 4°C, the wells were washed ten times with PBST, incubated for half an hour in PBST at room temperature, and washed again ten times. Bound phages were eluted by incubation with 100 μ L of 0.1 N glycine-HCl, pH 2.2, for 10 min. The phage eluate (600 μ L) was immediately neutralized with 30 μ l of 2 M trizma base, added to 10 mL of log-phase *E. coli* ARI 292 cells (Affymax Research Institute, Palo Alto, CA) and amplified in Luria-Bertoni (LB) media containing 0.25% K₂HPO₄, 0.1% MgSO₄, 0.1% glucose and 100 μ g/mL of ampicillin to an OD₆₀₀ = 0.4 AU. M13KO7 helper phage at a multiplicity of infection 10:1 was added. After a period of 20 min at 37 °C without shaking, arabinose and kanamycin were added to a final concentration of 0.02 % and 40 μ g/mL, respectively, and the cultures were incubated overnight at 37 °C with vigorous shaking. Phage from liquid cultures were obtained by clearing the supernatants by centrifugation at 12,000 \times g for 15 min, precipitated by adding 0.2 volumes of 20% polyethylene glycol 8,000, 2.5 M NaCl, on ice for 1 hour, and centrifuged at 10,000 \times g. Phage pellets were resuspended in

1 mL of sterile PBS and titrated in ARI 292. This amplified output was used for additional rounds of panning following the same procedure, except that during the last round of panning the final wash was performed over five days with periodic changes of the washing buffer (5 ng/mL of clomazone in PBST) before the elution of the phage.

Screening of phage eluate for positive clones by phage ELISA. Phage supernatants were prepared as described before². Individual clones were tested by Phage-ELISA by direct addition of 50 μ L of phage supernatants into wells coated with 10 μ g/mL of MAb5.6, with or without addition of 50 μ L of 200 ng/mL of clomazone in PBST per well. Bound phage was detected by addition of 100 μ L of anti-M13-HRP (GE Health Care), and clones were selected on the basis of the differential reactivity with the IC and the uncombined antibody.

S-2. FIGURES

A)

```

|---SfiI (1)----||KpnI-||Spacer  ||| peptide pA ||PstI||Spacer
G GCC CAG GCG GCC GGT ACC GCA TCC GGC AGC GCC TGC TCC CTG TGG GAC ACC ACA GGC TGG TGT CTG CAG GGT GGC GGC TCT GGA
||||| ||||||Verotoxin 1 B-Subunit |||
GGT GGC AGT ACG CCT GAT TGT GTA ACT GGA AAG GTG GAG TAT ACA AAA TAT AAT GAT GAC GAT ACC TTT ACA GTT AAA GTG GGT GAT
|||||
AAA GAA TTA TTT ACC AAC AGA TGG AAT CTT CAG TCT CTT CTT CTC AGT GCG CAA ATT ACG GGG ATG ACT GTA ACC ATT AAA ACT AAT
|||||
|||||SfiI (2)|||
GCC TGT CAT AAT GGA GGG GGA TTC AGC GAA GTT ATT TTT CGT GGC CAG GCC GGC C

```

B)

```

GTASGSACSLWDTTGWCLQGGGSGGGSTPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQ
SLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFRGQAGQHHHHHHGAYPYDVPDYASGS

```

Figure S-1. Nucleotide sequence of the pA-VTX cassette and amino acid sequence of the mature pA-nanopeptamer subunit. A) DNA sequence of the synthetic cassette used for assembling of the pA-VTX nanopentamer. The engineerer restriction sites and the coding sequences of the peptide pA and VTX are shown on top. B) Amino acid sequence of the pA-VTX nanopentamer subunit cloned into the pNvtx vector. The anti-molinate/MAB 14D7 IC peptide pA is shown in bold letters and the VTX subunit is underlined, tags are in italics.

```

|KpnI||Spacer  ||| peptide ||PstI|
ICx11 peptide
5'-- --C GCA TCC GGC AGC GCC TGT CTG GAG GCG CCG AAC ATT GAA GGC TGC CTG CA 3'
3'CA TGG CGT AGG CCG TCG CGG ACA GAC CTC CGC GGC TTG TAA CTT CCG ACG G-- -- 5'

ICx9 peptide
5'-- --C GCA TCC GGC AGC GCC TGT CTG GAG GCT CCG AAT GTG GAG GCG TGT CTG CA 3'
3'CA TGG CGT AGG CCG TCG CGG ACA GAC CTC CGA GGC TTA CAC CTC CGC ACA G-- -- 5'

ICx5 peptide
5'-- --C GCA TCC GGC AGC GCC TGT GCG ACT GCG CCA AAT GTT GAG GCT TGT CTG CA 3'
3'CA TGG CGT AGG CCG TCG CGG ACA CGC TGA CGC GGT TTA CAA CTC CGA ACA G-- -- 5'

```

Figure S-2. Oligonucleotides used for the assembling of the ICx11-VTX, ICx9-VTX and ICx5-VTX Nanopeptamers. The restriction sites and the coding sequences is denoted on the top of the figure.

References

1. Cwirla, S. E.; Dower, W. J.; Li, M., *Methods Mol Biol* **1999**, *128*, 131-41.
2. Cardozo, S.; Gonzalez-Techera, A.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Kramer, K.; Gonzalez-Sapienza, G. G., *Environ Sci Technol* **2005**, *39* (11), 4234-41.

