





Tesina de Grado - Licenciatura en Bioquímica

Producción de calibradores recombinantes quiméricos para ensayos serológicos COVID-19

María Belén Márquez De Los Santos

Tutor: Dr. Gabriel Lassabe

Área Inmunología, Facultad de Química, UdelaR

Montevideo, Uruguay 2023

Agradecimientos

A Gabriel por el apoyo, dedicación y paciencia, especialmente en momentos donde no podía ir seguido al Lab. Gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo.

Al Lab de Inmuno, y muy especialmente a la Casita del Fondo, por la mejor onda y disposición a siempre dar una mano. Mención especial a todos los estudiantes de posgrado del Lab, que trabajan con imponente dedicación todos los días. Se merecen lo mejor y les deseo muchos éxitos en sus carreras y sus vidas, a donde sea que las quieran llevar.

A Gerardo por haberme dado la oportunidad de trabajar y formarme con él desde 2020, sin lo cual no habría encarado igual esta etapa. Gracias también por tu comprensión y por siempre alentarme a priorizar la carrera.

A mis padres por el aguante de siempre, especialmente en estos últimos meses. Gracias por haberme escuchado, aunque la mitad de las veces no entendieran un comino.

A Brian, por tu apoyo incondicional y tu entusiasmo cuando te cuento las cosas que me encantan (y las que no) de este camino que elegí, por ponerte contento, casi más que yo, cuando las cosas salen bien, y por contenerme durante momentos difíciles.

A Lau por ser la mejor compinche, escucharme y apoyarme en todo **siempre**, cuando hubo sol y cuando hubo tormenta. Gracias por dar tanto cuando estabas con mil cosas arriba.

A Gisella, por enseñarme a usar las herramientas mentales para encarar esta y muchas otras áreas de la vida. Y a Tuli, por sus ronroneos y mimos terapéuticos.

A la Facultad de Ciencias por brindarme una excelente formación académica.

Índice

Resumen	4
Lista de Abreviaturas	5
1. Introducción	7
1.1. Evaluación de la respuesta humoral contra SARS-CoV-2	7
1.2. Nanobodies	10
1.3. Expresión recombinante en líneas celulares de mamífero	15
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo general	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Materiales	19
3.1. Buffers y soluciones	19
3.2. Medios de cultivo y complementos asociados	20
4. Métodos	21
4.1. Procedimientos Generales	21
4.1.1. Cultivo de E. coli	21
4.1.2. Transformación de E. coli	21
4.1.3. Extracción y purificación de ADN plasmídico	21
4.1.4. Digestión y purificación de ADN digerido	21
4.1.5. Electroforesis en gel de agarosa	22
4.1.6. Desfosforilación y ligación	23
4.1.7. Secuenciación	23
4.1.8. Cuantificación de ADN y proteínas	24
4.1.9. SDS-PAGE	24
4.1.10. Cultivo y pasaje de HEK293-T	24
4.1.11. Transfección de HEK293-T	25
4.1.12. ELISA	25
4.1.13. Procesamiento de datos	26
4.2. Expresión y purificación de la proteína de nucleocápside (ΝΔ121)	26
4.2.1. Expresión en BL21(DE3)-pBir	26
4.2.2. Purificación por IMAC	28
4.2.3. Purificación por gel-filtración	29
4.3. Producción y purificación de los calibradores Nb-Fc	29
4.3.1. Construcción y purificación de vectores pCDNA 3.1(+) para expresión recombinante en HEK293-T	29
4.3.2. Optimización de transfección y evaluación de elementos reguladores	31
4.3.3. Escalado de producción	32
4.3.4. Purificación por cromatografía de afinidad	32
4.4. Caracterización por gel-filtración y espectrometría de masas MALDI-TOF	33
4.4.1. Gel-filtración	33
4.4.2. Espectrometría de masas (MALDI-TOF)	34

4.5. Evaluación de afinidad, funcionalidad y estabilidad: ELISA e interferometría de	24
biocapa	34
	34
4.5.2. Interferometria de biocapa	35
4.5.3. Ensayos de estabilidad	. 37
4.6. Incorporación de los calibradores Nb-Fc a inmunoensayos	37
4.6.1. Cuantificación de IgG anti-RBD en suero	. 37
4.6.2. Detección cualitativa de IgG anti-N en suero	38
5. Resultados y discusión	39
5.1. Expresión y purificación de la proteína de nucleocápside (NΔ121)	39
5.2. Expresión y purificación de calibradores Nb-Fc	41
5.2.1. Optimización de transfección y evaluación de elementos reguladores	41
5.2.2. Producción y purificación por cromatografía de afinidad	. 44
5.3. Caracterización por gel-filtración y espectrometría de masas MALDI-TOF	46
5.4. Evaluación de afinidad y funcionalidad de calibradores Nb-Fc	49
5.4.1. Funcionalidad en ELISA	49
5.4.2. Interferometría de biocapa: parámetros cinéticos y termodinámicos	50
5.4.3. Ensayos de estabilidad	. 51
5.5. Incorporación de los calibradores a ensayos serológicos	54
5.5.1. Cuantificación de IgG anti-RBD en suero	. 54
5.5.1.2. Evaluación de reactividad cruzada contra RBD _{Omicron}	56
5.5.2. Detección cualitativa de IgG anti-N en suero	57
6. Conclusiones y perspectivas	60
7. Referencias	61
8. Anexo: parámetros generales de los calibradores Nb-Fc	67
8.1. Calibrador H8-Fc	67
8.2. Calibrador H4-Fc	68

Resumen

Los ensayos serológicos son un tipo de inmunoensayo con los que se detectan anticuerpos en suero, ya sea para el diagnóstico de una infección reciente, detección de alergias o evaluación de la calidad de la respuesta inmune humoral a largo plazo, entre otras cosas. Los inmunoensayos requieren calibradores y controles para poder distinguir resultados positivos y negativos, así como para la cuantificación. Los calibradores para ensayos serológicos suelen ser sueros que portan anticuerpos contra el antígeno de interés, lo cual acarrea desventajas: debido a su naturaleza policional no pueden ser completamente caracterizados, su reproducibilidad no es óptima y, al ser finitos, es necesario buscar nuevos sueros positivos a ser validados, aumentando el tiempo y costo de los ensayos. Una alternativa es la producción *in vitro* de calibradores recombinantes que mimeticen a la clase de anticuerpos a detectar, lo que resuelve las dificultades anteriores ya que éstos pueden producirse en forma eficiente e ilimitada, obtenerse en alta pureza (lo cual mejora la reproducibilidad de los ensayos), ser completamente caracterizados y almacenarse en condiciones que optimicen su estabilidad.

Este proyecto se centró en producir dos calibradores recombinantes quiméricos para ensayos de serología de SARS-CoV-2, constituidos por un nanobody fusionado a la región Fc de IgG1 humana. Se llama nanobody (Nb) a la forma recombinante del dominio VHH (variable) de anticuerpos de cadena pesada (HcAbs, *Heavy-chain-only Antibodies*), producidos por camélidos. Los Nbs presentan gran estabilidad conformacional y solubilidad, lo que permite su expresión recombinante en ausencia del resto de la cadena pesada o fusionados a otros dominios proteicos. A partir de Nbs previamente seleccionados contra antígenos de SARS-CoV-2 se construyeron vectores de expresión para dos calibradores Nb-Fc, uno de ellos reactivo contra la proteína de nucleocápside, y el restante reactivo contra el dominio de unión al receptor de la proteína Spike.

Los calibradores fueron expresados en células HEK293-T y purificados por cromatografía de afinidad. Se los caracterizó de forma general mediante técnicas como espectrometría de masas, gel-filtración (determinación de peso molecular), ELISA (evaluación de funcionalidad y estabilidad) e interferometría de biocapa (obtención de parámetros cinéticos y termodinámicos indicativos de afinidad).

Finalmente, los calibradores fueron incorporados a ensayos serológicos para la detección cualitativa de IgG anti-N y cuantificación de IgG anti-RBD. Para el primer caso, se logró un 82.5% de sensibilidad y 100% de especificidad, las curvas de calibración fueron reproducibles y permitieron normalizar ensayos donde se evaluó un número alto de sueros. Para el ensayo de cuantificación de IgG anti-RBD, se logró validar al calibrador recombinante al establecer una correlación entre la cuantificación con el mismo y con un estándar internacional, con la ventaja adicional de reducir el error relativo al lograr obtener curvas de calibración lineales. En suma, ambos calibradores Nb-Fc demostraron ser una alternativa robusta al uso de sueros para la estandarización de inmunoensayos.

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Bovine Serum Albumin (seroalbúmina bovina)
CDS	Coding Sequence (secuencia codificante)
CH1, CH2, CH3	Dominio constante de cadena pesada 1, 2, 3
DO	Densidad óptica
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (enzimoinmunoensayo de adsorción)
HcAbs	Heavy-chain-only Antibodies (anticuerpos de cadena pesada)
HEK	Human Embryonic Kidney Cells (células embrionarias de riñón humano)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HisTag	Cola de 6 histidinas
HPO	Horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano)
IMAC	Ion Metal Affinity Chromatography (cromatografía de afinidad por iones metálicos)
lg	Inmunoglobulina

IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetic Acid (níquel-ácido nitriloacético)
ON	Overnight (equivale a 16-20 hs)
pb	pares de bases
RPM	revoluciones por minuto
RT	Room temperature (temperatura ambiente)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SFB	Suero fetal bovino
ТМВ	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
UA	Unidades de absorbancia
URF	Unidades relativas de fluorescencia

1. Introducción

1.1. Evaluación de la respuesta humoral contra SARS-CoV-2

Durante estos últimos años numerosos métodos diagnósticos para infección (actual o resuelta) por SARS-CoV-2, agente causante de COVID-19, han cobrado marcada importancia. Brevemente, SARS-CoV-2 es un virus de ARN envuelto perteneciente a la subfamilia Coronavirinae, formado por 4 proteínas estructurales (S, E, M y N) y 16 proteínas no estructurales [1]. Las más relevantes para este trabajo son la proteína N o de nucleocápside y la proteína S o Spike. La primera, muy conservada entre los coronavirus, tiene como función empaquetar el ARN viral y colaborar en el ensamblaje de viriones mediante su interacción con la proteína M. Asimismo, la proteína N es un antígeno inmunodominante (la respuesta inmune contra la misma es mayor en comparación a otros antígenos del virus), por lo que es apropiada para medir anticuerpos en tests serológicos de diagnóstico [2-4]. La proteína Spike, que también es altamente inmunogénica [4,5], media la entrada del virus a la célula huésped y está compuesta por dos subunidades, S1 y S2. S1 posee un dominio C-terminal y un dominio de unión a receptor o RBD (receptor binding domain) que interacciona con la ACE2, proteína de membrana blanco para la entrada viral [1]. Tanto Spike como la proteína N han sido ampliamente utilizadas en ensayos de serología [3,4,6].



Figura 1.1. Esquema de los componentes principales de Sars-CoV-2. En este trabajo son relevantes la proteína de nucleocápside (N) y el dominio de unión a receptor (RBD) de la proteína Spike. Imagen creada en BioRender [7].

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son una parte esencial del sistema inmune adaptativo y se caracterizan por unirse con alta afinidad y especificidad a sus antígenos, habiendo varias clases (IgG, IgM, IgA, IgE) con distintas funciones efectoras, estado de oligomerización, avidez y afinidad [8]. La respuesta de anticuerpos generada ante SARS-CoV-2 es típica de infecciones virales, caracterizada por un primer pico de IgM en suero y posteriormente un pico de IgG de mayor magnitud y duración (Fig. 1.2) [9-11]. Las IgG tienen funciones efectoras esenciales para la respuesta a infecciones virales y poseen muy alta afinidad por sus antígenos en comparación a las IgM. Luego de la resolución de una infección, en general se pueden detectar niveles basales de IgG contra el patógeno durante meses, años e incluso décadas [4,12]. La detección cuantitativa y cualitativa de diferentes subclases de inmunoglobulinas en suero es una herramienta tanto de diagnóstico como de seguimiento. Como la primera etapa en la respuesta humoral frente a SARS-CoV-2 consiste en un pico de IgM, la detección de las mismas permite el diagnóstico de una infección reciente o cercana a la resolución [12] y puede usarse como un complemento al diagnóstico por detección de ácidos nucleicos o antígenos, previniendo falsos negativos en pacientes con baja carga viral [13]. Por otro lado, la detección de IgG en suero, pertinente a este proyecto, es ideal para evaluar la calidad de la respuesta humoral a largo plazo [12]. Esto último ha sido de interés en cuanto a SARS-CoV-2 ya que, con una correcta estandarización, es posible comparar la potencia de distintas vacunas, así como determinar la seroprevalencia del virus y la probabilidad de reinfección a nivel poblacional (asociada a un decaimiento en el título de IgG, especialmente IgG neutralizantes) [14,15].



Figura 1.2. Respuesta de anticuerpos específica contra Sars-CoV-2. Luego de la resolución de la infección hay niveles apreciables de IgG, los cuales pueden continuar disminuyendo y/o estabilizarse en el tiempo. Extraído de [9].

Hay diferentes formatos de inmunoensayos aptos para cuantificación de anticuerpos en suero, siendo uno de ellos el enzimoinmunoensayo de adsorción o ELISA. El mismo está basado en la detección de moléculas de interés mediante la formación de uno o sucesivos inmunocomplejos, donde se utiliza como reportero a un anticuerpo o antígeno conjugado a una enzima que cataliza una reacción colorimétrica. Luego de que se detiene la reacción se mide la absorbancia del producto, la cual es proporcional a la cantidad de moléculas de interés [16,17]. Estos ensayos se realizan usualmente en placas de 96 pocillos [16], en donde se inmoviliza un anticuerpo o antígeno por adsorción inespecífica [16,17]. Hay diversos formatos de ELISA para la detección de anticuerpos en suero, dependiendo de qué clase de anticuerpos se busca detectar; este proyecto se centra en la detección de IgG anti-SARS-CoV-2, por lo que se describe el formato correspondiente. Primeramente se inmoviliza al antígeno de interés y luego se incuban los sueros previamente diluidos donde se espera que las IgG específicas se unan al antígeno inmovilizado (dado que las IgG

desplazan a las IgM, de menor afinidad, no se requiere un procesamiento previo de los sueros o una captura de IgG **[18]**). Posteriormente se realiza una incubación con el anticuerpo secundario adecuado, el cual debe ser específico contra la clase de inmunoglobulinas que se busca detectar (IgG humanas). Finalmente, se añade una solución conteniendo el sustrato de la enzima y luego de un determinado período de tiempo se detiene la reacción adicionando una solución de frenado **[11,19]**.



Figura 1.3. Componentes de un ELISA para la detección de anticuerpos en suero. Imagen creada en BioRender [7].



Figura 1.4. Esquema de los pasos de un ELISA para la detección de IgG en suero. Luego de la sensibilización con el antígeno de interés, se incuban los sueros y posteriormente el anticuerpo secundario. Al agregar el sustrato correspondiente, la enzima conjugada al anticuerpo secundario cataliza una reacción colorimétrica, generando un producto cuantificable por espectrofotometría. Extraído de [11].

Para cualquier inmunoensayo es necesario contar con calibradores y controles para discriminar entre muestras positivas y negativas, así como para su cuantificación. En ensayos serológicos los calibradores suelen ser sueros positivos, provenientes de individuos que cursaron la infección por el patógeno de interés, o inmunoglobulinas concentradas a partir de dichos sueros [20], los cuales primero deben validarse antes de ser usados para la estandarización [21]. La utilización de sueros o derivados de los mismos tiene como desventaja la necesidad de buscar y validar continuamente nuevos estándares al ser los mismos finitos, aumentando el tiempo y costo de los ensayos. Asimismo, no es infrecuente la dificultad de obtener sueros adecuados; para estos casos se puede utilizar alternativamente un "suero artificial" [22] que de todas formas implica el uso de suero de un

animal hiperinmunizado contra el antígeno de interés. Por otro lado, la naturaleza policional de los sueros no permite que sean completamente caracterizados y puede afectar la reproducibilidad de los ensayos, debido a reactividad contra contaminantes y agentes bloqueantes, unión hidrofóbica inespecífica a las paredes del pocillo, e interacciones inespecíficas con el antígeno [23]. La producción de calibradores recombinantes que mimeticen la clase de anticuerpos a detectar es una alternativa que resuelve las dificultades anteriores, dado que estos tienen el potencial de producirse en forma ilimitada y obtenerse en alta pureza, de forma de reducir el ruido durante los ensayos y tener una completa valoración sobre sus propiedades fisicoquímicas (estabilidad, afinidad, peso molecular, etc).

Una alternativa a los sueros como calibradores es la utilización de anticuerpos monoclonales (mAbs), generalmente recombinantes; de hecho, hay varios mAbs anti-SARS-CoV-2 humanos disponibles a nivel comercial con potencial uso para la estandarización de ensayos serológicos [24-27]. Los mAbs recombinantes utilizados como estándares suelen ser quiméricos [28], en los cuales la región Fab o scFv (ver Fig. 1.5 en sección 1.2) proviene de anticuerpos de animales inmunizados y es fusionada a la región Fc humana de interés [29,30]. La producción recombinante de anticuerpos convencionales tiene desventajas relativas a la obtención de las secuencias codificantes para los dominios variables que contienen el sitio de unión al antígeno [31]; este punto se explica en mayor detalle en la sección 1.2 y se esquematiza en la Fig. 1.8.

Como alternativa a la utilización de sueros o mAbs convencionales como calibradores en ensayos serológicos, en este proyecto se planteó la construcción y producción de dos calibradores recombinantes quiméricos, compuestos por la región Fc de IgG1 humana fusionada a un nanobody específico contra un antígeno del SARS-CoV-2. La utilización de nanobodies en los constructos tiene varias ventajas, que serán abordadas en la siguiente sección. En la literatura científica hay antecedentes recientes de calibradores en base a nanobodies, aunque en formatos distintos al planteado en este trabajo, demostrando su aplicabilidad en la estandarización de inmunoensayos [32,33].

1.2. Nanobodies

Los anticuerpos convencionales son heterotetrámeros bivalentes (poseen dos paratopes, o sitios de unión a su antígeno, idénticos) con morfología similar a una Y, compuestos por dos cadenas livianas (L) y dos cadenas pesadas (H) (Fig. 1.5). Los dominios C-terminal conservados de las cadenas pesadas (CH2 y CH3 mínimamente) constituyen el fragmento cristalizable o Fc, responsable de las funciones efectoras de los anticuerpos y lo que los diferencia en clases y subclases. Por otro lado, las regiones bifurcadas (Fab, *antigen binding fragment*) están compuestas por la totalidad de la cadena liviana (dominios VL y CL) y los primeros dos dominios N-terminal de la cadena pesada (dominios VH y CH1). Los dominios N-terminal de ambas cadenas,VH y VL, presentan alta variabilidad en su secuencia, especialmente a nivel del paratope, el cual está constituido por 6 regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementarity-determining regions*) distribuidas entre el dominio VH y VL, cada uno aportando 3 CDR. Las porciones restantes de ambos dominios variables constituyen las regiones framework (FR, *framework regions*), que sirven de soporte y andamiaje para el plegamiento de las CDR [8].



Figura 1.5. Estructura general de un anticuerpo IgG típico y fragmentos derivados. Extraído de [34].

Si bien la estructura de los anticuerpos suele ajustarse a la convencional, hay numerosas variaciones en diferentes especies. En particular, los camélidos (llamas, alpacas, camellos), además de portar anticuerpos convencionales, son capaces de producir anticuerpos diméricos de cadena pesada o HcAbs (Heavy chain-only Antibodies), carentes de cadena liviana y pertenecientes a la clase IgG, la cual se subdivide en las subclases IgG2 e IgG3. Los HcAbs están compuestos por un dominio variable característico, denominado VHH. unido a los dominios CH2 y CH3, pero carecen del dominio CH1 que interacciona con la cadena liviana en anticuerpos convencionales (Fig 1.6) [35,36]. A la forma recombinante del dominio VHH se la denomina nanobody (Nb). Es importante aclarar que los camélidos también producen en menor proporción HcAbs cuyo dominio variable es del tipo VH soluble en lugar de VHH. Este dominio VH soluble es similar al VH convencional, con algunas diferencias que permiten que se exprese en ausencia de la cadena liviana. Curiosamente, los segmentos génicos correspondientes al dominio VH soluble pueden dar lugar por recombinación somática tanto a HcAbs (ausencia de dominio CH1) como a anticuerpos convencionales [37]. Aunque el término nanobody puede incluir a las formas recombinantes tanto de dominios VHH como de dominios VH solubles, en este trabajo nanobody se refiere únicamente a la forma recombinante de dominios VHH.



Figura 1.6. Diferencias estructurales entre anticuerpos convencionales y anticuerpos de cadena pesada. Arriba (extraído de [36]): comparación entre la estructura de un anticuerpo convencional IgG y la de un anticuerpo de cadena pesada (HcAb) de camélido. Estos últimos carecen de cadena liviana y del dominio CH1 presente en la cadena pesada de anticuerpos convencionales. Abajo (extraído de [38]): comparación entre el paratope de un anticuerpo convencional y un HcAb; en contraste con los primeros, los HcAbs contienen al paratope en un único dominio (VHH).

Los Nb, con un peso molecular de ~15 kDa, presentan características ventajosas en comparación a los anticuerpos convencionales y sus fragmentos derivados (scFv y Fab, ver Fig. 1.5). En primer lugar, tienen una alta solubilidad gracias a la sustitución o enmascaramiento por parte de CDR3 de residuos hidrofóbicos que interactuarían con la cadena liviana (Fig. 1.7) [36]. Asimismo, presentan gran estabilidad térmica y conformacional [36,39] dada la mayor proporción de residuos hidrofílicos y la presencia de enlaces disulfuro no canónicos en las CDR y FR [36]. Se ha demostrado su potencial de mantener el 100% de su capacidad de unión original tras ser incubados durante varios días a 37°C [39] y durante meses a 4°C [40], así como su resistencia a agentes caotrópicos y extremos de pH [39]. Pese a solamente contar con 3 CDR versus las 6 presentes en los paratopes de anticuerpos convencionales, la mayor longitud de CDR3 y un incremento en la frecuencia de puntos calientes durante el proceso de hipermutación somática [36] permite que los Nb logren afinidades comparables y, algunas veces, superiores a las de anticuerpos convencionales, en el rango nanomolar-picomolar [39]. La mayor extensión y flexibilidad conformacional de CDR3 hace posible la unión a epítopes cóncavos, como sitios activos de enzimas o regiones crípticas de proteínas virales [36]. Asimismo, los Nb parecen presentar una mayor diversidad en sus paratopes, dado lo mencionado anteriormente y sumándose el hecho de que la contribución de cada CDR al paratope es altamente variable y que a veces residuos canónicamente pertenecientes a FRs pueden formar parte del paratope, volviendo más difusa la frontera entre CDRs y FRs [41]. Todas las características mencionadas hacen de los Nb excelentes candidatos para expresión recombinante, tanto de forma independiente como fusionados a otros dominios proteicos, lo cual los ha convertido en herramientas con amplio potencial en terapia y diagnóstico [36,39].



Figura 1.7. Diferencias clave a nivel estructural y de secuencia aminoacídica entre dominios VHH y VH. Izquierda (extraído de [36]): estructura 3D general de un dominio VHH, donde se resaltan algunos de los residuos hidrofílicos (Arg50, Glu49), así como residuos hidrofóbicos que son enmascarados por CDR3 (Trp118, Phe42, Phe52); ambas características contribuyen a la solubilidad del dominio VHH. Derecha (extraído de [42]): comparación esquemática entre dominios VH y VHH; notar que para este último CDR3 tiene una mayor longitud y hay 4 sustituciones aminoacídicas en FR2 que contribuyen a la solubilidad, así como un enlace disulfuro entre CDR1 y CDR3 que resulta en una mayor estabilidad.

Otra ventaja crucial de los Nb es la obtención de bibliotecas genéticas fieles gracias a que el paratope está contenido en un único dominio, en contraste con los anticuerpos convencionales y sus fragmentos derivados (scFv, Fab), en donde el paratope está contenido en dos dominios variables (VH y VL). Al construir una biblioteca genética de fragmentos scFv, es necesario clonar los segmentos codificantes tanto del dominio VH como del dominio VL, resultando en un par VL-VH por vector. Debido a que el clonado se da de forma aleatoria, en muchos casos se pierde el par VL-VH original, disminuyendo así la calidad de la biblioteca (Fig. 1.8). En contraste, al construir una biblioteca genética de dominios VHH se debe clonar un solo inserto por vector, por lo que se logra construir una biblioteca fiel, volviendo innecesario aumentar el tamaño de la misma para compensar la pérdida de paratopes por el efecto de barajamiento [36].



Figura 1.8. Esquema de la construcción de una biblioteca de nanobodies (izquierda) versus una biblioteca de fragmentos scFv (derecha). Para el segundo caso, el clonado aleatorio de ADNc codificante para dominios VH y VL resulta en la pérdida de muchos pares originales. Extraído de [36].

Como se ha detallado anteriormente, los dos calibradores en los que se centra este proyecto constan de un Nb fusionado a la región Fc de IgG1 de forma de mimetizar a las IgG (Fig. 1.9). Los Nb fueron previamente seleccionados contra la proteína N y el RBD de Spike de la variante original (Wuhan-Hu-1) de SARS-CoV-2. La practicidad de la construcción de bibliotecas de Nb y su alta afinidad, estabilidad y facilidad de fusión a otros dominios proteicos los hacen ideales para ser incorporados en estos constructos.



Figura 1.9. Esquema de la estructura de los calibradores recombinantes quiméricos a producir y caracterizar en este proyecto. Ambos constan de un nanobody anti-Sars-CoV-2 fusionado a la región Fc de IgG1 humana. Uno de ellos es específico contra la proteína N y otro es específico contra RBD, ambas de la variante Wuhan-Hu-1. Imagen creada en BioRender [7].

1.3. Expresión recombinante en líneas celulares de mamífero

Si bien los Nb son expresados en general con éxito en sistemas procariotas [35], las quimeras Nb-Fc a producir son dímeros con un alto peso molecular (~90 kDa) y presentan un alto número de enlaces disulfuro en su conformación nativa, especialmente en la región Fc (4 enlaces intramoleculares v 2 intermoleculares para IgG1) [43], lo que acarrea dificultades para su expresión recombinante en procariotas. En primer lugar, proteínas con varios dominios y de alto peso molecular requieren asistencia de chaperonas y otras para un correcto plegamiento [44] y, dada la alta tasa de expresión recombinante de E. coli, se corre el riesgo de saturar sus mecanismos de asistencia al plegamiento y obtener agregados proteicos no funcionales. Por otro lado, en bacterias gram-negativas como E. coli los enlaces disulfuro proteicos estructurales se forman una vez que la proteína es translocada al periplasma, con ayuda de disulfuro-isomerasas [45]. En eucariotas, esto se da en el retículo endoplásmico de forma co-traduccional, también con ayuda de proteína disulfuro-isomerasas, entre otras [46]. La frecuencia de enlaces disulfuro estructurales en proteínas eucariotas secretadas parece ser aproximadamente 3 veces mayor en comparación a proteínas periplásmicas y secretadas de bacterias [47]. En ambos tipos de organismos hay proteínas citoplasmáticas con enlaces disulfuro pero estos suelen ser transitorios y estar involucrados en catálisis enzimática [45,46]. Si bien con la incorporación de un péptido señal para translocación al periplasma es posible la expresión recombinante en E. coli de proteínas con algunos enlaces disulfuro, como Nbs, a medida que aumenta el número de enlaces necesarios para un correcto plegamiento también se eleva la probabilidad -especialmente cuando la inducción de la expresión es fuerte- de obtener isoformas no nativas, no funcionales y con tendencia a la agregación y/o degradación [48]. Se han desarrollado cepas de E. coli capaces de catalizar la formación de enlaces disulfuro en proteínas recombinantes de localización citoplasmática [49]; también es posible expresar la proteína o quimera deseada con tags de fusión como tiorredoxinas o disulfuro-isomerasas que aumenten la probabilidad de formación de estos enlaces a nivel citoplasmático [48].

Teniendo en cuenta lo mencionado en el párrafo anterior, en general es preferible producir quimeras basadas en anticuerpos conteniendo regiones Fc en sistemas de expresión eucariota. En particular, las líneas celulares de mamíferos son ampliamente utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes eucariotas, algunas de ellas para fines terapéuticos, debido a su compleja maquinaria para efectuar modificaciones postraduccionales y a que sus patrones de glicosilaciones suelen ser idénticos a los encontrados en células humanas (lo cual es relevante para aplicaciones terapéuticas, donde es crucial una nula o baja inmunogenicidad) [50,51]. Las líneas celulares derivadas de HEK293 son, junto con la línea CHO y otras, las más utilizadas para la producción de anticuerpos monoclonales (aunque aquellos aprobados para aplicaciones terapéuticas no han sido producidos en HEK293) [52].

Una de las principales desventajas de las líneas celulares de mamíferos como sistema de expresión es la baja tasa de producción en comparación a otros sistemas como levaduras (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*) y procariotas (*E. coli*, *B. subtilis*) [53-55]. Por este motivo se han desarrollado varias estrategias para aumentar la tasa de expresión recombinante (Fig. 1.10). Entre ellas se incluyen la variación de la escala del cultivo, ingeniería genética (ej. generación de líneas celulares más productivas) y optimización de numerosas variables: codones, composición del medio de cultivo, método de transformación (transfección -sin uso de vectores virales- o transducción -uso de vectores virales-), y tipos de vector de expresión (elección de diferentes combinaciones de promotores y elementos reguladores) [56].



Figura 1.10. Esquema de los puntos principales de optimización para aumentar la expresión recombinante en líneas celulares de mamíferos (extraído de [57]). Entre ellos se encuentran la composición del medio de cultivo, el escalado, el método de transformación, la CDS de la proteína a expresar (optimización de codones) y los elementos del vector de expresión. En este proyecto se explora el último punto, evaluando el efecto de dos elementos reguladores en la expresión de los calibradores Nb-Fc.

En cuanto a la optimización del vector de expresión, distintos tipos de elementos postranscripcionales (regiones no traducidas en el extremo 5' o 3' del ARNm, intrones) han demostrado su potencial para aumentar la expresión génica en líneas celulares de mamíferos comúnmente utilizadas [58]. Dos elementos postranscripcionales empleados con relativa frecuencia son el intrón A de hCMV (citomegalovirus humano) y el elemento postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). Se ha reportado sobre ambos un aumento en la expresión de proteínas recombinantes en líneas derivadas de HEK293 y otras líneas celulares [56,58-62], aunque el efecto (pudiendo ser nulo, positivo o negativo) parece depender de la línea celular utilizada, así como del gen a expresar [58], y posiblemente de otras variables como el vector de expresión y el método de transformación. Además, puede o no haber un efecto sinérgico al combinarse dos o más elementos reguladores en un vector de expresión [58].

Se han planteado varios mecanismos por los cuales los intrones podrían aumentar la expresión génica: potenciación de la procesividad de la ARN polimerasa II, promoción de la interacción entre factores de transcripción y proteínas de splicing y/u otras, y facilitación del procesamiento del ARNm [57,58]. En particular, se ha observado que la probabilidad de que el intrón A de hCMV tenga un efecto potenciador en la expresión génica está vinculada a la presencia del promotor inmediato de citomegalovirus humano (pCMV), constitutivo y con acción mayormente independiente de factores celulares específicos [58]. No obstante, la presencia de estos dos elementos no garantiza un aumento en la expresión génica [57]. Por otro lado, WPRE parece actuar principalmente aumentando el largo de la cola poliA del ARNm [61,62]. La poliadenilación es crucial para la maduración, exportación y estabilidad del ARNm, habiendo relativo consenso en la literatura científica sobre la correlación positiva entre la longitud de la cola poliA y la estabilidad del ARNm. Sin embargo, más recientemente se han descubierto ARNms estables con colas poliA cortas y viceversa; asimismo, la poliadenilación no se da exclusivamente a nivel nuclear, sino que también puede ocurrir en el citoplasma, haciendo que la longitud de la cola poliA de un mismo ARNm pueda variar [63,64]. Esto podría explicar en parte que WPRE influya de manera variable en la expresión génica, visto que una mayor longitud de la cola poliA no garantiza una mayor estabilidad del ARNm.

En suma, la adición de elementos reguladores a un vector para líneas celulares de mamíferos tiene el potencial de aumentar la expresión recombinante, lo cual es de importancia dada la menor productividad de estas células. Por ende, en este proyecto se planteó evaluar la influencia del intrón A de hCMV y WPRE en la expresión de los calibradores Nb-Fc, utilizando una línea celular derivada de HEK293 como sistema de expresión.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

 Producir dos calibradores recombinantes quiméricos en base a Nbs contra la proteína de nucleocápside (N) y el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína Spike de Sars-CoV-2, variante Wuhan-Hu-1, e introducirlos en ensayos de serología COVID-19.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de dos elementos reguladores, el intrón A de hCMV y WPRE, en la expresión recombinante de los calibradores Nb-Fc, utilizando células HEK293-T como sistema de expresión
- Producir constructos Nb-Fc a mayor escala y purificarlos
- Caracterizar de forma general a los calibradores, determinando su peso molecular y afinidad, así como evaluando su estabilidad y reproducibilidad
- Incorporar el calibrador anti-RBD_{Wuhan} en un kit de ELISA para la cuantificación de IgG anti-RBD.
- Incorporar el calibrador anti-N en un ensayo de ELISA optimizado para la detección cualitativa de IgG anti-N.

3. Materiales

3.1. Buffers y soluciones

Las soluciones fueron preparadas en agua destilada a no ser que se indique lo contrario.

- Buffer fosfato salino (PBS) 1X: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO4 2mM, Na₂HPO4 10 mM, ph 7.4
- Sustrato para peroxidasa: TMB 0.096 mg/mL y H₂O₂ 0.004% en buffer acetato 100 mM, pH 5.5
- Buffer de interferencia para ensayos de estabilidad: Tris 1.0 M, NaCl 300 mM, EDTA 300 mM, BSA 1% m/v, pH 7.5
- Buffer FACS para citometría de flujo: PBS suplementado con BSA 0.1% m/v, NaN₃ 5 mM, HEPES 27 mM, EDTA 2 mM
- Soluciones para SDS-PAGE:
 - Buffer de carga 6X reductor: Tris-HCl 0.35 M, SDS 10% m/v, glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 175 μ M, DTT 0.1 M
 - Buffer de carga 6X no reductor: igual composición, sin DTT
 - Buffer de corrida 1X: Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% m/v
 - **Solución colorante:** azul de Coomassie R-250 1 g/L, ácido acético 7.5% v/v, metanol 5% v/v
 - Solución decolorante: ácido acético 7.5% v/v, metanol 5% v/v
- Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X: Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM en agua milli-Q, pH 8.
- Soluciones para IMAC:
 - Buffer de unión (buffer A): NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, pH 8.0, filtrado (tamaño de poro de 0.22 μm)
 - Buffer de elución (buffer B): NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, pH 8.0, filtrado (0.22 μ m)
- Soluciones para cromatografía de afinidad por Strep-Tactina:
 - Buffer de unión 1X: Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0, filtrado (0.22 μm)
 - **Buffer de elución:** buffer BXT (IBA-Lifesciences #2-1042-025) 1/10: Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, biotina 50 mM, pH 8.0, filtrado (0.22 μm)
- Soluciones para ensayos de interferometría de biocapa:
 - Buffer acetato: acetato de sodio 10 mM, pH 5.0
 - Kinetic Buffer (KB): PBS suplementado con BSA 0.1% m/v y Tween 0.02% v/v

3.2. Medios de cultivo y complementos asociados

Los medios fueron preparados en agua destilada a no ser que se indique lo contrario.