ARTÍCULO III

Noncompetitive Homogeneous Detection of Small Molecules Using Synthetic Nanopeptamer-Based Luminescent Oxygen Channeling

Gabriel Lassabe,[†] Karl Kramer,[‡] Bruce D. Hammock,[§] Gualberto González-Sapienza,^{*,†} and Andrés González-Techera^{*,†}

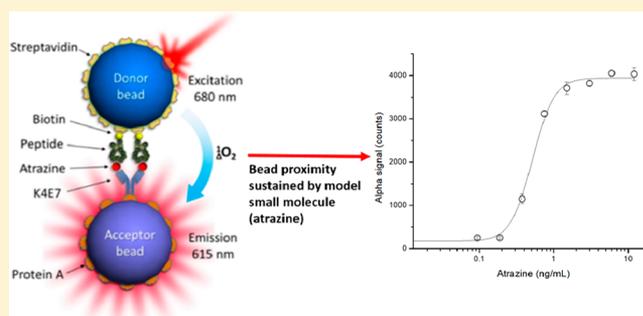
[†]Cátedra de Inmunología, DEPPIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UDELAR, Montevideo, 11600, Uruguay

[§]Department of Entomology and Nematology and UC Davis Comprehensive Cancer Center, University of California, Davis, California 95616, United States

[‡]Chair of Proteomics and Bioanalytics, Technical University of Munich, Freising, 85354, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Our group has previously developed immunoassays for noncompetitive detection of small molecules based on the use of phage borne anti-immunocomplex peptides. Recently, we substituted the phage particles by biotinylated synthetic anti-immunocomplex peptides complexed with streptavidin and named these constructs nanopeptamers. In this work, we report the results of combining AlphaLisa, a commercial luminescent oxygen channeling bead system, with nanopeptamers for the development of a noncompetitive homogeneous assay for the detection of small molecules. The signal generation of AlphaLisa assays relies on acceptor–donor bead proximity induced by the presence of the analyte (a macromolecule) simultaneously bound by antibodies immobilized on the surface of these beads. In the developed assay, termed as nanoAlphaLisa, bead proximity is sustained by the presence of a small model molecule (atrazine, MW = 215) using an antiatrazine antibody captured on the acceptor bead and an atrazine nanopeptamer on the donor bead. Atrazine is one of the most used pesticides worldwide, and its monitoring in water has relevant human health implications. NanoAlphaLisa allowed the homogeneous detection of atrazine down to 0.3 ng/mL in undiluted water samples in 1 h, which is 10-fold below the accepted limit in drinking water. NanoAlphaLisa has the intrinsic advantages for automation and high-throughput, simple, and fast homogeneous detection of target analytes that AlphaLisa assay provides.



Immunoassays are simple, robust, and inexpensive analytical techniques based on the use of antibodies for detecting molecules of interest. One of the most known immunoassay formats is the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), which is considered a heterogeneous method because it requires several washing steps in between addition of reagents. On the other hand, mix and measure assays, which do not require washing steps because the reagents and sample are mixed and the readout is measured after a short incubation period, are classified as “homogeneous”. Homogeneous assays are simpler to perform, take less time, and are easier to adapt to high throughput and automation than their heterogeneous counterparts.

In 2008, PerkinElmer Inc. first commercialized a luminescent oxygen channeling chemistry assay^{1,2} termed Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (AlphaLISA). In this assay, acceptor and donor beads bound to antibodies that recognize different epitopes of the antigen (typically a macromolecule) are brought together when the antigen is present, in a “sandwich” like format. Laser irradiation of donor beads at 680 nm generates a flow of singlet oxygen, triggering a cascade of chemical events in nearby acceptor beads, which

results in a chemiluminescent emission at 615 nm. This assay has been widely used for the detection of macromolecules^{3–11} and particles (spores),¹² but there are few references about its use for the detection of small molecules.¹³

We have previously developed immunoassays for small molecule detection (haptens) using analyte peptidomimetics in a competitive format^{14–16} and analyte–antibody anti-immunocomplex peptides^{17,18} displayed on M13 viral particles in a noncompetitive format. These peptides were isolated by phage display technology and have been used in conventional ELISA,^{15,18} real-time immuno-PCR assays,¹⁶ and electrochemical biosensors.^{14,19} Recently, we developed assays devoid of viral particles in which biotinylated anti-immunocomplex synthetic peptides complexed with a commercial streptavidin–peroxidase conjugate (referred to as nanopeptamers) were used as immunoassay reagents.²⁰ Also, nanopeptamers of recombinant nature where the anti-immunocomplex peptide is