- Caldo de lisogenia (LB, Sigma-Aldrich #L3522): NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L
- LB-agar (Sigma-Aldrich #L3147): agar 15 g/L, NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L
- Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC): triptona 20 g/L (Sigma-Aldrich), extracto de levadura 5 g/L (Sigma-Aldrich), NaCl 0.5 g/L en agua milli-Q, pH 7.0. Luego de autoclavar se agrega MgCl₂ y glucosa a concentración final 10 mM y 20 mM respectivamente, a partir de soluciones stock esterilizadas por filtración.
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo: DMEM alta glucosa (Capricorn #DMEM-HA), SFB 10% v/v (esterilizado por filtración, inactivado), antibiótico-antimicótico 1X (penicilina G, estreptomicina y anfotericina B, dilución de stock 100X, Gibco #15240-062)
- PBS 1X estéril (Capricorn #PBS-1A)
- Tripsina 12 mg/mL en PBS 1X suplementado con EDTA 60 μ M, esterilizada por filtración

4. Métodos

4.1. Procedimientos Generales

4.1.1. Cultivo de E. coli

Los cultivos de E. coli fueron incubados, a excepción de indicación contraria, a 37°C y 250 RPM. Las concentraciones finales de antibióticos utilizados para suplementar los medios de cultivo y placas de agar fueron las siguientes: ampicilina 100 μ g/mL, kanamicina 50 μ g/mL, cloranfenicol 34 μ g/mL.

4.1.2. Transformación de E. coli

Se incubaron entre 30 y 50 µL de células electrocompetentes con 1 µL de ADN plasmídico durante 30-60 segundos; luego fueron transferidas a cubetas de 2 mm (Sigma-Aldrich) y electroporadas con el equipo MicroPulser™ (BIO-RAD). Inmediatamente se suplementó a las células con 1 mL de medio SOC y se las transfirió a un tubo de polipropileno (Deltalab #401402) para ser incubadas a 37°C y 250 RPM por 45-60 minutos. Luego fueron plaqueadas en LB-agar suplementado con los antibióticos correspondientes e incubadas a 37°C ON.

4.1.3. Extracción y purificación de ADN plasmídico

Se realizaron cultivos ON en LB suplementado con los antibióticos necesarios a partir de colonias aisladas. La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN #27104).

Este kit se basa en el método de lisis alcalina: las bacterias son lisadas de forma suave en presencia de NaOH, SDS y RNAsa (Buffers P1 y P2). El pH elevado provoca la desnaturalización proteica y del ADN, tanto plasmídico como genómico. Posteriormente, la adición de otra solución para neutralizar el pH y aumentar la fuerza iónica hace que el ADN genómico, asociado a fosfolípidos de membrana, y los complejos proteína-SDS precipiten. [65]. El ADN plasmídico se mantiene en solución, y puede separarse del agregado por centrifugación. La purificación del ADN se basa en un intercambio aniónico: las mini-columnas del kit contienen una resina de sílica con alta densidad de grupos DEAE (dietilaminoetanol) cargados positivamente [66] que interaccionan con los grupos fosfato del ADN desolvatados. Luego de lavar la columna utilizando una solución con alta concentración de etanol, el ADN plasmídico es eluido en buffer Tris 10 mM, pH 8.5, para permitir la hidratación del mismo y romper las interacciones DEAE-fosfato.

4.1.4. Digestión y purificación de ADN digerido

Se incubaron hasta 10 µg de ADN plasmídico con 5 unidades/µg ADN de la enzima de restricción correspondiente, en un buffer comercial 1X (se parte de un stock 10X) donde la actividad de la misma es óptima, según el fabricante. Para el volumen final de cada reacción se consideró mantener una concentración final de glicerol (proveniente de la enzima) menor al 5% v/v. En cuanto al tiempo y temperatura de digestión, así como inactivación, se siguieron, en general, las recomendaciones de los fabricantes. Las dobles digestiones se realizaron de forma secuencial (no se utilizaron dos enzimas de restricción en simultáneo).

Enzima	Fabricante	Sitio de corte	Buffer	Digestión	Inactivación
BamHl	Thermo Scientific	5'GIGATCC3' 3'CCTAG1G5'	Tango	1 h, 37°C	20 min, 80°C
Notl	NEB	5' GC IGGCCGC3' 3'CGCCGGt <mark>CG</mark> 5'	NEBuffer™ 3.1	1 h, 37°C	20 min, 65°C
Sacl	NEB	5' G IAGCTC3' 3'CTCGA1G5'	CutSmart	1 h, 37°C	20 min, 65°C
Sfil	NEB	5'GGCCNNNN INGGCC 3' 3'CCGGN†NNNNCCGG5'	CutSmart	16 hs, 50°C	
Xbal	NEB	5' T ICTAGA3' 3'AGATC 1T 5'	NEBuffer™ 2.1	1 h, 37°C	20 min, 65°C

 Tabla 4.1. Enzimas de restricción utilizadas y sus respectivas condiciones de digestión.

Para purificar ADN plasmídico digerido con un solo corte se utilizó el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN #28104). Para purificar fragmentos de ADN plasmídico digerido se realizaron electroforesis en gel de agarosa. Los geles se cortaron con bisturí sin uso previo, reservando la porción conteniendo el fragmento de ADN de interés, el cual se purificó utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN #28704). Ambos kits se basan en la adsorción del ADN a una resina de sílica en presencia de sales caotrópicas que promueven su desolvatación. Luego de los pasos de lavado necesarios, el ADN se eluye en un buffer de baja fuerza iónica que promueve su hidratación y, por tanto, la ruptura de las interacciones resina-ADN [66].

4.1.5. Electroforesis en gel de agarosa

Los geles se prepararon con una concentración de agarosa de 1% m/v en buffer TAE 1X. Para el preteñido, se agregó una cantidad adecuada de agente intercalante GelRed (Millipore #SCT122), stock 10000X, para una concentración final 1X. Para el post-teñido (en caso de haber problemas con el preteñido), se colocó el gel en buffer TAE 1X y se adicionó GelRed para una concentración final 3X. A las muestras se les agregó la cantidad correspondiente de buffer de carga 6X (Thermo Scientific #R0611) antes de ser sembradas. Se utilizó el MPM GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific #SM1331).

4.1.6. Desfosforilación y ligación

La desfosforilación de los vectores digeridos previo a la ligación se llevó a cabo mediante incubación con rSAP (fosfatasa alcalina recombinante de camarón, NEB #M0371S). Se siguieron las instrucciones del fabricante respecto a la incubación, inactivación y cantidad de enzima, así como cantidad de vector.

Tabla 4.2. Condiciones de desfosforilación. Para mayor/menor cantidad de ADN	se	escala
proporcionalmente la cantidad de rSAP.		

ADN	1 picomol de extremos*	
Buffer CutSmart 10X	Para concentración final 1X	
rSAP	1 unidad	
Incubación	30 min, 37°C**	
Inactivación	5 min, 65°C	

*Siguiendo las recomendaciones del fabricante, 1 picomol de extremos es equivalente a 1 μg de un plásmido linealizado de 3 kpb **[67]**.

**En casos de baja eficiencia de desfosforilación se aumentó el tiempo de incubación a 1 h.

La ligación se realizó mediante incubación del vector digerido e inserto con T4 ligasa (Thermo Scientific). Se siguieron las instrucciones del fabricante, con la salvedad de aumentar el tiempo de incubación dado que en dichas condiciones se ha observado una mejor eficiencia de ligación.

Vector linealizado	20-100 ng	
Inserto	Relación 1:5-1:10 vector:inserto (en moles)	
Buffer T4 10X	Para concentración final 1X	
T4 ligasa	1 unidad	
Incubación	30-60 min, 22°C	
Inactivación	5 min, 65°C	

Tabla 4.3.	Condiciones	de ligación.
------------	-------------	--------------

4.1.7. Secuenciación

Los vectores construidos fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Korea). Se analizaron los resultados con SnapGene Viewer.

4.1.8. Cuantificación de ADN y proteínas

Para cuantificar ADN y proteínas se midió absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente, utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para determinar la concentración de ADN se utilizó el coeficiente de absortividad 0.020 $(ng/\mu L)^{-1}cm^{-1}$; para las proteínas se utilizaron los coeficientes de absortividad molar estimados a partir de sus secuencias aminoacídicas mediante ProtParam [68].

4.1.9. SDS-PAGE

Para evaluar las purificaciones de proteínas se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida 12.5-15%, en condiciones reductoras -salvo indicación contraria- y en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). Previo a ser cargadas al gel, las muestras se incubaron en buffer de carga 6X (concentración final 1X) a 100°C por 5 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular Pierce Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific #26610). Los geles se tiñeron con solución colorante conteniendo azul de Coomassie.

4.1.10. Cultivo y pasaje de HEK293-T

Todos los cultivos se incubaron a 37°C en estufa de CO_2 (% CO_2 = 5%). La manipulación de los cultivos y preparación de medios de cultivo y suplementos se realizó en cabina de flujo vertical.

A partir de alícuotas de células a -80°C conteniendo DMSO (dimetilsulfóxido) como criopreservante se realizaron cultivos iniciales. Las alícuotas fueron descongeladas a 37°C e inmediatamente transferidas a un tubo Falcon conteniendo 10 mL de DMEM completo a temperatura ambiente o precalentado a 37°C. Esto se centrifugó a 300g por 5 minutos a 20°C con el objetivo de separar a las células lo antes posible del DMSO, pues resulta tóxico para las células una vez descongeladas. Se descartó el medio y las células se resuspendieron en 5 mL de DMEM completo para ser sembradas en una botella de cultivo T25 (Greiner). A partir de estos cultivos se realizaron pasajes a botellas T75 (Greiner, 15 mL de medio), y a partir de estas últimas a botellas T125 (Greiner, 30 mL de medio).

Para realizar pasajes a partir de un cultivo previo se descartó el medio de la botella y se lavó suavemente con 1/2 volumen (un volumen equivale a la cantidad final de medio de cultivo por botella) de PBS 1X estéril (Capricorn #PBS-1A) precalentado a 37°C. Luego, para desprender a las células del fondo de la botella, se adicionó 1/10 volumen de tripsina 12 mg/mL-EDTA 60 μ M en PBS 1X precalentado a 37°C y se llevó la botella a una estufa de CO₂ por 2-3 minutos. Se adicionó inmediatamente la cantidad de DMEM completo necesaria para diluir 1/10 a la solución de tripsina; las células fueron resuspendidas por pipeteo y transferidas a un tubo Falcon. En caso de haber sido necesario, se realizó un conteo de células en cámara de Neubauer, a partir de una dilución 1/10 de la resuspensión en PBS 1X conteniendo azul de tripán. Se colocó el volumen adecuado de células resuspendidas en botellas conteniendo el volumen necesario de DMEM completo. Para pasajes a botellas T75 se sembraron entre 5 y 10 millones de células, mientras que para pasajes a botellas T125 se sembraron entre 15 y 20 millones de células.

4.1.11. Transfección de HEK293-T

Se transfectaron cultivos de HEK293-T con una confluencia de 70-90%, utilizando 36 µg de ADN por botella grande para expresión a gran escala o 2 µg por pocillo en placas de 6 pocillos (Greiner #657160) para pruebas de transfección. A excepción de los ensayos de optimización de transfección, se utilizó PEI MAX (Polysciences #24765-1), stock 1 mg/mL, pH 7.0, como agente transfectante en una relación 5:1 μ g_{PEI}: μ g_{ADN}.

Se diluyeron el stock de PEI 1/12 y el ADN 1/55 en DMEM completo, por separado, en tubos de polipropileno estériles (Deltalab #401402). No se utilizó DMEM completo para el paso anterior dado que el SFB interfiere con la formación de complejos PEI-ADN. Adicionalmente, el SFB contiene nucleasas, algunas de ellas resistentes a inactivación térmica (56°C por 30 minutos) [69,70]. Se transfirió el PEI diluido a los tubos con ADN; la mezcla se homogeneizó en un agitador vórtex por 30 segundos y fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir la formación de complejos PEI-ADN. Luego se descartó el medio de los pocillos o botellas conteniendo las células a transfectar y, previo a la adición suave de la mezcla de PEI-ADN, se les colocó la cantidad necesaria de DMEM completo para un volumen final estándar. El ADN en complejo con PEI está protegido contra degradación por nucleasas [56], por lo que para el paso anterior no es necesario utilizar DMEM incompleto. Se homogeneizó el contenido de forma suave y se incubaron las células al menos 4 hs a 37°C antes de realizar un cambio de medio (DMEM completo). Se recolectó el medio luego de 48-72 hs. En expresiones a gran escala, se realizó un recambio de medio y una segunda recolección.

4.1.12. ELISA

Estos ensayos se realizaron utilizando el antígeno correspondiente para la sensibilización, a excepción de indicación contraria, en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One #655061) o en placas previamente bloqueadas y sensibilizadas del kit QUANT-ELISA (ATGEN). Para el primer caso, a no ser que se indique lo contrario, los ensayos se realizaron de la siguiente forma:

- 1) Sensibilización: 100 μL de antígeno (concentración de 1-2 $\mu g/mL)\,$ en PBS 1X a 37°C por 1 h o a 4°C ON
- Bloqueo: 200 µL de PBS-BSA 1% a 37°C por 45 minutos; 5 lavados con PBS-Tween 0.05%
- Incubación con calibradores: 100 µL de diluciones seriadas en PBS-BSA 0.1% por 1h a RT y con agitación a 450 RPM; 6 lavados con PBS-Tween 0.05% Alternativamente, incubación con muestras: se detalla en la sección 4.5
- Incubación con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa: 100 μL de dilución adecuada en PBS-BSA 1%-Tween 0.05% por 45 minutos a RT y con agitación a 450 RPM; 6 lavados con PBS-Tween 0.05%
- 5) Revelado: 100 μ L de sustrato para peroxidasa, incubación por 8-10 minutos a temperatura ambiente, con agitación a 450 RPM; se frena la reacción adicionando 50 μ L de H₂SO₄ 2 N

La lectura de placas se realizó en el equipo FLUOstar OPTIMA, registrando absorbancia a 450 nm, con corrección por absorbancia a 620 nm.

Para las curvas de titulación o diluciones seriadas los datos fueron ajustados a una función sigmoide de tipo dosis-respuesta, detallada a continuación:

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{-p \log(x0/x)}}$$

Los parámetros de esta ecuación corresponden a la asíntota inferior (A1), asíntota superior (A2), pendiente de Hill (p), y centro (x0).

4.1.13. Procesamiento de datos

Para obtener parámetros numéricos y generar gráficos, regresiones lineales y no lineales se utilizaron los programas OriginPro 9.8.5.204.

Para analizar resultados de citometría de flujo se utilizó el programa FlowJo.

Las imágenes mostrando alineamientos de secuencias se generaron con SnapGene Viewer.

4.2. Expresión y purificación de la proteína de nucleocápside (NΔ121)

4.2.1. Expresión en BL21(DE3)-pBir

Para la expresión de la proteína de nucleocápside, referida como **NΔ121**, se utilizó la cepa BL21(DE3)-pBir, la cual posee el vector pCY216 que le confiere resistencia a cloranfenicol y permite la expresión de la enzima BirA (biotina ligasa) en presencia de arabinosa. Se transformaron células BL21(DE3)-pBir con el vector pET28a(+)-NΔ121, que confiere resistencia a kanamicina y contiene la CDS de una versión truncada de la proteína de nucleocápside del SARS-CoV-2 (carece de los primeros 121 residuos del extremo N-terminal), seguida del péptido AviTag[™] (GLNDIFEAQKIEWHE) y un HisTag (Fig. 4.1). El péptido AviTag es biotinilado de forma sitio-específica por BirA sobre el residuo de lisina. Si bien a efectos de este trabajo la biotinilación de esta proteína no es necesaria, funciona como un tag para su detección o inmovilización, lo cual resulta útil para líneas de trabajo de otros integrantes del laboratorio.

Luego de la transformación de BL21(DE3)-pBir con pET28a(+)-N Δ 121, se inocularon precultivos LB-cloranfenicol-kanamicina a partir de colonias aisladas y se incubaron a 37°C ON. A partir de ellos se realizó una dilución 1/100 en 3 matraces de 2 L con 200 mL de LB-cloranfenicol-kanamicina suplementado con arabinosa 4% m/v en cada uno. Se adicionó IPTG para una concentración final de 100 μ M cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0.6-0.7 y se los incubó ON a 28°C.



Figura 4.1. Vector utilizado para la expresión de la proteína NΔ121.

En la Fig. 4.1 se observa el vector pET28a(+)-N Δ 121. El mismo contiene un promotor constitutivo reconocido por la ARN polimerasa del fago T7 para la expresión de la proteína N Δ 121. Entre el promotor T7 y la secuencia de unión a ribosoma (RBS en la Fig. 4.1) se encuentra el operador lac; a esto se le denomina promotor T7*lac*. La cepa BL21(DE3) contiene en su genoma el gen codificante de la ARN polimerasa de T7, cuya expresión está controlada por el promotor lacUV5 y el operador lac. En ausencia de un inductor, el represor lacl -codificado tanto en el vector como en el genoma de *E. coli*- se une al operador lac, lo que impide la expresión de T7 y, por consecuencia, de la proteína N Δ 121. Además, la expresión de esta última también está bajo el control del operador lac (se encuentra río arriba de la CDS de dicha proteína). La adición de IPTG, un análogo no hidrolizable de la lactosa, permite la expresión de T7 y, en consecuencia, de la proteína codificada en el vector. Este inductor se une al represor lacl, disminuyendo fuertemente su afinidad por el operador lac.



Figura 4.2. Esquema del sistema de regulación de la expresión en sistemas pET con promotor T7lac. Imagen extraída y modificada de pET System Manual, 11th ed [71].

4.2.2. Purificación de NΔ121 por IMAC

Se centrifugaron los cultivos a 5000g por 20 minutos para sedimentar las células, las cuales fueron resuspendidas en 200 mL de buffer de lisis (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 500 mM, PMSF 170 µg/mL, biotina 1 mM, pH 8.0). Se realizaron dos ciclos de sonicación (15 minutos, pulso de 30 ms, 80% de potencia) utilizando el sonicador Omni-Ruptor 4000 (Omni International), luego se suplementó al lisado con RNAsa A para una concentración final de 10 µg/mL y se incubó a 37°C por 2 h para promover la biotinilación (este paso es necesario porque la reacción in vivo tiene baja eficiencia). Posteriormente fue centrifugado a 30000g por 30 minutos para eliminar restos celulares y el sobrenadante fue filtrado (0.22 µm).