Received: February 7, 2018

Accepted: April 25, 2018

Published: April 25, 2018

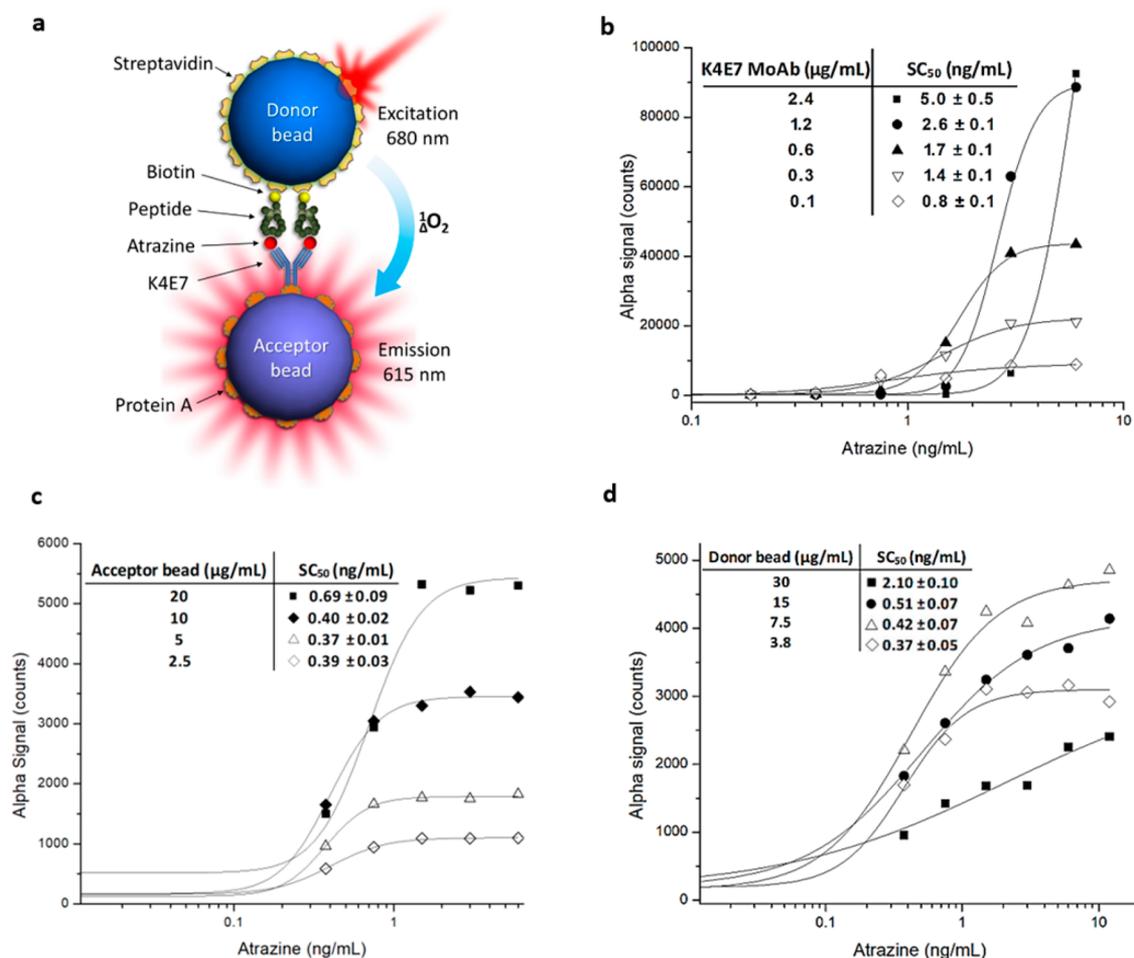


Figure 1. Optimization of conditions for developing sensitive nanoAlphaLisa assays for atrazine detection. (a) Scheme of noncompetitive nanoAlphaLisa assay. (b) Curves obtained using fixed amounts of streptavidin donor (7.5 μg/mL), protein A conjugated acceptor beads (10 μg/mL), and different amounts of K4E7MoAb: 2.4 μg/mL (black squares), 1.2 μg/mL (black circles), 0.6 μg/mL (black triangles), 0.3 μg/mL (white triangles), and 0.1 μg/mL (white diamonds). The obtained SC₅₀ values are shown in the inset. (c) Curves obtained using fixed amounts of K4E7MoAb (0.3 μg/mL) and donor bead (7.5 μg/mL) and different amounts of protein A conjugated acceptor beads: 20 μg/mL (black squares), 10 μg/mL (black diamonds), 5 μg/mL (white triangles), and 2.5 μg/mL (white diamonds). The obtained SC₅₀ values are shown in the inset. (d) Curves obtained using fixed amounts of K4E7MoAb (0.3 μg/mL) and protein A conjugated acceptor bead (10 μg/mL) and different amounts of streptavidin donor beads: 30 μg/mL (black squares), 15 μg/mL (black circles), 7.5 μg/mL (white triangles), and 3.8 μg/mL (white diamonds). The obtained SC₅₀'s are shown in the inset.

produced as a fusion with a multimeric protein have been used in conventional ELISA and lateral flow immunochromatography.^{20–22} Nanopeptamers are more suitable reagents for the immunoassay industry than viral-based reagents, since *E. coli* infecting phages could be a matter of concern in some laboratories.

In this work, we report the results of combining AlphaLisa technology with an anti-immunocomplex nanopeptamer with the aim of developing a novel noncompetitive homogeneous immunoassay for the detection of small molecules. As a model target analyte, we chose to use atrazine, since it is one of the most heavily used pesticides worldwide and its detection in water has relevant human health implications: it is reported to be an endocrine disruptive chemical and a potential carcinogen.^{23,24} The atrazine nanopeptamer-based AlphaLisa, which we called nanoAlphaLisa, was successfully developed and exhibited excellent recoveries in river water samples, robustness, and sensitivities below the accepted limits in drinking water.^{23,24} Atrazine determination using this strategy was performed in 1 h. Given the toxicological, environmental, and

medical analytical relevance of small molecules, this novel immunoassay prone to automation, high-throughput screening, and short incubation time can be adapted for the detection of these analytes.

■ MATERIALS AND METHODS

Materials. Atrazine and related triazines were a gift from Shirley Gee. The biotinylated synthetic peptides were supplied by a commercial manufacturer, Pepton, Inc. (Daejeon, South Korea). These peptides were synthesized to 80% purity by high-pressure liquid chromatography (HPLC), with intramolecular disulfide bonds between cysteines, an N-terminal biotin, and amidated C-terminus. AlphaLisa acceptor beads and streptavidin-coated donor beads were obtained from PerkinElmer (San Jose, CA, USA). High-sensitivity streptavidin peroxidase (SPO) and sodium cyanoborohydride were purchased from Thermo Scientific, Pierce (Rockford, IL). Bovine serum albumin (BSA), gelatin, protein A, Tween 20, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), and Corning White 96-well microplates (half area) were purchased from Sigma (St.

Louis, MO). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and dilution microtiter polystyrene plates were purchased from Greiner (Solingen, Germany).

Atrazine NanoAlphaLisa protocol. The noncompetitive nanoAlphaLisa assay was performed using protein A-coated acceptor beads, streptavidin-coated donor beads, the purified monoclonal atrazine antibody (MoAb) K4E7, and a biotinylated synthetic anti-immunocomplex peptide "13A" specific for the atrazine-K4E7 immunocomplex (Biotin-ASGSACTPVRWFDMC-NH₂).¹⁸ Protein A was conjugated to acceptor beads as described in the [Supporting Information](#). Atrazine standards and samples spiked with atrazine were prepared by adding 100 μL of 10 \times AlphaLisa Buffer (250 mM HEPES, pH 7.4, 1% casein, 10 mg/mL Dextran-500, 5% Triton X-100) to 900 μL of Milli-Q water or a water sample.