La purificación se realizó en mesada utilizando una columna con 2 mL de resina Ni-NTA sin empaquetar. Luego de lavar y equilibrar la columna con, mínimamente, 5 volúmenes de agua milliQ (filtrada 0.22 µm) y 5 volúmenes de buffer A, respectivamente, se procedió a sembrar el sobrenadante. Se realizaron varios lavados, cada uno de ellos con 5 volúmenes de columna y diferentes concentraciones de buffer B: 0%, 5%, 10% y 50% v/v. Las fracciones conteniendo buffer B fueron dializadas en PBS (con [NaCI] = 500 mM en lugar de 137 mM), con un cambio de buffer a las 24 hs. La alta fuerza iónica elegida tanto para el buffer de lisis como para los buffers de purificación y de diálisis se debe a que en purificaciones previas la proteína N precipitó; esto fue corregido al aumentar la fuerza iónica de los buffers. Se evaluó el eluido y otras fracciones de interés por SDS-PAGE y se cuantificó la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Luego de dializadas, las fracciones fueron suplementadas con la cantidad adecuada de cóctel de inhibidores de proteasas cOmplete (Roche #11697498001) para concentración final 1X, ya que en producciones anteriores se ha visto que esta proteína es muy sensible a proteólisis, y almacenadas a -20°C.

4.2.3. Purificación de N∆121 por gel-filtración

Para obtener la proteína en alta pureza se realizó una gel filtración utilizando el equipo AKTA *purification system* (GE Healthcare) y la columna Superose 12 HR 10/30 (Cytiva #17-0538-01). Previamente la proteína N Δ 121 purificada por IMAC se concentró utilizando un tubo concentrador Vivaspin (Sartorius AG #VS15T01), mediante sucesivas rondas de centrifugación a 4000g por 30 minutos, debido al volumen máximo de siembra de la columna (250 µL) como principal limitante. Se lavó y equilibró la columna con 5 volúmenes de agua milliQ y 5 volúmenes de PBS ([NaCI] = 500 mM), respectivamente. La presencia de proteína fue monitoreada continuamente registrando absorbancia a 280 nm. Se sembró la proteína concentrada y se recolectó el pico de mayor magnitud, correspondiente a la forma oligomérica, el cual fue evaluado por SDS-PAGE. Luego de la cuantificación, se suplementó a la proteína nuevamente con una solución del cóctel de inhibidor de proteasas cOmplete (Roche #11697498001) para una concentración final 1X. Las alícuotas fueron almacenadas a -20°C.

4.3. Expresión y purificación de los calibradores Nb-Fc

4.3.1. Construcción y purificación de vectores pCDNA 3.1(+) para expresión recombinante en HEK293-T

Las CDS de los Nb utilizadas en la construcción de los vectores fueron cedidas amablemente por Paula Segovia y Macarena Pírez, quienes seleccionaron Nb contra la proteína N y el RBD (dominio de unión al receptor de la proteína Spike) de la variante original (Wuhan-Hu-1) de SARS-CoV-2, respectivamente. Los nanobodies anti-N y anti-RBD utilizados en la construcción de las quimeras, compuestas por un nanobody fusionado a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana, se denominaron H4 y H8 respectivamente, por lo que los calibradores respectivos fueron nombrados H4-Fc y H8-Fc.

A partir del vector pcDNA 3.1(+) mostrado en la Fig. 4.3 se generaron 4 vectores de expresión para evaluar la influencia de dos elementos reguladores, el WPRE y el intrón A de hCMV, en la expresión del calibrador anti-N.



Figura 4.3. Vector de expresión de partida a modificar para la expresión de los calibradores Nb-Fc.

El vector pcDNA 3.1(+) de partida a modificar contiene, en orden, las CDS de: un péptido señal para secreción al medio extracelular, un Nb irrelevante, los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana, un sitio de corte para enteroquinasa y, además, un HisTag y un Twin-Strep-Tag. Se observan también los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas. Este vector pCDNA 3.1(+) está diseñado para expresión transitoria de proteínas recombinantes en líneas celulares de mamíferos [72]. Cuenta con un promotor constitutivo, además de un potenciador río arriba, ambos derivados de hCMV (en la Fig. 4.3: *CMV promoter* y *CMV enhancer*, respectivamente). El origen SV40 posibilita su replicación episomal en líneas celulares que expresen el antígeno T de SV40,como la línea HEK293-T [73], mientras que el origen pUC permite obtener un alto número de copias de este plásmido en bacterias. A estas últimas les confiere resistencia a ampicilina para su selección [72].

Además del vector pCDNA 3.1(+) de partida se contó con dos vectores pUC57, cada uno conteniendo uno de los elementos reguladores a evaluar (intrón A de hCMV y WPRE), provistos por la empresa General Biosystems. Los vectores pUC57 otorgan resistencia a ampicilina, a la vez que su origen posibilita una alta tasa de replicación en bacterias [74].

Para el primer clonado se amplificó por PCR la CDS del Nb H4; el amplicón generado fue purificado y digerido con Sfil y se ligó al vector pcDNA 3.1(+) de partida, previamente digerido con Sfil y desfosforilado. El vector generado se denominó pcDNA 3.1(+)-H4-Fc (*vector 1*), con el cual se transformaron células de *E. coli* DH5 α y a partir de colonias aisladas se realizaron cultivos ON para la purificación del ADN plasmídico por miniprep (ver sección 4.1.3). Para confirmar la correcta integración del gen del Nb de interés el ADN plasmídico purificado fue secuenciado por la empresa Macrogen.

A partir del vector 1 se generaron tres vectores adicionales: el pCDNA 3.1(+)-H4-Fc-WPRE (vector 2), el pCDNA 3.1(+)-I-H4-Fc (vector 3) y el pCDNA 3.1(+)-I-H4-Fc-WPRE (vector 4), cada uno conteniendo, respectivamente, el WPRE, el intrón A de hCMV, y ambos elementos reguladores. Se amplificaron de igual forma que el vector 1 (extracción de ADN plasmídico a partir de cultivos de colonias DH5 α transformadas), y también fueron secuenciados. Las condiciones de digestión y sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas se detallan en la sección 4.1.4. A continuación se muestra un esquema de los pasos realizados para la obtención de estos vectores.



Figura 4.4. Pasos para la obtención de los 4 vectores de expresión del calibrador H4-Fc a fin de evaluar el efecto del intrón A de hCMV y WPRE como elementos potenciadores. Imagen creada con BioRender [7]. Verde, CDS del calibrador H4-Fc incluyendo tags y señales; rojo, intrón A de hCMV; azul, WPRE.

*Previo a realizar una ligación el vector digerido se encuentra desfosforilado.

Para la expresión a mayor escala tanto del calibrador H4-Fc (anti-N) como del calibrador H8-Fc (anti-RBD), se seleccionó el vector que dió mejor resultado durante las pruebas de transfección (donde se evaluó la producción del calibrador H4-Fc) como punto de partida. Este fue el **vector 3**, conteniendo el intrón A de hCMV, el cual fue digerido con Sfil y desfosforilado para realizar el clonado de la CDS (previamente amplificada y digerida con Sfil) del nanobody H8. La amplificación, purificación y confirmación de resultados se realizó de igual forma que para los demás vectores. En la Fig. 4.5 se muestra un esquema de los vectores utilizados para la expresión a mayor escala de ambos calibradores.



Figura 4.5. Esquema representativo de los vectores pCDNA 3.1(+) utilizados para la expresión a gran escala de los calibradores Nb-Fc; notar la inclusión del intrón A de hCMV como elemento potenciador. Solo se muestran los componentes relevantes a la expresión de los mismos; ver Fig. 4.3 para un esquema más detallado.

4.3.2. Optimización de transfección y evaluación de elementos reguladores

Previo a evaluar la influencia de los elementos reguladores mencionados (WPRE e intrón A de hCMV), se evaluaron distintas condiciones de transfección a fin de elegir el formato más eficiente. Se transfectaron células HEK293-T en placas de cultivo de 6 pocillos con el vector pSyn-GFP para expresión citoplasmática constitutiva de la proteína GFP, lo cual permite evaluar la tasa de células transfectadas por citometría de flujo: se registra la fluorescencia en el rango de 500-560 nm, dentro del cual emite la GFP (pico a los 507-510 nm, hombro amplio a los 545 nm) [75]. Se utilizaron dos tipos de PEI como agente transfectante: PEI MAX (Polysciences #24765-1), polímero lineal de 40 kDa, y BPEI (Sigma-Aldrich #408727), polímero ramificado de 25 kDa. Para BPEI se utilizó una relación $\mu g_{PF}:\mu g_{ADN}$ de 5:1, preparando un stock de 1 mg/mL a pH 11.0 (estas condiciones fueron previamente determinadas como óptimas por otros integrantes del laboratorio). Para PEI MAX se utilizaron dos relaciones μg_{PE} : μg_{ADN} (5:1 y 10:1), y se prepararon dos stocks, uno a pH 7.0 y otro a pH 3.0, según recomendaciones del fabricante. Se incluyó un control negativo en el cual no se utilizó ningún agente transfectante durante la incubación con ADN. Transcurridas 48 hs desde la finalización de la transfección, las células fueron tripsinizadas, centrifugadas a 300g por 5 minutos a 4°C y resuspendidas en buffer FACS para ser inyectadas en el citómetro BD FACSCalibur (BD Biosciences). Se realizó un conteo de 30000 células para cada muestra, registrando fluorescencia entre 500-560 nm.

Para evaluar el efecto de WPRE y el intron A de hCMV como potenciadores de la expresión de los calibradores Nb-Fc se realizaron en distintos días 3 pruebas de transfección independientes en placas de 6 pocillos, utilizando los 4 vectores de expresión generados anteriormente para la producción del calibrador H4-Fc, más un control negativo (incubación con agente transfectante en ausencia de ADN). Se recolectó el medio de cultivo de cada pocillo 48 hs después de finalizada la transfección. Estos se centrifugaron a 300g por 5 minutos a temperatura ambiente para sedimentar las células que pudieron haberse desprendido de la botella; los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C hasta su uso. Mediante ELISA se evaluó la concentración del calibrador H4-Fc en los sobrenadantes, realizando curvas de titulación a partir de diluciones seriadas. Se realizaron ensayos en formato indirecto (sensibilización con la proteína N Δ 121, 2 µg/mL) y en formato sándwich (sensibilización con lg policional de conejo anti-IgG humana, 2 µg/mL). Se utilizó un conjugado HPO-Ig policional de cabra anti-Fc de IgG humana como anticuerpo secundario (Abcam #ab97225) diluido 1/10000. El protocolo general para ELISA está detallado en la sección 4.1.

4.3.3. Escalado de producción

Se transfectaron células HEK293T en botellas T125 según el protocolo descrito en la sección 4.1.11; el medio fue recolectado cada 48 hs durante 4 días y centrifugado a 300g por 5 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta el momento de la purificación.

4.3.4. Purificación por cromatografía de afinidad

Los calibradores se purificaron por cromatografía de afinidad usando una columna preempaquetada StrepTrapXT (Cytiva #29401317) en el equipo AKTA *purification system* (GE Healthcare). La resina de esta columna contiene un tipo de estreptavidina modificada, denominada Streptactina, con alta afinidad por el Twin-Strep-Tag (rango picomolar) **[76]**, el cual está presente en el extremo C-terminal de ambos calibradores.

Se agregó buffer de unión 5X a los sobrenadantes para una concentración final 1X. Éstos fueron filtrados (0.22 µm) y sembrados en la columna previamente lavada y equilibrada con 5 volúmenes de agua milliQ (filtrada 0.22 µm) y 5 volúmenes de buffer de unión, respectivamente. La presencia de proteína fue monitoreada continuamente registrando absorbancia a 280 nm. Luego de sembrar los sobrenadantes, se lavó la columna hasta que la absorbancia se estabilizó y mantuvo constante. Se inyectaron entre 6 y 7 mL de buffer de elución; el pico de elución fue recolectado y dializado en PBS, con un cambio de buffer a las 24 hs. Se evaluó el eluido y otras fracciones de interés por SDS-PAGE y se cuantificó la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Las alícuotas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su uso.

4.4. Caracterización por gel-filtración y espectrometría de masas MALDI-TOF

4.4.1. Gel-filtración

Se realizó una curva de calibración con varios estándares de peso molecular, detallados en la tabla 4.4, a fin de poder estimar el peso molecular de los calibradores. Asimismo, también se evaluó la presencia de agregados e impurezas. Se lavó y equilibró la columna Superose 12 HR 10/30 (Cytiva #17-0538-01) con 5 volúmenes de agua milliQ y 5 volúmenes de PBS, respectivamente (ambos filtrados 0.22 μ m). Los estándares se diluyeron en PBS conteniendo azul dextrano y se filtraron previo a ser inyectados en la columna. Se evitó diluir en conjunto estándares con peso molecular similar. Se sembraron alícuotas previamente filtradas (0.22 μ m) de los calibradores Nb-Fc de forma directa. La construcción de la curva de calibración se basó en el coeficiente de distribución K_{av}, definido de la siguiente forma:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

 V_e es el volumen de elución, V_t es el volumen total de la columna y V_0 es el volumen de exclusión de la columna, que equivale al volumen de elución del azul dextrano debido a su gran peso molecular.

 K_{av} se grafica en función del log(PM) de los estándares, y los valores de K_{av} de las proteínas de interés se pueden interpolar en la curva para estimar los correspondientes pesos moleculares.

Estándar	Peso molecular (kDa)
Azul Dextrano	2000
Ferritina	440
Aldolasa	160
Ovoalbúmina	45
Ribonucleasa A	13.7

Tabla 4.4. Estándares de peso molecular utilizados para la curva de calibración por gel filtración.

4.4.2. Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Se preparó una matriz de ácido sinapínico 0.1% m/v utilizando como diluyente una solución 1:1 de acetonitrilo y ácido trifluoroacético 1% v/v en agua destilada. Los calibradores se diluyeron 1/10 en el mismo diluyente y se mezclaron en proporción 1:1 con la matriz sobre parafilm. Lo mismo se hizo con una solución calibradora compuesta por varias proteínas de peso molecular conocido, a fin de calibrar el espectrómetro MALDI-TOF. Las mezclas se depositaron en una placa de MALDI y luego de que cristalizaron la placa fue introducida al equipo MALDI-TOF MIcroflex LRF (Bruker), utilizando una intensidad de láser de 30% y un rango m/z de 25 a 225 kDa. El equipo se calibró con el cristalizado de proteínas estándares y luego se tomaron espectros para cada calibrador. Se generó un promedio de 5 espectros por calibrador.

4.5. Evaluación de afinidad y funcionalidad: ELISA e interferometría de biocapa

Se evaluó la afinidad de cada calibrador Nb-Fc por sus respectivos antígenos, y también se compararon dichas afinidades con aquellas de los nanobodies H4 y H8 (producidos y cedidos amablemente por Paula Segovia y Macarena Pírez, respectivamente). Estos nanobodies fueron previamente biotinilados de forma sitio-específica (cuentan con un péptido Avi-Tag en su región C-terminal).

4.5.1. Funcionalidad en ELISA

Se realizaron curvas de titulación para comparar el comportamiento de los calibradores y sus respectivos nanobodies en ELISAs. Para ello, fue necesario utilizar un anticuerpo secundario específico para un tag presente tanto en los nanobodies como en los calibradores Nb-Fc: el único tag en común entre ellos es el HisTag, por lo que se utilizó un anticuerpo secundario anti-His. Para comparar a H4 y H4-Fc se utilizó la proteína N full-length como antígeno debido a que la proteína NΔ121 contiene un HisTag no clivable. Para comparar a H8 y H8-Fc se utilizaron tiras del kit QUANT-ELISA (ATGen) sensibilizadas con RBD_{Wuhan}, debido a la baja cantidad de RBD_{Wuhan} en solución como limitante. Por último, se evaluó la reactividad cruzada de H8-Fc por RBD_{Omicron} y se la comparó con la correspondiente a RBD_{Wuhan}. Las proteínas N full length, RBD_{Wuhan} y RBD_{Omicron} fueron cedidas por el Institut Pasteur de Montevideo en el marco del proyecto "Desafío COVID" de 2020. En la tabla 4.5 se detallan las condiciones utilizadas para los ELISAs realizados. Aquellas no especificadas son iguales a las descritas en la sección 4.1.12.

 Tabla 4.5. Condiciones específicas para ELISAs realizados a fin de evaluar la afinidad de los calibradores por sus respectivos antígenos.

Proteínas evaluadas	Sensibilización	Anticuerpo secundario	
H4-Fc vs H4	N full-length, 2 μg/mL	Anti-HisTag-HPO (GenScript #A00612) 1/2000	
H8-Ec	RBD _{Omicron} , 1.5 µg/mL, 4°C ON*	Anti-IgG Fc-HPO (Abcam	
	RBD _{Wuhan} , 1.5 μg/mL, 4°C ON	#ab97225) 1/10000	
H8-Fc vs H8-Bt	Utilización de tiras del kit QUANT-ELISA** por escasez de antígeno	Anti-HisTag-HPO (GenScript #A00612) 1/2000	

*Señal nula al sensibilizar a 37°C.

**Se siguió el protocolo general descrito en la sección 4.1. No se utilizaron reactivos del kit.

4.5.2. Interferometría de biocapa

Los ensayos de interferometría de biocapa se realizaron en el equipo BLItz[™] (ForteBio #CA89413-822). Este tipo de ensayo se basa en el análisis de patrones de interferencia de luz blanca generados por la capa de macromoléculas en contacto directo (inmovilizadas) o indirecto (unidas a las anteriores) con el biosensor. Al incidir el haz de luz sobre el extremo del sensor, es reflejado tanto por la interfase sensor-biocapa como por la interfase biocapa-líquido. Como el patrón de interferencia depende del espesor de la biocapa, hay una diferencia entre los patrones producidos por un biosensor cargado (con proteína inmovilizada) al ser expuesto a una solución blanco en comparación a una solución portando la muestra de interés [77]. Esta diferencia se utiliza para obtener constantes cinéticas y termodinámicas de los procesos de asociación y disociación.