On the basis of the manufacturer's instructions and as a starting point, assay performance was explored by keeping constant the amount of donor (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and protein A conjugated acceptor beads (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and testing different amounts of K4E7MoAb captured on acceptor beads in the final assay. Protein A coated acceptor beads at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared for assays by preincubation with K4E7MoAb at 24, 12, 0.6, 0.3, and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 30 min at 25 $^{\circ}\text{C}$ (mix 1) in 1 \times AlphaLisa buffer. At the same time, the streptavidin donor beads were preincubated with an excess of biotinylated peptide in 1 \times AlphaLisa buffer. For each 10 μg of streptavidin (MW = 58 kDa) donor bead, 15 μg of biotinylated peptide (MW \sim 1.8 kDa) (3 μL) was added to a final volume of 30 μL (mix 2). The preincubation was performed on ice and protected from light exposure. Assuming that 10 μg of streptavidin coated bead was all streptavidin (0.172 nmoles), there was at least a 50-fold molar excess of biotinylated peptide. However, since only the surface of the bead is occupied by streptavidin, the molar excess of peptide to streptavidin was much higher than 50-fold. The reaction was scaled up or down depending on the required amount for each assay.

Five microliters of protein A acceptor beads preincubated with different amounts of K4E7MoAb (mixes 1) and 5 μL of streptavidin coated donor beads preincubated with synthetic biotinylated "13A" anti-immunocomplex peptide (mix 2) were dispensed in a white microtiter plate (Greiner) containing 5 μL of 10 \times AlphaLisa buffer and 35 μL of Milli-Q or water samples spiked with atrazine. After 15–60 min of incubation at 25 $^{\circ}\text{C}$, the reaction was read on the AlphaLisa signal reader (Fusion α -FP Packard, PerkinElmer).

NanoAlphaLisa Assay Cross-Reactivity with Other Triazines. The selectivity of the nanoAlphaLisa was explored by determining the cross-reactivity with related triazines. Cross-reactant concentrations in the 0–10 000 ng/mL range were used in the noncompetitive nanoAlphaLisa. The molar compound concentration corresponding to the inflection point of the curve, which corresponds to the concentration of analyte producing 50% saturation of the signal (SC_{50}), was used to calculate the cross-reactivity of the assay according to the equation:

$$\% \text{crossreactivity} = 100 \times [SC(\text{analyte})/SC(\text{cross reacting compound})]$$

NanoAlphaLisa Assay with Undiluted River Water Samples, Intra- and Interassay Reproducibility. For the analysis of matrix effect, different river and mineral water samples from California, USA, with no registered use of atrazine, were spiked with known amounts of analyte and assayed by nanoAlphaLisa in the 0.3–1 ng/mL range, using 35

μL of undiluted water samples plus 5 μL of 10 \times AlphaLisa Buffer. Five microliters of each bead preincubated with K4E7MoAb and biotinylated peptide, respectively, were then added to the samples and incubated for 1 h. The intra-assay and interassay parameters were tested by performing three consecutive measurements of the same sample and repeated for three consecutive days, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of NanoAlphaLisa Assay and Optimization. The nanoAlphaLisa assay is represented in [Figure 1a](#); in the presence of analyte, donor and acceptor beads are brought together. Anti-immunocomplex synthetic biotinylated peptides bound to streptavidin-coated donor bead recognize the atrazine-K4E7MoAb immunocomplex (which has been previously captured by protein A-coated acceptor bead). Upon laser excitation (680 nm), the donor bead converts ambient oxygen to an excited singlet state. Singlet oxygen diffuses up to 200 nm to produce a chemiluminescent reaction in the acceptor bead, leading to light emission (at 615 nm). Acceptor beads were conjugated to protein A with the objective of assaying different amounts of atrazine MoAb antibody K4E7 captured on the surface of the beads. Nanopeptamer was formed on the surface of the donor beads by incubating biotinylated synthetic anti-immunocomplex peptide for atrazine (13A) with streptavidin coated donor beads using an excess of the biotinylated peptide (see [Materials and Methods](#)). In the first experimental step for the set up of the nanoAlphaLisa assay, we chose to use different concentrations of K4E7MoAb captured on the surface of the acceptor beads, from 2.4 to 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Standard noncompetitive atrazine curves were performed in these conditions. Taking into account the SC_{50} (50% of saturation signal) as an indicator of the assay sensitivity, as antibody concentrations were lowered, luminescence signals decreased, but assay sensitivities increased regarding their SC_{50} ([Figure 1b](#)). The most sensitive assays were achieved when 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($SC_{50} = 1.4 \pm 0.1$ ng/mL) and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($SC_{50} = 0.84 \pm 0.4$ ng/mL) of K4E7MoAb were captured on the surface of the acceptor bead. In light of these results, we chose to continue our work with 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of K4E7MoAb captured on the surface of the acceptor bead, since this condition resulted in higher signals and more reproducible assays (data not shown).

Next, we studied the effect of the amount of acceptor beads on the assay performance by keeping constant the amount of captured K4E7MoAb on the surface of both the acceptor beads (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and streptavidin donor beads (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Protein A-coated acceptor beads were assayed at 20, 10, 5, and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration). As shown in [Figure 1c](#), signal intensities increased in a directly proportional relation to the concentration of acceptor beads, but no significant changes in assay sensitivities were found. We decided to continue our assays with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the acceptor beads as it presented a better signal-to-noise ratio than the 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ assay. The last parameter that was explored was the influence of streptavidin coated donor bead concentration in assay performance by keeping constant the protein A acceptor bead and K4E7MoAb concentrations at 10 and 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Streptavidin beads were assayed at 30, 15, 7.5, and 3.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results of this last evaluation are shown in [Figure 1d](#); in most cases, assay performances were satisfactory and similar among assays except when 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of donor beads were used which yielded a poor assay. Subsequent assays revealed that the concentration

of 7.5 $\mu\text{g/mL}$ of streptavidin facilitated development of the most robust and reproducible assays.

It is worth noting that, in all the cases in which different conditions were explored for nanoAlphaLisa assay optimization, bead proximity only occurred in the presence of atrazine. This differs with previous results obtained in standard ELISA in which background noise due to residual interaction between the anti-immunocomplex peptide and the unliganded antibody was observed during assay setup, as shown in Figure S1.¹⁸ Taking into account the data obtained from the optimization experiments, we chose to perform an atrazine standard curve following the same procedure as described above. In a final volume of 50 μL , atrazine standards at 2-fold dilution concentration from 12 to 0.09 ng/mL were detected using the defined bead concentrations (donor bead at 7.5 $\mu\text{g/mL}$ and acceptor bead at 10 $\mu\text{g/mL}$) and 0.3 $\mu\text{g/mL}$ of K4E7MoAb. The final optimized assay for atrazine is shown in Figure 2 and

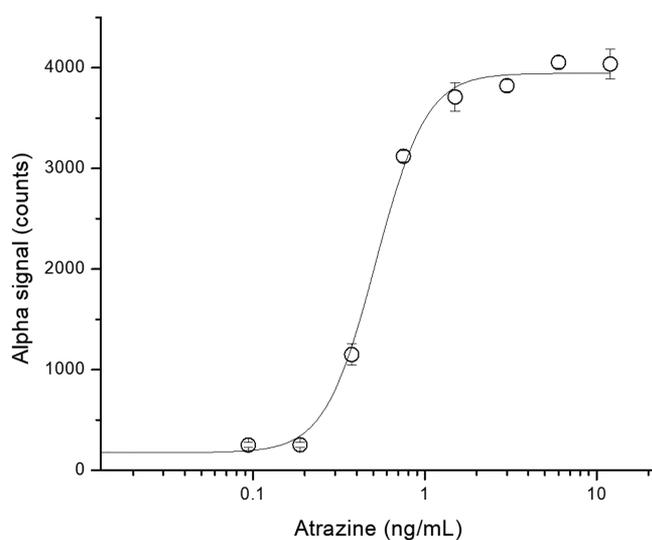


Figure 2. NanoAlphaLisa assay for atrazine. The assay was performed in 50 μL of AlphaLisa buffer containing K4E7MoAb at 0.3 $\mu\text{g/mL}$, protein A acceptor beads at 10 $\mu\text{g/mL}$, and atrazine at 2-fold dilution concentrations. Donor beads preincubated with an excess of biotinylated synthetic peptide 13A were added, and the mixture was incubated for 1 h at 25 $^{\circ}\text{C}$. After that, beads were irradiated at 680 nm and signal was registered at 615 nm. The atrazine standard curve shows a $\text{SC}_{50} = 0.5 \pm 0.02$ ng/mL and a $\text{LOD} = 0.3$ ng/mL.

performed with an SC_{50} of 0.5 ± 0.02 ng/mL and limit of detection (LOD), defined as the amount of atrazine that results in a signal of 10% of the saturation signal, of 0.3 ng/mL. This sensitivity is similar to that obtained with the original hapten-based competitive ELISA performed with K4E7MoAb, which exhibited an $\text{IC}_{50} = 0.64 \pm 0.06$ ng/mL and a $\text{LOD} = 0.18$ ng/mL.²⁵ While the original ELISA took 4 h with washing steps, nanoAlphaLisa was completed within 1 h in a mix and measure mode with no washing steps.

It is well-known that AlphaLisa assays display a loss of signal when an excess of analyte is present in the sample and surpass a saturation concentration (hook point), a phenomenon known as “hook effect” and described at the manufacturer’s Web site.²⁶ Beyond the hook point, the excess of analyte disrupts associations between donor and acceptor beads causing a decrease in signal. However, in the nanoAlphaLisa assay, no hook effect was observed from 1 to 200 ng/mL of atrazine, as shown in Figure S2. This showed that free atrazine is not bound

by nanopeptamers and only atrazine complexed with K4E7MoAb on the surface of the acceptor bead is recognized by nanopeptamers. The absence of the hook effect has practical implications, since samples containing high amounts of analyte will not result in a false negative, which would be the case in a standard AlphaLisa.

In order to reduce the assay time, we explored lowering the incubation time with the objective of assessing the shortest incubation time of beads and atrazine that could still yield accurate assays. For this, we first performed standard atrazine curves in buffer prepared with Milli-Q water. As shown in Figure S3, appropriate calibration curves were obtained when irradiating beads at 15, 30, and 45 min of incubation. However, when analyzing real water samples, the recoveries were affected with short incubation times and it was necessary to extend the incubation to 1 h.

Atrazine Determination in River Water Samples Using the NanoAlphaLisa Assay. The performance of the assay with real samples was tested using undiluted samples obtained from river and mineral water. Atrazine was spiked at 1, 0.75, 0.5, and 0.3 ng/mL, and each sample was analyzed in triplicates. The recoveries are shown in Table 1. Very good recoveries

Table 1. Recovery (% , $n = 3$) of Atrazine in Undiluted Spiked Water Samples Measured with NanoAlphaLisa Assay

spiked atrazine (ng/mL)	River 1	River 2	River 3	mineral water
1	79 ± 2			
0.75	95 ± 2			
0.5	102 ± 4	124 ± 7	117 ± 4	113 ± 6
0.3	105 ± 6			

ranging from $79 \pm 2\%$ to $124 \pm 7\%$ were obtained for all the samples, showing that the nanoAlphaLisa can be used for detection of atrazine in undiluted water samples.

The intra-assay and interassay parameters were tested by performing three consecutive measurements of the same sample and repeated for three consecutive days, respectively. As shown in Table 2, nanoAlphaLisa for atrazine showed a very

Table 2. Accuracy and Reproducibility of the NanoAlphaLisa Assay^a

atrazine concentration (ng/mL)	intra-assay mean	interassay mean
1	90 ± 6	110 ± 6
0.35	95 ± 10	107 ± 7

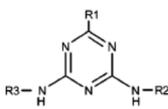
^a% of recovery.

good accuracy and reproducibility. Cross-reactivities with other compounds of the triazine family were very similar to those obtained in conventional ELISA when using M13 phage particles bearing anti-immunocomplex peptides as immunoassay reagents, shown in Table 3.