Se utilizaron sensores AR2G (ForteBio #CA89413-844) para inmovilización covalente y sensores de estreptavidina (ForteBio #CA89413-842) para inmovilización no covalente. Estos últimos se basan en la altísima afinidad entre la estreptavidina y la biotina (K_D en el orden de 10⁻¹³ M) **[78]**. Por otro lado, la inmovilización en sensores AR2G se basa en la formación de enlaces amida mediante la reacción entre grupos amino proteicos y ésteres de sulfo-NHS, los cuales se forman incubando el sensor, que presenta grupos carboxilato, en una solución conteniendo sulfo-NHS y EDC. Si bien se podrían lograr enlaces amida utilizando solamente EDC, el aducto resultante de la reacción entre EDC y los grupos carboxilato del biosensor es muy reactivo, lo que lo hace más susceptible a hidrólisis: gran parte de los aductos se pierden antes de incubar el biosensor activado con la proteína a inmovilizar, reduciendo la eficacia del proceso. Los ésteres de sulfo-NHS son menos reactivos, lo que resulta en una inmovilización más eficaz **[79]**.



Figura 4.6. Mecanismo de activación de sensores AR2G para inmovilización de proteínas. Extraído de [79].

Se utilizaron entre 4 y 5 sensores para cada proteína inmovilizada, los cuales fueron incubados en soluciones con diferente concentración de antígeno o calibrador, según el caso, para poder obtener una mejor estimación de los parámetros cinéticos y termodinámicos. Los cálculos se realizaron con el software BLItz Pro[™], realizando un ajuste global para los cursos temporales correspondientes a diferentes concentraciones de una misma proteína en solución. Se utilizó un modelo de unión 1:1 no cooperativo, derivando las constantes cinéticas y termodinámicas mediante las ecuaciones listadas a continuación:

$$Y = Y0 + A(1 - e^{tk_{obs}})$$
 (Cinética de asociación)

 $Y = Y0 + Ae^{tk_d})$

(Cinética de disociación)

$$k_{a} = \frac{k_{obs} - k_{d}}{[Analito]} \qquad \qquad K_{D} = \frac{k_{d}}{k_{a}}$$

Y refiere al porcentaje de analito en solución unido, Y0 refiere al mismo porcentaje al inicio del curso temporal, A es un valor asintótico, t es el tiempo, k_{obs} refiere a la constante cinética *observada* de asociación, k_s refiere a la constante cinética de disociación, y K_D a la constante termodinámica de disociación.

Las constantes obtenidas se detallan en la tabla 4.6. Los protocolos utilizados para ambos tipos de biosensores se detallan a continuación:

Sensores AR2G

Hidratación: 10 minutos en H₂O

- 1) Blanco: 400 µL H₂O, 30 seg
- 2) Activación: 4 µL EDC 0.1 M + NHS 0.05 M en buffer acetato 10 mM, pH 5.0, 5 min
- 3) Blanco: 400 μL H₂O, 30 seg
- Inmovilización: 4 μL proteína (concentración >100 μg/mL) en buffer acetato, 10 min
- 5) Bloqueo: 400 µL etanolamina 1 M, pH 9.0, 5 min
- 6) Blanco: 400 µL Kinetic Buffer, 30 seg
- Asociación: 4 µL proteína correspondiente en Kinetic Buffer, 120 seg
- 8) Disociación: 400 µL Kinetic Buffer, 120 seg

Sensores de estreptavidina

Hidratación: 10 minutos en H₂O

- 1) Blanco: 400 µL Kinetic Buffer, 30 seg
- Inmovilización: 4 μL proteína biotinilada (concentración >100 μg/mL) en Kinetic Buffer, x tiempo
- 3) Blanco: 400 µL Kinetic Buffer, 30 seg
- Asociación: 4 µL proteína correspondiente en Kinetic Buffer, 120 seg
- Disociación: 400 µL Kinetic Buffer, 120 seg

Proteína inmovilizada	Tipo de biosensor	Proteína en solución	Rango de concentraciones (nM)
NΔ121	AR2G	H4-Fc	50-400
	4020	RBD _{Omicron}	100-300
H0-FC	ARZG	RBD_Wuhan	25-300
LIQ	Fotroptoviding	RBD _{Omicron}	75-300
ПО		RBD_Wuhan	40-240

 Tabla 4.6. Proteínas inmovilizadas y rango de concentración de las proteínas correspondientes en solución.

4.5.3. Ensayos de estabilidad

Utilizando viales de vidrio se realizaron diluciones seriadas al ½ de ambos calibradores, abarcando desde ~1.77 nM a ~0.8 pM para H4-Fc y desde ~0.72 nM a ~5 pM para H8-Fc. Las diluciones se realizaron en una solución estabilizante y fueron incubadas a 37 y 4°C, y evaluadas mediante ELISA cada 7 días aproximadamente. Se realizó una curva a tiempo 0 previa a las incubaciones, así como una curva a partir de stocks concentrados almacenados a 4°C como control en cada ELISA subsecuente. Debido a la cantidad de antígeno como limitante, las curvas de H8-Fc se realizaron con una menor cantidad de puntos y la sensibilización se realizó con RBD_{Wuhan} a una concentración de 1 µg/mL, mientras que para las curvas de H4-Fc se sensibilizaron los pocillos con N Δ 121 2 ug/mL. La solución estabilizante elegida se basó parcialmente en resultados previos del laboratorio y consta de una dilución de buffer de interferencia (ver sección 3.1) 1/10 en PBS con algunos suplementos. Su composición es la siguiente: BSA 0.1% m/v, EDTA 30 mM, Tris 100 mM, NaCl 30 mM, NaN₃ 0.05%, PMSF 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasas cOmplete (Roche #11697498001) 1X en PBS, pH 7.4.

4.6. Incorporación de los calibradores Nb-Fc a inmunoensayos

4.6.1. Cuantificación de IgG anti-RBD en suero

Para la cuantificación de IgG anti-RBD en suero se utilizó el kit QUANT-ELISA (ATGen), que incluye tiras previamente sensibilizadas con RBD_{Wuhan} y bloqueadas, diluyente de muestras, conjugado enzimático, solución de revelado, solución de frenado y solución de lavado 25X. Se siguieron en general las instrucciones del fabricante. Utilizando un estándar internacional designado por la OMS (NIBSC 20/136) para cuantificación de IgG anti-RBD en BAU/mL (una unidad de título de anticuerpos), primeramente se estableció una correlación entre la cuantificación con dicho estándar y la cuantificación con el calibrador H8-Fc (utilizando nM como unidad arbitraria). Una vez demostrada la correlación, se realizó un ensayo para calcular el título del calibrador H8-Fc en BAU/mL a partir del estándar internacional. En todos los casos las cuantificaciones se realizaron por interpolación. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Dilución 1/100 o 1/5000 de sueros positivos (provenientes de personas vacunadas) y 1/100 de sueros negativos (obtenidos antes de 2019) por duplicado y/o dilución seriada del calibrador H8-Fc y del estándar internacional por triplicado en diluyente de muestras. Incubación a 37°C por 30 minutos; 6 lavados con PBS-Tween 0.05%
- Incubación con el conjugado enzimático, 37°C por 30 minutos; 6 lavados con PBS-Tween 0.05%
- Incubación con solución de revelado por 20 minutos a RT; se frena la reacción adicionando 50 μL de H₂SO₄ 2 N.

4.6.2. Detección cualitativa de IgG anti-N en suero

Dado que al momento de la realización de este trabajo no se contaba con un estándar internacional para cuantificación de IgG anti-N, se optó por incorporar el calibrador H4-Fc a un ensayo cualitativo. Se partió de condiciones previamente optimizadas, compartidas amablemente por el Dr. Gustavo Mourglia. Primero se realizó un ELISA con pocas muestras para evaluar dos diluyentes de muestras (diluyente del kit QUANT-ELISA versus suero normal de cabra 5% en PBS-BSA 1%-Tween 0.2%). Se realizó un segundo ELISA con un mayor número de muestras, incluyendo curvas de H4-Fc por duplicado para la normalización y utilizando el diluyente que dió mejor resultado. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

- 1) Sensibilización con proteína NΔ121, 1µg/mL en PBS, ON a 4°C
- 2) Bloqueo con PBS-BSA 1%, 1 h a RT; 5 lavados con PBS-Tween 0.2%
- Dilución 1/100 de sueros positivos (provenientes de pacientes infectados) y negativos por duplicado y/o dilución seriada del calibrador H4-Fc (un duplicado por placa). Incubación de muestras y calibrador por 1h a RT y con agitación a 450 RPM; 6 lavados con PBS-Tween 0.2%
- 4) Incubación con conjugado HPO-IgG policional de cabra anti-Fc de IgG humana (Abcam #ab97225) 1/50000 en PBS-BSA 1%-Tween 0.2% por 30 minutos a RT; 6 lavados con PBS-Tween 0.2%
- 5) Incubación con sustrato por 8-10 minutos a RT, con agitación a 450 RPM; se frena la reacción adicionando 50 μ L de H₂SO₄ 2 N

Para los ensayos descritos en esta sección (4.6), los sueros fueron inactivados (incubación a 56°C por 1h) antes de su manipulación.

5. Resultados y discusión

El objetivo central de este trabajo fue producir calibradores recombinantes basados en nanobodies para incorporar en ensayos de serología COVID-19. Estos calibradores Nb-Fc constan de un nanobody fusionado a la región Fc de IgG1 humana, además de tags y señales para su expresión y purificación (secuencia detallada en *Anexo*). Uno de ellos, denominado H4-Fc, es reactivo contra la proteína de nucleocápside (N) y el restante, llamado H8-Fc, contra el dominio de unión al receptor (RBD) de Spike de la variante Wuhan-Hu-1 de SARS-CoV-2. Ambos nanobodies, H4 y H8, fueron previamente seleccionados por otros integrantes del laboratorio.

5.1. Expresión y purificación de la proteína de nucleocápside (NΔ121)

Previo a la validación de los calibradores fue necesario producir la proteína de nucleocápside de SARS-CoV-2. Se expresó y purificó una variante truncada -carente de 121 residuos en su extremo N-terminal-, referida como N∆121, con el fin de utilizarla como antígeno en un ensayo de serología para la detección cualitativa de anticuerpos IgG anti-N. El montaje de este ensayo permite también caracterizar al calibrador H4-Fc. La utilización de una variante truncada para los inmunoensavos se fundamentó en varios hallazgos. Anteriormente se ha demostrado que varias especies de coronavirus contienen motivos conservados en la región N-terminal de la proteína de nucleocápside, abarcando los primeros 134 residuos [80]. Más recientemente, se confirmó que SARS-CoV-2 comparte un alto grado de homología con otros coronavirus en cuanto a la secuencia aminoacídica de la proteína N, particularmente en los residuos 1-176 [81]. Asimismo, un artículo demuestra que la utilización de una versión truncada (carente de los primeros 121 residuos) de la proteína N de SARS-CoV (no confundir con SARS-CoV-2) permitió reducir notablemente la reactividad cruzada al evaluar sueros corroborados como negativos [82]. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que eliminar residuos N-terminal de la proteína de nucleocápside de SARS-CoV-2 aumentaría la especificidad de los ensayos serológicos.

La proteína N Δ 121 fue expresada en *E. coli*, siguiendo un protocolo previamente optimizado, y purificada por IMAC, realizando lavados con diferente concentración de imidazol. Se evaluó por SDS-PAGE el contenido de las fracciones recolectadas (Fig 5.1), observándose en cada fracción una banda con un tamaño de aproximadamente 35 kDa, correspondiente a N Δ 121, cuyo peso molecular estimado es de 37 kDa. Se observaron muchas bandas minoritarias de menor peso molecular que indicaron una potencial degradación de la proteína, mientras que también se observaron bandas de mayor tamaño correspondientes a impurezas.



Figura 5.1. SDS-PAGE correspondiente a la purificación por IMAC de la proteína N∆121. **A**, primera elucion (45 mM imidazol); **B**, segunda elución (70 mM imidazol); **C**, tercera elucion (270 mM imidazol).

A fin de eliminar estas impurezas se realizó una gel-filtración como purificación adicional (Fig. 5.2). Como resultado de esta cromatografía se recolectó el pico mayoritario, con un volumen de elución de alrededor 12 mL, probablemente correspondiente a la proteína N en estado oligomérico (en su forma nativa tiene tendencia a formar oligómeros de alto orden, proceso aparentemente independiente del dominio N-terminal [83]). Además se observan otros picos de menor magnitud, probablemente correspondientes a agregados proteicos de alto peso molecular (volumen de elución <12 mL) y a contaminantes de menor peso molecular (volúmenes de elución >12 mL). Al analizar por SDS-PAGE la fracción recolectada se observó que la proteína se obtuvo en mayor pureza, a la vez que las bandas por debajo de 35 kDa correspondientes a productos de degradación de la N no pudieron ser eliminadas. Como resultado de la expresión y de la doble purificación, se obtuvieron 4 mL de proteína a una concentración de 7.23 µM (28.9 nmoles totales). Si bien se perdió más del 90% respecto a lo obtenido a partir de la IMAC, la gel-filtración permitió eliminar impurezas, lo cual es fundamental para poder utilizarla como antígeno en ensayos serológicos. Adicionalmente, la cantidad obtenida sería suficiente para sensibilizar alrededor de 50 placas de 96 pocillos a una concentración final de 2 µg/mL. Pese a los productos de degradación de la N, se decidió continuar trabajando con esta preparación para desarrollar los inmunoensayos dado que la calidad del producto fue muy similar a lotes previos que ya habían sido implementados satisfactoriamente en el montaje de inmunoensayos del laboratorio.



Figura 5.2. Gel-filtración de la proteína N∆121. Izquierda, cromatograma de gel-filtración; se recolectó el pico de mayor magnitud que corresponde a la proteína en forma oligomérica. Derecha, SDS-PAGE (15% bis-acrilamida) correspondiente al pico recolectado.

5.2. Expresión y purificación de calibradores Nb-Fc

Debido al gran tamaño de los calibradores y abundancia de enlaces disulfuro, particularmente en la región Fc (4 enlaces intramoleculares y 2 intermoleculares), se consideró poco factible una producción exitosa en *E. coli* y se optó por utilizar células HEK293-T, una línea celular de mamíferos, como sistema de expresión. Previo a la expresión a escala grande, se evaluó la influencia de los elementos reguladores intrón A de hCMV y del WPRE en la expresión a pequeña escala del calibrador H4-Fc.

5.2.1. Optimización de transfección y evaluación de elementos reguladores

Para la puesta a punto de la transfección, primeramente se evaluó un método de transfección química basada en dos polímeros catiónicos diferentes: BPEI, ramificado y de 25 kDa, y PEI MAX, lineal y de 40 kDa. Se transfectaron células HEK293-T con el plásmido pSyn-GFP, que permite la expresión constitutiva de GFP, utilizada como proteína reportera por su capacidad de emitir fluorescencia en el rango de 500-560 nm [75]. De esta forma se determinó la tasa de células transfectadas para cada condición de transfección estudiada mediante citometría de flujo. La primera prueba de transfección consistió en comparar un método previamente optimizado con BPEI, stock a pH 11.0, y una relación masa/masa de

ADN:PEI de 5:1 con una transfección realizada con preparación de PEI-Max y relación ADN:PEI 5:1.

Como se observa en la Fig. 5.3, se obtuvieron mayores tasas de transfección utilizando PEI MAX en comparación a BPEI. Esta diferencia observada entre los transfectantes es concordante con lo visto en otros trabajos de investigación que indican que los PEI ramificados son, en general, menos eficientes que los PEI lineales [56,84], lo cual puede deberse a que las ramificaciones de BPEI impiden un alineamiento e interacción óptima entre sus grupos amino y los grupos azúcar-fosfato del ADN. A continuación, se evaluaron distintas preparaciones de PEI MAX con variaciones en el pH del stock (3.0 y 7.0) y la relación PEI:ADN (5:1 y 10:1), en base a sugerencias del fabricante. Los resultados indicaron que no hubo diferencias apreciables entre las distintas preparaciones y que la relación 10:1 fue levemente superior a la de 5:1. Considerando el balance entre la eficiencia de transfección y el gasto del agente transfectante se decidió continuar utilizando PEI MAX, pH 7, con relación 5:1 para todas las transfecciones subsecuentes.



Figura 5.3. Tasa de células transfectadas utilizando diferentes agentes transfectantes: BPEI (ramificado, 25 kDa) y PEI MAX (lineal, 40 kDa). Para PEI Max se varió la relación μg_{PEI}:μg_{ADN}, así como el pH del stock de PEI. Los histogramas de la citometría de flujo muestran el número de eventos (células) en función de su intensidad de fluorescencia entre 500-560 nm, dada por GFP como proteína reportera.

Por otro lado, a efectos de evaluar la influencia del intrón A de hCMV y el WPRE como potenciadores de la expresión se construyeron 4 vectores pCDNA 3.1(+) para expresión a pequeña escala del calibrador H4-Fc, con los cuales se realizaron 3 pruebas de transfección independientes en placas de cultivo de 6 pocillos, llevadas a cabo en distintos días. Cada uno de los vectores evaluados contuvo uno, ninguno o ambos elementos reguladores; la construcción de los mismos está detallada en la sección 4.3.1. Pasadas 72 hs desde la finalización de la transfección se recolectaron los sobrenadantes de cultivo, en los cuales se debería encontrar el calibrador secretado. Los sobrenadantes de cultivo fueron evaluados por ELISA realizando curvas de titulación por duplicado, donde se sensibilizaron los pocillos con Ig policional de conejo anti-IgG humana o con la proteína NΔ121. En ambos casos se utilizó HPO-Ig policional de cabra anti-IgG humana como anticuerpo secundario.

Los resultados muestran que el calibrador es funcional en ambos formatos de inmunoensayo, es decir que es posible afirmar que el calibrador posee un nanobody funcional y reactivo, y a su vez su región Fc es reconocida por los anticuerpos utilizados (Fig. 5.4). Por otro lado, aplicando el test no paramétrico de Kolmogórov-Smirnov se determinó que hubo una diferencia estadísticamente significativa (p-valor < 0.05) entre los FD50 (factor de dilución del sobrenadante en el que la señal decae a la mitad) obtenidos para sobrenadantes de cultivos transfectados con vectores conteniendo el intrón A de hCMV y los FD50 obtenidos para los sobrenadantes de cultivos transfectados con el vector carente de elementos reguladores (Fig. 5.5). No se observó un aumento de la expresión estadísticamente significativo atribuible a la presencia de WPRE, ni un efecto sinérgico apreciable entre los dos elementos potenciadores.



Figura 5.4. Curvas de titulación del calibrador H4-Fc a partir de los sobrenadantes obtenidos en cada prueba de transfección; se realizaron 3 pruebas independientes. FD, factor de dilución del sobrenadante de cultivo. A, sensibilización con N∆121. B, sensibilización con Ig policional de conejo anti-IgG humana. Cada gráfica corresponde a los resultados de una sola prueba de transfección.



Figura 5.5. Valores de FD50 promedio de las curvas de titulación de H4-Fc a partir de los sobrenadantes obtenidos en las pruebas de transfección. FD50 se refiere al factor de dilución en que la señal decae un 50%.

*p-valor <0.05 en comparación a ausencia de elementos reguladores (test de Kolmogórov-Smirnov). **p-valor <0.005.

Los resultados demuestran que el intrón A de hCMV potencia la expresión del calibrador H4-Fc. Si bien el efecto de varios elementos reguladores, entre ellos el intrón A de hCMV, depende del gen a expresar y de la línea celular utilizada, entre otras cosas [58], se optó por extrapolar lo observado e inferir que el intrón A de hCMV tendrá un efecto similar en la expresión de H8-Fc. Esto se justifica por la alta similitud en su CDS en comparación a H4-Fc (ver *Anexo*) y por la utilización de la misma línea celular para la expresión de ambos constructos se utilizó la misma línea celular. Por lo tanto, para la expresión a mayor escala de ambos calibradores Nb-Fc se utilizaron vectores pCDNA 3.1(+) portando el intrón A de hCMV.

5.2.2. Producción y purificación por cromatografía de afinidad

Para la expresión de H4-Fc y H8-Fc se transfectaron células HEK293-T en botellas T125 con los vectores de expresión correspondientes. Cada producción implicó la incubación de las células durante 4 días y la recolección y recambio del medio de cultivo cada 48 hs. Los calibradores se purificaron por cromatografía de afinidad por StrepTactina, en virtud del Twin-Strep-Tag ubicado en sus extremos C-terminal.

Ambas proteínas fueron obtenidas con un alto nivel de pureza, según se pudo observar por SDS-PAGE (Fig. 5.6). En condiciones reductoras se observan bandas correspondientes a un peso molecular ligeramente mayor a ~45 kDa, masa teórica esperada para un monómero Nb-Fc (~45 kDa sin tomar en cuenta glicosilaciones). En condiciones no reductoras se observan 2 bandas por encima de 116 kDa, peso molecular mayor al esperado para un dímero Nb-Fc (~92 kDa excluyendo glicosilaciones). Esto puede deberse a desnaturalización incompleta, un problema relativamente frecuente en SDS-PAGE no reductora de anticuerpos dado el alto número de enlaces disulfuro, característica

compartida con los constructos Nb-Fc en virtud de la región Fc. La desnaturalización incompleta ocasiona artefactos, donde distintas bandas corresponden a la misma proteína con diferentes grados de desnaturalización **[85]**. Por otro lado, en condiciones no reductoras se aprecian mínimamente bandas cercanas a los 45 kDa, indicando que los calibradores Nb-Fc se encuentran mayormente en forma dimérica y que se ha dado una correcta formación de enlaces disulfuro intermoleculares. Dada la baja proporción de impurezas observada en relación a los calibradores Nb-Fc se consideró innecesario realizar pasos de purificación adicionales y se continuó trabajando con los constructos Nb-Fc obtenidos como resultado de estas purificaciones en los inmunoensayos subsecuentes.



Figura 5.6. SDS-PAGE correspondiente a la purificación de los calibradores Nb-Fc. *A1* y *A2*, eluidos de la purificación de H4-Fc y H8-Fc, respectivamente, en condiciones no reductoras. *B1* y *B2*, eluidos de la purificación de H4-Fc y H8-Fc, respectivamente, en condiciones reductoras.

Los resultados anteriores corresponden a producciones utilizando vectores portando el intrón A de hCMV. Se obtuvieron 4.9 mL a 7.54 μ M (~36.9 nmoles) y 2.2 mL a 7.26 μ M (~16.0 nmoles) de H4-Fc y H8-Fc, respectivamente. En paralelo, se realizaron otras producciones, con la misma metodología, utilizando vectores carentes de elementos potenciadores, para confirmar que el aumento de expresión dado por el intrón A hCMV observado en expresión a pequeña escala de H4-Fc fuera extrapolable a producciones a mayor escala de ambos calibradores. En ambos casos los resultados mostraron un incremento de aproximadamente 5 veces en la cantidad de proteína obtenida por litro de cultivo atribuible a este elemento regulador (Tabla 5.1).

 Tabla 5.1. Cantidad de calibrador Nb-Fc por litro de cultivo obtenida en diferentes producciones, utilizando un vector pCDNA 3.1(+) con o sin la inclusión del intrón A de hCMV.

Calibrador	Vector de expresión	mg _{proteína} / L _{cultivo}
	Sin elem. reguladores	10.0
H4-FC	+ Intrón A de hCMV	49.4
	Sin elem. reguladores	11.2
H8-Fc	+ Intrón A de hCMV	46.2

5.3. Caracterización por gel-filtración y espectrometría de masas MALDI-TOF

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular para estimar el peso molecular de los calibradores Nb-Fc utilizando una curva de calibración generada a partir de los volúmenes de elución de 5 estándares de peso molecular conocido, considerando para cada estándar el coeficiente de distribución (K_{av}) en función del log(PM) (Fig 5.7).

Los volúmenes de elución para H8-Fc y H4-Fc fueron 12.7 y 12.8 mL, respectivamente, a partir de los cuales se estimó un peso molecular de 137.9 kDa para H4-Fc y 174.6 kDa para H8-Fc. Estos valores están muy por encima de lo esperado (no más de 100 kDa tomando en cuenta los N-glicanos de la región Fc -estimado a partir de ProtParam [68] y GlycanMass [86], utilizando la glicoforma de mayor peso molecular posible para IgG1 [87]-), lo cual puede ser debido a que el flujo de una proteína por una columna de gel-filtración no depende solamente de su tamaño (directamente relacionado con el peso molecular) sino también de su radio hidrodinámico y de su forma. El volumen de elución tiene una relación fiel con el peso molecular cuando la proteína es globular; sin embargo, proteínas no globulares eluyen mucho antes de lo previsto [88]. Considerando la estructura terciaria teórica de los calibradores (similar a la de un anticuerpo convencional o a un HcAb, es decir, similar a una Y), es razonable suponer que tienen un radio hidrodinámico lo suficientemente alto como para ocasionar una sobreestimación de su peso molecular mediante gel-filtración.



Figura 5.7. Curva de calibración por gel-filtración utilizada para estimar el peso molecular de los calibradores. El peso molecular y volumen de elución para cada estándar utilizado en la curva se pueden ver en la tabla a la derecha.

Los cromatogramas permitieron por otro lado observar el perfil de impurezas y determinar la presencia de agregados de alto peso molecular (Fig. 5.8). El cromatograma de H4-Fc presenta un pequeño pico poco después del volumen muerto de la columna (~8.6 mL) correspondiente a agregados, además de un pico alrededor de los 2 mL que se considera un artefacto dado el volumen muerto de la columna. Por otro lado, en el cromatograma de H8-Fc también se observa un pequeño hombro antes del pico mayoritario atribuible a agregados y para ambos calibradores se observa un pequeño pico tardío que puede atribuirse a alguna impureza o producto de degradación. En concordancia con lo observado por SDS-PAGE en la sección 5.2, no se observan picos atribuibles a la forma monomérica de los calibradores ya que, en base a la tabla de la Fig. 5.7, de estar presente, la misma debería tener un pico de elución alrededor de los 13.9 mL (o mayor), correspondiente a un peso de aproximadamente 45 kDa.



Figura 5.8. Cromatogramas correspondientes a la gel-filtración de H8-Fc y H4-Fc. En ambos se observa un pico mayoritario correspondiente a la forma dimérica de cada calibrador.

Debido a que por gel-filtración se obtuvieron pesos moleculares no concordantes para los calibradores, se decidió analizar a ambos por espectrometría de masas MALDI-TOF (Fig. 5.9). Se obtuvo un peso molecular de 95.4 kDa para H8-Fc y de 94.2 kDa para H4-Fc, apenas por encima de lo estimado a partir de sus secuencias aminoacídicas (excluyendo glicosilaciones), correspondientes a 92.57 kDa (H8-Fc) y 91.73 (H4-Fc). Los pesos moleculares estimados a partir de MALDI-TOF son concordantes con lo esperado, considerando la presencia de N-glicanos tipicos en la región Fc de los calibradores. Asimismo, estos espectros permiten confirmar la integridad de los calibradores.



Figura 5.9. Espectros MALDI-TOF para los calibradores Nb-Fc. Los dos picos más prominentes corresponden a los calibradores con carga (z) +1 (~95 kDa) y +2 (~48 kDa).

5.4. Evaluación de afinidad y funcionalidad de calibradores Nb-Fc

El objetivo principal de este trabajo es introducir a los calibradores Nb-Fc en ensayos serológicos para detección de IgG anti-N y anti-RBD; por tanto resulta esencial determinar si los nanobodies mantienen su reactividad cuando forman parte de los calibradores y a la vez que sean funcionales en ELISAs y que permitan una buena reproducibilidad.

5.4.1. Funcionalidad en ELISA

Primeramente se evaluó la reactividad de ambos calibradores, H4-Fc y H8-Fc, frente a sus antígenos (proteína de nucleocápside y RBD_{Wuhan}, respectivamente). Se realizaron curvas de titulación de cada calibrador y en ambos casos se compararon frente curvas de titulación realizadas con los nanobodies H4 y H8 sin Fc como referencia para estimar el desempeño de las quimeras. Ambos calibradores demostraron ser funcionales, lo cual confirma que la fusión de los Nb a la región Fc no afecta su reactividad. Al ser los calibradores comparados con los nanobodies respectivos, se observó una mayor reactividad para los primeros (Fig 5.10), reflejada en una diferencia en los EC50 (tabla 5.2), lo cual era de esperar dada la bivalencia de los constructos.

Cabe señalar que para comparar la reactividad de H4-Fc y el nanobody H4 fue necesario utilizar como antígeno a la proteína N full-length en lugar de N∆121 ya que la misma posee un HisTag no clivable, el cual también está presente en H4 y H4-Fc y permite la detección de los mismos.



Figura 5.10. Curvas de titulación comparando la reactividad de los calibradores Nb-Fc y los nanobodies respectivos frente a sus antígenos. Izquierda, curvas realizadas por triplicado para H4-Fc y H4 frente a la proteína N. Derecha, curvas H8-Fc y H8 realizadas por duplicado frente a RBD_{Wuhan}.

 Tabla 5.2. EC50 obtenidos a partir de curvas de titulación de los calibradores Nb-Fc y los nanobodies respectivos.

Antígeno	Calibrador/Nb	EC50 (nM)
N full-length	H4-Fc	0.10 ± 0.02
	H4	0.15 ± 0.03
RBD_Wuhan	H8-Fc	0.24 ± 0.03
	H8	0.53 ± 0.01

5.4.2. Interferometría de biocapa: parámetros cinéticos y termodinámicos

La conservación de la reactividad de los nanobodies al estar fusionados a la región Fc de IgG1 también se demostró mediante ensayos de interferometría de biocapa. Para llevar a cabo esta técnica, uno de los componentes del par calibrador/antígeno debe ser inmovilizado sobre un sensor, el cual luego es incubado en distintas soluciones con concentraciones diferentes del componente restante. Utilizando un modelo de unión 1:1 no cooperativo (ver sección 4.5.2) solo se pueden determinar constantes reales de asociación y disociación cuando la molécula en solución se encuentra en estado monomérico. Contrariamente, para proteínas multiméricas no se pueden obtener parámetros que reflejen su verdadera afinidad sin efectos de avidez (Fig. 5.11). En el caso del sistema H8-Fc/RBD, dado que RBD es monomérica se optó por inmovilizar al calibrador e incubar los sensores en soluciones conteniendo RBD. Por otro lado, dada la bivalencia de los constructos y el estado de oligomerización de la proteína N, no es posible obtener parámetros no afectados por la avidez para el par H4-Fc/N. Para este caso se optó por la inmovilización de la proteína N dado que implicaría una menor sobreestimación de la afinidad.



Figura 5.11. Diferentes formatos de inmovilización pueden afectar -o no- la evaluación de la afinidad. La inmovilización de un antígeno oligomérico permite evitar la multivalencia.

Los resultados (Tabla 5.3) muestran que los calibradores tienen una afinidad alta por sus respectivos antígenos, con constantes de disociación (K_D) en el rango nM para H8-Fc y por debajo del límite de detección (10^{-10} M) para H4-Fc, aunque sobreestimada para este último debido a la bivalencia. Datos proporcionados por otros integrantes del laboratorio donde se evaluó al nanobody H4 en solución frente a la proteína N muestran una K_D en el orden de 10^{-10} , lo cual indica una muy alta afinidad, no sobreestimada por efectos de avidez.

Comparando H8-Fc y H8 frente al mismo antígeno vemos que los parámetros no varían de forma significativa, manteniéndose dentro del mismo orden. Para H8-Fc, el ligero aumento de K_D y k_d , así como la disminución de k_a , se puede atribuir a la utilización de diferentes sensores: H8, estando biotinilado en su extremo C-terminal, fue inmovilizado de forma no covalente y específica en un sensor de estreptavidina, mientras que H8-Fc fue inmovilizado covalentemente en un sensor AR2G. La inmovilización covalente tiene como consecuencia la posible pérdida de función por la formación aleatoria de enlaces entre el sensor activado y los grupos amino proteicos, reflejada en una subestimación de la afinidad. Si bien tanto H8-Fc como H8 cuentan con un HisTag en sus respectivos extremos C-terminal, la inmovilización en sensores de níquel no fue exitosa, por lo que no se los pudo comparar utilizando un mismo tipo de sensor.

Calibrador/ Nb evaluado	Antígeno	К _р (М)	k _a (M⁻¹ s⁻¹)	k _d (s⁻¹)
H4-Fc, en solución	N∆121, inmovilizada (AR2G)	< Lím. detección	3.68 E⁵	< Lím. detección
H4, en solución	N full-length, inmovilizada (Estreptavidina)	5.83 E ⁻¹⁰	1.75 E⁵	1.02 E ⁻⁴
H8-Fc, inmovilizado (AR2G)	RBD_{Wuhan}	8.65 E ⁻⁹	2.11 E⁵	1.82 E ⁻³
H8, inmovilizado (Estreptavidina)	RBD_Wuhan	3.38 E ⁻⁹	1.57 E⁵	5.31 E ⁻⁴

5.4.3. Ensayos de estabilidad

Siendo el objetivo principal lograr incorporar los calibradores a ensayos serológicos, es esencial demostrar que son estables a la concentración de uso final. Para ello se incubaron diluciones seriadas de cada calibrador preparadas en una solución estabilizante (detallada en la sección 4.5.3, en base a trabajos previos de otros integrantes del laboratorio [89]) y almacenadas en condiciones de temperatura de 4°C y 37°C durante un periodo de 3-4 semanas. Durante dicho período y una vez por semana se realizaron curvas de titulación mediante ELISA con el conjunto de diluciones almacenadas a una u otra temperatura, y el

desempeño de cada curva y sus parámetros fueron comparados con una curva de referencia generada el día 0 de la preparación de las diluciones de los calibradores y con curvas realizadas durante cada semana a partir de una solución stock de alta concentración conservada a 4°C. Los resultados se muestran a continuación (Fig. 5.12 y Tablas 5.4 y 5.5).



Figura 5.12. ELISA comparando diluciones seriadas de H4-Fc (izquierda) y H8-Fc (derecha) a tiempo 0 y tras 3-4 semanas de incubación a 37°C y 4°C.

Es apreciable la similitud entre las curvas (normalizadas por A_{max} promedio) a tiempo 0 y luego de 3 y 4 semanas de incubación para H8-Fc y H4-Fc, respectivamente (Fig. 5.12), lo cual indica que los calibradores muy probablemente mantienen su funcionalidad luego de 3-4 semanas de incubación a 37°C y que, por tanto, la mantendrían por más tiempo al almacenarlos a 4°C. La dispersión es mayor para las curvas de H8-Fc porque, debido a la escasez de RBD_{Wuhan}, la sensibilización se realizó a una concentración de 1 µg/mL y se utilizaron menos pocillos, mientras que para las curvas de H4-Fc fue posible sensibilizar con N Δ 121 a 2 µg/mL.

Si bien el número de réplicas hace inviable realizar análisis estadísticos confiables, los parámetros obtenidos para los ajustes (ver EC50 en Tabla 5.4 y pendiente de Hill en Tabla 5.5) muestran que no hay diferencias apreciables entre las curvas a tiempo 0 y las correspondientes a 3-4 semanas de incubación a 37°C y 4°C. Asimismo, se observa que hay una mayor variación en estos parámetros para las curvas realizadas a partir de los stocks concentrados que para las correspondientes a las incubaciones a lo largo del tiempo (última fila en Tablas 5.4 y 5.5), lo cual indica que las diluciones seriadas de los calibradores Nb-Fc otorgan mayor reproducibilidad.

Tabla 5.4. EC50 (nM) obtenidos para las diluciones seriadas de los calibradores, incubadas a 37°C y
 4°C durante 3-4 semanas. Como control se realizó una curva a partir de un stock concentrado para cada ensayo posterior al tiempo 0. La desviación estándar promedio es en cuanto a los valores obtenidos para los parámetros en diferentes ensayos, no tiene valor estadístico y es meramente ilustrativa de la variabilidad inter-ensayo observada.