CONCLUSIONS

AlphaLisa assay signal generation relies on acceptor–donor bead proximity induced by the presence of the analyte, which is typically bound by antibody pairs immobilized on the surface of the beads. Small analytes cannot be bound simultaneously by two antibodies, and hence, they cannot be used to bridge the acceptor and donor beads. In this study, we demonstrated that anti-immunocomplex peptides, which react selectively with

Table 3. Cross Reactivity (%) of Atrazine in NanoAlphaLisa Assay with Related Compounds from the Triazine Family^a

Compound	Structure	Competitive ELISA ¹⁵	PHAIA ¹⁸	nanoAlphaLisa
				
atrazine	Cl C ₂ H ₅ CH(CH ₃) ₂	100	100	100
simazine	Cl C ₂ H ₅ C ₂ H ₅	48	0	0
propazine	Cl CH(CH ₃) ₂ CH(CH ₃) ₂	116	144	94
cyanazine	Cl C ₂ H ₅ C ₂ N(CH ₃) ₂	91	0	0
terbutryn	SCH ₃ C ₂ H ₅ C(CH ₃) ₃	0	0	0
ametryn	SCH ₃ C ₂ H ₅ CH(CH ₃) ₂	0	0	0
simetryn	SCH ₃ C ₂ H ₅ C ₂ H ₅	0	0	0
prometryn	SCH ₃ CH(CH ₃) ₂ CH(CH ₃) ₂	0	0	0

^aAll data are the mean of two independent experiments. A value of 0 means that there was no observable cross-reactivity with the highest concentration tested, 10⁴ ng/mL.

small analyte–antibody complexes, provide sufficient stabilization of bead proximity to enable the generation of strong luminescent oxygen channeling signals. Using atrazine as a model small molecule analyte, we developed a novel immunoassay (nanoAlphaLisa) for this herbicide that allowed the sensitive mix-and-read detection of atrazine in undiluted water samples within 1 h. Given the toxicological, environmental, and medical analytical relevance of small molecules and considering that anti-immunocomplex peptides can be isolated in a straightforward manner from phage display peptide libraries, the nanoAlphaLisa presented here constitutes a valuable addition to the toolbox of rapid methods for the detection of these compounds. This methodology also has the intrinsic advantages of automation and high-throughput processing that homogeneous luminescent oxygen channeling assays provide.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00657.

Differential binding of anti-immunocomplex peptide 13A to K4E7 MoAb in the presence or absence of atrazine; Hook effect is not observed in nanoAlphaLisa; reduction of incubation time and assay performance in buffer; supplementary methods (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: agontech@fq.edu.uy (A.G.-T.).

*E-mail: ggonzal@fq.edu.uy (G.G.-S.).

ORCID

Bruce D. Hammock: 0000-0003-1408-8317

Gualberto González-Sapienza: 0000-0003-1824-0611

Andrés González-Techera: 0000-0001-5490-8899

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by project CSIC 149 (UDELAR). We are thankful to Dr. Judy Callis and Dr. John Riggs of Molecular and Cell Biology Department in UC Davis for kindly providing access to perform experiments in the AlphaLisa reader Fusion α -FP Packard, PerkinElmer instrument. G.L. is a recipient of a doctorate fellowship from CAP (Comisión Académica de Posgrado) and performed this research in The Entomology Department at UC Davis with a fellowship from ANII, MOV_CA_2015_1_107451. Partial support from the NIEHS Superfund Program Research Program P42 ES004699 is acknowledged.

■ REFERENCES

- Ullman, E. F.; Kirakossian, H.; Switchenko, A. C.; Ishkanian, J.; Ericson, M.; Wartchow, C. A.; Piriou, M.; Pease, J.; Irvin, B. R.; Singh, S.; Singh, R.; Patel, R.; Dafforn, A.; Davalian, D.; Skold, C.; Kurn, N.; Wagner, D. B. *Clin Chem.* **1996**, *42*, 1518–1526.
- Beaudet, L.; Rodriguez-Suarez, R.; Venne, M. H.; Caron, M.; Bédard, J.; Brechler, V.; Parent, S.; Bielefeld-Sévigny, M. *Nat. Methods* **2008**, *5*; DOI: 10.1038/nmeth.f.230.
- Zhao, H.; Lin, G.; Liu, T.; Liang, J.; Ren, Z.; Liang, R.; Chen, B.; Huang, W.; Wu, Y. *J. Immunol. Methods* **2016**, *437*, 64–69.
- Bracht, T.; Molleken, C.; Ahrens, M.; Poschmann, G.; Schlosser, A.; Eisenacher, M.; Stuhler, K.; Meyer, H. E.; Schmiegel, W. H.; Holmskov, U.; Sorensen, G. L.; Sitek, B. *J. Transl. Med.* **2016**, *14*, 201.
- Wang, H.; Nefzi, A.; Fields, G. B.; Lakshmana, M. K.; Minond, D. *Anal. Biochem.* **2014**, *459*, 24–30.
- Steinsbo, O.; Dorum, S.; Lundin, K. E.; Sollid, L. M. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 1530–1540.e3.
- Burlein, C.; Bahnck, C.; Bhatt, T.; Murphy, D.; Lemaire, P.; Carroll, S.; Miller, M. D.; Lai, M. T. *Anal. Biochem.* **2014**, *465*, 164–171.
- Liu, T. C.; Huang, H.; Dong, Z. N.; He, A.; Li, M.; Wu, Y. S.; Xu, W. W. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *426*, 139–144.
- He, A.; Liu, T. C.; Dong, Z. N.; Ren, Z. Q.; Hou, J. Y.; Li, M.; Wu, Y. S. *J. Clin. Lab. Anal.* **2013**, *27*, 277–283.
- Zou, L. P.; Liu, T. C.; Lin, G. F.; Dong, Z. N.; Hou, J. Y.; Li, M.; Wu, Y. S. *J. Immunoassay Immunochem.* **2013**, *34*, 134–148.