Tiempo	EC50 - H4-Fc		EC50 - H4-Fc (stock)	EC50 - H8-Fc		EC50 - H8-Fc (stock)
	37°C	4°C		37°C	4°C	
то	0.082 :	± 0.005		0.22	± 0.02	
7 días	0.106 ± 0.005	0.112 ± 0.007	0.24 ± 0.02	0.180 ± 0.008	0.21 ± 0.01	0.42 ± 0.01
14 días	0.055 ± 0.002	0.058 ± 0.005	0.040 ± 0.004	*	*	*
21 días	0.0567 ± 0.0002	0.059 ± 0.001	0.0327 ± 0.0007	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.102 ± 0.004
28 días	0.056 ± 0.005	0.054 ± 0.004	0.024 ± 0.002	*	*	*
Desv. est. promedio	± 0.022	± 0.024	± 0.104	± 0.056	± 0.032	± 0.225

*Por escasez de antígeno no se realizó un ELISA para evaluar a H8-Fc a los 14 y 28 días.

Tabla 5.5. Pendientes de hill (p) obtenidas para las diluciones seriadas de los calibradores incub	adas
a 37°C y 4°C durante 3-4 semanas.	

Tiempo	Pend. de Hill - H4-Fc		Pend. de Hill - H4-Fc (stock)	Pend. de Hill - H8-Fc		Pend. de Hill - H8-Fc (stock)
	37°C	4°C		37°C	4°C	
то	1.4 ± 0.1			1.18 ± 0.06		
7 días	1.21 ± 0.08	1.4 ± 0.1	1.14 ± 0.04	1.2 ± 0.2	1.20 ± 0.07	1.51 ± 0.06
14 días	1.32 ± 0.02	1.46 ± 0.09	1.48 ± 0.07			
21 días	1.41 ± 0.06	1.39 ± 0.06	1.5 ± 0.1	1.36 ± 0.04	1.2 ± 0.2	1.258 ± 0.007
28 días	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.217 ± 0.006			
Desv. est. promedio	± 0.081	± 0.088	± 0.183	± 0.099	± 0.011	± 0.178

5.5. Incorporación de los calibradores a ensayos serológicos

5.5.1. Cuantificación de IgG anti-RBD en suero

Se valoró a H8-Fc como calibrador al introducirlo en el kit QUANT-ELISA (ATGen), el cual fue diseñado para la detección en suero de IgG anti-RBD_{Wuhan}. Este kit permite la cuantificación de IgG a partir de curvas de calibración generadas con sueros estándares validados contra un estándar de referencia internacional provisto por la OMS, y por lo tanto cuentan con concentración de anticuerpos definida en valores arbitrarios de BAU/mL. Utilizando dicho kit se analizaron 20 sueros positivos y 20 sueros negativos, y a su vez se realizaron curvas por triplicado con el estándar de la OMS, en BAU/mL, y con el calibrador H8-Fc. en nM (Fig 5.13), a modo de compararlas y establecer una correlación entre ambos métodos de cuantificación. Los sueros negativos tuvieron una señal cercana a 0, mientras que los sueros positivos presentaron señales adecuadas para la cuantificación de IgG anti-RBD. Al comparar la cuantificación con ambas curvas, los resultados muestran una excelente correlación entre la utilización de ambos estándares, con R2 = 0.99 (Fig. 5.14), a la vez que se obtuvo un menor error relativo en la cuantificación para los valores obtenidos a partir de H8-Fc (dichos errores se calcularon mediante los principios de propagación de incertidumbre, detallados en [90]). Esto último fue atribuido a que H8-Fc generó curvas dentro de un rango lineal mientras que el estándar internacional no siguió un comportamiento estrictamente lineal, por lo que los datos se ajustaron a una función exponencial de orden 1 (ver ecuación en Fig 5.13) con 3 parámetros, lo cual aumenta el error relativo de los valores obtenidos por interpolación.



Figura 5.13. Curvas utilizadas para la determinación del título del calibrador H8-Fc, con el estándar internacional de la OMS como referencia, así como para la cuantificación de IgG anti-RBD en sueros.



Figura 5.14. Correlación entre la cuantificación de IgG anti-RBD en sueros utilizando el estándar internacional (BAU/mL) y el calibrador H8-Fc (nM).

De igual manera que para los sueros, se determinó el título en BAU/mL de las diluciones de H8-Fc utilizadas por interpolación en la curva de calibración realizada con el estándar internacional. Se obtuvieron valores promedio de BAU/mL para cada concentración de H8-Fc utilizada, en base a los cuales se calculó un valor promedio de BAU/mL para el stock a partir del cual se hicieron las diluciones (es importante puntualizar que se excluyeron algunos valores extremos para mejorar el cálculo). A partir del valor de BAU/mL del stock se recalculó el título correspondiente a cada concentración de H8-Fc utilizada en la curva, para que los valores fueran enteramente coherentes con el factor de dilución, y se calcularon los porcentajes de recuperación respecto a los valores obtenidos por interpolación (Tabla 5.8), que demuestran que el título calculado para cada dilución es similar a los obtenidos por interpolación. Los resultados obtenidos permiten validar al calibrador H8-Fc como estándar para este ensayo cuantitativo de serología.

Tabla 5.8. Concentración y título de las diluciones de H8-Fc utilizadas en las curvas. El porcentaje de
recuperación es igual a 100 veces el título recalculado a partir del valor calculado para el stock
dividido entre el título obtenido por interpolación. Se promediaron 3 porcentajes de recuperación ya
que la curva se realizó por triplicado.

Concentración (pM)	374.5	249.6	166.4	110.9	74.0	49.3	32.9	21.9
Título (BAU/mL)	5.56	3.71	2.47	1.65	1.10	0.73	0.49	0.33
Porcentaje de recuperación	84 ± 4	98 ± 9	107 ± 7	106 ± 7	111 ± 14	108 ± 7	112 ± 12	104 ± 1

5.5.1.2. Evaluación de reactividad cruzada contra RBD_{Omicron}

Hasta este punto la reactividad y funcionalidad del Nb H8 y el calibrador H8-Fc habían sido demostrados contra RBD_{Wuhan}; sin embargo, a lo largo de la pandemia surgieron nuevas variantes de SARS-CoV-2 destacadas por su alta variabilidad a nivel de la proteína Spike y RBD [91]. Por tanto, en este trabajo fue de interés evaluar la reactividad de H8-Fc contra RBD de la variante Omicron mediante ELISA e interferometría de biocapa, siguiendo los mismos protocolos aplicados para RBD_{Wuhan} (ver secciones 4.5.2 y 5.4.2).

Se demostró que H8-Fc presenta reactividad cruzada contra RBD_{Omicron}, aunque con mayor $K_{D,} k_d y k_a$, en comparación a RBD_{Wuhan} (Tabla 5.9), lo que globalmente indica una menor afinidad. Sin embargo, los valores alcanzados están en el mismo orden, por lo que el calibrador H8-Fc podría ser utilizado en ensayos con este antígeno en concentraciones mayores a las determinadas para el ensayo de RBD_{Wuhan}. Al evaluar al calibrador H8-Fc contra RBD_{Omicron} mediante ELISA, realizando los pasos de sensibilización y bloqueo a 4°C, también se evidenció una menor afinidad respecto a RBD_{Wuhan} (Fig. 5.15). Desafortunadamente, los resultados en ELISA no fueron reproducibles, obteniéndose muy baja señal en la mayoría de ellos (resultados no mostrados). Es probable que H8-Fc

reconozca un epítope de RBD_{Omicron} con variabilidad conformacional y sensibilidad a la temperatura que se vea alterado al adherirse la proteína a los pocillos de las placas.

Antígeno	К _D (М)	k _a (M⁻¹ s⁻¹)	k _d (s ⁻¹)
RBD_Wuhan	8.65 E⁻⁰	2.11 E⁵	1.82 E ⁻³
RBD _{Omicron}	1.21 E⁻ ⁸	2.28 E⁵	2.76 E ⁻³

Tabla 5.9. Constantes cinéticas y termodinámicas obtenidas para H8-Fc frente a RBD
Wuhan y
RBD
Omicron, mediante interferometría de biocapa.



Figura 5.15. Curvas de titulación de H8-Fc contra RBD_{Wuhan} y RBD_{Omicron}. No fue posible reproducir el resultado mostrado en la imagen para RBD_{Omicron}, debido a que probablemente H8-Fc reconoce un epítope con alta variabilidad conformacional y sensibilidad a la temperatura.

Como alternativa al uso del calibrador H8-Fc, en este trabajó se dejó establecida la plataforma para expresar este tipo de quimeras y por tanto sería posible incorporar fácilmente nuevos nanobodies más específicos para el reconocimiento de nuevas variantes de SARS-CoV-2. En esta línea es posible seleccionar mediante Phage Display nuevos nanobodies anti-RBD con alta afinidad por epítopes conservados en diferentes variantes del virus, pudiendo ser utilizados en la construcción de nuevos calibradores.

5.5.2. Detección cualitativa de IgG anti-N en suero

Dado que no se contaba con un kit comercial para la cuantificación de IgG anti-N al momento de realizar este proyecto, se optó por incorporar al calibrador H4-Fc a un ELISA cualitativo desarrollado en el laboratorio. El protocolo y soluciones utilizadas, previamente optimizados por otros integrantes del laboratorio, se detallan en la sección 4.5.2.

En primer lugar se realizó un ELISA preliminar con pocas muestras para evaluar dos diluyentes de muestras: una solución de suero normal de cabra (SNC) 5% v/v en PBS-BSA 1%-Tween 0.2% y el diluyente del kit QUANT-ELISA (ATGen). En este punto no fue necesario introducir al calibrador porque el objetivo fue determinar cuál diluyente permite una mejor separación entre sueros positivos y negativos. El diluyente del kit dió mejor resultado (Fig. 5.16), obteniéndose una mayor sensibilidad fijando la especificidad en 100% (78.6% vs 62.5% para la solución de SNC 5%). Por lo tanto, se optó por utilizar el diluyente del kit en los siguientes ensayos.



Figura 5.16. Resultados de ensayo serológico preliminar para detección cualitativa de IgG anti-N. Comparación entre la utilización de dos diluyentes distintos (solución de suero normal de cabra (SNC) 5% v/v en PBS-BSA 1%-Tween 0.2% vs diluyente del kit QUANT-ELISA). Las barras representan la media de cada grupo.

Posteriormente se introdujo el calibrador H4-Fc a fin de utilizarlo como estándar para la normalización de ensayos realizados en distintas placas. Se evaluaron 35 sueros en dos placas y se realizó una curva por duplicado de H4-Fc en cada placa. Para la normalización se eligieron señales de A_{450} de entre 0.5 y 1.0 dadas por el calibrador, las cuales se correspondieron con concentraciones de 13.8 y 27.6 pM ($A_{450} \sim 0.55$ y 0.96 respectivamente). Se construyeron curvas ROC (Fig. 5.17) para evaluar cuál valor de normalización permite aumentar más la sensibilidad del ensayo (fijando la especificidad en 100%). La normalización por la señal ~0.55 dio como resultado una curva ROC con una mejor relación sensibilidad-especificidad, permitiendo aumentar un poco la sensibilidad del ensayo para una especificidad de 100%. Se determinó que normalizando los valores por la señal correspondiente a una concentración del calibrador de 13.8 pM el ensayo tiene un 82.5% de sensibilidad y un 100% de especificidad. El cutoff establecido para este ensayo fue de 1.95 (Fig 5.18).



Figura 5.17. Curvas ROC para ensayo de detección de IgG anti-N, evaluando 35 sueros. Valores normalizados según señales dadas por diferentes concentraciones del calibrador H4-Fc.



Figura 5.18. Resultados de ensayo serológico para detección cualitativa de IgG anti-N, evaluando 35 sueros. Valores normalizados por la señal dada por el calibrador H4-Fc a 13.8 pM. Las barras indican la media de cada grupo. Se determinó un cut-off de 1.95 para un 100% de especificidad y un 82.5% de sensibilidad.

6. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se generaron dos quimeras recombinantes Nb-Fc para usar como calibradores en ensayos de serología COVID-19. Para su producción se utilizó la línea celular HEK293-T y se puso a punto un método de expresión que involucró la incorporación del intrón A de hCMV como potenciador a los vectores de expresión. La expresión con este sistema permitió obtener aproximadamente 5 veces más proteína que la obtenida al utilizar vectores sin el intrón A de hCMV, siendo este resultado de alta relevancia considerando que los costos de producción de proteínas recombinantes en cultivos de líneas celulares de mamíferos son bastante más elevados que en los alternativos como *E. coli* o levaduras. Es importante destacar que la incorporación de este elemento potenciador también ha permitido la expresión de otras proteínas recombinantes, relevantes para otros proyectos, con mayores rendimientos a los logrados previamente.

Una vez producidos, los calibradores Nb-Fc fueron obtenidos en alta pureza, en su conformación esperada y en concentraciones en el orden micromolar. Considerando que las concentraciones necesarias para su aplicación en los ensayos finales se situaron en el orden picomolar, es apreciable el elevado rendimiento en cuanto a número de ensayos realizables, por lo que su producción sería muy rentable para fines de elaboración de kits comerciales.

La reactividad de los nanobodies no se vio afectada por el hecho de haber sido fusionados a la región Fc de IgG1, mientras que esta última mantuvo la integridad necesaria como para ser reconocida por los anticuerpos anti-IgG utilizados en los ensayos de serología. A su vez, la estabilidad de estos constructos, demostrada en este trabajo, indica que los mismos podrían ser introducidos como reactivos en kits diagnósticos, lo que los convertiría en una alternativa más eficiente a reactivos basados en sueros.

Si bien este trabajo consistió en demostrar la aplicabilidad de calibradores recombinantes en ensayos de serología COVID-19, es relevante destacar que se estableció una plataforma de expresión basada en un vector que permite el intercambio de secuencias codificantes de nanobodies de forma rápida, los cuales se pueden seleccionar eficazmente mediante técnicas como Phage Display. Por tanto, es posible adecuar las estrategias aquí mostradas a la generación de futuros calibradores para la estandarización de ensayos de serología enfocados en la detección de anticuerpos contra distintas variantes de SARS-CoV-2, así como de otros patógenos o antígenos. Asimismo, es posible construir quimeras de este tipo que mimeticen cualquier clase de anticuerpos, facilitando la estandarización de ensayos serológicos para diagnóstico de alergias (detección de IgE) o de infecciones (detección de IgM). En suma, las quimeras Nb-Fc han demostrado ser una alternativa robusta a los sueros como estándares, y tienen el potencial de aplicarse en ensayos serológicos con diferentes formatos.

7. Referencias

- [1] Wang M-Y, Zhao R, Gao L-J, Gao X-F, Wang D-P, Cao J-M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. Front Cell Infect Microbiol 2020;10. DOI: <u>10.3389/fcimb.2020.587269</u>.
- [2] Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. Viruses 2021;13:1115. DOI: <u>10.3390/v13061115</u>.
- [3] Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. J Clin Microbiol 2020;58. DOI: <u>10.1128/JCM.00461-20</u>.
- [4] Rikhtegaran Tehrani Z, Saadat S, Saleh E, Ouyang X, Constantine N, DeVico AL, et al. Performance of nucleocapsid and spike-based SARS-CoV-2 serologic assays. PLoS ONE 2020;15:e0237828. DOI: <u>10.1371/journal.pone.0237828</u>.
- [5] Brochot E, Demey B, Touzé A, Belouzard S, Dubuisson J, Schmit J-L, et al. Anti-spike, Anti-nucleocapsid and Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Inpatients and Asymptomatic Individuals. Front Microbiol 2020;11. DOI: <u>10.3389/fmicb.2020.584251</u>.
- [6] Shah J, Liu S, Potula H-H, Bhargava P, Cruz I, Force D, et al. IgG and IgM antibody formation to spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 characterized by multiplex immunoblot assays. BMC Infect Dis 2021;21. DOI: <u>10.1186/s12879-021-06031-9G</u>.
- [7] BioRender [Internet]. Disponible en: <u>www.biorender.com</u>.
- [8] Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology, 9th Ed. New York (NY): Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2017.
- [9] Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, Veen W, Brüggen M, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. Allergy 2020;75:1564–81. DOI: <u>10.1111/all.14364</u>.
- [10] Post N, Eddy D, Huntley C, van Schalkwyk MCI, Shrotri M, Leeman D, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. PLoS ONE 2020;15:e0244126. DOI: <u>10.1371/journal.pone.0244126</u>.
- [11] Galipeau Y, Greig M, Liu G, Driedger M, Langlois M-A. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. Front Immunol 2020;11. DOI: <u>10.3389/fimmu.2020.610688</u>.
- [12] Meyer B, Drosten C, Müller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: Challenges and pitfalls. Virus Research 2014;194:175–83. DOI: <u>10.1016/j.virusres.2014.03.018</u>.
- [13] Van Elslande J, Houben E, Depypere M, Brackenier A, Desmet S, André E, et al. Diagnostic performance of seven rapid IgG/IgM antibody tests and the Euroimmun IgA/IgG ELISA in COVID-19 patients. Clinical Microbiology and Infection 2020;26:1082–7. DOI: <u>10.1016/j.cmi.2020.05.023</u>.
- [14] Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V, Jiang K, Strohmeier S, Arunkumar GA, et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. Current Protocols in Microbiology 2020;57. DOI: <u>10.1002/cpmc.100</u>.

- [15] Freeman J, Conklin J. Standardization of two SARS-CoV-2 serology assays to the WHO 20/136 human standard reference material. Journal of Virological Methods 2022;300:114430. DOI: <u>10.1016/j.jviromet.2021.114430</u>.
- [16] Lin AV. Indirect ELISA. Methods in Molecular Biology 2015:51–9. DOI: <u>10.1007/978-1-4939-2742-5_5</u>.
- [17] Drijvers JM, Awan IM, Perugino CA, Rosenberg IM, Pillai S. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Basic Science Methods for Clinical Researchers 2017:119–33. DOI: <u>10.1016/B978-0-12-803077-6.00007-2</u>.
- [18] Ha B, Jadhao S, Hussaini L, Gibson T, Stephens K, Salazar L, et al. Evaluation of a SARS-CoV-2 Capture IgM Antibody Assay in Convalescent Sera. Microbiol Spectr 2021;9. DOI: <u>10.1128/Spectrum.00458-21</u>.
- [19] Alhabbab RY. Enzyme Immunoassay (EIAs) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert 2018:83–95. DOI: E10.1007/978-3-319-77694-1_12.
- [20] Dimech W. The Standardization and Control of Serology and Nucleic Acid Testing for Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev 2021;34. DOI: <u>10.1128/CMR.00035-21</u>.
- [21] Rijpkema S, Hockley J, Rigsby P, Guy EC. Establishment of replacement International Standard 13/132 for human antibodies to Toxoplasma gondii. Biologicals 2016;44:448–55. DOI: <u>10.1016/j.biologicals.2016.04.006</u>.
- [22] Offermann N, Plum M, Hübner U, Rathloff K, Braren I, Fooke M, et al. Human serum substitution by artificial sera of scalable allergen reactivity based on polyclonal antibodies and chimeras of human FcyRI and IgE domains. DOI: 10.1111/all.13038.
- [23] Waritani T, Chang J, McKinney B, Terato K. An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays. MethodsX 2017;4:153–65. DOI: <u>10.1016/j.mex.2017.03.002</u>.
- [24] Thomas A, Messer WB, Hansel DE, Streblow DN, Kazmierczak SC, Lyski ZL, et al. Establishment of Monoclonal Antibody Standards for Quantitative Serological Diagnosis of SARS-CoV-2 in Low-Incidence Settings. Open Forum Infectious Diseases 2021;8. DOI: <u>10.1093/ofid/ofab061</u>.
- [25] Abcam [Internet]. Recombinant Anti-SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 antibody [CR3022] (ab273073) [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>Recombinant Anti-SARS-CoV-2 Spike</u> <u>Glycoprotein S1 antibody [CR3022] (ab273073) (abcam.com)</u>.
- [26] ABclonal [Internet]. SARS-CoV-2 neutralizing antibody (A19215) [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>SARS-CoV-2 neutralizing antibody-SARS-CoV-2 - ABclonal</u>
- [27] Abeomics [Internet]. Recombinant Anti-SARS-CoV-2 Spike RBD antibody (ABMX-002) [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>Recombinant Anti-SARS-CoV-2 Spike RBD antibody</u> <u>10-2005 | ABMX-002 (abeomics.com)</u>
- [28] Hamilton RG. Application of engineered chimeric antibodies to the calibration of human antibody standards. Ann Biol Clin (Paris). 1991;49(4):242-8. PMID: <u>1928840</u>.
- [29] Hackett J Jr, Hoff-Velk J, Golden A, Brashear J, Robinson J, Rapp M, et al. Recombinant Mouse-Human Chimeric Antibodies as Calibrators in Immunoassays That Measure Antibodies to Toxoplasma gondii. J Clin Microbiol 1998;36:1277–84. DOI: <u>10.1128/JCM.36.5.1277-1284.1998</u>.

- [30] Tu B, Ziemann RN, Tieman BC, Hawksworth DJ, Tyner J, Scheffel J, et al. Generation and Characterization of Chimeric Antibodies against NS3, NS4, NS5, and Core Antigens of Hepatitis C Virus. Clin Vaccine Immunol 2010;17:1040–7. DOI: <u>10.1128/CVI.00068-10</u>.
- [31] Jugler C, Grill FJ, Eidenberger L, Karr TL, Grys TE, Steinkellner H, et al. Humanization and expression of IgG and IgM antibodies in plants as potential diagnostic reagents for Valley Fever. Front Plant Sci 2022;13. DOI: <u>10.3389/fpls.2022.925008</u>.
- [32] Segovia-de los Santos P, Quintero-Campos P, Morais S, Echaides C, Maquieira Á, Lassabe G, et al. Bispecific Single-Domain Antibodies as Highly Standardized Synthetic Calibrators for Immunodiagnosis. Anal Chem 2021;94:1342–9. DOI: <u>10.1021/acs.analchem.1c04603</u>.
- [33] Quintero-Campos P, Segovia-de los Santos P, Ibáñez-Echevarria E, Hernández-Fernández de Rojas D, Casino P, Lassabe G, et al. An ultra-sensitive homologous chemiluminescence immunoassay to tackle penicillin allergy. Analytica Chimica Acta 2022;1214:339940. DOI: <u>10.1016/j.aca.2022.339940</u>.
- [34] Doshi R, Chen BR, Vibat CRT, Huang N, Lee C-W, Chang G. In vitro nanobody discovery for integral membrane protein targets. DOI: <u>10.1038/srep06760</u>.
- [35] Muyldermans S. Applications of Nanobodies. Annu Rev Anim Biosci 2021;9:401–21. DOI: 10.1146/annurev-animal-021419-083831.
- [36] Gonzalez-Sapienza G, Rossotti MA, Tabares-da Rosa S. Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. Front Immunol 2017;8. DOI: <u>10.3389/fimmu.2017.00977</u>.
- [37] Deschacht N, De Groeve K, Vincke C, Raes G, De Baetselier P, Muyldermans S. A Novel Promiscuous Class of Camelid Single-Domain Antibody Contributes to the Antigen-Binding Repertoire. The Journal of Immunology 2010;184:5696–704. DOI: <u>10.4049/jimmunol.0903722</u>.
- [38] Mitchell LS, Colwell LJ. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data. Proteins 2018;86:697–706. DOI: <u>10.1002/prot.25497</u>.
- [39] Salvador J-P, Vilaplana L, Marco M-P. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. Anal Bioanal Chem 2019;411:1703–13. DOI: <u>10.1007/s00216-019-01633-4</u>
- [40] Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. Annu Rev Biochem 2013;82:775–97. DOI: <u>10.1146/annurev-biochem-063011-092449</u>.
- [41] Mitchell LS, Colwell LJ. Analysis of nanobody paratopes reveals greater diversity than classical antibodies. Protein Engineering, Design and Selection 2018;31:267–75. DOI: <u>10.1093/protein/gzy017</u>.
- [42] Asaadi Y, Jouneghani FF, Janani S, Rahbarizadeh F. A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments. Biomark Res 2021;9. DOI: <u>10.1186/s40364-021-00332-6</u>.
- [43] Liu H, May K. Disulfide bond structures of IgG molecules. mAbs 2012;4:17–23. DOI: <u>10.4161/mabs.4.1.18347</u>.
- [44] Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Nat Biotechnol 2004;22:1399–408. DOI: <u>10.1038/nbt1029</u>.
- [45] Manta B, Boyd D, Berkmen M. Disulfide Bond Formation in the Periplasm of Escherichia coli. EcoSal Plus 2019;8. DOI: <u>10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2018</u>.
- [46] Robinson PJ, Bulleid NJ. Mechanisms of Disulfide Bond Formation in Nascent Polypeptides Entering the Secretory Pathway. Cells 2020;9:1994. DOI: <u>10.3390/cells9091994</u>.

- [47] Bosnjak I, Bojovic V, Segvic-Bubic T, Bielen A. Occurrence of protein disulfide bonds in different domains of life: a comparison of proteins from the Protein Data Bank. Protein Engineering Design and Selection 2014;27:65–72. DOI: <u>10.1093/protein/gzt063</u>.
- [48] Nozach H, Fruchart-Gaillard C, Fenaille F, Beau F, Ramos OHP, Douzi B, et al. High throughput screening identifies disulfide isomerase DsbC as a very efficient partner for recombinant expression of small disulfide-rich proteins in E. coli. Microb Cell Fact 2013;12:37. DOI: <u>10.1186/1475-2859-12-37</u>.
- [49] Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M. SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. Microb Cell Fact 2012;11. DOI: <u>10.1186/1475-2859-11-56</u>.
- [50] Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. Front Bioeng Biotechnol 2021;9. DOI: <u>10.3389/fbioe.2021.796991</u>.
- [51] Brondyk WH. Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. Methods in Enzymology 2009:131–47. DOI: <u>10.1016/S0076-6879(09)63011-1</u>.
- [52] Kunert R, Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing. Appl Microbiol Biotechnol 2016;100:3451–61. DOI: <u>10.1007/s00253-016-7388-9</u>.
- [53] Rettenbacher LA, Arauzo-Aguilera K, Buscajoni L, Castillo-Corujo A, Ferrero-Bordera B, Kostopoulou A, et al. Microbial protein cell factories fight back? Trends in Biotechnology 2022;40:576–90. DOI: <u>10.1016/j.tibtech.2021.10.003</u>.
- [54] Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. Biotechnology Advances 2012;30:1158–70. DOI: <u>10.1016/j.biotechadv.2011.08.022</u>.
- [55] Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. Appl Microbiol Biotechnol 2004;65:363–72. DOI: <u>10.1007/s00253-004-1656-9</u>.
- [56] Jäger V, Büssow K, Schirrmann T. Transient Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells. Cell Engineering 2014:27–64. DOI: <u>10.1007/978-3-319-10320-4_2</u>.
- [57] Hunter M, Yuan P, Vavilala D, Fox M. Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. Current Protocols in Protein Science 2018;95:e77. DOI: <u>10.1002/cpps.77</u>.
- [58] Mariati, Ho SCL, Yap MGS, Yang Y. Evaluating post-transcriptional regulatory elements for enhancing transient gene expression levels in CHO K1 and HEK293 cells. Protein Expression and Purification 2010;69:9–15. DOI: <u>10.1016/j.pep.2009.08.010</u>.
- [59] Quilici LS, Silva-Pereira I, Andrade AC, Albuquerque FC, Brigido MM, Maranhão AQ. A minimal cytomegalovirus intron A variant can improve transgene expression in different mammalian cell lines. Biotechnol Lett 2012;35:21–7. DOI: <u>10.1007/s10529-012-1043-z</u>.
- [60] Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors. J Virol 1999;73:2886–92. DOI: <u>10.1128/JVI.73.4.2886-2892.1999</u>.
- [61] Zanta-Boussif MA, Charrier S, Brice-Ouzet A, Martin S, Opolon P, Thrasher AJ, et al. Validation of a mutated PRE sequence allowing high and sustained transgene expression while abrogating WHV-X protein synthesis: application to the gene therapy of WAS. Gene Ther 2009;16:605–19. DOI: 10.1038/gt.2009.3.
- [62] Wang L, Wang Z, Zhang F, Zhu R, Bi J, Wu J, et al. Enhancing Transgene Expression from Recombinant AAV8 Vectors in Different Tissues Using Woodchuck Hepatitis Virus Post-Transcriptional Regulatory Element. Int J Med Sci 2016;13:286–91. DOI: <u>10.7150/ijms.14152</u>.
- [63] Nicholson AL, Pasquinelli AE. Tales of Detailed Poly(A) Tails. Trends in Cell Biology 2019;29:191–200. DOI: <u>10.1016/j.tcb.2018.11.002</u>.

- [64] Liu J, Lu X, Zhang S, Yuan L, Sun Y. Molecular Insights into mRNA Polyadenylation and Deadenylation. IJMS 2022;23:10985. DOI: <u>10.3390/ijms231910985</u>.
- [65] QIAGEN [Internet]. QIAprep Miniprep Handbook [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>QIAprep Miniprep Handbook - QIAGEN</u>.
- [66] QIAGEN [Internet]. QIAGEN Purification Technologies [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>QIAGEN Purification Technologies</u>.
- [67] NEB [Internet]. Protocol for Dephosphorylation of 5'-ends of DNA using rSAP (M0371) [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: Protocol for Dephosphorylation of 5'-ends of DNA using rSAP (M0371) | NEB.
- [68] Expasy [Internet]. ProtParam [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: Expasy ProtParam tool.
- [69] von Köckritz-Blickwede M, Chow OA, Nizet V. Fetal calf serum contains heat-stable nucleases that degrade neutrophil extracellular traps. Blood 2009;114:5245–6. DOI: <u>10.1182/blood-2009-08-240713</u>.
- [70] Hahn J, Wickham SFJ, Shih WM, Perrault SD. Addressing the Instability of DNA Nanostructures in Tissue Culture. ACS Nano 2014;8:8765–75. DOI: <u>10.1021/nn503513p</u>.
- [71] Harvard University [Internet]. Novagen pET System Manual 11th Edition [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: pET 11 (12_5) MZ.indd (harvard.edu).
- [72] Addgene [Internet]. Vector Database pcDNA 3.1(+) [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: Addgene: Vector Database - pcDNA3.1(+).
- [73] BioSpace [Internet]. HEK 293 Cells: Background, Advantages, and Applications [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>HEK 293 Cells: Background, Advantages, and Applications</u> (biospace.com).
- [74] SnapGene [Internet]. pUC57 Sequence and Map [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: pUC57 Sequence and Map (snapgene.com).
- [75] Uniprot [Internet]. GFP Green Fluorescent Protein Aequorea victoria (Water jellyfish) [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>GFP Green fluorescent protein Aequorea victoria (Water jellyfish) | UniProtKB | UniProt</u>.
- [76] IBA Lifesciences [Internet]. Strep-tag® leading affinity tag in recombinant protein production [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>Strep-tag® - leading affinity tag in recombinant</u> protein production (iba-lifesciences.com).
- [77] Sharafeldin M, Davis JJ. Characterising the biosensing interface. Analytica Chimica Acta 2022;1216:339759. DOI: <u>10.1016/j.aca.2022.339759</u>.
- [78] Deng L, Kitova EN, Klassen JS. Dissociation Kinetics of the Streptavidin–Biotin Interaction Measured Using Direct Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis. J Am Soc Mass Spectrom 2012;24:49–56. DOI: <u>10.1007/s13361-012-0533-5</u>.
- [79] Thermo Scientific [Internet]. NHS and Sulfo-NHS Thermo Fisher Scientific [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>MAN0011309 NHS SulfoNHS UG.pdf (thermofisher.com)</u>.
- [80] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, et al. Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. Science 2003;300:1394–9. DOI: <u>10.1126/science.1085952</u>.
- [81] Cubuk J, Alston JJ, Incicco JJ, Singh S, Stuchell-Brereton MD, Ward MD, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. Nat Commun 2021;12. DOI: <u>10.1038/s41467-021-21953-3</u>.

- [82] Yu F, Le MQ, Inoue S, Thai HTC, Hasebe F, del Carmen Parquet M, et al. Evaluation of Inapparent Nosocomial Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by Use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clin Vaccine Immunol 2005;12:848–54. DOI: <u>10.1128/CDLI.12.7.848-854.2005</u>.
- [83] McBride R, van Zyl M, Fielding B. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. Viruses 2014;6:2991–3018. DOI: <u>10.3390/v6082991</u>.
- [84] Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. DOI: <u>10.1002/jgm.187</u>.
- [85] Zhang Y, Wang Y, Li Y. Major cause of antibody artifact bands on non-reducing SDS-PAGE and methods for minimizing artifacts. Protein Expression and Purification 2019;164:105459. DOI: <u>10.1016/j.pep.2019.105459</u>.
- [86] Expasy [Internet]. GlycanMass [último acceso: 14/05/2023]. Disponible en: <u>GlycanMass</u> (expasy.org).
- [87] Kiyoshi M, Tsumoto K, Ishii-Watabe A, Caaveiro JMM. Glycosylation of IgG-Fc: a molecular perspective. International Immunology 2017;29:311–7. DOI: <u>10.1093/intimm/dxx038</u>.
- [88] Ó'Fágáin C, Cummins PM, O'Connor BF. Gel-Filtration Chromatography. Methods in Molecular Biology 2016:15–25. DOI: <u>10.1007/978-1-4939-6412-3_2</u>.
- [89] Pírez M, Gonzalez-Sapienza G, Sienra D, Ferrari G, Last M, Last JA, et al. Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: Simple and affordable methods may be the answer. Journal of Environmental Management 2013;114:63–71. DOI: <u>10.1016/j.jenvman.2012.10.052</u>.
- [90] Farrance I, Frenkel R. Uncertainty of Measurement: A Review of the Rules for Calculating Uncertainty Components through Functional Relationships. Clin Biochem Rev. 2012 May;33(2):49-75. PMID: <u>22896744</u>.
- [91] Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions [última actualización: 20/03/2023]. Disponible en: <u>SARS-CoV-2 Variant Classifications</u> and <u>Definitions (cdc.gov)</u>.

8. Anexo: parámetros generales de los

calibradores Nb-Fc

Parámetros estimados a partir de ProtParam [67].

8.1. Calibrador H8-Fc

Secuencia aminoacídica:

METDTLLLWVLLLWVPGATGD | AAQAAMAQVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SSYAMGWFRQVPGKEREFVAVVTGSDYTTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKFE DTAVYYCVADPGDSYYYTRPTEYNYWGQGTQVTVSSKGQAGQLEEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDDDDKHHHHHHGGGGGSAWSHP QFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEKASGG

- Péptido señal IgK Leader (secreción extracelular, es clivado y no forma parte del producto final)
- Nanobody H8
- Región Fc de IgG1 humana
- Sitio de corte para enteroquinasa
- HisTag
- Twin-Strep-Tag

Peso molecular*	Punto isoeléctrico*	Coef. de absortividad molar**
91.57 kDa	6.78	151469 M ⁻¹ cm ⁻¹

*En base a secuencia aminoacídica, excluye glicosilaciones.

**Asumiendo que la región Fc y los nanobodies presentan enlaces disulfuro típicos.

8.2. Calibrador H4-Fc

Secuencia aminoacídica:

METDTLLLWVLLLWVPGATGD | AAQAAMAEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFPF RFNAMAWFRQAPGNQRELVAGIFTTYATNYAESVKGRFTISRDNDKNTVYLQMNSLKPED TGVYYCNAAYVSTSIWRPLYDDWGQGTQVTVSSKGQAGQLEEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDDDDKHHHHHHGGGGGSAWSHPQFE KGGGSGGGSGGSAWSHPQFEKASGG

- Péptido señal IgK Leader (secreción extracelular)
- Nanobody H4
- Región Fc de IgG1 humana
- Sitio de corte para enteroquinasa
- HisTag
- Twin-Strep-Tag

Peso molecular*	Punto isoeléctrico*	Coef. de absortividad molar**
91.73 kDa	6.60	147569 M ⁻¹ cm ⁻¹

*En base a la secuencia aminoacídica, excluye glicosilaciones.

**Asumiendo que la región Fc y los nanobodies presentan enlaces disulfuro típicos.