- (11) Chau, D. M.; Shum, D.; Radu, C.; Bhinder, B.; Gin, D.; Gilchrist, M. L.; Djaballah, H.; Li, Y. M. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2013**, *16*, 415–424.
- (12) Mechaly, A.; Cohen, N.; Weiss, S.; Zahavy, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 3965–3972.
- (13) Zhang, Y.; Huang, B.; Zhang, J.; Wang, K.; Jin, J. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 1944–1947.
- (14) Arevalo, F. J.; Gonzalez-Techera, A.; Zon, M. A.; Gonzalez-Sapienza, G.; Fernandez, H. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *32*, 231–237.
- (15) Cardozo, S.; Gonzalez-Techera, A.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Kramer, K.; Gonzalez-Sapienza, G. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 4234–4241.
- (16) Kim, H. J.; Gonzalez-Techera, A.; Gonzalez-Sapienza, G. G.; Ahn, K. C.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 2047–2053.
- (17) Gonzalez-Techera, A.; Kim, H. J.; Gee, S. J.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9191–9196.
- (18) Gonzalez-Techera, A.; Vanrell, L.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7799–7806.
- (19) Gonzalez-Techera, A.; Zon, M. A.; Molina, P. G.; Fernandez, H.; Gonzalez-Sapienza, G.; Arevalo, F. J. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 650–656.
- (20) Vanrell, L.; Gonzalez-Techera, A.; Hammock, B. D.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1177–1182.
- (21) Carlomagno, M.; Lassabe, G.; Rossotti, M.; Gonzalez-Techera, A.; Vanrell, L.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10467–10473.
- (22) Lassabe, G.; Rossotti, M.; Gonzalez-Techera, A.; Gonzalez-Sapienza, G. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5541–5546.
- (23) World Health Organization. *Guidelines for Drinking-water Quality*; WHO: Geneva, 2011; http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf; accessed 9 Nov 2017.
- (24) EPA. <https://safewater.zendesk.com/hc/en-us/articles/212077787-4-What-are-EPA-s-drinking-water-regulations-for-atrazine->; 2015.
- (25) Giersch, T. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1006–1011.
- (26) PerkinElmer. <http://www.perkinelmer.com/es/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/alphascreen-no-wash-assays/hook-effect.html>; accessed April 24, 2018.

Supporting Information

Noncompetitive Homogeneous detection of small molecules using synthetic nanopeptamer based Luminescent Oxygen Channeling

Gabriel Lassabe[†], Karl Kramer[‡], Bruce D. Hammock[§], Gualberto González-Sapienza^{*†} and Andrés González-Techera^{*†}

[†] Cátedra de Inmunología, DEPBIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, UDELAR, Montevideo, 11600, Uruguay

[§] Department of Entomology and Nematology and UC Davis Comprehensive Cancer Center, University of California, Davis, 95616, United States

[‡] Chair of Proteomics and Bioanalytics, Technical University of Munich, Freising, 85354, Germany

* Corresponding authors: Andrés González-Techera: agontech@fq.edu.uy
Gualberto González-Sapienza: ggonzal@fq.edu.uy

Figure S1	page S1
Figure S2	page S2
Figure S3	page S3
Methods	page S4

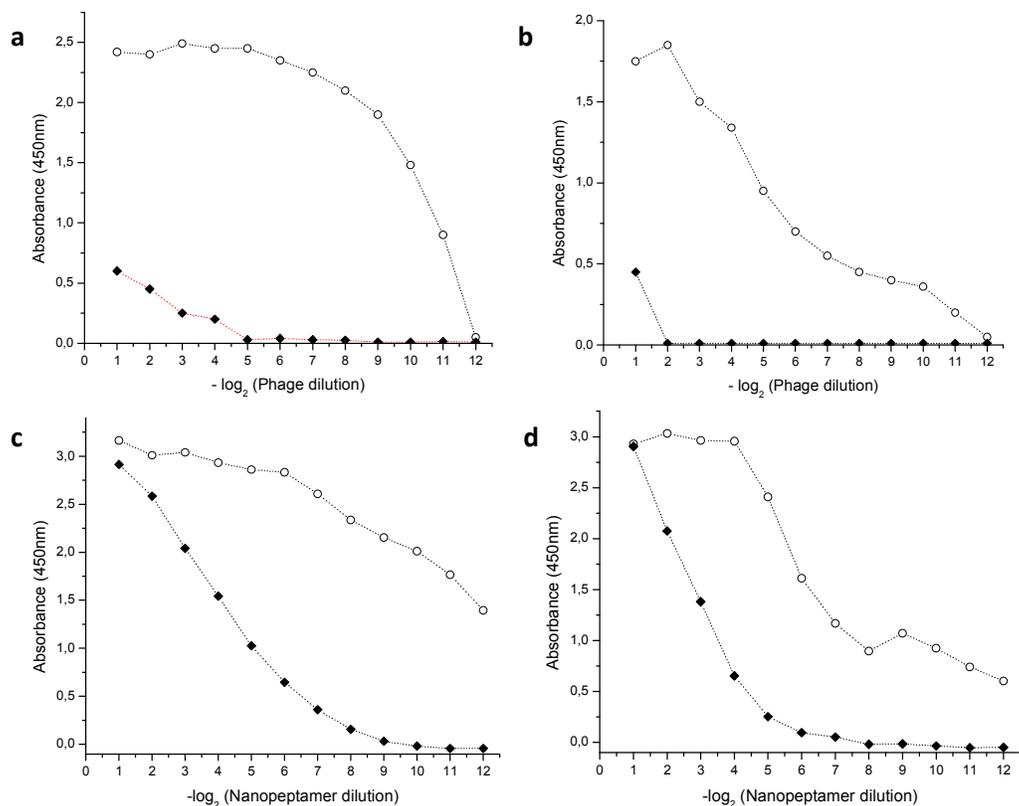


Figure S1. Binding of anti-immunocomplex peptide 13A to K4E7 MoAb in the absence of atrazine by ELISA. a,b) PHAIA checkerboards titration curves performed in ELISA wells coated with 10 $\mu\text{g/mL}$ (a) and 2.5 $\mu\text{g/mL}$ of K4E7 MoAb (b). The initial concentration was 4×10^{11} 13A phage particles per mL. Two-fold serial dilutions of this solution were performed in PBS-Tween in the presence of 100 ng/mL of atrazine (white circles) or absence of it (black diamonds). The ELISA assay was revealed with a commercial anti-M13 peroxidase conjugate MoAb. c,d) 13A Nanopeptamer checkerboards titration curves performed with wells coated as in a,b. Nanopeptamer was formed by incubating 250 pmoles of commercial high sensitivity streptavidin-peroxidase with a 50-fold molar excess of 13A biotinylated peptide in a final volume of 100 μL of PBS-BSA 1%, as described previously.¹⁹ The nanopeptamer was then diluted ten times to yield a solution which was used to perform two-fold serial dilutions in PBS-Tween in the presence of 100 ng/mL of atrazine (white circles) or absence of it (black diamonds).

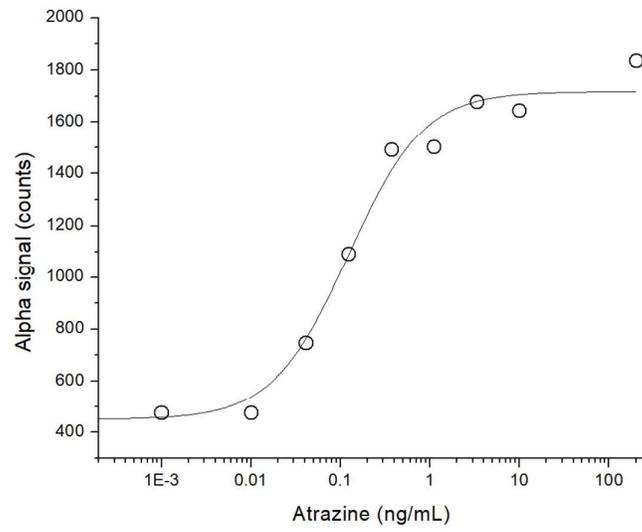


Figure S2. NanoAlphaLisa for atrazine assay does not exhibit the “hook effect”. Different concentrations of atrazine were tested in the range 0-200 ng/mL. No signal loss was observed upon saturation.

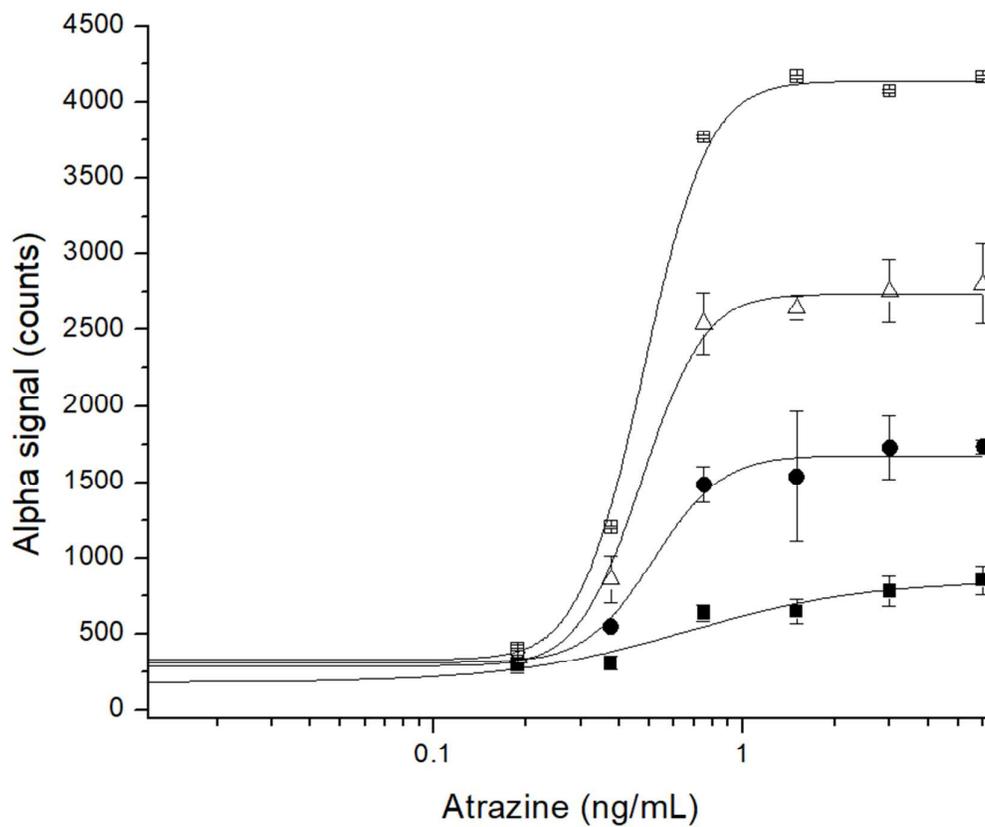


Figure S3. Reduction of incubation time and assay performance in buffer. Curves were performed as described previously with incubation periods of: 15 (black squares, $SC_{50} = 0.66 \pm 0.23$ ng/mL), 30 (black circles, $SC_{50} = 0.52 \pm 0.05$ ng/mL), 45 (white triangles, $SC_{50} = 0.47 \pm 0.02$ ng/mL), 60 minutes (white squares, $SC_{50} = 0.48 \pm 0.01$ ng/mL) and laser irradiation at 680 nm.

Supporting Methods

Protein A conjugation to AlphaLisa acceptor beads. A detailed antibody/bead conjugation protocol from AlphaLisa technical manual was followed to conjugate protein A to the beads. The procedure was almost the same as outlined in the protocol but we took into account that protein A is smaller than antibodies in order to keep the recommended protein/bead ratio. One milligram of beads was conjugated to 0.028 mg of protein A in a 10:1 ratio. Briefly, fifty microliters of the original beads at 20 mg/mL, were mixed with 50 μ L of PBS, followed by a centrifugation step at 16000 g for 15 minutes after which the supernatant was discarded. The conjugation was performed by resuspending the pelleted beads in 200 μ L of buffer containing: 1.25 μ L of Tween-20 10%, 10 μ L of 400 mM NaBH₃CN (Na Cyanoborohydride), 100 mM Hepes pH 7.4. This solution already had 0.028 mg of protein A and was incubated for 20 hours at 37°C in a rotator tube (Barnstead Labquake Rotisserie Shaker). The unreacted sites were blocked by adding 10 μ L of fresh solution of CMO (65 mg/mL carboxymethoxylamine in 800 mM of NaOH) and incubating for 1 h at 37°C in the same rotator. Conjugated beads were washed by performing two consecutive cycles of centrifugation (15 minutes at 16000 g), bead pellet resuspension in 200 μ L of 100 mM Tris-HCL pH 8.0 and bead solution sonication (10 short pulses of 1 second and power not more than 20 % of the maximum). Finally the beads were resuspended at 5 mg/mL in 200 μ L of PBS.